



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**OBTENCIÓN DE PARÁMETROS DE COMPOSICIÓN PARA UTILIZARSE DENTRO DE UN
MÉTODO DE CONTROL DE CALIDAD DE *Verbena carolina* COMO PLANTA MEDICINAL**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. GONZALO RODOLFO LARA ISSASI



TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario	Dra. Martha Patricia García Camacho

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS

Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

- La Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.
- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios (271106).
- A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por su invaluable apoyo profesional, su compromiso y dedicación a mí y a todos sus alumnos así como su indudable calidad académica y moral.
- A los miembros del jurado de examen de grado, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez y la Dra. Martha Patricia García Camacho por sus valiosas aportaciones para la corrección del trabajo de tesis.
- Al M. en C. Alberto Cedillo Cruz por su constante apoyo durante el desarrollo de la tesis y su valiosa asesoría académica.
- Al M. en C. Gerardo David Anaya Eugenio, por la valiosa orientación durante el desarrollo de las pruebas de toxicidad.
- A los profesores participantes en el programa de posgrado, por los conocimientos adquiridos en sus excelentes cátedras.
- La DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM), Proyecto IN223411.
- Al PAIP (Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado) por el proyecto 4390-01.
- Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros IR y RMN, Q. Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta y M. en C. Rosa Isela del Villar.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a todas las personas importantes en mi vida, familia y amigos ya que el éxito que alcanza una persona ya sea profesional o personal, depende en gran medida del ambiente donde se desarrolla, cada persona aporta en pequeña o gran medida los ingredientes necesarios para alcanzar las metas propuestas.

A mi padre, Gonzalo Lara Álvarez, mi madre, Patricia Issasi Castañeda, mi hermana, Jacqueline Lara Issasi, a mis sobrinos André y Giselle, a mi abuela, Áurea Gabriela Castañeda Gómez, a mi abuelo, Rodolfo Issasi Díaz un gran hombre que hace poco más de un año nos dejó para seguir otro camino, recuerdo con cariño sus consejos. A mi primo Rodolfo Hazaad Flores Issasi y a mi amigo Samuel Alfonso Arriaga García, mis dos hermanos de toda la vida.

A mis amigos de la licenciatura, David, Fidel Ángel, Edgar Fidel, Denhí, Iván y José Manuel, de la maestría, Nancy, Wendy, Hugo, Alberto, Elba, Cristian, Paulino, Alejandro y Simone. Tengo la fortuna de conocer a muchas personas con quienes he compartido momentos importantes que harían esta lista interminable, a todos ellos les dedico este trabajo.

A fructibus cognoscitur arbor

Frase latina

CONGRESOS

- El presente trabajo se presentó en el evento QUIMIUNAM 2013, en la modalidad cartel con el título “Chemical isolation and quantitative determination of major constituents in the aerial parts of *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) by HPLC” en el mes de noviembre de 2013.



ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	X
ÍNDICE DE ESPECTROS	XI
1. ABSTRACT	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Familia Verbenaceae	6
4.2. Género Verbena.	6
4.2.1 Distribución y hábitat	7
4.2.2 Composición química	7
4.3. <i>Verbena carolina</i> L.	13
4.3.1. Nombres comunes	13
4.3.2. Clasificación taxonómica	13
4.3.3 Sinonimia	13
4.3.4 Usos	13
4.3.5 Descripción	14
4.3.6 Distribución geográfica	14
4.4 Compuestos marcadores de plantas medicinales.	16
4.4.1 Compuestos marcadores de <i>Verbena carolina</i> L.	16
4.5 Biogénesis de compuestos marcadores	18
4.5.1 Iridoides	18
4.5.2 Fenilpropanoides (Compuestos C6-C3 y C6-C2)	20
4.5.3 Flavonoides	22
4.6 Cromatografía	25
4.6.1 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)	26
4.7. Validación de métodos analíticos	27
5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo General	28
5.2 Objetivos particulares	28



6. PARTE EXPERIMENTAL	30
6.1 Material y equipo	30
6.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)	30
6.1.2 Cromatografía en columna abierta (CCA)	30
6.1.3 Rotaevaporador	30
6.1.4 Espectroscopía de infrarrojo (IR)	30
6.1.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	30
6.1.6 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)	30
6.1.7 Prueba de toxicidad aguda, modelo de Lorke	31
6.2 Reactivos y disolventes	31
6.3 Material vegetal	32
6.4 Extracción	32
6.5 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico	34
6.5.1 Aislamiento del hastatósido	36
6.5.2 Aislamiento de la verbenalina	36
6.5.3 Aislamiento del verbascósido	37
6.5.4 Aislamiento y elucidación estructural por métodos espectroscópicos del 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina (7OGH) por RMN.	38
6.6 Validación del método analítico	40
6.6.1 Pruebas preliminares para la validación del método por CLAE.	40
6.6.1.1 Método de extracción para la cuantificación por CLAE	43
6.6.1.2 Determinación de los rangos para cada compuesto marcador.	43
6.6.1.3 Preparación de las soluciones “stock”	43
6.6.2 Validación del sistema por CLAE	46
6.6.2.1 Adecuabilidad del sistema	46
6.6.2.2 Precisión del sistema	46
6.6.2.3 Linealidad del sistema	46
6.6.2.4 Sensibilidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)	47
6.6.3 Validación del método analítico por CLAE	47
6.6.3.1 Linealidad y exactitud del método	47
6.6.3.2 Precisión del método	48
6.6.3.2.1 Repetibilidad	48
6.6.3.2.2 Precisión intermedia o tolerancia interdía / analista.	48
6.6.4 Estabilidad analítica de la muestra.	48
6.6.5 Cuantificación de metabolitos secundarios en <i>V. carolina</i> L.	49
6.7 Pruebas de toxicidad aguda por el método de Lorke	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
7.1 Aislamiento y confirmación estructural de los compuestos marcadores	50
7.1.1 Aislamiento del hastatósido (I)	50
7.1.2 Aislamiento de la verbenalina (II).	51
7.1.3 Aislamiento del verbascósido (III).	52
7.1.4 Aislamiento y elucidación espectroscópica del 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina por RMN.	53
7.2 Validación de método analítico de cuantificación por CLAE	54
7.2.1 Validación del sistema	54
7.2.1.1 Adecuabilidad del sistema	54



7.2.1.2	Precisión del sistema	55
7.2.1.3	Linealidad del sistema	55
7.2.1.3.1	Linealidad del sistema para el hastatósido	56
7.2.1.3.2	Linealidad del sistema para verbenalina	58
7.2.1.3.3	Linealidad del sistema para verbascósido	60
7.2.1.3.4	Linealidad del sistema para 7-O-β-D-glucurónido de la Hispidulina	62
7.2.1.4	Sensibilidad (LOD y LOC)	64
7.2.2	Validación del método	66
7.2.2.1	Linealidad y exactitud del método	66
7.2.1.2	Repetibilidad	73
7.2.2.3	Precisión del método (precisión intermedia).	75
7.2.3	Estabilidad analítica de la muestra	76
7.2.4	Cuantificación de compuestos marcadores en distintas colectas.	82
7.3	Evaluación toxicidad aguda y determinación de DL ₅₀	86
8.	CONCLUSIONES	87
9.	PERSPECTIVAS	88
10.	BIBLIOGRAFÍA	89
11.	ANEXOS	92



LISTA DE ABREVIATURAS

$ d_i $	Diferencia absoluta de medias
\bar{y}_0	Media aritmética del análisis inicial
\bar{y}	Media aritmética
$^1\text{H RMN}$	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
$^1\text{H COSY}$	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear de hidrógeno
$^{13}\text{C RMN}$	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
\leq	Menor o igual a
\geq	Mayor o igual a
%	Por ciento
7OGH	7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
Å	Angstrom
AcOEt	Acetato de etilo
<i>ad libitum</i>	A voluntad
b_0	Ordenada al origen
b_1	Pendiente
C18	Octadecilsilano
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CD_3OD	Metanol deuteriado
CDCl_3	Cloroformo deuteriado
CL	Cromatógrafo de líquidos
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de variación
$\text{CV}_{x/y}$	Coefficiente de variación de la regresión lineal
d	Doblete
dd	Doble de dobletes
D.F.	Distrito Federal
DL_{50}	Dosis letal 50
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuteriado
E.U.A.	Estados Unidos de América
<i>et al</i>	Y otros
Etc	Etcétera
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
G	Gramo
H	Hora
HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples ligaduras
HSQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a una ligadura
I	Hastatósido



IC β_0	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC β_1	Intervalo de confianza para la pendiente
IC μ	Intervalo de confianza para la media poblacional
ICR	Institute for Cancer Research
II	Verbenalina
III	Verbascósido
INAHM	Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos
IR	Infrarrojo
IV	7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina
Kg	Kilogramo
L.	Lineo
LD	Límite de detección
LD	Límite de cuantificación
M	Multiplete
m.s.m.	Metros sobre el nivel del mar
m/v	Relación masa – volumen
MHz	Megahertz
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mV	Milivoltios
N	Normalidad
Nm	Nanómetro
NOESY	Espectroscopía bidimensional homonuclear de interacciones incrementadas por efecto nuclear Overhauser
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organización mundial de la salud
p.f.	Punto de fusión
QP	Químicamente puro
R	Coefficiente de correlación lineal
r^2	Coefficiente de determinación
Rf	Factor de retención
S	Desviación estándar
$S_{y/x}$	Desviación estándar debida a la regresión lineal
T	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USAI	Unidad de servicios de apoyo a la investigación
UV	Ultravioleta
<i>V. carolina</i>	<i>Verbena carolina</i>
Δ	Desplazamiento químico
λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorción
Mm	Micrómetro
μ V	Microvoltios
μ V/s	Microvoltios por segundo
v_{max}	Frecuencia de máxima absorción



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución geográfica Familia Verbenaceae	6
Figura 2	Distribución geográfica <i>V. carolina</i> L. Región del Bajío	15
Figura 3	Imagen de <i>Verbena carolina</i> L. (Verbenaceae)	15
Figura 4	Numeración del esqueleto iridoide y sus sustituyentes más comunes	18
Figura 5	Ruta biosintética iridodial – ácido desoxilogánico	19
Figura 6	Ruta biosintética 8-epiiridodial – ácido 8-epidesoxilogánico	20
Figura 7	Esqueletos de compuestos C ₆ -C ₁ , C ₆ -C ₂ y C ₆ -C ₃	21
Figura 8	Esquema general de biogénesis de compuestos C ₆ -C ₃	21
Figura 9	Estructura base del esqueleto flavonoide	22
Figura 10	Estructuras de diversos grupos de flavonoides	23
Figura 11	Ruta biosintética de flavonoides	24
Figura 12	Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia	31
Figura 13	Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos marcadores	41
Figura 14	Cromatograma del extracto metanólico	41
Figura 15	Cromatogramas del extracto metanólico enriquecido con hastatósido, verbenalina, verbascósido y 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina.	42
Figura 16	Comparativo matriz de trabajo y placebo analítico	66
Figura 17	Cromatogramas comparativos de las seis colectas	84



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Metabolitos secundarios mayoritarios del género <i>Verbena</i>	8
Tabla 2	Compuestos marcadores de <i>V. carolina</i> L. (Verbenaceae)	17
Tabla 3	Tipos de cromatografía	25
Tabla 4	Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico	34
Tabla 5	Purificación del hastatósido por CCA	36
Tabla 6	Purificación de la verbenalina por CCA	37
Tabla 7	Purificación del verbascósido por CCA	37
Tabla 8	Condiciones de gradiente de elución	40
Tabla 9	Determinación de las concentraciones de trabajo para cada metabolito	43
Tabla 10	Preparación de las soluciones stock A	44
Tabla 11	Parámetros de desempeño para adecuabilidad del sistema.	46
Tabla 12	Concentraciones de cada metabolito con respecto a las estimadas en el extracto	47
Tabla 13	Concentraciones empleadas para calcular LD y LC	47
Tabla 14	Datos espectroscópicos del hastatósido	50
Tabla 15	Datos espectroscópicos de la verbenalina	51
Tabla 16	Datos espectroscópicos del verbascósido	52
Tabla 17	Datos espectroscópicos de 7OGH	53
Tabla 18	Valores obtenidos para adecuabilidad del sistema	54
Tabla 19	Parámetros de desempeño para adecuabilidad del sistema	54
Tabla 20	Valores obtenidos para precisión del sistema	55
Tabla 21	Valores obtenidos para linealidad del sistema del hastatósido	56
Tabla 22	Parámetros de desempeño para linealidad del sistema del hastatósido	56
Tabla 23	Valores obtenidos para linealidad del sistema de la verbenalina	58
Tabla 24	Parámetros de desempeño para linealidad del sistema de la verbenalina	59
Tabla 25	Valores obtenidos para linealidad del sistema del verbascósido	60
Tabla 26	Parámetros de desempeño para linealidad del sistema del verbascósido	61
Tabla 27	Valores obtenidos para linealidad del sistema de 7OGH	62
Tabla 28	Parámetros de desempeño para linealidad del sistema de 7OGH	63
Tabla 29	Respuestas analíticas para curva de calibración lineal sensibilidad	64
Tabla 30	Valores de LD y LC para los compuestos marcadores de <i>V. carolina</i>	65
Tabla 31	Linealidad del método	67
Tabla 32	Parámetros de desempeño, linealidad del método, hastatósido	68
Tabla 33	Parámetros de desempeño, linealidad del método de verbenalina	69
Tabla 34	Parámetros de desempeño, linealidad del método del verbascósido	70
Tabla 35	Parámetros de desempeño, linealidad del método de 7OGH	71
Tabla 36	Resultados para exactitud del método	72
Tabla 37	Parámetros de desempeño para exactitud del método	73
Tabla 38	Resultados obtenidos para la evaluación de repetibilidad	74



Tabla 39	Parámetros de desempeño para repetibilidad	74
Tabla 40	Datos obtenidos para precisión intermedia	75
Tabla 41	Parámetros de desempeño para precisión intermedia	75
Tabla 42	Mediciones de estabilidad analítica de la muestra: 4°C en ausencia de luz	77
Tabla 43	Mediciones de estabilidad analítica de la muestra: 4°C en presencia de luz	78
Tabla 44	Mediciones de estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en ausencia de luz	79
Tabla 45	Mediciones de estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en presencia de luz	80
Tabla 46	Mediciones de estabilidad analítica de la muestra a 37°C en ausencia de luz	81
Tabla 47	Resultados finales de las pruebas de estabilidad analítica	82
Tabla 48	Cuantificación de compuestos marcadores en <i>V. carolina</i>	83



ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Procedimiento de extracción de partes aéreas de <i>V. carolina</i> L.	33
Esquema 2	Obtención del 7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina por precipitación	38
Esquema 3	Plan de trabajo para la validación del método analítico por CLAE para la cuantificación de los compuestos marcadores de <i>V. carolina</i> L.	45



ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Gradiente de elución	40
Gráfico 2	Linealidad del sistema para el hastatósido	57
Gráfico 3	Linealidad del sistema para la verbenalina	59
Gráfico 4	Linealidad del sistema para el verbascósido	61
Gráfico 5	Linealidad del sistema para el 7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina	63
Gráfico 6	Linealidad del método para el hastatósido	68
Gráfico 7	Linealidad del método para la verbenalina	69
Gráfico 8	Linealidad del método para el verbascósido	70
Gráfico 9	Linealidad del método para el 7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina	71
Gráfico 10	Comparativo del contenido metabólico de las seis colectas cuantificadas	85



ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro ^1H RMN 400 MHz del hastatósido	92
Espectro 2	Espectro ^1H RMN 300 MHz del hastatósido (ampliación 1)	93
Espectro 3	Espectro ^1H RMN 300 MHz del hastatósido (ampliación 2)	94
Espectro 4	Espectro ^{13}C RMN 100 MHz del hastatósido	95
Espectro 5	Espectro ^{13}C RMN 100 MHz del hastatósido (ampliación)	96
Espectro 6	Espectro ^1H COSY del hastatósido	97
Espectro 7	Espectro HSQC del hastatósido	98
Espectro 8	Espectro HSQC del hastatósido (ampliación)	99
Espectro 9	Espectro HMBC del hastatósido	100
Espectro 10	Espectro HMBC del hastatósido (ampliación)	101
Espectro 11	Espectro NOESY del hastatósido	102
Espectro 12	Espectro ^1H 400 MHz de la verbenalina	103
Espectro 13	Espectro ^1H 400 MHz de la verbenalina (ampliación 1)	104
Espectro 14	Espectro ^1H 400 MHz de la verbenalina (ampliación 2)	105
Espectro 15	Espectro ^{13}C 100 MHz de la verbenalina	106
Espectro 16	Espectro ^{13}C 100 MHz de la verbenalina (ampliación)	107
Espectro 17	Espectro ^1H COSY 400 MHz de la verbenalina	108
Espectro 18	Espectro ^1H COSY 400 MHz de la verbenalina (ampliación)	109
Espectro 19	Espectro HSQC de la verbenalina	110
Espectro 20	Espectro HSQC de la verbenalina (ampliación)	111
Espectro 21	Espectro HMBC de la verbenalina	112
Espectro 22	Espectro HMBC de la verbenalina (ampliación)	113
Espectro 23	Espectro NOESY de la verbenalina	114
Espectro 24	Espectro ^1H 400 MHz del verbascósido	115
Espectro 25	Espectro ^1H 400 MHz del verbascósido (ampliación 1)	116
Espectro 26	Espectro ^1H 400 MHz del verbascósido (ampliación 2)	117
Espectro 27	Espectro ^{13}C 100 MHz del verbascósido	118
Espectro 28	Espectro ^{13}C 100 MHz del verbascósido (ampliación 1)	119
Espectro 29	Espectro ^{13}C 100 MHz del verbascósido (ampliación 2)	120
Espectro 30	Espectro ^1H COSY del verbascósido	121
Espectro 31	Espectro ^1H COSY del verbascósido (ampliación 1)	122
Espectro 32	Espectro ^1H COSY del verbascósido (ampliación 2)	123
Espectro 33	Espectro HSQC del verbascósido	124
Espectro 34	Espectro HSQC del verbascósido (ampliación 1)	125
Espectro 35	Espectro HSQC del verbascósido (ampliación 2)	126
Espectro 36	Espectro HMBC del verbascósido	127
Espectro 37	Espectro HMBC del verbascósido (ampliación)	128
Espectro 38	Espectro NOESY del verbascósido	129
Espectro 39	Espectro ^1H 400 MHz del 7OGH	130
Espectro 40	Espectro ^1H 300 MHz del 7OGH (ampliación 1)	131
Espectro 41	Espectro ^1H 300 MHz del 7OGH (ampliación 2)	132
Espectro 42	Espectro ^{13}C 100 MHz del 7OGH	133
Espectro 43	Espectro ^1H COSY del 7OGH	134
Espectro 44	Espectro HSQC del 7OGH	135
Espectro 45	Espectro HSQC del 7OGH (ampliación)	136
Espectro 46	Espectro HMBC del 7OGH	137
Espectro 47	Espectro NOESY del 7OGH	138



1. ABSTRACT

Two iridoid glucosides, hastatoside (**I**) and verbenalin (**II**), a phenylpropanoid, verbascoside (**III**) and a flavonoid glucuronide that has not been previously described in the species, hispidulin-7-O- β -D-glucuronide (**IV**) were isolated from the aerial parts of *Verbena carolina* L. (Verbenaceae). Verbain, is a widely used plant in the Mexican traditional medicine and listed in the Mexican herbal pharmacopeia.

The chemical identities of the four compounds were confirmed by spectroscopic techniques. A procedure for the extraction of these constituents was developed. A reversed-phase HPLC system with dual λ UV detector was used to resolve the four compounds in the methanol extracts of the aerial parts of the plant.

A quantification method was validated according to the Analytical Methods Validation Guideline and the Mexican Pharmacopeia acceptance criteria.

Six different samples of verbain were collected, dried, grounded and submitted to the extraction process; their concentrations were determined through the quantification method, and resulted rich in all these constituents (0.17-3.37% w/w).

The assay methods described are simple, accurate and easily applicable for the quantification of the chemical constituents of verbain in mostly scientific instrumental laboratories, and could form part of future medicinal plant authentication protocols, such as monographs.



2. RESUMEN

Dos glucósidos iridoides, hastatósido (I) y verbenalina (II), un fenilpropanoide, verbascósido (III) y un glucurónido flavonoide que no había sido descrito previamente en la especie, 7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina (IV) fueron aislados de las partes aéreas de *Verbena carolina* L. (Verbenaceae). La verbena es una planta extensamente utilizada en la medicina tradicional Mexicana y está listada en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

Se desarrolló un método para la extracción de los cuatro compuestos (I, II, III y IV) cuya identidad se confirmó empleando técnicas espectroscópicas. Asimismo se empleó un sistema de cromatografía en fase reversa (CLAE) con un detector para doble λ UV para resolver los cuatro compuestos contenidos en los extractos metanólicos de las partes aéreas de la planta.

El método de cuantificación fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en la Guía para la Validación de Métodos Analíticos del Colegio Mexicano de Químicos Farmacéuticos Biólogos y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Se determinó la concentración de los cuatro compuestos contenidos en muestras provenientes de seis colectas diferentes, las cuales fueron secadas, fragmentadas y evaluadas mediante el método de cuantificación.

El método desarrollado demostró ser simple, exacto y fácilmente aplicable para la cuantificación de los constituyentes químicos de Verbena en la mayoría de los laboratorios científicos instrumentales y podría ser empleado como parte de futuros protocolos para la identificación de la planta medicinal, tales como monografías.



3. INTRODUCCIÓN

Importancia del estudio de las plantas medicinales

OMS

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina “alternativa”.

La medicina tradicional se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad.

La medicina tradicional ha mantenido su popularidad en todo el mundo. A partir del decenio de 1990 se ha constatado un resurgimiento de su utilización en muchos países desarrollados y en desarrollo¹.

La OMS reconoció desde el año 2000 la importancia y alcance de la medicina tradicional y alternativa para la población mundial, así como la situación actual y problemática inherente a la naturaleza de su práctica².

Problemas

Diversidad internacional. Las prácticas propias de la medicina tradicional han sido traspuestas a distintas culturas y regiones sin que al mismo tiempo se elaboraran normas y métodos internacionales para evaluarlas.

Seguridad, eficacia y calidad. Son escasos los datos resultantes de ensayos científicos destinados a evaluar la seguridad y eficacia de muchos de los productos y las prácticas de la medicina tradicional. Aunque hay datos demostrativos de que la acupuntura, algunos medicamentos herbarios y ciertas terapias manuales (por ejemplo, el masaje) son eficaces para tratar determinadas enfermedades, se precisan más estudios de productos y prácticas³².

Los requisitos y métodos para esas investigaciones y evaluaciones son complejos. Por ejemplo, puede resultar difícil evaluar la calidad de productos herbarios acabados. Su seguridad, eficacia y calidad depende de la calidad de las materias de origen (que pueden ser centenares) y del modo en que esos elementos son manipulados en los procesos de producción².

¹ World Health Organization. (2013) “Medicina tradicional”. World Health Organization, Geneva, Swiss

² World Health Organization. (2000) “Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial”. World Health Organization, Geneva, Swiss



Situación en México

La diversidad biológica y cultural de América fueron elementos que admiraron los europeos desde su llegada al continente, ya que constituyeron una verdadera explosión de nuevas posibilidades económicas y terapéuticas. La riqueza de recursos vegetales medicinales, así como el conocimiento que tenían sobre ellos las personas nativas, fue algo que causó un enorme interés, por lo que los países europeos adquirieron muchas de las plantas medicinales usadas por la población y se las llevaron a su continente con la intención de estudiarlas y poderlas emplear, este hecho marcó el desarrollo de la fitoterapia en el siglo XVI³.

La medicina tradicional Mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país, sus prácticas y recursos se encuentran profundamente arraigados en la sociedad. Las culturas indígenas de México herederas de una larga tradición prehispánica, han preservado formas y procedimientos eficaces para resolver problemas de salud de la población.

El libro más importante sobre la medicina de épocas prehispánicas es el escrito en idioma latín llamado “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*” (Libreto de hierbas medicinales de las Indias), cuya importancia no sólo radica en el vasto contenido herbolario, sino en su carácter artístico al estar ilustrado con dibujos de plantas medicinales a color, sus nombres en náhuatl, la descripción de sus efectos y su aplicación. La versión en latín fue hecha por el traductor Xochimilca Juan Badiano, sobre la información proporcionada por el médico Tlatelolca Martín de la Cruz, sobre el uso medicinal de una gran cantidad de especies vegetales. En la actualidad se le conoce a dicho documento como el Códice De la Cruz-Badiano⁴.

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana, su uso tan extendido en diferentes grupos étnicos del país representa la única fuente de información con la que se cuenta para conocer la manera en la que estos pobladores solucionan sus problemas de salud, sobre todo en aquellas zonas donde el acceso a la medicina alopática es difícil. Sin embargo, a pesar de la tradición tan arraigada y la vasta utilización que el pueblo mexicano hace de las plantas medicinales, la información científica al respecto no está disponible, ya que en la mayoría de los casos el conocimiento se transmite verbalmente de una generación a otra, por otra parte el mayor cúmulo de conocimiento ha quedado en manos de curanderos.

Actualmente en México, las especies vegetales se expenden bajo la forma de drogas crudas o como preparados procesados industrialmente o de manera casera, en ambos casos con los más diversos niveles de calidad y no se encuentran registrados como medicamentos o como remedios herbolarios, por tal motivo y con las recomendaciones

³ Ríos, L. G. (2000). “Control de calidad de una droga de origen vegetal: *lostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl”. Tesis de maestría (Maestría en Ciencias Químicas), Facultad de Química, UNAM. México, DF.

⁴ De la Cruz, M. (1991) “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*”. Manuscrito azteca de 1552. Traducción latina de Juan Badiano. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores. México: Editorial fondo de cultura económica, Instituto mexicano del seguro social.



hechas por la OMS, la Secretaría de Salud promovió la creación de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) cuya primera edición fue en 2001⁵.

La creación de la FHEUM evidenció que no se contaba con la información necesaria para incluir las monografías de especies nativas o esta era limitada en cantidad y calidad. Por lo tanto fue necesario iniciar un proceso de integración de monografías tipo OMS, emanadas de un proceso sistemático de investigación, de aquellas especies de mayor uso en la medicina tradicional de nuestro país.

Una de las dos partes de las que consta una monografía se refiere a la identificación y control de calidad (aspectos botánicos, pruebas de identificación, pureza, análisis químico, principales constituyentes).

La importancia de realizar diversas pruebas para el control de calidad en especies vegetales medicinales radica en que tradicionalmente la evaluación de la calidad de éstas se basa simplemente en la inspección visual. Dicha inspección puede resultar insuficiente si a simple vista no se diferencian claramente las especies del mismo género o incluso diferentes partes de las plantas pueden tener un valor medicinal diferente⁶.

⁵ México. (2001). Secretaría de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

⁶ Wills, R., Bone, K. y Morgan, M. (2000). "Herbal products: active constituents, mode of action and quality control". Nutrition Research Reviews. 13:47-77.



4. ANTECEDENTES

4.1. Familia Verbenaceae

Rzedowski y Rzedowski ⁷ en sus trabajos con la flora mexicana, describen a la familia Verbenaceae como un grupo de taxonomía sumamente complicada, en donde la circunscripción, tanto en la propia familia, como de muchos de sus géneros y especies es incierta. Siguiendo el criterio moderno, aceptado en el trabajo de Thorne⁸, la familia queda ajustada a unos 35 géneros y poco más de 1000 especies. Familia casi completamente tropical y subtropical con pocas especies de regiones templadas⁹ en la Figura 1 se muestran en rojo las zonas de distribución geográfica de la familia Verbenaceae..

Entre los géneros más representativos de la familia se encuentran *Aloysia spp*, *Glandularia spp*, *Lippia spp*, *Lantana spp*, *Stachytarpheta spp*, *Verbena spp* y *Vitex spp* ¹⁰.



Figura 1. Distribución geográfica Familia Verbenaceae⁹

4.2. Género Verbena.

El género *Verbena* L. se ha dividido tradicionalmente en secciones, series o en grupos informales principalmente sobre la base de caracteres morfológicos, de caracteres anatómicos y de distribución geográfica. O'Leary y colaboradores reconocen para el género *Verbena*. 44 especies y 10 variedades, agrupadas en 2 series: *Verbena* y *Pachystachyae*, la primera integrada por tres grupos informales: *Verbena*, *Hastae* y *Bracteosae*; la segunda

⁷ Rzedowski, J., et al. (2002). "Flora del Bajío y de regiones adyacentes". Fasc. 100. Instituto de Ecología. Centro regional del Bajío, México. pp. 118-139.

⁸ Thorne, R. F. (2000) The classification and geography of the flowering plants. Dicotyledons of the class Angiospermae (subclasses Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Asteridae and Lamidae). Bot. Rev. 66: 525. 2000.

⁹ Heywood, V. H. (1985). Las plantas con flores. Ed. Reverté. España. p 329.

¹⁰ Stevens, P.F. (2008). Angiosperm Phylogeny (documento en línea). Version 9, junio de 2008 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Citado septiembre de 2013.



por dos subseries: Pachystachyae y Pseudoracemosae. Estudios filogenéticos previos indican que Verbena es monofilética y su grupo hermano es Glandularia¹¹.

Sus características botánicas son las siguientes: plantas herbáceas o a veces subarborescentes; tallos más o menos manifiestamente tetraédricos; hojas por lo general opuestas, a veces verticiladas o las superiores alternas; flores agrupadas en espigas (o con frecuencia más bien racimos espiciformes) bracteadas, por lo general estrechas y alargadas, a veces contraídas en cabezuelas, las espigas simples o dispuestas en inflorescencias más complejas, flores subsésiles o prácticamente sésiles; cáliz tubuloso, 5-dentado o someramente 5-lobado, subactinomorfo; corola hipocraterimorfa, morada, violácea o blanquecina, tubo recto o curvado, lóbulos 5, subiguales, a veces emarginados en el ápice; estambres 4, didínamos, inclusos; ovario bicarpelar, tetralocular, con un óvulo en cada lóculo, estilo terminal o subterminal, estigma bilobado, pero uno de los lóbulos estéril; fruto esquizocárpico, de 4 mericarpios subcilíndricos que se separan en la madurez¹².

Género de cerca de 100 especies, casi todas americanas y unas cuantas en el Antiguo Mundo.

Hasta el momento, los trabajos en Verbena distan de clarificar las complejas relaciones dentro del género y únicamente se cuenta con estudios a nivel regional o catálogos¹¹.

4.2.1 Distribución y hábitat

El género Verbena es de origen americano; actualmente se extiende por América tropical y templada, norte de África, Asia, Europa y Australia; crece desde el nivel del mar hasta casi 4000 m.s.m., en la región andina de Ecuador, Bolivia y Perú. Existen tres grandes centros de diversidad específica, uno en zonas templado-cálidas del noreste Argentino y sur de Brasil, taxa principalmente pertenecientes a la serie Pachystachyae; el segundo en el sudoeste de Estados Unidos de América y norte de México, con algunas especies en la zona Pacífica y montañosa; el tercero en la zona templada del este de Estados Unidos de América y sur de Canadá; estos dos últimos centros representados principalmente por taxa pertenecientes a la serie Verbena¹¹.

4.2.2 Composición química

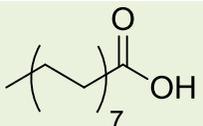
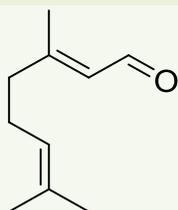
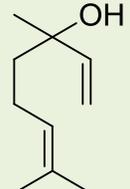
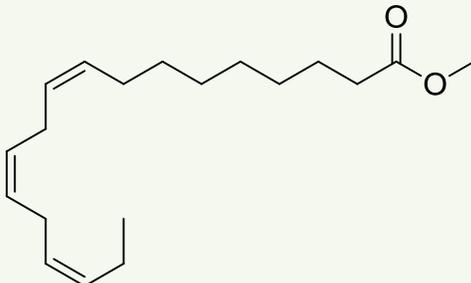
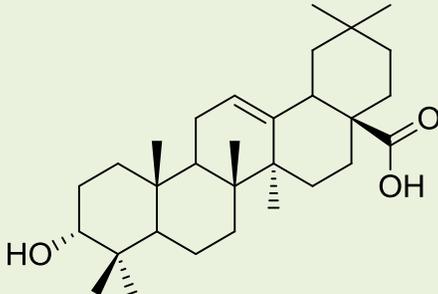
Se han encontrado diversos tipos de compuestos biosintetizados por plantas del género Verbena, tales como iridoides glicosilados, feniletanoides, triterpenoides, esteroides, etc., entre los cuales se ha encontrado actividad farmacológica (Tabla 1).

¹¹ O'Leary, N., et al (2007) "Filogenia del género Verbena (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". **45**:103-105.

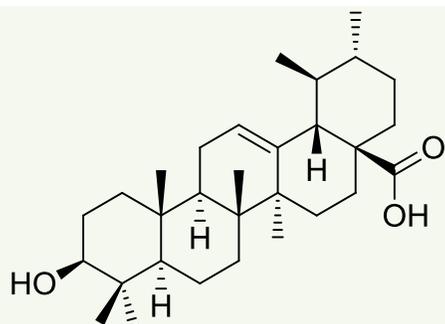
¹² O'Leary, N., et al (2007) "Filogenia del género Verbena (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". **45**:118.



Tabla 1. Metabolitos secundarios mayoritarios del género Verbena

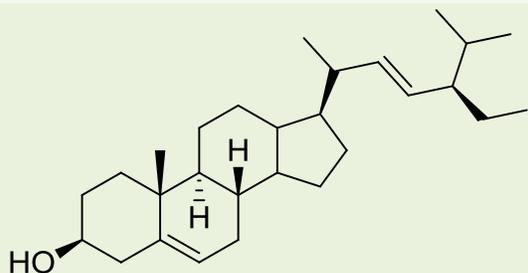
Fórmula	Nombre trivial	Especie representativa
	Ácido palmítico	<i>Verbena officinalis</i> ¹³
	Geranial	<i>Verbena officinalis</i> ¹³
	Linalol	<i>Verbena officinalis</i> ¹³
	Linolenato de metilo	<i>Verbena officinalis</i> ¹³
	Ácido oleanoico	<i>Verbena littoralis</i> ¹⁴

¹³ Arkadani, M., et al (2003). "Volatile Constituents from the Aerial Parts of *Verbena Officinalis* L. (Vervain). pp. 39-42.¹⁴ Gamboa, C., et al. (2004). "Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae)". **65**:2369-2372.



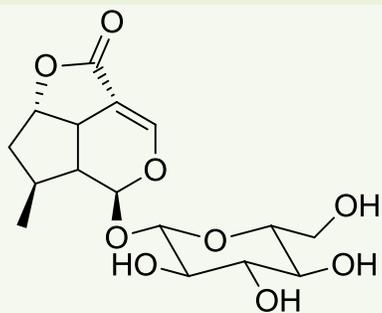
Ácido ursólico

*Verbena officinalis*¹⁵
*Verbena carolina*¹⁶



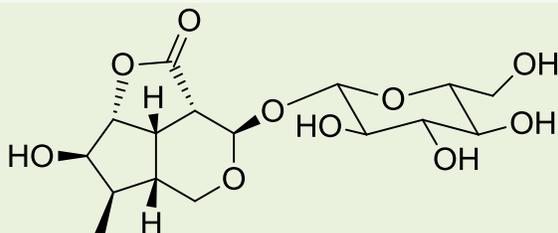
Estigmasterol

*Verbena littoralis*¹⁴



Brasósido

*Verbena officinalis*¹⁵



Vebrásido

*Verbena brasiliensis*¹⁷

¹⁵ Deepak, M., et al. (2000). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". **11**:351-355.

¹⁶ Morales, A., et al. (2009) "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)"

¹⁷ Franke, A., et al. (1987). "Vebraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*". **11**: 3015-3020.



	Verbenalina	<i>Verbena officinalis</i> ^{15,18} <i>Verbena carolina</i> ¹⁶
	Hastatósido	<i>Verbena officinalis</i> ¹⁵ <i>Verbena carolina</i> ¹⁶
	Griselinósido	<i>Verbena brasiliensis</i> ¹⁹
	Aralidiósido	<i>Verbena brasiliensis</i> ¹⁹
	Apigenina-7-glucurónido	<i>Verbena officinalis</i> ²⁰

¹⁵ Deepak, M., et al. (2000). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". **11**:351-355.

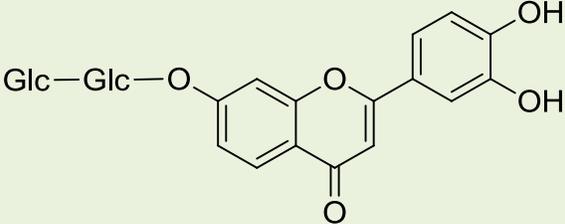
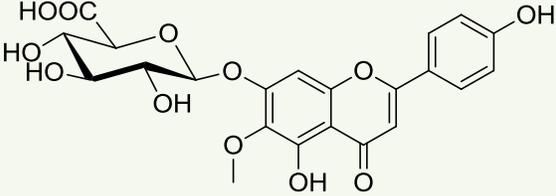
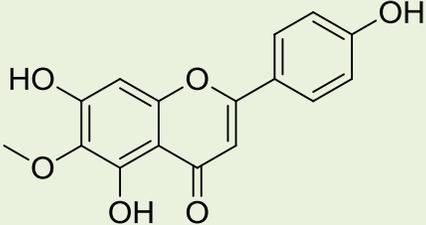
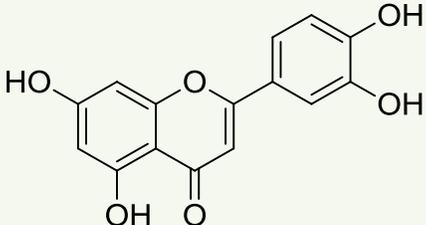
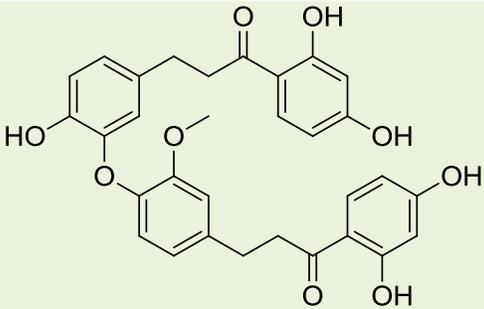
¹⁶ Morales, A., et al. (2009) "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)".

¹⁸ Müller, A., et al. (2004). "Analysis of the Aerial Parts of *Verbena officinalis* L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography". **60**:193-197.

¹⁹ Ono, M., et al. (2006). "New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Verbena brasiliensis*". **54**(10): 1421-1424.

²⁰ Casanova, E., et al. (2008). Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". **63**: 93-97.



	Luteolina-7-diglucurónico	<i>Verbena officinalis</i> ²⁰
<p>Glc = Glucurónico</p> 	7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina	<i>Verbena bonariensis</i> ²¹
	Hispidulina	<i>Verbena citriodora</i> ²² <i>Verbena carolina</i> ¹⁶
	Luteolina	<i>Verbena citriodora</i> ²²
	Verbenachalcona	<i>Verbena littoralis</i> ²³

¹⁵ Deepak, M., et al. (2000). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". **11**:351-355.

¹⁶ Morales, A., et al. (2009) "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)"

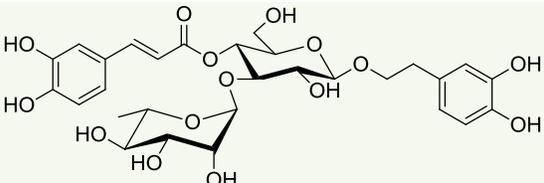
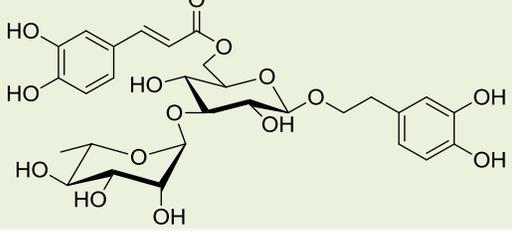
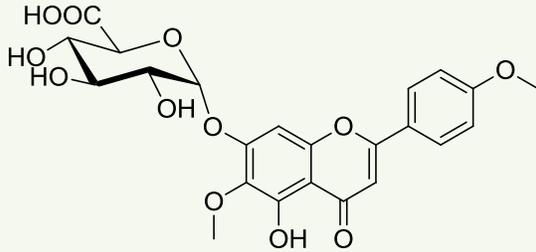
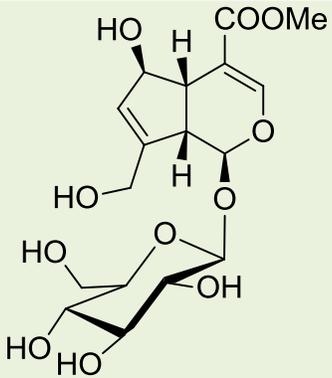
²⁰ Casanova, E., et al. (2008). Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". **63**: 93-97.

²¹ Chen, C-C. et al. (2003). Chemical constituents of *Verbena bonariensis*. **55**(1):65-70.

²² Valento, P., et al. (1999). "Análisis of the Vervain Flavonoids by HPLC/Diod Array Deterctor Method. Its Application to Quality Control". **47**:4579-4582.

²³ Li, Y., et al. (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". **64**(6):806-808.



	Verbascósido	<i>Verbena officinalis</i> ¹⁵ <i>Verbena carolina</i> ²³
	Isoverbascósido	<i>Verbena officinalis</i> ²⁴
	7-O-α-D- glucurónido de la pectinolaringenina	<i>Verbena carolina</i> ²⁵
	Aucubina	<i>Verbena officinalis</i> ²⁶

²³ Li, Y., et al. (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". **64**(6):806-808.

²⁴ Aguila, M. A., et al. (2011). "Pruebas de identidad y pureza para el control de calidad de dos drogas vegetales medicinales: *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) y *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake (Asteraceae)".

²⁵ Bilia, A. R., et al (2007). "HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". **46**: 463-470.

²⁶ García, A. R., et al. (2012). "Estudio químico complementario de las partes aéreas de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae).

²⁷ Rehecho, S., et al. (2011). "Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L.". **44**: 875-882.



4.3. *Verbena carolina* L.

4.3.1. Nombres comunes²⁸

Ajenjo grande, berbena, chilillo chino, hierba de San José, hierba de San Juan, hierba lengua de perro, nardo de campo, poleo negro, San Juan Shihuitl, verbena corriente, verbena del perro, verbena grande; Chiapas: pe'emculum, yakankul'uk; Estado de México: ndinich, ndinishá, shanxú grande (mazahua); Michoacán: mistikitsikua, tititsikua (purhépecha); Morelos: axixipatli (náhuatl); Nayarit: cuverben (tepehuano); Puebla: chilpunxiut, chilpunxiuit (nahua); Verbain (inglés).

4.3.2. Clasificación taxonómica²⁹

Dominio: Eukarya
Reino: Plantae
Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Verbenaceae
Género: *Verbena*
Especie: *Verbena carolina* L.

4.3.3 Sinonimia²⁸

- *Verbena biserrata* Kunth
- *Verbena caroliniana* Wild
- *Verbena mollis* Mart. et Galeotti
- *Verbena polystachya* Kunth
- *Verbena veronicaefolia* Kunth

4.3.4 Usos

En la medicina tradicional mexicana, *Verbena carolina* L., es utilizada en el tratamiento de la diarrea, el vómito, la disentería y como purgante pero principalmente en las enfermedades biliares. La verbena se utiliza en diversos padecimientos renales, entre los que destacan la disolución de los cálculos en la vejiga y como diurético²⁸.

Pero es la “bilis” la enfermedad para la que más se menciona. Se dice que ésta se origina a causa de corajes o sustos, “da calor de cabeza, la boca se pone amarga, hay debilidad y falta de apetito”. Cuando se tienen tres o cuatro años de padecerla “duele la boca del

²⁸ UNAM., (2009). “BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. *Verbena carolina* L.” Monografía en línea, disponible en URL <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbena&id=7509>

²⁹ *Verbena carolina* L. Integrated Taxonomic Information System ITIS report taxonomic serial No 32090, monografía en internet, disponible en URL http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32090.



estómago, donde late una bolita que es latido”. La manera más común para curarla es con la infusión de la verbena suministrada en forma de té, donde todas las partes de la planta son utilizadas. Se elabora una decocción agregando hojas de nogal (*Juglans major*), fresno (*Fraxinus uhdei*), menta (*Mentha sp.*), salvia (*Salvia officinallis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) limón (*Citrus aurantifolia*), Santa María (*Chrysanthemum parthenium*), guácima (*Guazuma ulmifolia*), tepoza (*Buddleja sessiliflora*), romero (*Rosmarinus officinalis*), y se toma por las mañanas²⁸. También se emplea como cicatrizante y posee actividad antimicrobiana.

4.3.5 Descripción

Planta herbácea perenne, erecta o ascendente, hasta de 75 cm de alto; tallo por lo general solitario, otras veces partiendo varios de la base, más o menos notablemente cuadrangular, ramificado, hirsuto con pelos comúnmente de menos de 1 mm de largo; hojas opuestas, subsésiles o con peciolos hasta de 3 mm de largo, lámina elíptica, variando a lanceolada, oblanceolada u oblonga, de 2 a 8 cm de largo y de 0.5 a 2 cm de ancho, aguda a obtusa en el ápice, cuneada en la base, de textura membranácea, toscamente serrada en el margen, estrigosa en el haz, hirsutoestrigosa en el envés, con los pelos concentrados a lo largo de las nervaduras; espigas terminales y axilares, con frecuencia integrando conjuntos paniculiformes, hasta de 26 cm de largo, con las flores más bien espaciadas entre sí, brácteas acuminadas en el ápice, por lo general de cerca de 1 mm de largo; cáliz de 1.5 a 2 mm de largo, con los lóbulos diminutos, pubérulo; corola morada, de color lila o azulosa, tubo de aproximadamente 2.5 mm de largo, pubérulo en la parte superior, limbo de 2 a 2.5 mm de diámetro; mericarpios subcilíndricos, de cerca de 1.5 mm de largo, estriados a casi lisos, de color café⁷.

4.3.6 Distribución geográfica

Distribuida del suroeste de Estados Unidos a Nicaragua: E.U.A.; Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México, D.F., Morelia, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas; Centroamérica⁷, en la Figura 2 se muestra la distribución geográfica de *Verbena carolina* en la región del Bajío y en la Figura 3 una imagen de *V. carolina*.

Componente de la vegetación secundaria derivada de bosques de coníferas y de encino, a menudo también en calidad de ruderal, muy común en el norte de Michoacán, menos frecuente en Guanajuato y en Querétaro. Altitud de 1900-3200 m.s.m. Se ha colectado en flor durante casi todo el año, principalmente entre junio y octubre⁷.

²⁸ UNAM., (2009). “BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. Verbena carolina L.” Monografía en línea, disponible en URL <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbena&id=7509>.

⁷ Rzedowski, J., et al. (2002). “Flora del Bajío y de regiones adyacentes”. Fasc. 100. Instituto de ecología. Centro regional del bajío, México. pp. 118-139.

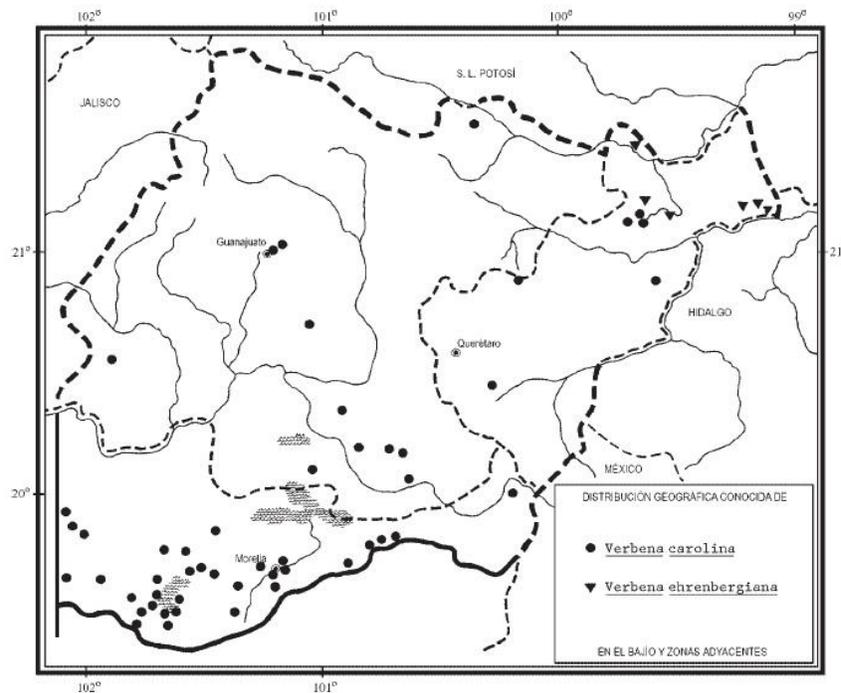


Figura 2. Distribución geográfica *V. carolina* L. Región del Bajío⁷



Figura 3. Imagen de *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)²⁸

⁷ Rzedowski, J., et al. (2002). "Flora del Bajío y de regiones adyacentes". Fasc. 100. Instituto de ecología. Centro regional del bajío, México. pp. 118-139.

²⁸ UNAM., (2009). "BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. *Verbena carolina* L." Monografía en línea, disponible en URL <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbena&id=7509>. Imagen proporcionada por Pedro Tenorio Lezama CONABIO.



4.4 Compuestos marcadores de plantas medicinales.

Los constituyentes de las drogas vegetales y preparaciones a partir de drogas vegetales son clasificados en las tres categorías siguientes:

- a) **Compuestos con actividad terapéutica conocida.** Corresponden a compuestos químicamente definidos o grupos de sustancias que generalmente son aceptadas por contribuir sustancialmente a la actividad terapéutica de droga vegetal, estos constituyentes aisladamente ejercen el mismo (o similar) efecto terapéutico en el extracto total.
- b) **Compuestos que contribuyen a la eficacia terapéutica.** No ejercen el mismo (o similar) efecto terapéutico como el extracto total, sin embargo, de acuerdo al conocimiento científico, éstos contribuyen a la actividad terapéutica.
- c) **Sustancias marcadoras o grupos de sustancias marcadoras.** Las sustancias marcadoras o grupos de sustancias marcadoras son constituyentes químicamente definidos de las drogas vegetales, preparaciones a partir de drogas vegetales o de productos medicinales derivados de los mismos que, de acuerdo al conocimiento científico actual no contribuyen a la actividad terapéutica y sólo sirven para propósitos analíticos.³⁰

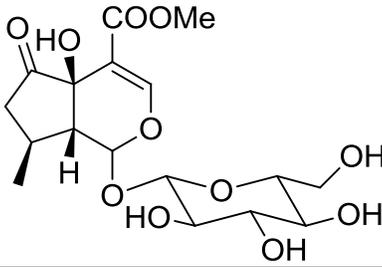
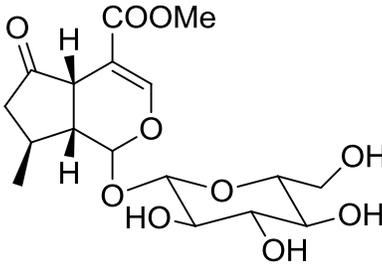
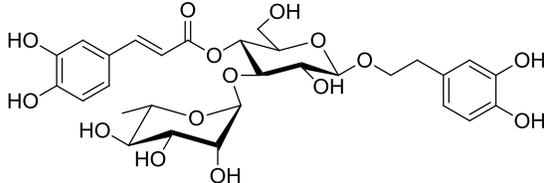
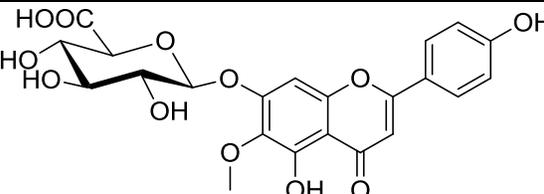
Estos constituyentes deberán ser característicos de la planta medicinal y fácilmente detectables por métodos analíticos. Del mismo modo que en las dos primeras categorías mencionadas, los compuestos marcadores pueden participar dentro de un control completo desde la materia prima vegetal hasta de un preparado vegetal medicinal.

4.4.1 Compuestos marcadores de *Verbena carolina* L.

De acuerdo a los criterios de selección previamente enunciados y tomando en cuenta reportes analíticos previos de otras especies del género *Verbena* (Deepak, 2000) y los reportes de Morales (2009), Aguila (2011) y García (2012), que confirman la existencia de los mismos en la droga vegetal y demuestran sus propiedades ópticas (λ_{\max} de absorción en UV), se enuncian a continuación los compuestos marcadores de *Verbena carolina* L.

³⁰ Gaedcke, F., et al. (2003). "Herbal Medicinal Products. Scientific and Regulatory Basis for Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation". CRC Press, New York. pp. 22-23.

Tabla 2. Compuestos marcadores de *V. carolina* L. (Verbenaceae)

Compuesto	Nombre trivial	Fórmula	λ_{UV} de trabajo (nm)
I	Hastatósido		240 nm
II	Verbenalina		240 nm
III	Verbascósido		330 nm
IV	7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina		330 nm

(Los números designados a cada compuesto fueron elegidos con base en el orden de aparición de los picos cromatográficos por CLAE, columna C18 PrincetonSPHERE®, fase móvil H_2O/H^+ - Acetonitrilo con detector UV, las longitudes de onda a las que son detectados obedecen a los máximos reportados en la literatura^{16,24, 26}) Aún no se tienen reportes de actividad farmacológica específica de estos compuestos.

¹⁶ Morales, A., et al. (2009) "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)"

²⁴ Aguila, M. A., et al. (2011). "Pruebas de identidad y pureza para el control de calidad de dos drogas vegetales medicinales: *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) y *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake (Asteraceae)".

²⁶ García, A. R., et al. (2012). "Estudio químico complementario de las partes aéreas de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae).



4.5 Biogénesis de compuestos marcadores

De los cuatro compuestos marcadores de *V. caroina*, (I) y (II) son compuestos iridoides, (III) es un fenilpropanoide y (IV) es un glucurónido de flavonoide.

4.5.1 Iridoides

Los iridoides representan un gran grupo de ciclopentano-[c]-piranmonoterpenoides. Se han encontrado como constituyentes naturales en un gran número de familias de plantas regularmente, pero no invariablemente como glicósidos³¹.

El nombre “iridoide” es derivado de una especie de hormigas, *Iridomyrmex spp.*, las cuales biosintetizan la iridomirmecina y el iridodial **1d** (ver Figura 4) que se encuentran en sus secreciones defensivas³².

El esqueleto de ciclopentano-[c]-pirano puede constituir de diez, nueve o raramente ocho átomos de carbono, en el cual el C₁₁ se pierde con más facilidad que el C₁₀.³³ Un biciclo H-5/H-9 β , β -cis-fusionado del sistema del anillo ciclopentanopirano **1a** es la característica más común de estos compuestos, sin embargo varios iridoides enantioméricos también existen en la naturaleza. La escisión en el anillo de ciclopentano de los iridoides da lugar a los secoiridoides **1b**, mientras que la escisión en el anillo de pirano produce iridoides derivados **1c**, por lo tanto el anillo de ciclopentano es el anillo base del esqueleto de los iridoides. En el reino vegetal, estos se derivan del 9-hidroxinerol por fosforilación seguida de una ciclización, oxidación y glicosilación en varios pasos. Posiblemente el iridodial **1d** o el 8-epiiridodial **1e** son los predecesores de los iridoides en muchas familias vegetales. Los iridoides están presentes en varias plantas medicinales usadas como tónico amargo, sedativo, antipirético, medicamentos para la tos, remedios para heridas, trastornos de la piel y como hipotensivos.³⁴

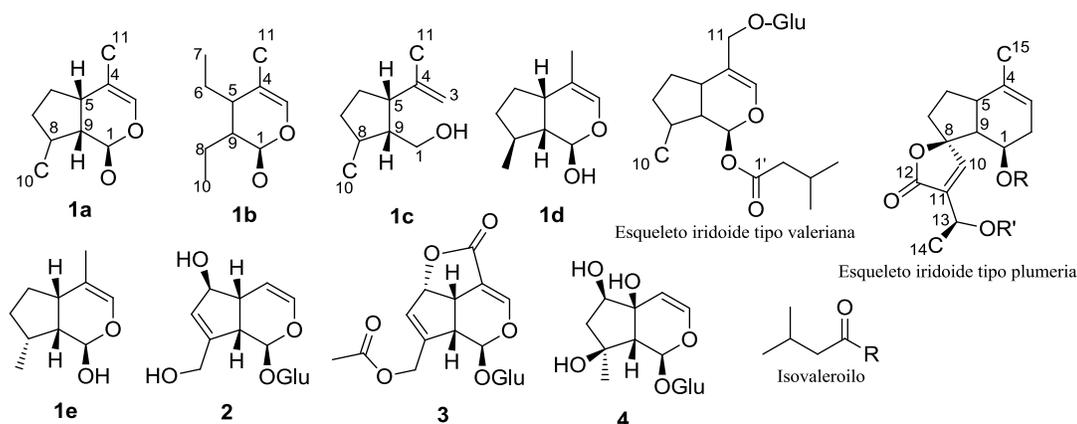


Figura 4. Numeración del esqueleto iridoide y sustituyentes más comunes³⁴.

³¹El-Naggar, J., et al. (1980). "Iridoids, A review". **43**:649-709.

³²Villaseñor, M., (2007). "Bioactivities of Iridoids". **6**:307-314.

³³Sempaio-Santos, M. et al. (2001). "Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics". **12**(2): 144-153.

³⁴Dinda, B., et al. (2007). "Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1". **55**(2): 159-222.



Los iridoides son compuestos de naturaleza terpenoide y su biosíntesis ha sido bastante bien investigada³⁵, por lo que se conoce que existen dos rutas biosintéticas. Una vía principal (Figura 5) que va desde el iridodial - ácido desoxilogánico³⁶.

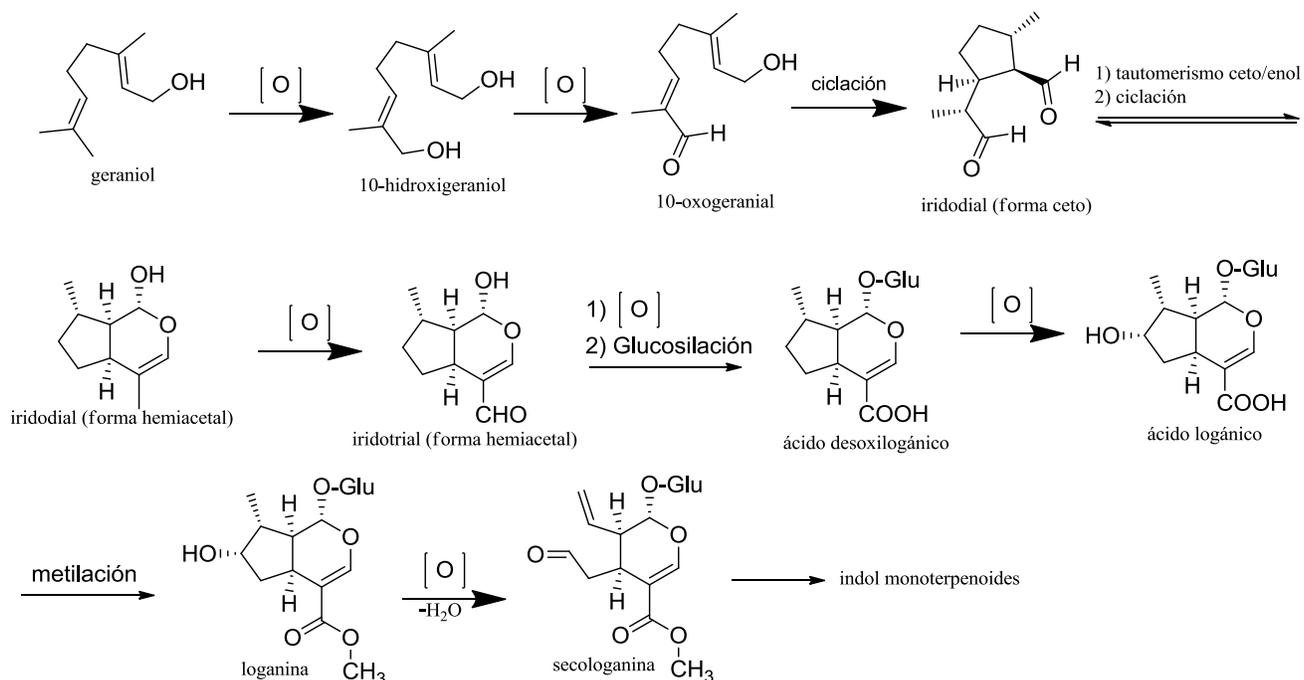


Figura 5. Ruta biosintética iridodial – ácido desoxilogánico.

Otra ruta biosintética de iridoides implica al 8-epiiridodial, 8-epiiridotrial y ácido 8-epidesoxilogánico; estos son los precursores de iridoides carboxílicos descarboxilados como la aucubina y el catalpol. Estos compuestos se encuentran casi exclusivamente en el orden Lamiales y nunca en Gentianales u Oleaceas³⁵.

Algunos secoiridoides poco comunes se forman por esta ruta pero tienen diferente estructura con respecto a los derivados de la ruta iridodial – ácido desoxilogánico, como se muestra en la Figura 6.

³⁵ Jensen, S. R., (1992). "Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae". **79**: 284-302.

³⁶ Dewick, P. M., (2009). "Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach". 3rd. Ed. p 207.

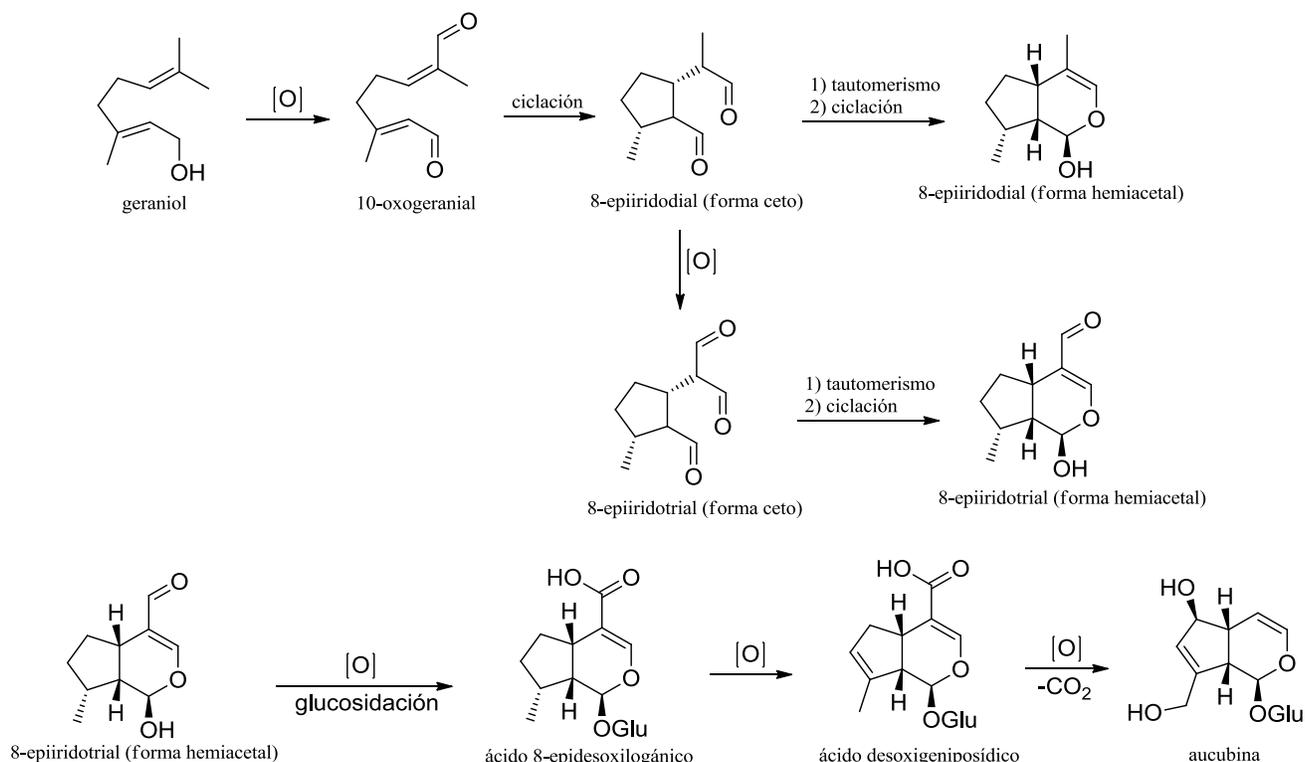


Figura 6. Ruta biosintética 8-epiiridodial – ácido 8-epidesoxilogánico.

Los iridoides presentes en *Verbena carolina* L. son hastatósido (I) y verbenalina (II).

4.5.2 Fenilpropanoides (Compuestos C₆-C₃ y C₆-C₂)

Son compuestos que presentan la estructura C₆-C₃, C₆-C₂ y C₆-C₁ (Figura 7) en forma aislada o glicosilada y que a su vez pueden ser intermediarios en la biogénesis de un grupo muy diverso de metabolitos secundarios de importancia biológica y/o farmacológica, tales como los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, triptófano; flavonoides, lignanos, taninos, etc³⁶.

³⁶ Dewick, P. M., (2009). "Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach". 3rd Ed. p 137.

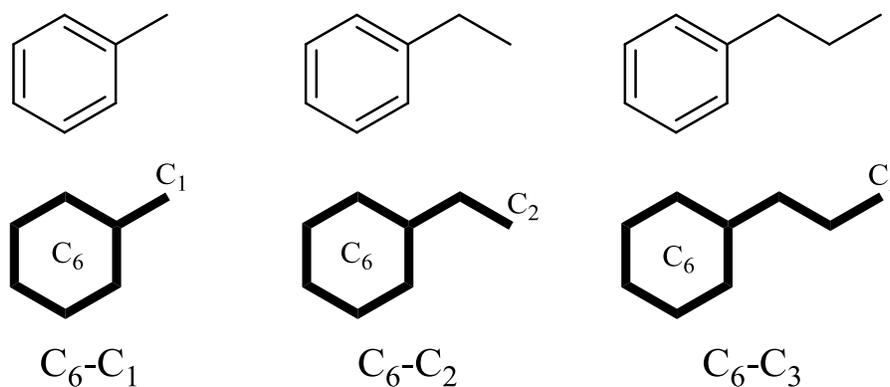
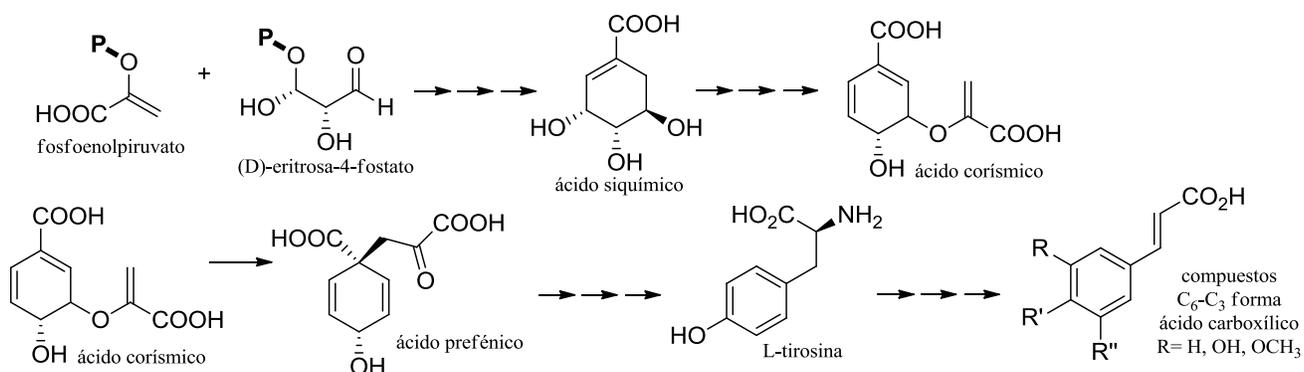


Figura 7. Esqueletos de compuestos C_6-C_1 , C_6-C_2 y C_6-C_3 .

Estos compuestos presentan la característica de ser aromáticos con un sustituyente alquílico y se originan biogénicamente mediante la ruta anabólica del ácido siquímico³⁶, como se esquematiza en la Figura 8.



El compuesto fenilpropanoide glicosilado y compuesto marcador presente en *Verbena carolina* L. es el verbascósido (III).

³⁶ Dewick, P. M., (2009). "Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach". 3rd Ed. p. 136-149.



4.5.3 Flavonoides

Es un grupo de compuestos presente en muchas especies vegetales, con diversas actividades farmacológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiana, algunos con potencial actividad anticarcinogénica o cardioprotectora.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien aisló a partir de la cáscara de limón una sustancia en 1930, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares³⁷.

Los flavonoides se denominaron primeramente como vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C₂ (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C. Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950³⁷.

Etimológicamente la palabra flavonoide deriva del latín *flavus* que significa “amarillo”, los flavonoides se encuentran en la naturaleza tanto en su estado libre como glicosilado y constituyen el grupo de los fenoles naturales³⁸.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, especialmente en las angiospermas, pero han sido detectados algunos en hongos y algas. Se encuentran especialmente en partes aéreas, en tejidos superficiales, y se les encuentra en forma libre (agliconas flavonoides), como glicósidos, sulfatos y algunas veces como dímeros o polímeros³⁹. Los glicósidos se pueden diferenciar por el tipo de enlace, habiendo de dos tipos C-glicósidos y O-glicósidos, siendo los segundos los más frecuentes⁴⁰.

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena policetídica, un anillo B, derivado del ácido siquímico, tres átomos de carbono que conectan a los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropanoide y por eso se les conoce como compuestos C₆-C₃-C₆ (Figura 9).

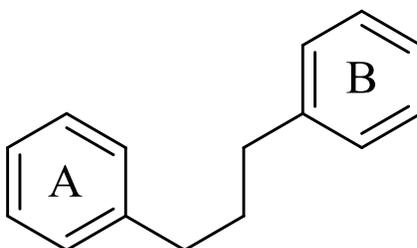


Figura 9. Estructura base del esqueleto flavonoide.

³⁷ Singleton, V. L., et al. (1981). “Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods” **27**: 149-242.

³⁸ Bruneton, J. (2002). “Farmacognosia. Plantas medicinales” 2ª Ed, España. pp 306-341.

³⁹ Törrönen, R. (1997). “Flavonoid and phenolic acids in selected berries”. **114** (1-2): 191-192.

⁴⁰ Li, Y. Q., et al. (1996). “Studies on the structure of isoostelbin”. **31**(10): 761-763



Entre las distintas estructuras se encuentran con cadena abierta (chalconas) formando un heterociclo (γ -pironas), polimerizaciones que ocurren principalmente por uniones C-C etc., a continuación se presenta una figura con diversos grupos estructurales de flavonoides (Figura 10).

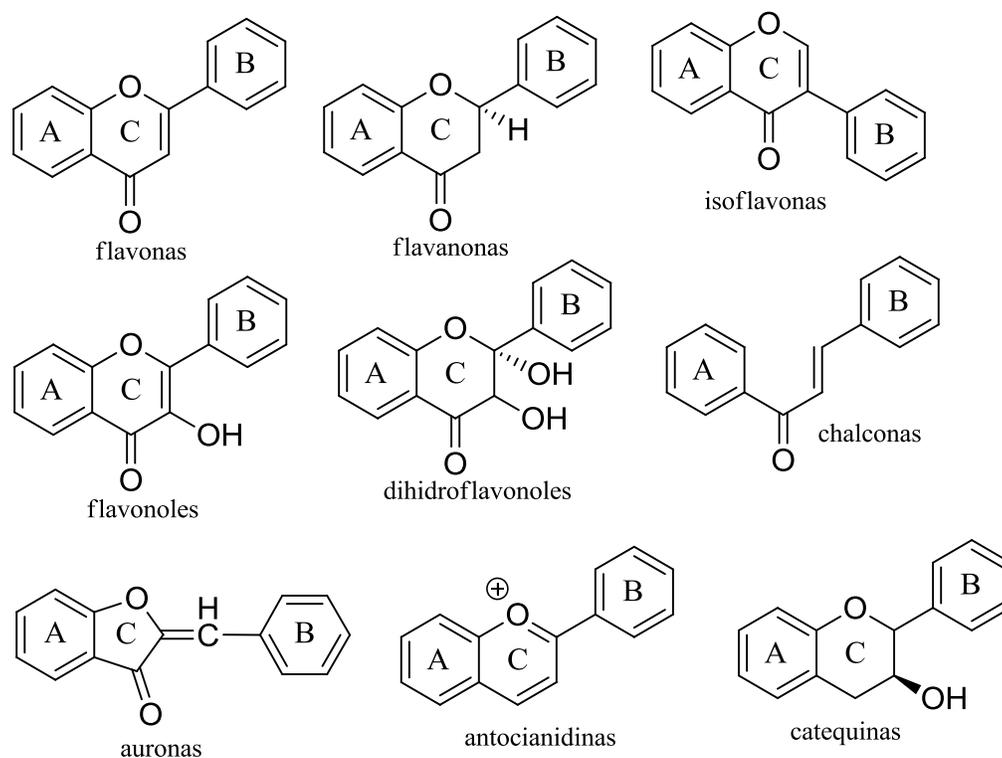


Figura 10. Estructuras de diversos grupos de flavonoides⁴¹.

Los flavonoides se originan por biogénesis mixta: el anillo A proviene de la ruta de los policétidos, el anillo B y la cadena C₃ se originan de la ruta del ácido siquímico, como se denota en la Figura 11.

⁴¹ Harborne, J. B., et al. (1975). "The flavonoids" (part 2) pp 159-161, 693-696.

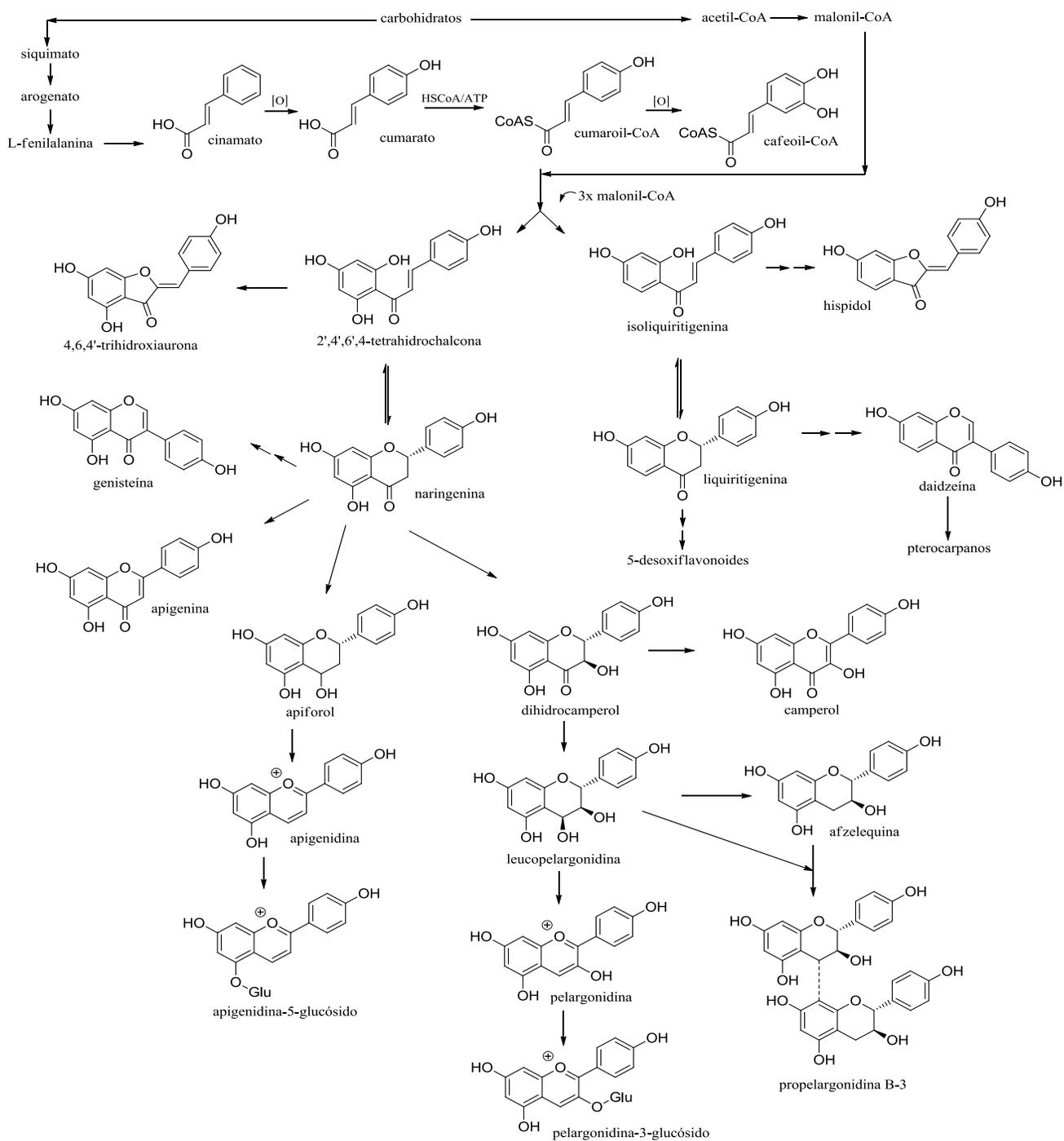


Figura 11. Ruta biosintética de flavonoides⁴¹.

⁴¹ Harborne, J. B., et al. (1975). "The flavonoids" (part 2) pp 159-161, 693-696.



4.6 Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación de mezclas. El nombre de cromatografía, proviene de las raíces Griegas “χρωματος” (cromatos) que significa color, y “γραφω” (grafos) que significa escritura, debido a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como bandas coloridas. En general la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados selectivamente por una fase móvil (líquido o gas) y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en cromatografía de líquidos y cromatografía de gases⁴² (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos de cromatografía

Cromatografía de líquidos	
Cromatografía plana	Cromatografía en columna
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía líquido-sólido (adsorción)
Cromatografía en papel (reparto)	Cromatografía líquido-sólido (reparto)
	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de exclusión
Cromatografía de gases	
Cromatografía gas-líquido (reparto)	Cromatografía gas-sólido (adsorción)

⁴² México. (2000). Secretaría de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.



4.6.1 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAE) es una técnica analítica eficaz, sensible, confiable y adaptable para la detección, resolución y cuantificación de diversas sustancias, ha demostrado ser adecuada para la purificación y cuantificación de metabolitos secundarios provenientes de plantas medicinales.

La migración diferencial en la CLAE es el resultado de la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron, hasta un detector donde se registran sus concentraciones y los tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos con forma idealmente simétrica con un tiempo de retención característico por lo que ese tiempo de retención puede emplearse para identificar el compuesto⁴².

Existen modificaciones en cada tipo de las cromatografías mencionadas, como en la cromatografía de fases enlazadas en la cual la fase estacionaria está unida químicamente a las partículas de soporte. Esta varianza se puede llevar a cabo en fase normal o reversa; en la primera se utilizan empaques polares que funcionan de manera semejante a la cromatografía líquido-sólido (adsorción). La cromatografía de fase reversa involucra una fase estacionaria relativamente poco polar con cadenas de hidrocarburos, comunmente de 8 a 18 átomos de carbono unidos a los grupos silano del soporte y se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares⁴².

Esencialmente un cromatógrafo de líquidos consta de las siguientes partes:

- Sistema de bombeo. Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, mantenimiento de un flujo constante, puede tener un controlador de flujo y gradiente.
- Sistema de inyección. Un factor importante para obtener una buena resolución en la separación es la introducción adecuada de la muestra al sistema. El sistema de inyección más sencillo es con una jeringa, otro sistema es mediante un inyector automatizado que minimiza errores. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error del volumen inyectado.
- Columna. Se considera la parte fundamental en la cromatografía ya que es en ésta, en donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque y dimensiones dependerán básicamente de la composición de la mezcla a separar, es recomendable un controlador de la temperatura para minimizar variaciones.
- Detector. Puede ser de dos tipos, aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil y aquellos que miden alguna propiedad del soluto únicamente.

⁴² México. (2000). Secretaría de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.



- Registrador de señales. Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar al detector, la señal que emite debe ser registrada por un graficador o un integrador electrónico que traduce la señal óptica en eléctrica y a su vez en numérica, los integradores electrónicos evitan los errores en la medición de áreas.

4.7. Validación de métodos analíticos

De acuerdo a la FDA la validación es la evidencia documentada, que provee con un alto grado de seguridad que un proceso específico, produce consistentemente un producto de acuerdo a especificaciones predeterminadas y atributos de calidad⁴³.

La validación se clasifica en⁴³:

- Validación prospectiva. Es aquella que establece mediante la evidencia documentada obtenida en forma experimental, si un proceso se comporta consistentemente. Su desarrollo requiere de la elaboración previa de un protocolo de validación.
- Validación retrospectiva. Es aquella que se aplica cuando se cuenta con la evidencia documentada de que el sistema desempeña lo que se propuso hacer, basada en la revisión y análisis histórico de la información del proceso.
- Validación concurrente. Establece la evidencia documentada de que el proceso hace lo que se propuso hacer, basada en la información generada durante el desarrollo del proceso.

La validación de un método analítico, es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas⁴⁴. El método de validación se basa principalmente en el cumplimiento de una serie de requerimientos, explica cómo seleccionar esos requerimientos y la forma en que se suministran evidencias.

⁴³ Alpizar, M., et al. (2004). "Formas farmacéuticas sólidas". pp 13, 17-18.

⁴⁴ Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002). "Guía para la validación de métodos analíticos".



5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La identificación y cuantificación de los compuestos marcadores en una droga vegetal constituye un paso imprescindible para el aseguramiento de la calidad de la misma, comprende el cumplimiento de numerosos objetivos, tales como evitar la adulteración de la droga vegetal con otras especies similares, del mismo género, familia, o incluso con otras partes de la planta no correspondientes a las empleadas en terapéutica, permite determinar mediante un método analítico apropiado la concentración de los compuestos antes mencionados.

Si bien se pueden desarrollar métodos de cuantificación sencillos para ciertos compuestos, es necesario que sean validados para asegurar que puedan ser empleados en otros laboratorios analíticos y por analistas distintos, sin tener la necesidad de hacer adecuaciones mayores; la validación de un método analítico comprende establecer parámetros como: linealidad del sistema, linealidad del método, límites de detección y cuantificación, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) entre otros, todo basado en las normas oficiales vigentes.

El presente trabajo consta de dos etapas, la primera comprende la extracción, purificación y caracterización de los compuestos marcadores de la especie vegetal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae), por métodos espectroscópicos, para ser empleados como estándares en el desarrollo de la segunda etapa que involucra el desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación de los mismos, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Lo anterior podrá ser base del contenido de la monografía de la planta, para eventualmente ser incluida dentro de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

5.1. Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico por CLAE para cuantificar los compuestos marcadores presentes en la planta *Verbena carolina* L. (Verbenaceae).

5.2. Objetivos particulares

- Actualización de los datos bibliográficos acerca de los antecedentes de estudios químicos y biológicos de la especie vegetal.
- Aislar, purificar y confirmar la identidad de los compuestos marcadores de *Verbena carolina* L., para ser empleados en el desarrollo y validación de un método analítico apropiado destinado al aseguramiento de la calidad de la droga vegetal.
- Determinar las condiciones óptimas para la resolución y detección del contenido metabólico secundario de la especie vegetal.



- Comprobar los siguientes parámetros requeridos para declarar la validación del método para la cuantificación de los compuestos marcadores por CLAE.
 - Adecuabilidad del sistema
 - Precisión del sistema
 - Linealidad del sistema
 - Límite de detección (LD)
 - Límite de cuantificación (LC)
 - Linealidad y exactitud del método
 - Precisión del método
- Evaluar la estabilidad de la muestra en distintas condiciones de almacenaje.
- Cuantificar las cantidades de los compuestos marcadores contenidos en las partes aéreas de *Verbena carolina* L., provenientes de distintas colectas a partir de sus extractos en el disolvente encontrado como idóneo para la extracción.
- Determinar la toxicidad aguda de la decocción de las partes aéreas de *V. carolina* L., por el método de Lorke⁴⁵.

⁴⁵ Lorke, D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. **54**: 275-287



6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Material y equipo

6.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se emplearon cromatofolios de gel de sílice MACHEREY-NAGEL DÜREN ALUGRAM®, provistos de indicador UV, una cámara con lámpara UV para tres longitudes de onda, 254, 302 y 365 nm. Se emplearon sistemas de elución variables y como agente revelador químico una solución de sulfato cérico amoniacal $[(NH_4)_4Ce(SO_4)_4 \cdot 2H_2O]$ al 1% en H_2SO_4 2N seguido de calentamiento en parrilla eléctrica.

6.1.2 Cromatografía en columna abierta (CCA)

Se emplearon columnas de vidrio provistas de llave de paso de diversas medidas de acuerdo a necesidades de cada sistema con gel de sílice 60G marca Merck (malla 0.063-0.200 mm) como adsorbente, empleando diversos sistemas de gradiente de disolvente en fase normal.

6.1.3 Rotaevaporador

Se empleó rotaevaporador marca Büchi modelo RE 111 y R 124 provisto de una bomba marca Büchi modelo V 710.

6.1.4 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2, en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

6.1.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN fueron determinados a 300 y 400 MHz, en equipos de RMN modelo Varian Unity Inova 300 y Varian Unity Inova 400 respectivamente, empleando como disolventes $CDCl_3$, CD_3OD , D_2O y $DMSO-d_6$, y TMS como estándar interno.

6.1.6 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

Para el desarrollo y validación del método de cuantificación de los metabolitos secundarios de *V. carolina* se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Waters (Waters Corp., Milford MA, USA), modelo 515 con controlador de gradiente Waters modelo 680, dos bombas marca Waters modelos 515 y 510 respectivamente, inyector automático Jasco, AS-2055PLUS, detector UV/VIS modelo 2487 con capacidad de lectura de dos canales, horno y controlador de temperatura de la columna, software Millennium 32. La columna analítica empleada fue una PrincetonSPHER, C18, 150 x 4.6 mm, tamaño de partícula 3µm, tamaño de poro 100Å. Se emplearon prefiltros Acrodisc 13 mm Syringe Filter membrana de GHP, ver Figura 12.



Figura 12. Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.

6.1.7 Prueba de toxicidad aguda, modelo de Lorke

Para la evaluación de la toxicidad aguda del extracto por decocción por el método de Lorke⁴⁵ se emplearon ratones macho de la cepa ICR, adaptados a las condiciones de bioterio de 21°C, humedad relativa entre 70-80%, ciclos de 12 h de luz/obscuridad y alimento/agua *ad libitum*, adquiridos en Harlan con un peso entre 20 y 26 gramos.

6.2 Reactivos y disolventes

- *n*-heptano grado analítico J.T. Baker ®
- Cloroformo grado técnico J.T. Baker ®
- Cloruro de metileno grado técnico y grado analítico J.T. Baker ®
- Acetato de etilo grado técnico
- Acetona grado técnico
- Metanol grado técnico
- Metanol grado cromatográfico LiChrosolv ®
- Acetonitrilo grado cromatográfico LiChrosolv ®
- Agua grado cromatográfico (Sistema MilliQ)
- Solución reveladora de sulfato cérico amoniacal
- Sulfato de sodio grado técnico
- Ácido acético glacial J.T. Baker ®
- Estándares de hastatósido (I), verbenalina (II) y verbascósido (III) obtenidos de estudios fitoquímicos anteriores.

⁴⁵ Lorke, D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. **54**: 275-287



6.3 Material vegetal

Las partes aéreas de *Verbena carolina* fueron compradas en el mercado de Sonora de la Ciudad de México, en el puesto “Plantas medicinales Doña Max y Karina”; un ejemplar de referencia se encuentra depositado en el herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos y fueron identificadas por las Maestras Margarita Avilés y Macrina Fuentes, con el siguiente número de clasificación: INAHM-2018.

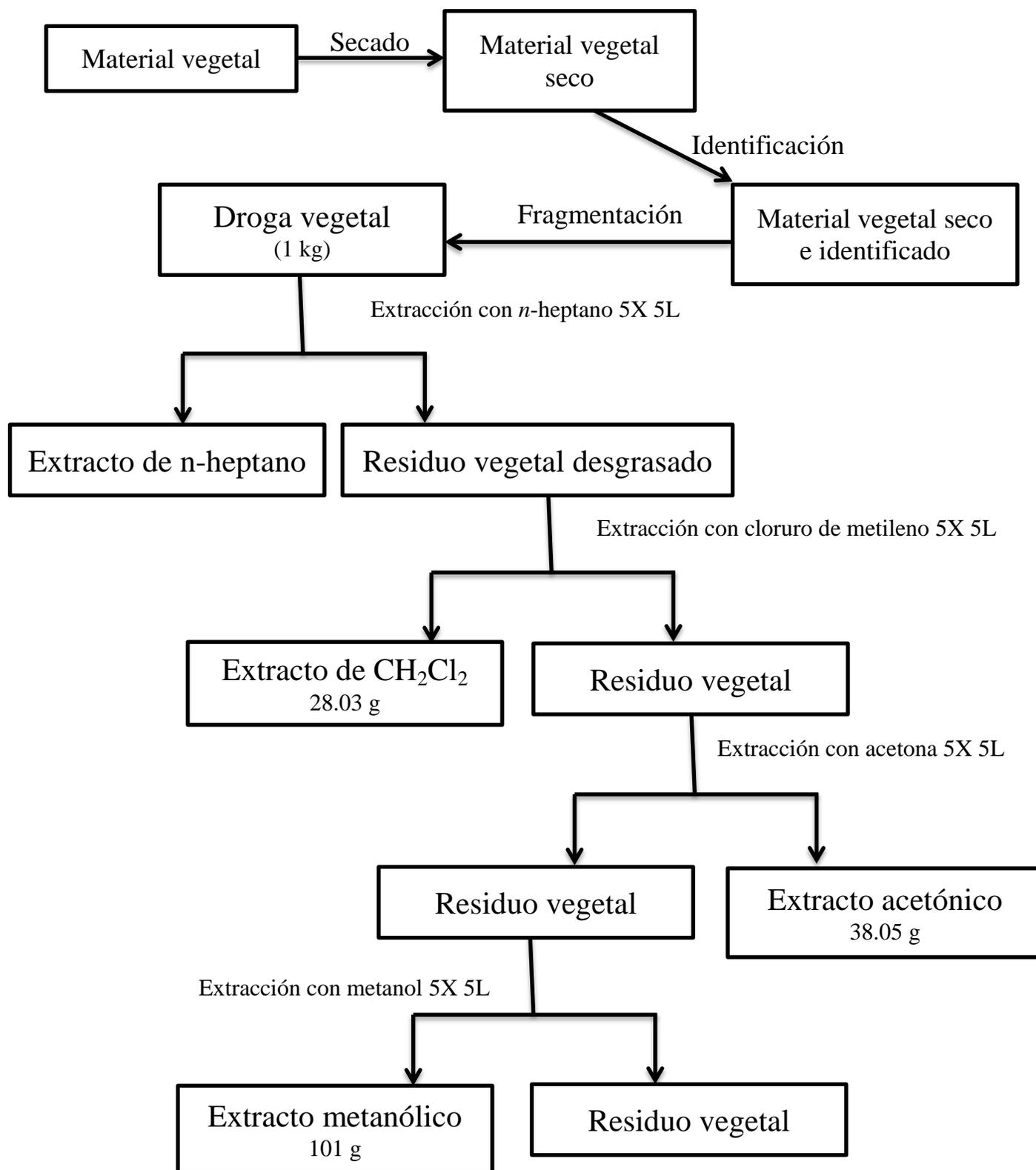
6.4 Extracción

3.4 kg del material vegetal (partes aéreas de *V. carolina*) fueron sometidos a secado a temperatura ambiente sobre papel de estraza por aireación, siendo separado en tres lotes de acuerdo a su origen, dos manojos de origen silvestre (1.3 kg cada uno) y otro cultivado (0.8 kg), los pesos finales reflejaron una pérdida de humedad de 62.5 y 69.8 % respectivamente (colecta silvestre y cultivada).

El material seco fue molido empleando una licuadora de potencia industrial provista de vaso de acero inoxidable, los lotes obtenidos del proceso de molienda fueron almacenados (droga vegetal).

1 kg de droga vegetal proveniente de los tres lotes mezclados uniformemente fueron extraídos con *n*-heptano por percolación en una columna de vidrio con llave de paso, provista de filtro de gasa y algodón, por 24 horas. El disolvente conteniendo el extracto fue recuperado mediante evaporación a presión reducida, repitiendo dicho ciclo cinco veces, colectando en cada caso el residuo en un recipiente contenedor.

Una vez agotada la materia prima fue extraída con cloruro de metileno grado analítico, repitiendo el ciclo de extracción cinco veces. Posteriormente se extrajo con acetona destilada y después con metanol destilado, obteniéndose respectivamente los extractos de *n*-heptano, cloruro de metileno, acetona y metanol, como se observa en el Esquema 1.



Esquema 1. Procedimiento de extracción de partes aéreas de *V. carolina* L.



6.5 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico

50 gramos del extracto metanólico fueron adsorbidos en 50 gramos de gel de sílice 60G siendo suspendidos con cloruro de metileno grado QP destilado, evitando la formación excesiva de grumos y se permitió su secado durante la noche. El extracto adsorbido se homogeneizó con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino color verde.

En una columna cromatográfica abierta de vidrio se colocó un filtro de gasa y algodón, seguido de un sello de sulfato de sodio anhidro grado técnico (aprox. 5 g) y 150 gramos de sílica gel 60G suspendidos en cloroformo destilado. Se aplicó el extracto adsorbido previamente homogeneizado y se selló con sulfato de sodio. La elución se efectuó con mezclas de disolventes de polaridad creciente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$; se monitoreó el fraccionamiento con CCD y se juntaron las fracciones con contenido químico con RF similar como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico

Fracciones	Composición	Volumen por fracción	Descripción de la fracción	Cantidad de residuo (g)
1-19	CHCl_3	40 mL	Incoloro	0
20-23	CHCl_3	40 mL	Amarillo	0.005
24-68	CHCl_3	40 mL	Incoloro	0
69-78	CHCl_3	40 mL	Verde	0.01
79-94	CHCl_3	40 mL	Verde	0.01
95-98	CHCl_3	200 mL	Verde	0.008
99-107	49:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Verde	0.368
108-112	49:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.027
113-115	19:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Verde	0.245
116-118	19:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.314
119-124	19:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.204
125-132	19:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.3
133-134	19:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Verde cristalino	0.603
135-136	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.09
137-139	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.341
140	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.252
141	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.449
142	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.34
143	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	0.676
144-157	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	3.51
158-165	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	1.19
166-174	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	1.35
175-183	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	1.2
184-190	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	1.5
191-197	9:1:: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$	200 mL	Amarillo	2



198	9:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo	0.2
199-205	9:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo	0.9
206-215	9:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo	2.7
216-225	8:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	0.4
226-236	8:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	2
237-243	6:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo	3
244-249	5:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	0.6
250-256	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	4
257	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	0.06
258	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	0.06
259	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo obscuro	0.2
260-264	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	200 mL	Amarillo	0.9
265-273	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Amarillo (presencia precipitado)	3.5
274-279	4:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Amarillo	2.8
280-297	7:3:: CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Amarillo	5
298-304	2:1:: CHCl ₃ :CH ₃ OH 1.5:1::CHCl ₃ :CH ₃ OH 1:1:: CHCl ₃ :CH ₃ OH 1:1.5:: CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Amarillo obscuro	3.8
305-312	3:7::CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Ámbar	2.9
313-317	1:9:: CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Ámbar	3.2
318-326	1:9:: CHCl ₃ :CH ₃ OH	600 mL	Amarillo	1.8
327-333	CH ₃ OH	600 mL	Amarillo obscuro	3.1



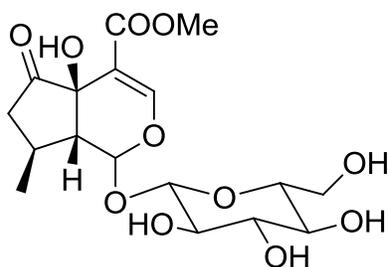
6.5.1 Aislamiento del hastatósido (I)

En las fracciones 144-157 del fraccionamiento cromatográfico primario se detectó un compuesto cuyo Rf en CCD correspondía con el de un estándar de I, por lo que se purificó por CCA empleando como fase estacionaria gel de sílice 60G. 3.5 g de la muestra fueron adsorbidos en 3 gramos de gel de sílice, y se fraccionaron en una columna cromatográfica de vidrio previamente empacada con 30 g de gel de sílice 60G suspendidos en *n*-hexano. La muestra fue eluida con mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo y metanol como se muestra en la Tabla 5 (Se identifican las fracciones obtenidas para la purificación del hastatósido (I) con una letra A para ser diferenciadas del fraccionamiento primario).

Tabla 5. Purificación del hastatósido por CCA

Fracciones	Composición	Volumen por fracción (mL)	Descripción de la fracción	Masa (mg)
1A-18A	hexano:AcOEt::1:1	40 mL	Amarillo verdoso	15.2
19A-32A	AcOEt	120 mL	Verde cristalino	40
33A-39A	AcOEt	120 mL	Verde cristalino	95.3
40A-43A	AcOEt	120 mL	Amarillo	81.3
44A-56A	AcOEt	120 mL	Amarillo	55.4
57A	AcOEt	120 mL	Amarillo	27.4
58A	AcOEt	120 mL	Blanco	32.1
59A	MeOH	300 mL	Café	220.3

De la fracción 57A se obtuvo un sólido color amarillo claro, que forma cristales muy pequeños, mostró pureza cromatográfica y se confirmó su identidad como la del hastatósido (I) mediante técnicas espectroscópicas (RMN).



I

6.5.2 Aislamiento de la verbenalina (II).

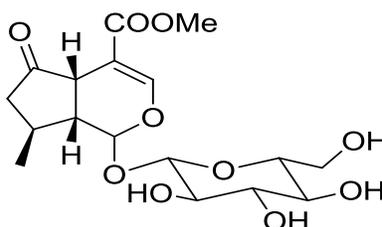
De las fracciones primarias 133-134 del fraccionamiento cromatográfico primario se obtuvo un compuesto cristalino color verdoso, cuyo Rf coincidió con el de la verbenalina al ser comparado con un estándar. Este compuesto presentaba un color verdoso atribuible a la presencia de clorofilas, fue recristalizado dos veces empleando mezclas *n*-hexano/AcOEt, obteniéndose un sólido cristalino incoloro, el cual se purificó por CCA de gel de sílice, adsorbiendo 200 mg provenientes de las fracciones 133-134 en 300 mg de gel de sílice. Se fraccionó con acetato de etilo de manera isocrática. Se resume en la Tabla 6.



Tabla 6. Purificación de la verbenalina por CCA.

Fracciones	Composición	Volumen por fracción (mL)	Descripción física	Masa (mg)
1B-10B	AcOEt	40 mL	Incoloro	0
11B-12B	AcOEt	40 mL	Cristales incoloros	31
13B-15B	AcOEt	40 mL	Cristales incoloros	12
16B	AcOEt	40 mL	Cristales incoloros	18
17B	AcOEt	40 mL	Cristales incoloros	17
18B-25B	AcOEt	40 mL	Ligeramente amarillo	5

Las fracciones secundarias obtenidas para la purificación de la verbenalina (II) se identifican con una letra B. Las fracciones 11B a la 17B presentaron la presencia de un sólido cristalino, siendo las más puras las 16B y 17B por CCD. Por comparación con un estándar de verbenalina (II) y análisis espectroscópicos (RMN) se confirmó la identidad de éste compuesto.



II

6.5.3 Aislamiento del verbascósido (III)

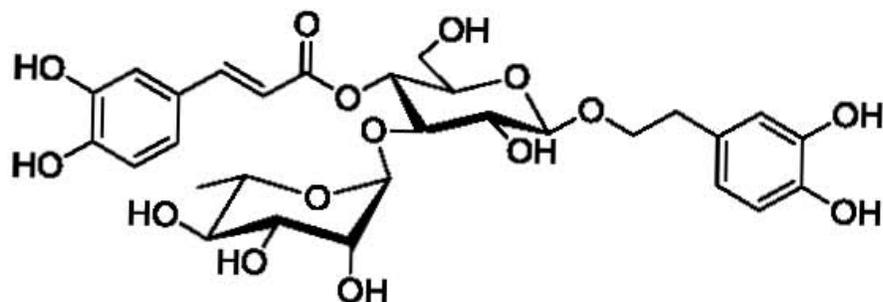
En las fracciones primarias 226-236 (2 g) se detectó la presencia del verbascósido (III) por CCD; se procedió a su purificación mediante CCA, de gel de sílice, para lo cual se adsorbieron en 1.5 g de gel de sílice en una columna cromatográfica con 15 g de gel de sílice en AcOEt. La elución se llevó a cabo con AcOEt y metanol de manera isocrática, como se muestra en la Tabla 7 (Las fracciones secundarias obtenidas de la purificación del verbascósido (III) se identifican con una letra C).

Tabla 7. Purificación del verbascósido (III) por CCA.

Fracciones	Composición	Volumen por fracción (mL)	Descripción física	Masa (mg)
1C-3C	AcOEt	40 mL	Incoloro	5
4C-10C	AcOEt	40 mL	Blanco cristalino	120
11C-14C	AcOEt	40 mL	Amarillo cristalino	180
15C	AcOEt	40 mL	Café	30
16C-18C	AcOEt	40 mL	Café	25
19C-20C	AcOEt	40 mL	Café	30
21C	AcOEt	40 mL	Café	30
22C	MeOH	80 mL	Café	40



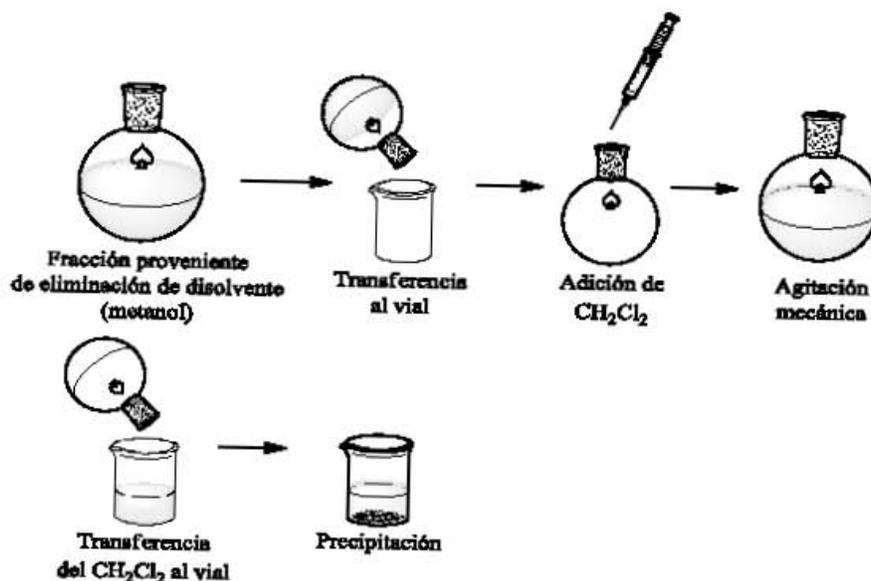
De las fracciones secundarias 19C-20C se obtuvieron 30 mg de un sólido café constituido en su totalidad por verbascósido (III) el cual mostró pureza cromatográfica y coincidencia en su R_f con el de un estándar. Su identidad se confirmó mediante espectroscopía RMN.



III

6.5.4 Aislamiento y elucidación estructural por métodos espectroscópicos del 7-O- β -D-glucurónido de la hispidulina (7OGH) por RMN.

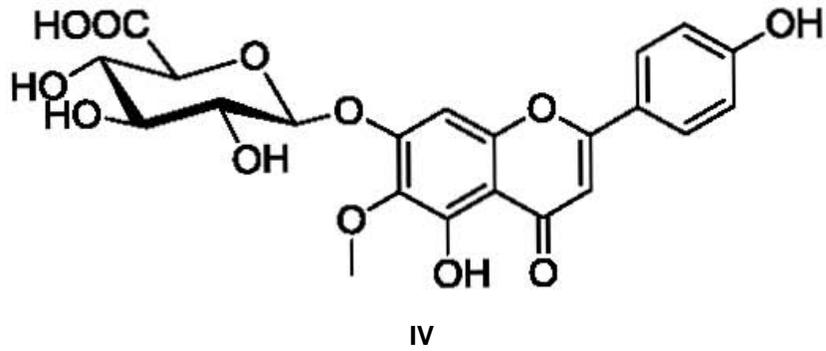
En las fracciones 265-273 del fraccionamiento cromatográfico primario se detectó un compuesto que precipitó por el cambio de polaridad provocado al transferir las fracciones del matraz del rotaevaporador al frasco vial, con metanol y cloruro de metileno. Dicho comportamiento fue aprovechado, obteniendo así de cada fracción mencionada un compuesto de color blanquecino ligeramente amarillo, amorfo. El método de obtención se representa en el Esquema 2.



Esquema 2. Obtención del 7OGH por precipitación.



La estructura flavonoide de dicho compuesto se elucidó mediante RMN y se identificó como 7-O- β -D-glucurónido de hispidulina, (**IV**). Su estructura se muestra a continuación.





6.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.6.1 Pruebas preliminares para la validación del método por CLAE.

Los compuestos marcadores de *V. carolina* fueron determinados con base en datos bibliográficos (Deepak, 2000) y los reportes de Morales (2009), que confirman la existencia de los mismos en la droga vegetal y reportan sus propiedades ópticas (absorción en UV), que comprueban que es posible evaluarlos por CLAE empleando un detector UV-visible.

Las condiciones cromatográficas fueron determinadas de manera experimental, inyectando una mezcla de los cuatro compuestos marcadores puros, encontrando las condiciones óptimas de trabajo abajo descritas, corroborando su aplicabilidad al inyectar posteriormente los extractos metanólicos.

Columna: PrincetonSPHER-100 C18, 100 Å, 150 x 4.6 mm, 3µm.

Volumen de inyección: 20 µL

Longitudes de onda de detección: 240 y 330 nm.

Disolvente para las muestras: Metanol

Temperatura del horno: 30°C

Gradiente de elución: Sistema H₂O/H⁺ (ácido acético 0.1%)-acetonitrilo. Las condiciones de gradiente se muestran en la Tabla 8 y Gráfico 1.

Tabla 8. Condiciones de gradiente de elución.

Tiempo (minutos)	Flujo (mL/min)	Acetonitrilo (%)	H ₂ O/H ⁺ (%)
Inicial	0.7	4	96
8	0.7	20	80
14	0.7	40	60
16	0.7	65	35
18	0.7	100	0
20	0.7	100	0
22	0.7	4	96

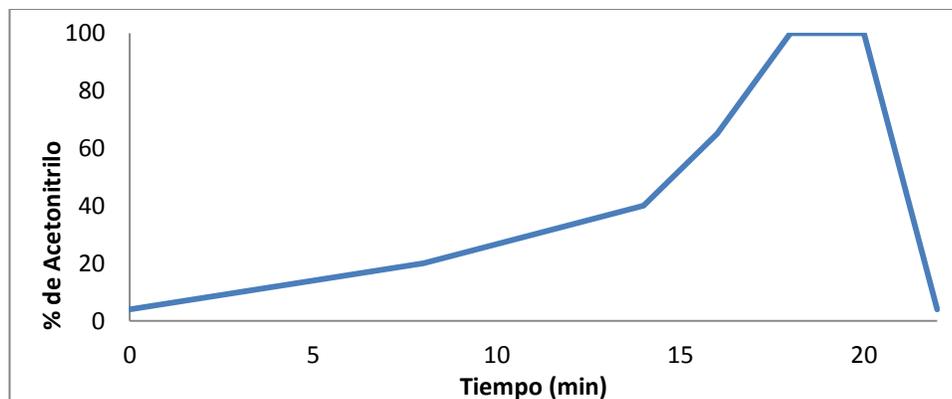


Gráfico 1. Gradiente de elución



Se comprobó que el contenido metabólico de los extractos metanólicos de *V. carolina* podía ser resuelto con las condiciones instrumentales arriba mencionadas, como se muestra en las Figuras 13 y 14.

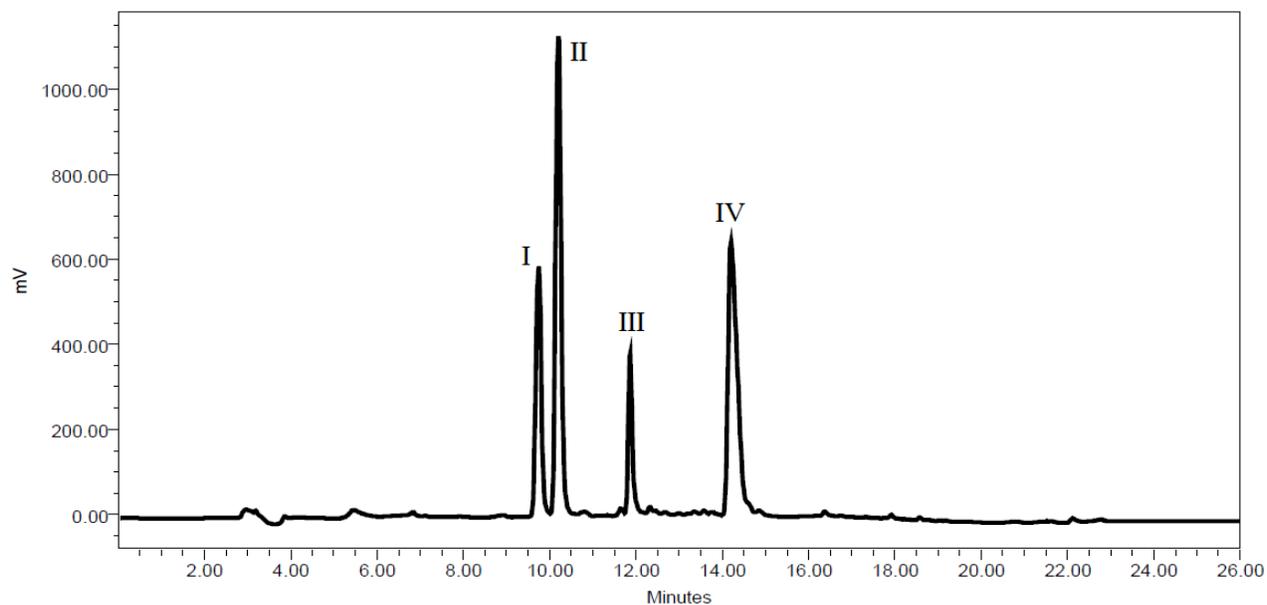


Figura 13. Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos marcadores

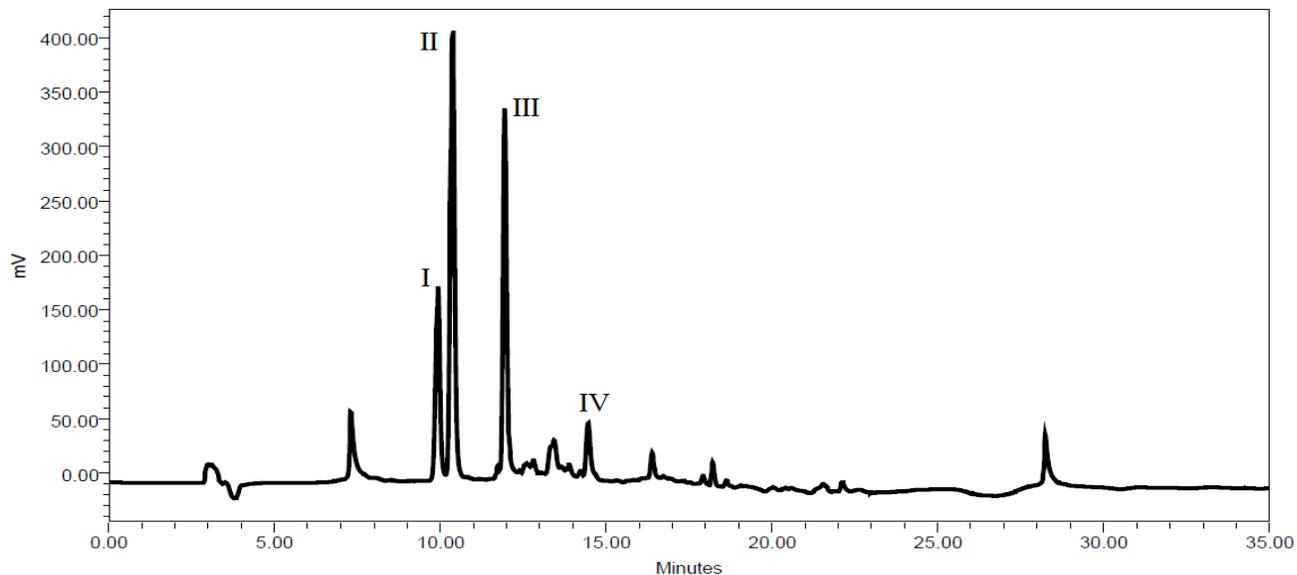


Figura 14. Cromatograma del extracto metanólico.



La identidad de cada pico se demostró inyectando el extracto metanólico cuatro veces, enriqueciendo cada muestra con cada compuesto puro, como se muestra en la Figura 15.

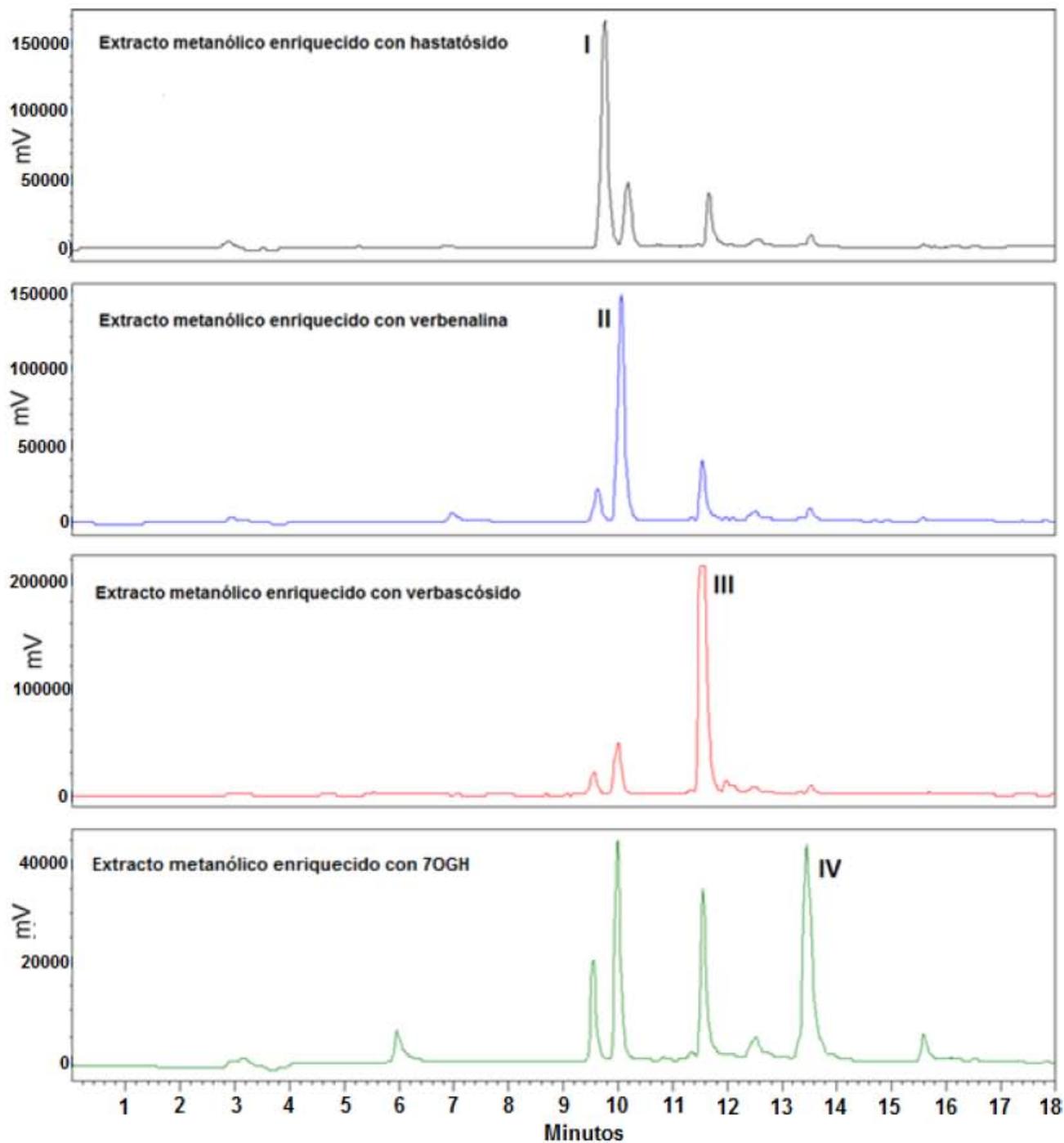


Figura 15. Cromatogramas del extracto metanólico enriquecido con hastatósido (I), verbenalina (II), verbascósido (III) y 7OGH (IV).



6.6.1.1 Método de extracción para la cuantificación por CLAE

Se utilizó ultrasonido como método de extracción de los metabolitos secundarios. Se pesaron con precisión y exactitud 50 mg de la droga vegetal (partes aéreas de *V. carolina*), previamente secas, fragmentadas y tamizadas con criba de 1.4 mm por triplicado. El material vegetal se transfirió a tubos para centrífuga con capacidad para 15 mL; se agregaron 3 mL de metanol y sometió a extracción con ultrasonido durante 15 minutos; posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. El extracto se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con metanol. Una cantidad apropiada de cada muestra se filtró con acrodiscos de 0.45 μm e inyectó al CL.

6.6.1.2 Determinación de los rangos para cada compuesto marcador.

Los rangos de concentraciones de trabajo fueron determinados con base en la altura promedio de los picos cromatográficos obtenidos de las respuestas de cada compuesto marcador en los extractos. Se prepararon soluciones de cada compuesto puro con concentraciones conocidas y comparó su altura con la de los picos correspondientes a cada compuesto en los cromatogramas de los extractos. La concentración de cada metabolito se calculó por el método de comparación con su estándar, considerando la concentración de cada compuesto en el extracto como un 100% o concentración de trabajo. Los datos para la determinación de las concentraciones de trabajo se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Determinación de las concentraciones de trabajo para cada metabolito.

Compuesto marcador	Longitud de onda de medición (nm)	Altura promedio del pico en el extracto (mV)	Altura del pico a una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (mV)	Concentración del compuesto marcador ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Hastatósido	240	175017	1076341	40.65
Verbenalina	240	409647	1414288	72.41
Verbascósido	330	561570	1547030	90.74
7OGH	330	105049	322291	81.48

Los valores obtenidos de concentraciones para los compuestos arriba citados fueron: 40, 70, 90 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

6.6.1.3 Preparación de las soluciones “stock”

Se prepararon de manera independiente cuatro soluciones “stock”, correspondientes a cada uno de los compuestos puros, con una concentración equivalente al 1500% de las concentraciones de trabajo, nombradas stock A, como se muestra en la Tabla 10.

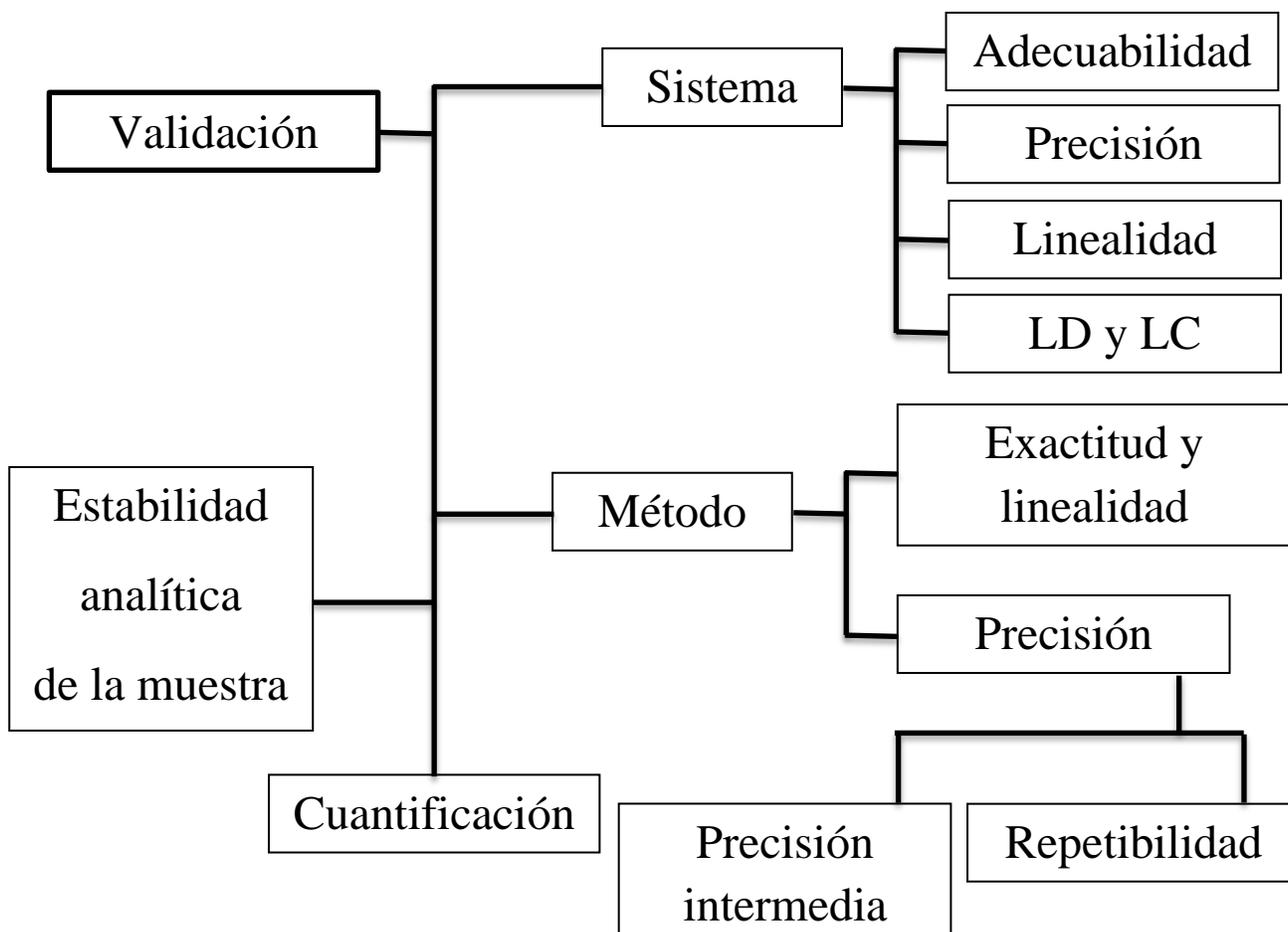


Tabla 10. Preparación de las soluciones stock A.

Compuesto marcador	Cantidad pesada (mg)	Aforo (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración relativa (%)
Hastatósido	6	10	600	1500
Verbenalina	10.5	10	1050	1500
Verbascósido	13.5	10	1350	1500
7OGH	12	10	1200	1500

A partir de las soluciones “stock” A, se preparó una solución “stock” B, mezclando volúmenes iguales de las soluciones “stock” A y se ajustó el volumen para obtener una concentración final equivalente al 300% de las concentraciones de trabajo de la manera siguiente: se mezcló 1 mL de cada una de las soluciones “stock” A y aforó a 5 mL. Se obtuvo así una mezcla de los cuatro compuestos marcadores, cada uno con una concentración relativa del 300% con respecto a la solución de trabajo. Asimismo, el “stock” B comprende el punto más alto de las concentraciones que serán empleadas en la validación del método, evaluando concentraciones correspondientes al 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300% con respecto a la solución de trabajo.

En el Esquema 3 se muestra el plan de trabajo a desarrollar, así como los parámetros de desempeño a evaluar.



Esquema 3. Plan de trabajo para la validación del método analítico por CLAE para la cuantificación de los compuestos marcadores de *V. carolina* L.



6.6.2 Validación del sistema por CLAE

6.6.2.1 Adecuabilidad del sistema

A partir del “stock” B, se preparó una solución, con una concentración equivalente al 80% de la cantidad de cada marcador estimada en el extracto. Se registró la respuesta de cada metabolito para calcular el CV. Criterio de aceptación: $CV \leq 1.5\%$ y cumplir con los parámetros de desempeño resumidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros de desempeño para adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Límite
Tiempo de retención	-
Tiempo muerto	-
Factor de capacidad k'	>2
Factor de coleo	<2
Número de platos teóricos	-

6.6.2.2 Precisión del sistema

Se prepararon por sextuplicado y por dilución independiente a partir del stock B, soluciones con una concentración equivalente al 100% de la cantidad de cada marcador, se midió la respuesta analítica de cada metabolito y posteriormente se calcularon la media aritmética, desviación estándar y CV. Criterio de aceptación: $CV \leq 1.5\%$.

6.6.2.3 Linealidad del sistema

A partir del stock B, se prepararon soluciones equivalentes a siete niveles de concentraciones, por triplicado y por diluciones independientes, representando 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300% con respecto a las concentraciones estimadas de cada metabolito en el extracto, representando tres puntos superiores y tres inferiores a la concentración de trabajo estimada, dichas soluciones fueron inyectadas al CL, las respuestas respectivas fueron registradas y fueron calculados los valores siguientes: pendientes (b_1), ordenadas al origen (b_0), coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de correlación lineal (r) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, $IC(\beta_1)$ no debe incluir el 0.

En la Tabla 12 se muestran las concentraciones correspondientes a cada nivel de la curva de calibración lineal para cada compuesto marcador.

**Tabla 12.** Concentraciones de cada metabolito con respecto a las estimadas en el extracto.

Compuesto marcador	Nivel de concentración ($\mu\text{g/mL}$)						
	12.5%	25%	50%	100%	150%	200%	300%
I (Hastatósido)	5	10	20	40	60	80	120
II (Verbenalina)	8.75	17.5	35	70	140	175	210
III (Verbascósido)	22.8	45	90	135	180	225	270
IV (7OGH)	10	20	40	80	120	160	240

6.6.2.4 Sensibilidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Se prepararon soluciones por triplicado a partir del stock B, evaluando niveles de concentración por debajo de los empleados para determinar linealidad del sistema, para determinar la concentración más baja en la que los compuestos son detectados y calculando con base al CV entre ellos, la concentración más baja en la que pueden ser cuantificados de manera precisa, las concentraciones evaluadas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones empleadas para calcular LD y LC.

Compuesto marcador	Nivel de concentración ($\mu\text{g/mL}$)					
	1.5625%	3.125%	6.25%	12.5%	25%	50%
I (Hastatósido)	0.625	1.25	2.5	5	10	20
II (Verbenalina)	1.09375	2.1875	4.375	8.75	17.5	35
III (Verbascósido)	1.403125	2.80625	5.6125	11.225	22.5	45
IV (7OGH)	1.25	2.5	5	10	20	40

6.6.3 Validación del método analítico por CLAE

6.6.3.1 Linealidad y exactitud del método

Se preparó un placebo analítico que consistió en partes aéreas de *V. carolina* L. previamente sometidas a secado, fragmentación y tamizado a través de una criba de 1.4 mm, sometidas al proceso de extracción de los metabolitos secundarios hasta quedar agotados los mismos en la matriz vegetal, comprobando su ausencia al someter una cantidad equivalente a la de trabajo (50 mg) en proceso de extracción descrito en el apartado 5.1.1.1 e inyectando la solución al CL y comprobando la inexistencia de las señales correspondientes.

A la cantidad equivalente (50 mg) del placebo analítico, se le agregaron cantidades conocidas de cada compuesto marcador, correspondientes a las concentraciones relativas de 50%, 100% y 150% de las concentraciones de trabajo, por triplicado y por mediciones independientes. Fueron sometidas al proceso de extracción y se inyectaron dichas soluciones al CL, registrando las respuestas y se interpolaron en la curva de calibración lineal del sistema obteniendo las concentraciones experimentales para cada inyección, a partir de dichos datos se calcularon los porcentajes de recobro de las muestras, los coeficientes de determinación (r^2), coeficientes de correlación lineal (r), pendientes (b_1), ordenadas al origen (b_0), el intervalos de confianza para las pendientes ($IC(\beta_1)$), intervalos



de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$), media poblacional (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$). Criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, $IC(\beta_1)$ no debe incluir el 0, $IC(\beta_0)$ debe incluir el 0, $CV_{y/x} \leq 2\%$ y $IC(\mu)$ debe incluir el valor de 100%.

6.6.3.2 Precisión del método

Se evaluó mediante los parámetros de *Repetibilidad* y *Precisión intermedia*.

6.6.3.2.1 Repetibilidad

La determinación de la repetibilidad se llevó a cabo mediante la metodología empleada en “linealidad del método”, evaluando por sextuplicado cada placebo analítico enriquecido con las cantidades de los compuestos marcadores necesarios para obtener las concentraciones relativas al 100% para cada compuesto. A partir de las respuestas analíticas se calcularon los porcentajes de recobro para cada muestra, determinando su media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro. Criterios de aceptación: $CV \leq 2\%$, $IC(\mu)$ incluye el valor de 100%.

6.6.3.2.2 Precisión intermedia o tolerancia interdía / analista.

La precisión intermedia se realizó analizando por triplicado una muestra homogénea en un nivel equivalente al 100% de la concentración de trabajo, en dos días y por dos analistas, usando la misma solución de referencia, así como los instrumentos y equipos. A partir de las respuestas analíticas se calcularon la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV). Criterio de aceptación: $CV \leq 2\%$.

6.6.4 Estabilidad analítica de la muestra.

El proceso de análisis de la estabilidad analítica de la muestra se llevó a cabo con muestras independientes a partir de una muestra homogénea, el análisis se realizó por triplicado y de manera simultánea para cada una de las siguientes condiciones.

- Temperatura ambiente en presencia de luz
- Temperatura ambiente en ausencia de luz
- 4°C en presencia de luz
- 4°C en ausencia de luz
- 37°C en ausencia de luz

Los resultados se reportaron en los siguientes intervalos de tiempo (0, 24 y 72 horas, 8 días). Se calcularon la media aritmética del análisis inicial (\bar{y}_0), para cada condición de almacenaje (\bar{y}_1) y la diferencia absoluta de la muestra aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$). Criterio de aceptación: $|d_i| \leq 2\%$.



6.6.5 Cuantificación de metabolitos secundarios en *V. carolina*

Para determinar la cantidad de los cuatro metabolitos secundarios de interés presentes en las partes aéreas de *V. carolina* L. se empleó el método descrito en “Método de extracción para la cuantificación por CLAE” (apartado 5.1.1.1). Se obtuvo la respuesta analítica en el CL, misma que fue interpolada en la curva de calibración obtenida en “Linealidad del sistema” (apartado 5.6.2.3). A partir de la ecuación de la regresión se calculó la concentración de cada compuesto marcador contenida en las distintas colectas.

6.7 Pruebas de toxicidad aguda por el método de Lorke

Se evaluó un extracto proveniente de una decocción, en dos etapas. Se emplearon ratones macho con un rango de peso de 20 a 26 g, adquiridos en Harlan, adaptados a las condiciones de bioterio: 21°C, humedad relativa entre 79 y 80%, y con ciclos de 12 h de luz/obscuridad.

Se evaluó la toxicidad de los extractos de la planta empleando los rangos de dosis descritos por Lorke⁴⁵, 10, 100 y 1000 mg/kg de peso en la primera fase. En la segunda fase se emplearon 1600, 2900 y 5000 mg/kg de peso, utilizando tres animales para evaluar cada dosis y un grupo control en ambas fases que fue administrado con solución de NaCl al 0.9% m/v; todos los animales fueron administrados por vía oral y en dosis única. Los animales fueron privados de alimento durante 4 horas previo a la administración pero se mantuvo el suministro de agua.

Los animales fueron monitoreados durante 14 días en ambas fases, se efectuó un seguimiento de sus pesos y comportamiento (nivel de actividad, agresividad, etc); al término de la evaluación fueron sacrificados en la cámara de CO₂ de acuerdo a lo establecido por la norma (NOM-062-ZOO-1999) y siguiendo las normas de ética para el manejo de animales de laboratorio.

Se realizó también un estudio *post mortem* de todos los animales evaluando las características físicas de los órganos internos principales (corazón, pulmones, hígado, estómago, intestinos y riñones) con la finalidad de detectar alguna alteración atribuible a toxicidad inducida por la administración de los extractos.

Asimismo se eliminaron del estudio los ratones que murieron producto de la administración, mismos que fueron disectados para evaluar sus órganos internos vitales para confirmar la muerte por dicha causa.

⁴⁵ Lorke, D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. **54**: 275-287



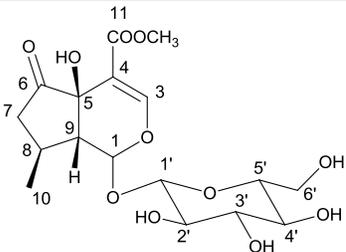
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento y confirmación estructural de los compuestos marcadores

7.1.1 Aislamiento del hastatósido (I)

En las fracciones 144-157 del fraccionamiento cromatográfico inicial se detectó un compuesto cuyo R_f en CCD correspondía al del estándar de I, por lo que se procedió a purificarlo por CCA empleando como fase estacionaria gel de sílice 60G. El tratamiento cromatográfico por columna eluyendo con mezclas *n*-hexano/acetato de etilo y metanol dio como resultado la obtención de cristales pequeños color amarillo claro, cuya identidad fue confirmada mediante sus características espectroscópicas que se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos espectroscópicos del hastatósido (I).

Datos	
Fórmula	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁
Estructura	
p.f.	103 - 105°C
IR	V _{max} . (pastilla) cm ⁻¹ : 3381, 2957, 2926, 1753, 1710, 1621, 1440, 1383, 1297, 1076, 932, 870, 853, 778, 686, 635.
¹ H RMN (Espectro 1)	400 MHz, CD ₃ OD, δ: 7.71 (1H, s H-3), 5.95 (1H, d, J=1.8 Hz, H-1), 4.64 (1H, d, J=7.8 Hz, H-1'), 3.93 (1H, dd, J=11.85, 2.1 Hz, H _a -6'), 3.69 (3H, s, O-CH ₃), 3.66 (1H, dd, J=12, 6Hz, H _b -6'), 3.38 (1H, dd, J=14.8, 8.7Hz, H-5'), 3.34 (1H, m, H-3'), 3.29 (1H, m, H-4'), 3.20 (1H, dd, J=16,8 Hz, H-2'), 2.75 (1H, dd, J=18.4, 9.8Hz, H _a -7), 2.16 (1H, dd, J=12, 4.2Hz, H-9), 1.99 (1H, m, H-8), 1.88 (1H, dd, J=18.6, 9.8Hz, H _b -7) y 1.20 (3H, d, J=6.3Hz, H-10)
¹³ C RMN (Espectro 2)	100 MHz, CD ₃ OD, δ: 211.9 (C-6), 167.3 (C-11), 156.4 (C-3), 107.2 (C-4), 100.6 (C-1'), 94.7 (C-1), 78.5 (C-5'), 77.4 (C-3'), 74.6 (C-5), 74.3 (C-2'), 71.5 (C-4'), 62.7 (C-6'), 53.3 (C-9), 51.8 (O-CH ₃), 41.1 (C-7), 27.2 (C-8), 20.0 (C-10).

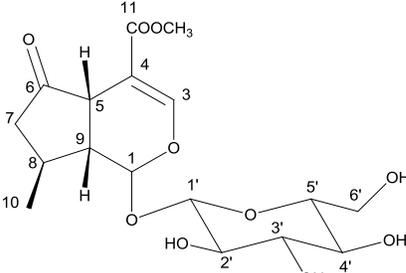
El punto de fusión de obtuvo en un equipo Fisher – Johns y no está corregido.



7.1.2 Aislamiento de la verbenalina (II).

De las fracciones 133-134 del fraccionamiento cromatográfico primario se obtuvo un compuesto cristalino color verdoso, que fue purificado por recristalización y posterior CCA obteniéndose un sólido cristalino incoloro. Por análisis de RMN se confirmó la identidad del compuesto como verbenalina (II). Los datos espectroscópicos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Datos espectroscópicos de la verbenalina (II).

Datos	
Fórmula	$C_{11}H_{24}O_{10}$
Estructura	
p.f.	181-182°C
IR	V_{max} (pastilla) cm^{-1} : 3358, 2911, 2898, 1738, 1694, 1645, 1444, 1407, 1360, 1251, 1100, 1075, 1032, 992, 952, 910, 887, 871, 853, 816, 794, 769, 687.
1H RMN (Espectro 7)	300 MHz, CD_3OD , δ : 7.44 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-3), 5.21 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1), 4.64 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.88 (2H, dd, $J= 11.85, 2.1$ Hz, H_a-6'), 3.70 (3H, s, O- CH_3), 3.61 (1H, dd, $J= 11.85, 6$ Hz, H_b-6'), 3.52 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-5), 3.36 (1H, dd, $J= 8, 12$ Hz, $H3'$), 3.26 (1H, m, H-5'), 3.23 (1H, m, H-4'), 3.21 (1H, m, H-2'), 2.55 (1H, m, H-8), 2.21 (1H, m, H-9) 2.0 (2H, m, H7) y 1.23 (3H,d, $J= 6.9$ Hz, H-10).
^{13}C RMN (Espectro 8)	75 MHz, CD_3OD , δ : 215.7 (C-6), 166.8 (C-11), 153.7 (C-3), 105.4 (C-4), 100.6 (C-1'), 97.1 (C-1), 78.5 (C-5'), 78.0 (C-3'), 74.6 (C-2'), 71.5 (C-4'), 62.7 (C-6'), 51.9 (O- CH_3), 45.6 (C-9), 43.7 (C-7), 43.6 (C-5), 29.9 (C-8), 20.6 (C-10).

El punto de fusión de obtuvo en un equipo Fisher – Johns y no está corregido.



7.1.3 Aislamiento del verbascósido (III).

La purificación de las fracciones 226-236 (2g) del fraccionamiento cromatográfico primario, dio como resultado la obtención del verbascósido (III), al compararse con sus características físicas y espectroscópicas (Tabla 16) con las de una muestra estándar.

Tabla 16. Datos espectroscópicos del verbascósido (III).

Datos	
Fórmula	$C_{29}H_{36}O_{15}$
Estructura	
p.f.	110-111°C
IR	ν_{max} . (pastilla) cm^{-1} : 3328, 2927, 2071, 1698, 1628, 1598, 1516, 1258, 1033, 811, 565.
1H RMN (Espectro 14)	400 MHz, CD_3OD , δ : 7.59 (1H, d, $J=15.9Hz$, H7), 7.06 (1H, d, $J=1.2$, H2), 6.95 (1H, dd, $J=8.1, 2Hz$, H6), 6.78 (1H, dd, $J=8, 0.5 Hz$, H5), 6.69 (1H, m, H2') 6.67 (1H, d, $J=4$, H2'), 6.56, (1H m, H-5') 6.27 (1H, d, $J=16 Hz$, H8), 5.18 (1H, d, $J=2Hz$, H1''') 4.92 (1H, m, H4''), 4.37 (1H, d, $J=8Hz$, H1''), 4.05 (1H, m, H-8'), 3.92 (1H, m, H-2'''), 3.81 (1H, t, $J=16 Hz$, H-3''), 3.61 (1H, m, H3'''), 3.56 (1H, m, H-5'''), 3.52 (1H, m, H5''), 3.39 (1H, t, $J=16Hz$ H2'') 3.30 (1H, dd, $J=8, 0.5Hz$, H4''), 2.78 (2H, t, $J=16Hz$, H7'), 1.09 (3H, d, $J=8Hz$, H6''')
^{13}C RMN (Espectro 15)	100 MHz, CD_3OD , δ : 168.2 (C-9), 149.7 (C-4), 147.9 (C-7), 146.7 (C-3), 146.0 (C-3'), 144.6 (C-4'), 131.4 (C-1'), 127.6 (C-1), 123.2 (C-6), 121.2 (C-5'), 117.1 (C-2'), 116.5 (C-6'), 116.3 (C-5), 115.2 (C-2'), 104.1 (C1'''), 103.0 (C1'''), 81.6 (C3'''), 76.1 (C2'''), 75.9 (C5'''), 73.7 (C4'''), 72.3 (C6'''), 72.2 (C2'''), 72.0 (C5'''), 70.6 (C5'''), 70.5 (C4'''), 70.4 (C-6'') 62.3 (C2''), 61.5 (C-8') 36.5 (C-7') 18.4 (C6''').

El punto de fusión de obtuvo en un equipo Fisher – Johns y no está corregido.



7.1.4 Aislamiento y elucidación espectroscópica del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina (7OGH) por RMN.

Con el objetivo de aislar compuestos nuevos en la especie vegetal se estudió el extracto metanólico. En las fracciones 265-273 del fraccionamiento cromatográfico primario se detectó un compuesto que precipitó por el cambio de polaridad provocado al transferir las fracciones del matraz del rotaevaporador al frasco vial. Dicho comportamiento fue aprovechado, obteniendo así de cada fracción mencionada un compuesto blanquecino ligeramente amarillo, amorfo (Esquema 2).

Dicho compuesto fue estudiado mediante RMN, con lo que se pudo determinar que el enlace O-glicosídico del compuesto es en orientación β (Constante de acoplamiento H1''-H2'' = 8Hz), confirmando su identidad como la del 7OGH (IV), este compuesto no había sido reportado en la especie vegetal. Los datos espectroscópicos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Datos espectroscópicos del 7OGH (IV).

Datos	
Fórmula	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂
Estructura	
p.f.	182-184°C
[α]_D²⁵	-117.4°
IR	ν _{max} . (pastilla) cm ⁻¹ : 3332, 2922, 1656, 1602, 1509, 1488, 1459, 1351, 1251, 1182, 1066, 1021, 829, 711.
¹H RMN (Espectro 19)	400 MHz, DMSO-d ₆ , δ: 12.94 (1H, s, C5-OH), 7.75 (2H, d, J=8Hz, H6',H2'), 6.83 (1H,s, H8), 6.79 (2H, d, J=12Hz, H3', H5'), 6.66 (1H, s, H3), 5.12 (1H, d, J= 8Hz, H1''), 3.78 (3H, s, OCH ₃), 3.70 (1H, d, J=12Hz, H5''), 3.34 (2H, m, H2'', H3''), 3.26 (1H, dd, J=4, 10 Hz H4'').
¹³C RMN (Espectro 21)	100 MHz, DMSO-d ₆ , δ: 182.1 (C4), 172.5 (C6''), 164.2 (C2), 162.2 (C4'), 156.3 (C7), 152.3 (C5), 152.0 (C9), 132.3 (C6), 128.1 (C2'), 120.0 (C1'), 115.8 (C5'), 105.5 (C10), 102.0 (C3), 99.4 (C1''), 93.9 (C8), 76.6 (C3''), 73.8 (C5''), 72.9 (C2''), 71.9 (C4''), 60.2 (OCH ₃),

El punto de fusión de obtuvo en un equipo Fisher – Johns y no está corregido.



7.2 Validación de método analítico de cuantificación por CLAE

7.2.1 Validación del sistema

En el presente trabajo se diseñó el protocolo de validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, el cual incluyó la evaluación de parámetros que se evaluaron de forma estadística mediante la paquetería *Microsoft Office Excel 2010*.

7.2.1.1 Adecuabilidad del sistema

Se evaluó inyectando por quintuplicado una solución de referencia que contenía los compuestos marcadores a una concentración equivalente al 80% de la concentración de trabajo preparada a partir del stock B. Las respuestas analíticas (Área bajo la curva) para cada compuesto fueron registradas, se calcularon las medias aritméticas (\bar{y}), desviaciones estándar (S) y coeficientes de variación (CV). Los datos se concentran en la Tabla 18 y los parámetros de desempeño en la Tabla 19⁴⁴.

Tabla 18. Valores obtenidos para adecuabilidad del sistema

Inyecciones	Áreas bajo la curva ($\mu\text{V/s}$)			
	Hastatócido	Verbenalina	Verbascósido	7OGH
1	935592	2812749	3190752	608289
2	907103	2785163	3224819	614930
3	921349	2885149	3227156	625405
4	931482	2834794	3121749	617375
5	922999	2839219	3181373	618269
\bar{y}	923705	2831414.8	3189169.8	616853.6
S	10993.84	36903.01	42786.31	6173.61
CV	1.19%	1.30%	1.34%	1.00%

Tabla 19. Parámetros de desempeño para adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Hastatócido	Verbenalina	Verbascósido	7OGH	Criterio de aceptabilidad
Tiempo de retención (min)	8.76	9.44	13.22	15.67	-
Tiempo muerto (min)	2.82	2.82	2.82	2.82	-
Factor de capacidad k'	2.10	2.34	3.68	4.55	>2
Factor de coleo	1.07	1.14	1.90	1.37	<2
Número de platos teóricos por columna	8604	8238	15259	17840	-

⁴⁴ Colegio Mexicano de Químicos Farmacéuticos Biólogos (3000). Guía para la validación de métodos analíticos.



7.2.1.2 Precisión del sistema

Se evaluó inyectando seis soluciones preparadas por dilución independiente a partir del stock B, que contenían una concentración equivalente al 100% de la concentración de trabajo, se registraron las respuestas analíticas y se calcularon las medias aritméticas (\bar{y}), desviaciones estándar (S) y coeficientes de variación (CV), los cuales no excedieron el 1.5%, como criterio de aceptación, los datos se concentran en la Tabla 20.

Tabla 20. Valores obtenidos para precisión del sistema

Inyecciones	Áreas bajo la curva ($\mu\text{V/s}$)			
	Hastatócido	Verbenalina	Verbascósido	7OGH
1	1265451	3620855	3790738	782727
2	1266006	3543262	3680643	787068
3	1235617	3667520	3715960	763994
4	1234603	3681434	3697524	782621
5	1248097	3655542	3733101	798092
6	1243249	3639878	3631656	775942
\bar{y}	1248837.1	3634748.5	3708270.3	781740.6
S	13999.62	49547.95	53338.76	11367.17
CV	1.12%	1.36%	1.43%	1.45%

7.2.1.3 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema fue comprobada inyectando soluciones que contenían los compuestos marcadores preparadas a partir del stock B, con concentraciones equivalentes al 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300% con respecto a la concentración de trabajo, las soluciones fueron inyectadas por triplicado preparadas por dilución independiente. Los parámetros evaluados fueron: pendientes (b_1), ordenadas al origen (b_0), coeficientes de determinación (r^2), coeficientes de correlación lineal (r) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Los datos se muestran en las Tablas 21, 23, 25 y 27. Se cumplieron en todos los casos los criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, $IC(\beta_1)$; no incluyó el 0.



7.2.1.3.1 Linealidad del sistema para el hastatósido

Tabla 21. Valores obtenidos para linealidad del sistema del hastatósido

Inyecciones	Concentración relativa (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V/s}$)	CV
1	12.5	5	156369	1.99%
2	12.5	5	154381	
3	12.5	5	160509	
4	25	10	320756	0.97%
5	25	10	322435	
6	25	10	316395	
7	50	20	625047	1.74%
8	50	20	640813	
9	50	20	646468	
10	100	40	1209664	1.61%
11	100	40	1196914	
12	100	40	1235492	
13	150	60	1827036	1.98%
14	150	60	1844559	
15	150	60	1814036	
16	200	80	2482297	1.37%
17	200	80	2478037	
18	200	80	2421570	
19	300	120	3575437	1.67%
20	300	120	3693297	
21	300	120	3662056	

Los parámetros de desempeño para evaluar la linealidad del sistema fueron calculados mediante las herramientas estadísticas del “software” *Microsoft Office Excel 2010*, empleando los datos aislados. Se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde “y” representa el área de la respuesta cromatográfica ($\mu\text{V/s}$), b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y “x” la concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$). Los cálculos efectuados no incluyen el 0. Los criterios de aceptación se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Parámetros de desempeño para linealidad del sistema del hastatósido

Parámetro de desempeño	Valor	Criterio de aceptación
b_1	30308.01	-
b_0	15429.38	-
r	0.9997	≥ 0.999
r^2	0.9994	≥ 0.98
$S_{y/x}$	155.63	-
S_{b_1}	20051.93	-
IC (β_1)	29982.2 30633.7	No incluye al 0

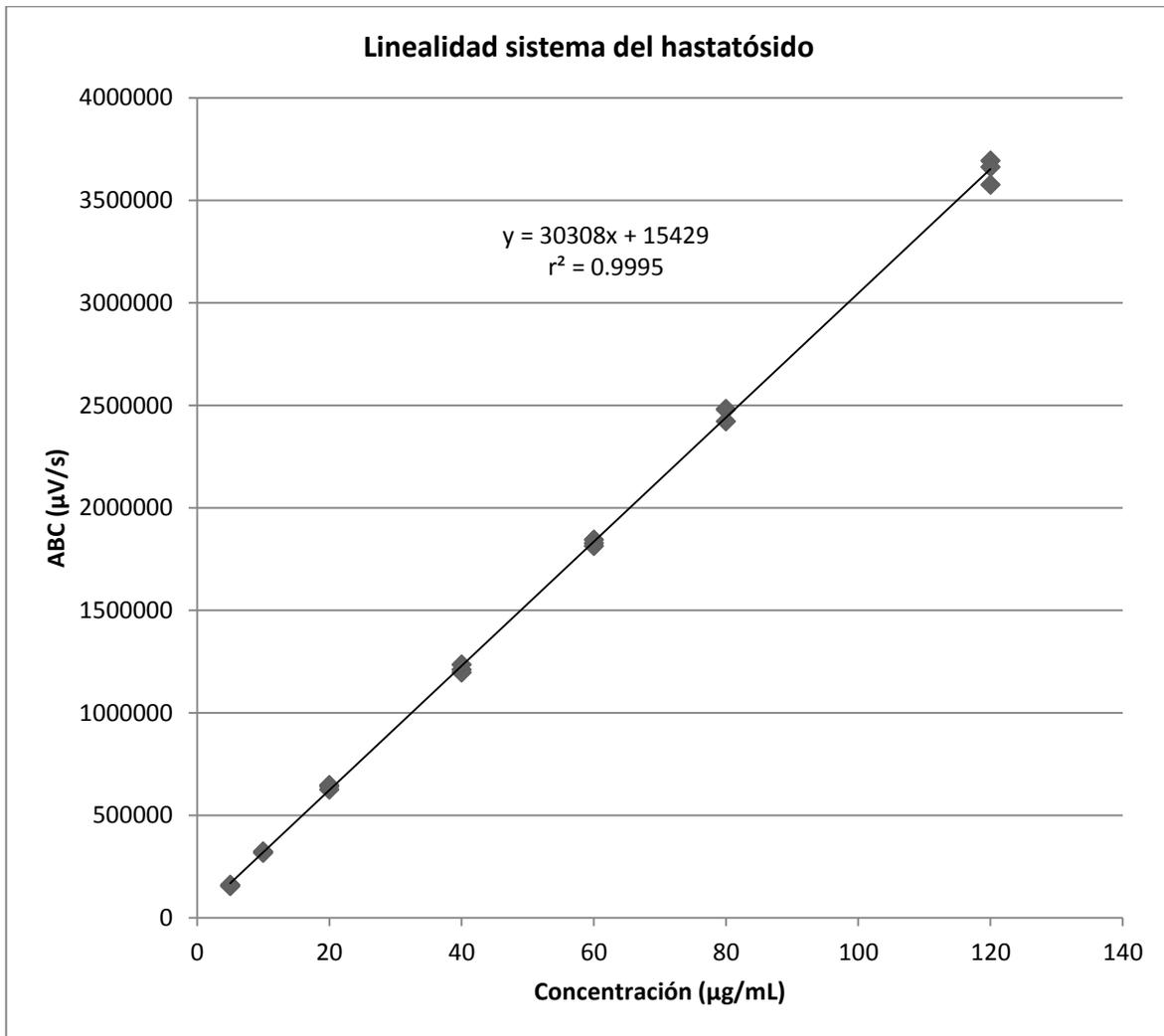


Gráfico 2. Linealidad del sistema para el hastatósido



7.2.1.3.2 Linealidad del sistema para la verbenalina

Tabla 23. Valores obtenidos para linealidad del sistema de la verbenalina

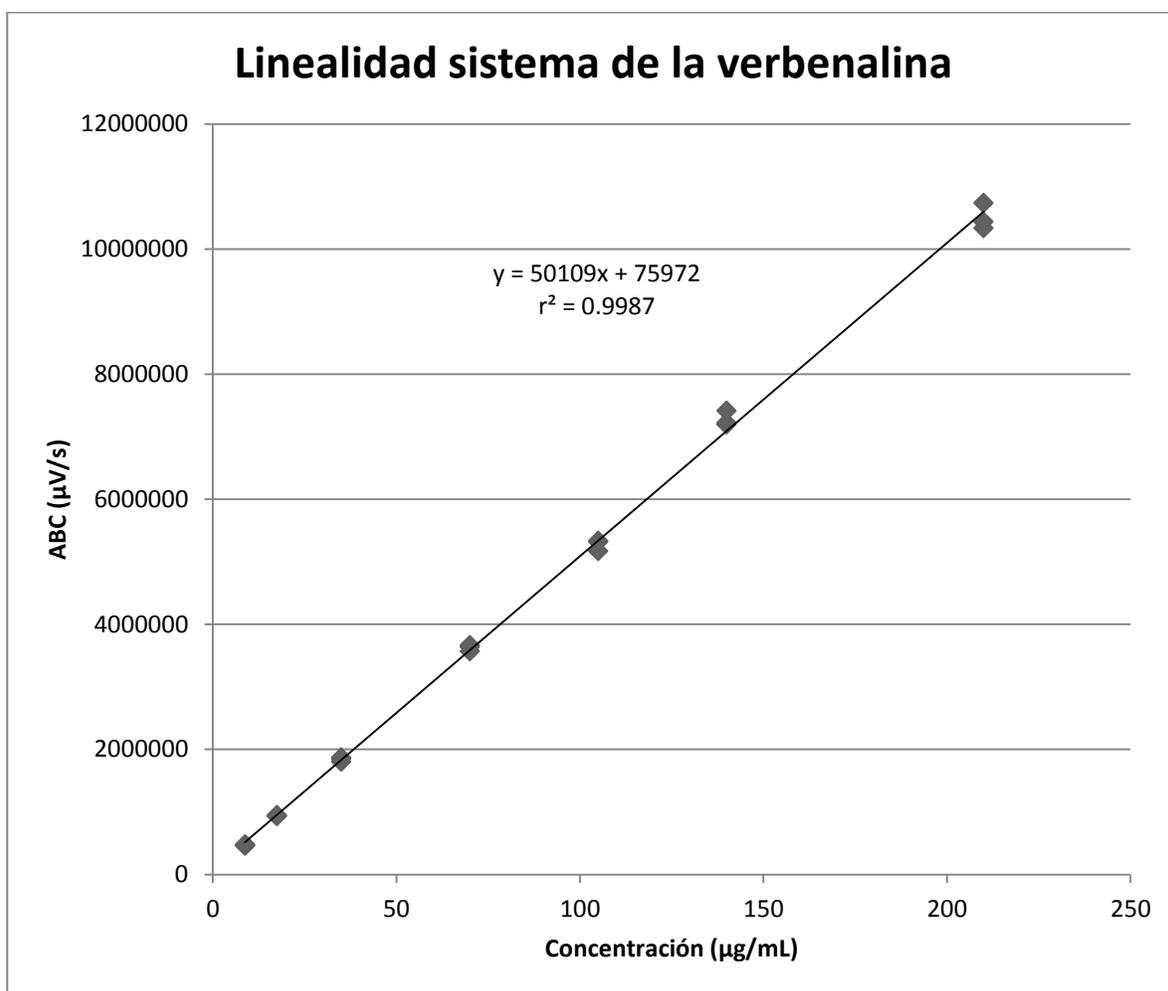
Inyecciones	Concentración relativa (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V/s}$)	CV
1	12.5	8.75	464343	
2	12.5	8.75	460514	1.96%
3	12.5	8.75	477996	
4	25	17.5	933883	
5	25	17.5	945387	0.80%
6	25	17.5	931245	
7	50	35	1799359	
8	50	35	1848177	1.89%
9	50	35	1866652	
10	100	70	3661162	
11	100	70	3564439	1.38%
12	100	70	3636562	
13	150	105	5329364	
14	150	105	5168137	1.69%
15	150	105	5314411	
16	200	140	7192901	
17	200	140	7221173	1.63%
18	200	140	7412057	
19	300	210	10434482	
20	300	210	10733143	1.99%
21	300	210	10329860	

Los parámetros de desempeño para evaluar la linealidad del sistema fueron calculados mediante las herramientas estadísticas del “software” *Microsoft Office Excel 2010*, empleando los datos aislados, para la construcción de la gráfica (Gráfica 2) se emplearon las medias aritméticas de las respuestas analíticas. Se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde “y” representa el área de la respuesta cromatográfica ($\mu\text{V/s}$), b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y “x” la concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$). Los cálculos efectuados no incluyen el 0. Los criterios de aceptación se muestran en la Tabla 24.



Tabla 24. Parámetros de desempeño para linealidad del sistema de la verbenalina

Parámetro de desempeño	Valor	Criterio de aceptación
b_1	50109.35	-
b_0	75972.27	-
r	0.9993	≥ 0.999
r^2	0.9987	≥ 0.98
$S_{y/x}$	124868.67	-
S_{b1}	402.16	-
IC (β_1)	49267.61 50951.09	No incluye al 0



Gráfica 3. Linealidad del sistema para la verbenalina



7.2.1.3.3 Linealidad del sistema para el verbascósido

Tabla 25. Valores obtenidos para linealidad del sistema del verbascósido.

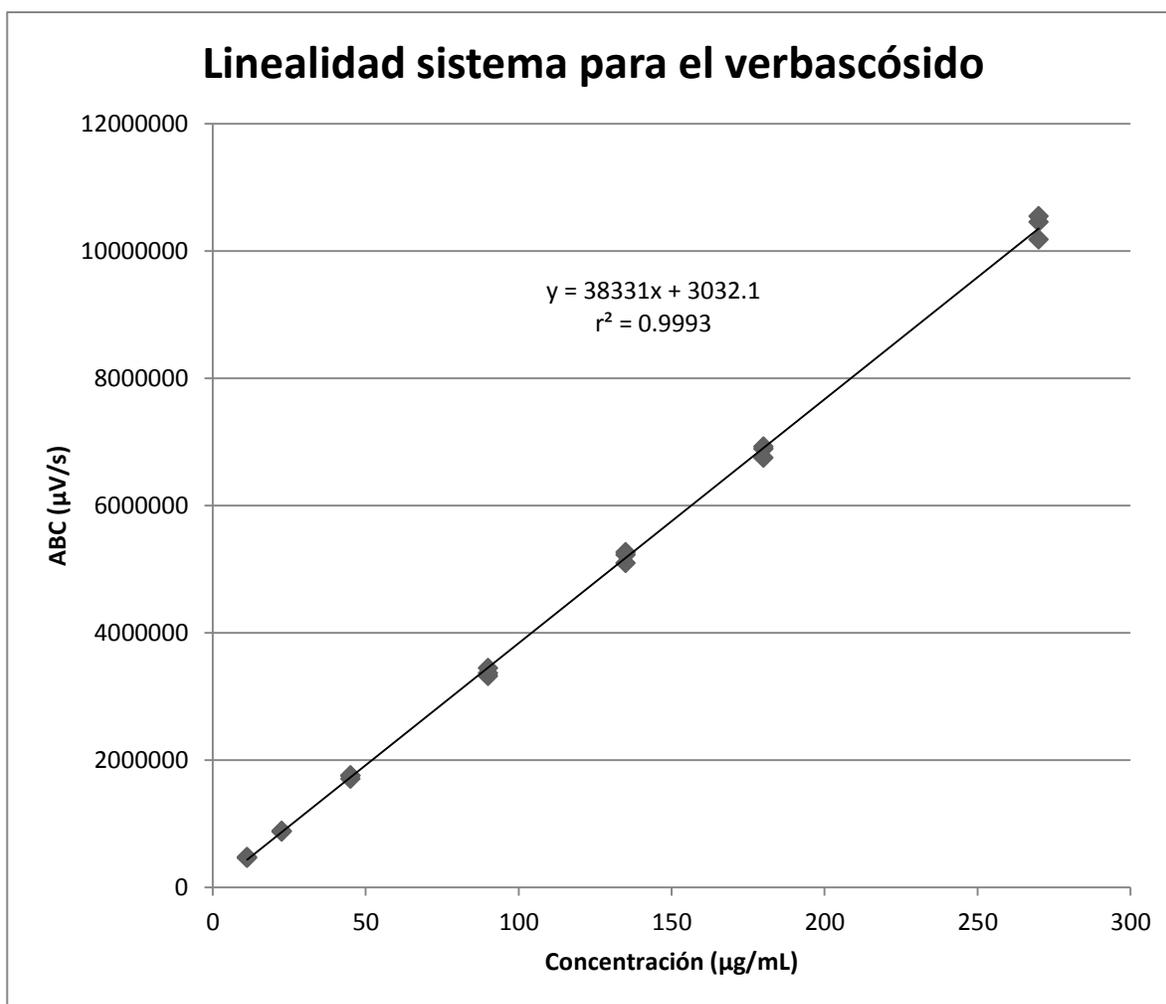
Inyecciones	Concentración relativa (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V/s}$)	CV
1	12.5	11.225	465590	1.12%
2	12.5	11.225	465123	
3	12.5	11.225	474487	
4	25	22.5	884383	0.53%
5	25	22.5	880890	
6	25	22.5	875031	
7	50	45	1704943	1.70%
8	50	45	1755270	
9	50	45	1757114	
10	100	90	3321939	1.84%
11	100	90	3366605	
12	100	90	3444807	
13	150	135	5266812	1.74%
14	150	135	5093944	
15	150	135	5227310	
16	200	180	6892901	1.35%
17	200	180	6926122	
18	200	180	6751200	
19	300	270	10180097	1.83%
20	300	270	10457183	
21	300	270	10546794	

Los parámetros de desempeño para evaluar la linealidad del sistema fueron calculados mediante las herramientas estadísticas del “software” *Microsoft Office Excel 2010*, empleando los datos aislados, para la construcción de la gráfica (Gráfica 3) se emplearon las medias aritméticas de las respuestas analíticas. Se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde “y” representa el área de la respuesta cromatográfica ($\mu\text{V/s}$), b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y “x” la concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$). Los cálculos efectuados no incluyen el 0. Los criterios de aceptación se muestran en la Tabla 26.



Tabla 26. Parámetros de desempeño para linealidad del sistema del verbascósido

Parámetro de desempeño	Valor	Criterio de aceptación
b_1	38331.78	-
b_0	3032.16	-
r	0.9996	≥ 0.999
r^2	0.9993	≥ 0.98
$S_{y/x}$	89041.10	-
S_{b1}	223.03	-
IC (β_1)	37864.96 38798.60	No incluye al 0



Gráfica 4. Linealidad del sistema para el verbascósido



7.2.1.3.4 Linealidad del sistema para el 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina (7OGH)

Tabla 27. Valores obtenidos para linealidad del sistema del 7OGH

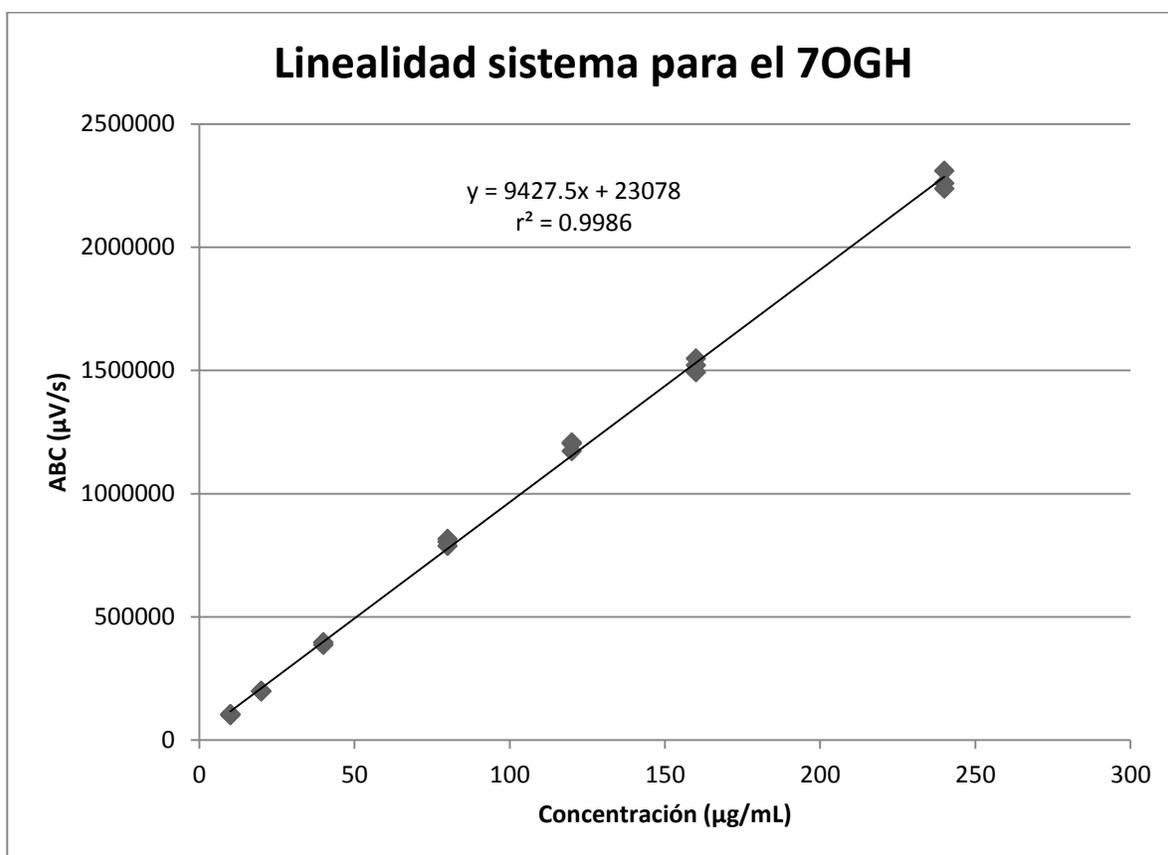
Inyecciones	Concentración relativa (%)	Concentración (µg/mL)	ABC (µV/s)	CV
1	12.5	10	103844	1.65%
2	12.5	10	100491	
3	12.5	10	103844	
4	25	20	199282	0.48%
5	25	20	197358	
6	25	20	198091	
7	50	40	385607	1.45%
8	50	40	395612	
9	50	40	395389	
10	100	80	815949	1.75%
11	100	80	787871	
12	100	80	804157	
13	150	120	1203392	1.64%
14	150	120	1171401	
15	150	120	1207222	
16	200	160	1492256	1.80%
17	200	160	1547082	
18	200	160	1520968	
19	300	240	2308751	1.62%
20	300	240	2258753	
21	300	240	2236675	

Los parámetros de desempeño para evaluar la linealidad del sistema fueron calculados mediante las herramientas estadísticas del “software” *Microsoft Office Excel 2010*, empleando los datos aislados, para la construcción de la gráfica (Gráfica 4) se emplearon las medias aritméticas de las respuestas analíticas. Se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde “y” representa el área de la respuesta cromatográfica (µV/s), b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y “x” la concentración de la muestra (µg/mL). Los cálculos efectuados no incluyen el 0. Los criterios de aceptación se muestran en la Tabla 28.



Tabla 28. Parámetros de desempeño para linealidad del sistema del 7OGH

Parámetro de desempeño	Valor	Criterio de aceptación
b_1	9427.53	-
b_0	23078.30	-
r	0.9993	≥ 0.999
r^2	0.9986	≥ 0.98
$S_{y/x}$	27919.45	-
S_{b1}	78.68	-
IC (β_1)	9262.85 9592.21	No incluye al 0



Gráfica 5. Linealidad del sistema para el 7OGH



7.2.1.4 Sensibilidad (LOD y LOC)

El límite de detección (LD) se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser detectada en la muestra. El límite de cuantificación (LC) es la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas y en la cual el sistema conserva el comportamiento lineal.

Para estimar LOD y LOC se efectuaron diluciones con los puntos equivalentes a las concentraciones de 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50% de las concentraciones respectivas de trabajo para cada analito, fueron preparadas por diluciones sucesivas a partir del “stock” B. Los datos se concentran en la Tabla 29.

Tabla 29. Respuestas analíticas para curva de calibración lineal sensibilidad

Compuesto Concentración (µg/mL)	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	CV
I 20	625047	640813	646468	1.79%
10	320756	322435	316395	0.97%
5	156369	154381	160509	1.99%
2.5	83708	80452	81889	1.98%
1.25	44581	38401	39653	7.99%
0.62	22058	22628	17352	14.00%
II 35	1769359	1848177	1866652	2.82%
17.5	933883	945387	931245	0.80%
8.75	464343	460514	477996	1.96%
4.37	242593	237104	244573	1.60%
2.18	122390	112355	113821	4.66%
1.09	66680	66882	59977	6.09%
III 45	1785943	1755270	1757114	0.97%
22.5	884383	880890	875031	0.53%
11.22	465590	465123	474487	1.12%
5.61	189537	183389	181776	1.66%
2.80	89930	87430	88555	1.41%
1.40	45956	44732	43118	3.19%
IV 40	385607	395612	395389	1.45%
20	199282	197358	198091	0.48%
10	101880	100491	103844	1.65%
5	50538	50054	50412	0.49%
2.50	25641	24389	24708	2.61%
1.25	16165	16481	12994	12.67%



Los compuestos **I** y **II** fueron detectados hasta las concentraciones de 1250 y 2187 ng/mL respectivamente, conservando la simetría los picos cromatográficos, por lo que se estima su LD en 1250 y 2200 ng/mL respectivamente (cifra redondeada). Ambos compuestos conservaron un CV inferior a 2% hasta las concentraciones de 2500 y 2806.25 ng/mL respectivamente, por lo que se estima su LC en 2500 ng/mL para **I** y 2800 ng/mL para **II** (cifra redondeada). El compuesto **III** siguió siendo detectado a concentraciones inferiores a 1403.12 ng/mL, por lo que se estima su LD en 1400 ng/mL (cifra redondeada) y presentó un CV inferior a 2% hasta la concentración de 2806.25 ng/mL por lo que se calcula su LC en 2800 ng/mL (cifra redondeada). El compuesto **IV** fue detectado hasta la concentración de 1250 ng/mL; su LD se estima en 1250 ng/mL y presentó un CV inferior a 2% hasta la concentración de 5 µg/mL, por lo que su LC se estima en 5 µg/mL. Los valores de LD y LC se resumen en la Tabla 30.

Tabla 30. Valores de LD y LC para los compuestos marcadores de *V. carolina*

Compuesto	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
I	1.25	2.5
II	2.20	2.8
III	1.40	2.8
IV	1.25	5



7.2.2 Validación del método

7.2.2.1 Linealidad y exactitud del método

Para la validación del método analítico, específicamente en cuanto a linealidad y exactitud del mismo, se preparó un placebo analítico que consistió en las partes aéreas de *Verbena carolina* sometidas a un proceso de extracción exhaustivo con metanol, para obtener una matriz de trabajo que consiste en los componentes que usualmente presenta la muestra analítica pero no contiene los compuestos marcadores. La ausencia de los mismos se comprobó efectuando una extracción bajo el “modelo de extracción” e inyectando dicha muestra al CL en donde no se detectaron las señales de los analitos. En la Figura 16 se compara una muestra de la matriz de trabajo y el placebo analítico.



Figura 16. Comparativo matriz de trabajo (izquierda) y placebo analítico (derecha)

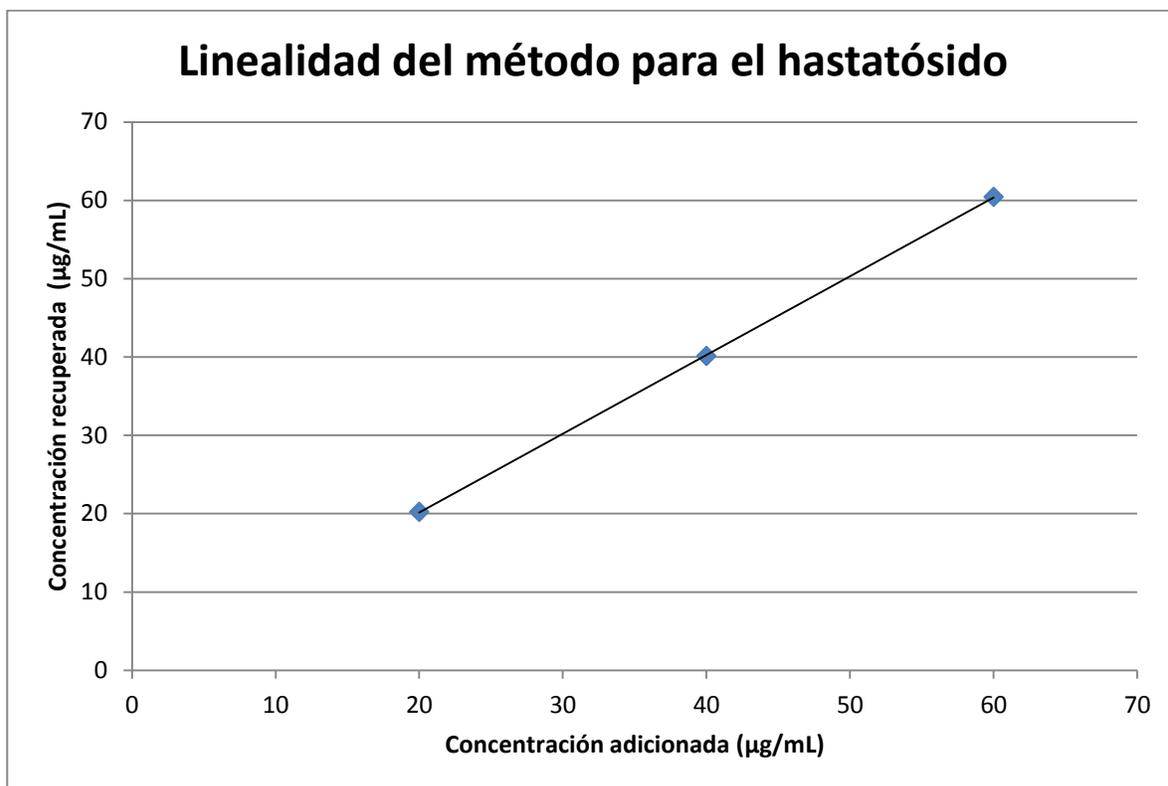
A la cantidad de placebo analítico equivalente a la empleada en el proceso de extracción del método, operación hecha por triplicado y por preparaciones independientes, le fueron agregadas cantidades equivalentes de los compuestos marcadores para ajustarse a un rango equivalente a 50, 100 y 150% de las concentraciones relativas de los mismos, a partir del stock B y fueron sometidas al proceso de extracción. Las muestras fueron inyectadas al CL y con los datos recopilados de las respuestas analíticas se calcularon los coeficientes de correlación lineal (r), coeficientes de determinación (r^2), coeficientes de variación de la regresión ($CV_{x/y}$). Se cumplió con los criterios de aceptación: $r \geq 0.999$, $r^2 \geq 0.98$, $CV_{x/y} \leq 2\%$, $IC_{\beta 0}$ incluyó al 0, $IC_{\beta 1}$ incluyó a la unidad.

Las respuestas analíticas para linealidad del método se muestran en la Tabla 31, los parámetros de desempeño se condensan en las Tablas 32 a la 35.



Tabla 31. Linealidad del método

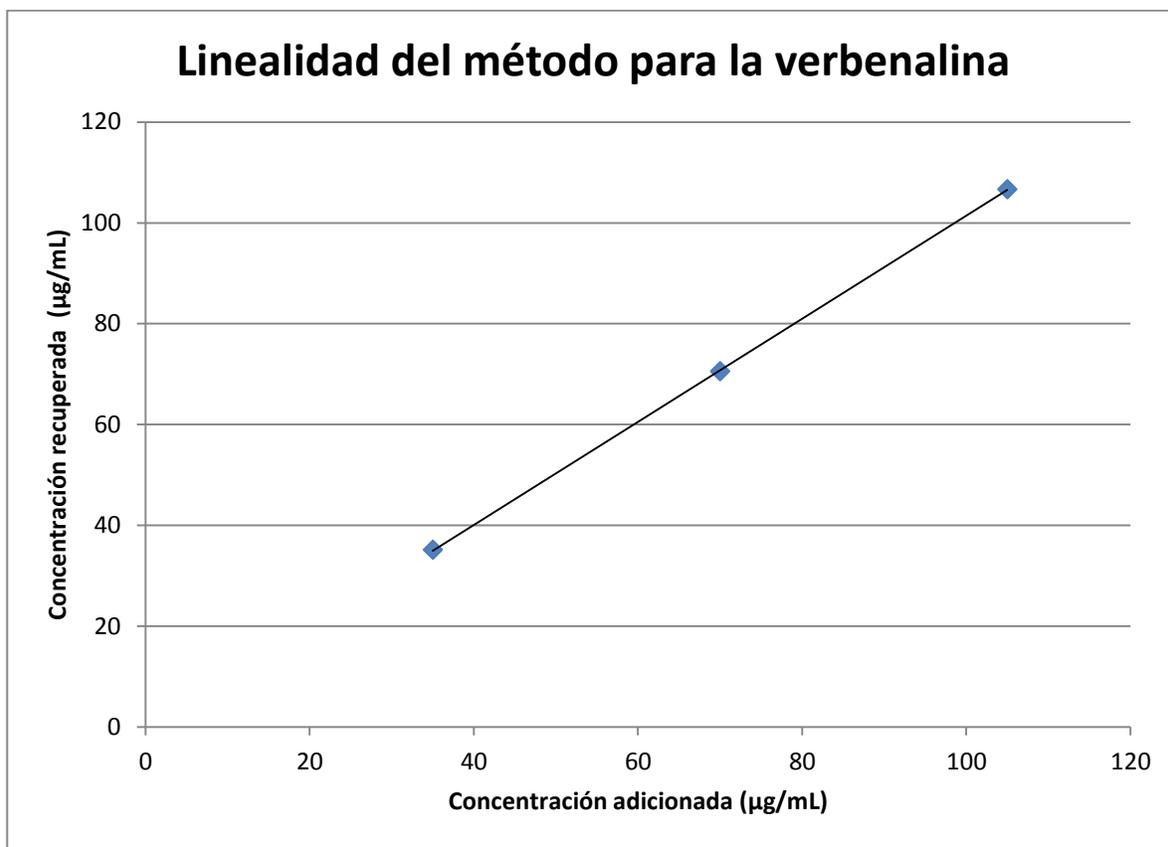
Placebo analítico adicionado (I)	Concentración (µg/mL)	Concentración relativa (%)	Área (µV/s)	CV
1	20	50	629994	0.47%
2	20	50	624701	
3	20	50	629720	
4	40	100	1244026	1.13%
5	40	100	1232317	
6	40	100	1216203	
7	60	150	1843367	0.95%
8	60	150	1830276	
9	60	150	1865083	
Placebo analítico adicionado (II)	Concentración (µg/mL)	Concentración relativa (%)	Área (µV/s)	CV
1	35	50	1807489	2.16%
2	35	50	1880062	
3	35	50	1816031	
4	70	100	3648590	1.85%
5	70	100	3534246	
6	70	100	3651951	
7	105	150	5385861	0.59%
8	105	150	5436568	
9	105	150	5449582	
Placebo analítico adicionado (III)	Concentración (µg/mL)	Concentración relativa (%)	Área (µV/s)	CV
1	45	50	1727292	1.54%
2	45	50	1704015	
3	45	50	1757374	
4	90	100	3453860	0.67%
5	90	100	3495570	
6	90	100	3493792	
7	135	150	5139401	1.55%
8	135	150	5215823	
9	135	150	5301174	
Placebo analítico adicionado (IV)	Concentración (µg/mL)	Concentración relativa (%)	Área (µV/s)	CV
1	40	50	393008	0.42%
2	40	50	394942	
3	40	50	391577	
4	80	100	770416	1.21%
5	80	100	784508	
6	80	100	788411	
7	120	150	1157577	0.75%
8	120	150	1160232	
9	120	150	1165653	



Gráfica 6. Linealidad del método para el hastatósido (I)

Tabla 32. Parámetros de desempeño linealidad del método del hastatósido.

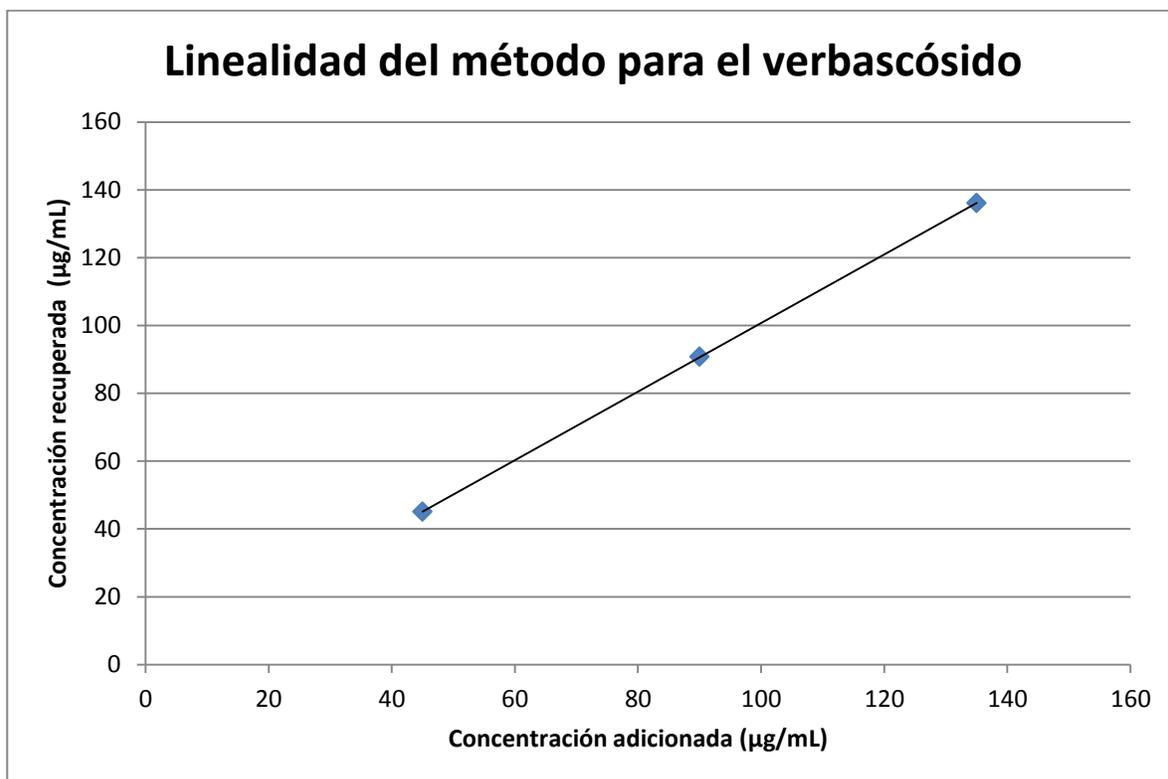
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	1.004	-
b₀	0.050	-
r	0.9997	≥0.999
r²	0.9995	≥0.98
S_{y/x}	0.4148	-
IC_{β0}	-0.97 1.08	Incluye al 0
IC_{β1}	-2.06 4.07	Incluye al 1
CV_{y/x}	1.03%	<2%



Gráfica 7. Linealidad del método para la verbenalina (II)

Tabla 33. Parámetros de desempeño linealidad del método de la verbenalina.

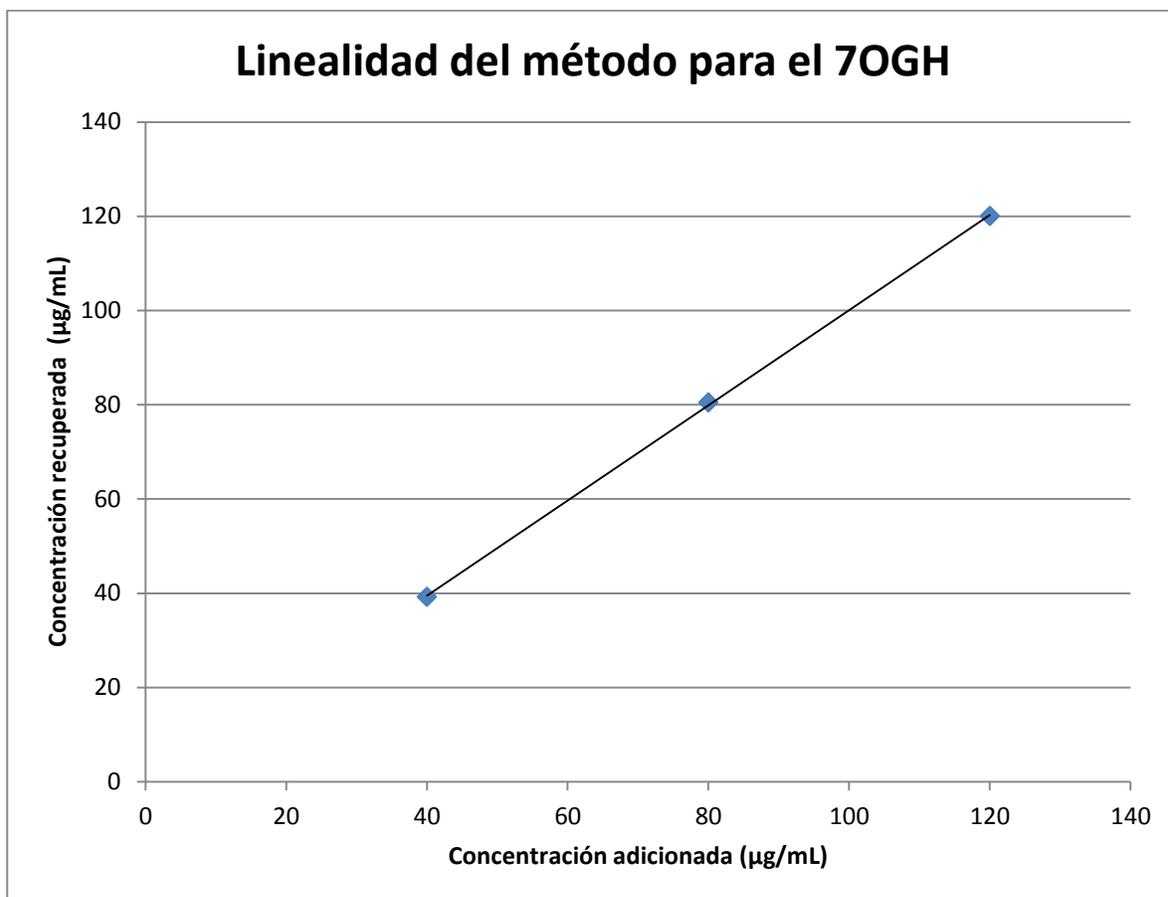
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	1.022	-
b₀	-0.795	-
r	0.9996	≥0.999
r²	0.9992	≥0.98
S_{y/x}	0.951	-
IC_{β0}	-3.22 5.27	Incluye al 0
IC_{β1}	-2.98 1.39	Incluye al 1
CV_{y/x}	1.29%	<2%



Gráfica 8. Linealidad del método para el verbascósido (III)

Tabla 34. Parámetros de desempeño linealidad del método del verbascósido.

Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	1.0114	-
b₀	-0.4121	-
r	0.9995	≥0.999
r²	0.9991	≥0.98
S_{y/x}	1.2369	-
IC_{β0}	-3.99 6.02	Incluye al 0
IC_{β1}	-3.35 2.53	Incluye al 1
CV_{y/x}	1.36%	<2%



Gráfica 9. Linealidad del método para el 7OGH (IV)

Tabla 35. Parámetros de desempeño linealidad del método del 7OGH.

Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	1.0095	-
b₀	-0.8777	-
r	0.9995	≥0.999
r²	0.9991	≥0.98
S_{y/x}	1.0972	-
IC_{β0}	-3.6710 5.6902	Incluye al 0
IC_{β1}	-3.4968 1.7412	Incluye al 1
CV_{y/x}	1.37%	<2%

La exactitud del método fue evaluada mediante el porcentaje de recobro (cantidad recuperada respecto a la adicionada), los criterios evaluados fueron el coeficiente de variación del porcentaje de recobro (CV) y el intervalo de confianza de la media poblacional (IC_μ). Los resultados y los criterios de aceptación se representan en las Tablas 36 y 37.



Tabla 36. Resultados para exactitud del método.

Placebo analítico adicionado con (I)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	20	20.2772	101.38
2	20	20.1026	100.51
3	20	20.2682	101.34
4	40	40.5370	101.34
5	40	40.1506	100.37
6	40	39.6190	99.04
7	60	60.3120	100.52
8	60	59.8800	99.80
9	60	61.0285	101.71
Placebo analítico adicionado con (II)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	35	34.5547	98.72
2	35	36.0030	102.86
3	35	34.7252	99.21
4	70	71.2964	101.85
5	70	69.0145	98.59
6	70	71.3634	101.94
7	105	105.9660	100.92
8	105	106.7783	101.69
9	105	107.2376	102.13
Placebo analítico adicionado con (III)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	45	44.9825	99.96
2	45	44.3752	98.61
3	45	45.7672	101.70
4	90	90.0252	100.02
5	90	91.1133	101.23
6	90	91.0669	101.18
7	135	133.9976	99.25
8	135	135.9913	100.73
9	135	138.2179	102.38
Placebo analítico adicionado con (IV)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	40	39.2392	98.09
2	40	39.4444	98.61
3	40	39.0874	97.71
4	80	79.2717	99.08
5	80	80.7665	100.95
6	80	81.1805	101.47
7	120	120.3388	100.28
8	120	120.6204	100.51
9	120	121.1954	100.99



Tabla 37. Parámetros de desempeño para exactitud del método.

Estadístico	Resultado	Criterio de aceptación	
Hastatósido (I)	\bar{y}	100.67	-
	S	0.8681	-
	CV	0.86%	$\leq 2\%$
	IC(μ)	100.00 101.33	Incluye al 100
Verbenalina (II)	\bar{y}	100.88%	-
	S	1.6161	-
	CV	1.60%	$\leq 2\%$
	IC(μ)	99.64 102.12	Incluye al 100
Verbascósido (III)	\bar{y}	100.56	-
	S	1.2067	-
	CV	1.19%	$\leq 2\%$
	IC(μ)	99.63 101.49	Incluye al 100
7OGH (IV)	\bar{y}	99.74	-
	S	1.3897	-
	CV	1.39%	$\leq 2\%$
	IC(μ)	97.90 101.59	Incluye al 100

7.2.2.3 Repetibilidad

La repetibilidad del método fue evaluada mediante el porcentaje de recobro, adicionando a una cantidad equivalente del placebo analítico, una cantidad equivalente del stock B para obtener una concentración relativa final cercana al 100%, o que se encuentre dentro del rango lineal de trabajo, por sextuplicado, por un solo analista y en un mismo día. Se evaluó el porcentaje de recobro. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 38 y los parámetros de desempeño en la Tabla 39.



Tabla 38. Resultados obtenidos para la evaluación de repetibilidad.

Placebo analítico adicionado con (I)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	40	40.5370	101.34
2	40	40.1506	100.37
3	40	39.6190	99.04
4	40	40.6221	101.55
5	40	41.4226	103.55
6	40	41.5926	103.98
Placebo analítico adicionado con (II)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	70	71.2964	101.85
2	70	69.0145	98.59
3	70	71.3634	101.94
4	70	71.8627	102.66
5	70	71.8799	102.68
6	70	68.8342	98.33
Placebo analítico adicionado con (III)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	90	90.0252	100.02
2	90	91.1133	101.23
3	90	91.0669	101.18
4	90	91.5330	101.70
5	90	92.7782	103.08
6	90	89.2773	99.19
Placebo analítico adicionado con (IV)	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	80	79.2717	99.08
2	80	80.7665	100.95
3	80	81.1805	101.47
4	80	81.7530	102.19
5	80	80.9918	101.23
6	80	82.1031	102.62

Tabla 39. Parámetros de desempeño para repetibilidad.

Parámetro	Compuesto								Criterio de aceptación
	Hastatósido (I)		Verbenalina (II)		Verbascósido (III)		7OGH (IV)		
\bar{y}	101.64%		101.01%		101.07%		101.26%		-
S	1.8745		2.0062		1.3493		1.2320		-
CV	1.84%		1.98%		1.33%		1.21%		≤2%
IC(µ)	99.67	103.61	98.90	103.11	99.65	102.48	99.97	102.55	Incluye el 100



7.2.2.3 Precisión del método (precisión intermedia).

La precisión intermedia se realizó analizando por triplicado una muestra homogénea en un nivel cercano al 100% de la concentración de trabajo, en dos días y por dos analistas, usando la misma solución de referencia, así como los instrumentos y equipos. A partir de las respuestas analíticas se calcularon la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV). Criterios de aceptación: $CV \leq 2\%$. Los resultados se muestran en la Tabla 40 y los parámetros de desempeño en la Tabla 41.

Tabla 40. Datos obtenidos para precisión intermedia.

Hastatósido	Analista		Verbenalina	Analista			
	1	2		1	2		
Día	1	42.3610	44.5330	Día	1	70.7322	73.6637
		43.9564	44.0644			72.3339	74.4515
		45.5374	44.6947			74.2316	73.8664
	2	43.5298	44.9450		2	73.8914	75.7781
		43.5298	44.2693			75.0929	72.7495
		44.4213	45.0095			73.6476	75.4937
Verbascósido	Analista		7OGH	Analista			
	1	2		1	2		
Día	1	93.9053	95.2441	Día	1	81.2066	81.2066
		95.5050	98.5815			81.1140	81.1140
		95.8411	96.0629			80.0965	80.0965
	2	99.0116	98.5516		2	83.1181	80.8358
		98.2471	93.3847			82.8479	82.0011
		96.8425	97.1281			80.6327	83.2780

Tabla 41. Parámetros de desempeño para precisión intermedia.

Parámetro	Hastatósido (I)	Verbenalina (II)	Verbascósido (III)	7OGH (IV)	Criterio de aceptación
\bar{y}	44.23	73.82	96.52	81.56	-
S	0.8393	1.4069	1.8595	1.2909	-
CV	1.89%	1.90%	1.92%	1.58%	$\leq 2\%$



7.2.3 Estabilidad analítica de la muestra

Se preparó una muestra homogénea de los compuestos marcadores, con una concentración equivalente al 100 % de las concentraciones relativas de trabajo para cada compuesto, dicha solución se inyectó al CL por triplicado para registrar la medición a tiempo cero y se dividió para ser sometida a cinco condiciones de almacenaje que se enuncian a continuación:

- 4°C en ausencia de luz
- 4°C en presencia de luz
- temperatura ambiente en ausencia de luz
- temperatura ambiente en presencia de luz
- 37°C en ausencia de luz

Las muestras fueron evaluadas en tres periodos de tiempo, 24, 72 horas y 8 días, se descartó la pérdida de disolvente por diferencia de peso de los viales contenedores justo después de ser envasada la solución y antes de ser tomada la muestra para inyectar al CL.

Se evaluó la estabilidad analítica de la muestra al comparar la media aritmética de cada condición de almacenaje con la medición a tiempo cero y de una muestra preparada en fresco para cada tiempo. El parámetro de desempeño fue la diferencia absoluta de medias ($|d_i|$). Criterio de aceptación $|d_i| \leq 2\%$.

Los resultados del estudio de estabilidad analítica de la muestra se muestran en las Tablas 42 a la 46, se condensan los resultados definitivos en la Tabla 47.



Tabla 42. Mediciones de estabilidad analítica de la muestra: 4°C en ausencia de luz.

Hastatósido	Inicial (y ₀) (µg/mL)	Tiempo de almacenaje (4°C en ausencia de luz)			Criterio de aceptación
		24 horas (y ₁) (µg/mL)	72 horas (y ₂) (µg/mL)	8 días (y ₃) (µg/mL)	
1	41.3619	35.4093	42.4172	43.8694	-
2	43.2369	41.3926	42.4407	42.5977	-
3	41.8241	41.3554	42.8414	42.5723	-
\bar{y}	42.14	41.39	42.44	42.59	-
$ d_i $		0.74%	0.87%	0.45%	≤ 2%
\bar{y} fresco		41.32	43.31	43.05	-
$ d_i $		0.74%	0.87%	0.45%	≤ 2%
Verbenalina					
1	71.3472	75.0319	72.7741	73.8010	-
2	72.5347	73.6472	74.0318	73.5844	-
3	73.8351	71.5016	73.8714	74.9114	-
\bar{y}	72.57	73.39	73.55	74.09	-
$ d_i $		0.82%	0.98%	1.52%	≤ 2%
\bar{y} fresco		72.66	74.36	74.46	-
$ d_i $		0.73%	0.81%	0.36%	≤ 2%
Verbascósido					
1	101.6363	99.9587	101.7908	100.3235	-
2	99.8966	103.6878	103.9048	104.3937	-
3	102.3738	103.8582	102.7531	104.5065	-
\bar{y}	101.30	102.50	102.81	103.07	-
$ d_i $		1.19%	1.51%	1.77%	≤ 2%
\bar{y} fresco		100.84	102.39	102.44	-
$ d_i $		1.65%	0.42%	0.63%	≤ 2%
7OGH					
1	82.6443	82.2857	85.4056	85.9530	-
2	83.2483	84.3496	82.6683	80.7073	-
3	86.1042	83.0230	83.5994	82.9728	-
\bar{y}	83.99	83.21	83.89	83.21	-
$ d_i $		0.77%	0.10%	0.78%	≤ 2%
\bar{y} fresco		82.10	83.52	84.56	-
$ d_i $		1.11%	0.36%	1.35%	≤ 2%



Tabla 43. Mediciones de estabilidad analítica de la muestra: 4°C en presencia de luz.

Hastatósido	Inicial (y ₀) (µg/mL)	Tiempo de almacenaje (4°C en presencia de luz)			Criterio de aceptación
		24 horas (y ₁) (µg/mL)	72 horas (y ₂) (µg/mL)	8 días (y ₃) (µg/mL)	
1	41.3619	43.4360	43.4360	43.0578	-
2	43.2369	43.1569	43.1569	41.6323	-
3	41.8241	39.3604	39.3604	42.4053	-
\bar{y}	42.14	43.15	43.15	41.63	-
$ d_i $		1.01%	0.15%	0.50%	≤ 2%
\bar{y} fresco		41.32	43.31	43.05	-
$ d_i $		1.01%	1.01%	0.5%	≤ 2%
Verbenalina					
1	71.3472	67.5053	74.3890	75.7598	-
2	72.5347	72.5146	73.2145	73.4091	-
3	73.8351	72.8008	75.1555	72.8226	-
\bar{y}	72.57	70.94	73.55	73.99	-
$ d_i $		0.82%	0.98%	1.42%	≤ 2%
\bar{y} fresco		72.66	74.36	74.46	-
$ d_i $		1.63%	1.68%	1.42%	≤ 2%
Verbascósido					
1	101.6363	102.0276	94.6121	87.5295	-
2	99.8966	100.4880	91.9286	86.1545	-
3	102.3738	100.2969	95.0887	87.7958	-
\bar{y}	101.30	100.93	93.87	87.15	-
$ d_i $		0.36%	7.42%	14.14%	≤ 2%
\bar{y} fresco		100.84	102.39	102.44	-
$ d_i $		0.08%	8.51%	15.28%	≤ 2%
7OGH					
1	82.6443	82.3628	84.3016	82.7607	-
2	83.2483	84.1005	83.8455	85.9619	-
3	86.1042	83.9709	83.9542	82.9237	-
\bar{y}	83.99	83.47	84.03	83.88	-
$ d_i $		0.52%	0.03%	0.11%	≤ 2%
\bar{y} fresco		82.10	83.52	84.56	-
$ d_i $		1.37%	0.50%	0.67%	≤ 2%



Tabla 44. Mediciones de estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Hastatósido	Inicial (y_0) ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de almacenaje (temperatura ambiente en ausencia de luz)			Criterio de aceptación
		24 horas (y_1) ($\mu\text{g/mL}$)	72 horas (y_2) ($\mu\text{g/mL}$)	8 días (y_3) ($\mu\text{g/mL}$)	
1	41.3619	34.9489	34.9489	42.9526	-
2	43.2369	42.3948	42.3948	42.1813	-
3	41.8241	41.9281	41.9281	41.7089	-
\bar{y}	42.14	42.39	42.39	42.18	-
$ d_i $		0.25%	0.25%	0.04%	$\leq 2\%$
\bar{y} fresco		41.32	43.31	43.05	-
$ d_i $		0.25%	0.25%	0.04%	$\leq 2\%$
Verbenalina					
1	71.3472	67.1769	74.1882	72.3525	-
2	72.5347	72.9244	73.3963	73.4898	-
3	73.8351	74.1070	72.3129	73.3665	-
\bar{y}	72.57	71.40	73.29	73.06	-
$ d_i $		1.16%	0.72%	0.49	$\leq 2\%$
\bar{y} fresco		72.66	74.36	74.46	-
$ d_i $		1.16%	0.72%	0.49%	$\leq 2\%$
Verbascósido					
1	101.6363	98.7241	107.2663	102.7000	-
2	99.8966	103.6540	106.6343	102.2694	-
3	102.3738	105.2201	103.9886	101.6511	-
\bar{y}	101.30	102.53	105.96	102.20	-
$ d_i $		1.23%	1.23%	0.90%	$\leq 2\%$
\bar{y} fresco		100.84	102.39	102.44	-
$ d_i $		1.68%	1.83%	0.23%	$\leq 2\%$
7OGH					
1	82.6443	82.2395	84.2414	82.4527	-
2	83.2483	83.7153	84.7717	86.0165	-
3	86.1042	82.0219	86.1709	84.0734	-
\bar{y}	83.99	82.65	85.06	84.18	-
$ d_i $		1.34%	0.62%	0.18%	$\leq 2\%$
\bar{y} fresco		82.10	83.52	84.56	-
$ d_i $		0.55%	1.10%	0.38%	$\leq 2\%$



Tabla 45. Mediciones de estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en presencia de luz.

Hastatósido	Inicial (y ₀) (µg/mL)	Tiempo de almacenaje (temperatura ambiente en presencia de luz)			Criterio de aceptación
		24 horas (y ₁) (µg/mL)	72 horas (y ₂) (µg/mL)	8 días (y ₃) (µg/mL)	
1	41.3619	43.4863	43.4863	44.2711	-
2	43.2369	42.5614	42.5614	42.4029	-
3	41.8241	41.5084	41.5084	41.6472	-
\bar{y}	42.14	42.56	42.56	42.40	-
$ d_i $		0.42%	0.42%	0.26%	≤ 2%
\bar{y} fresco		41.32	43.31	43.05	-
$ d_i $		0.42%	0.42%	0.26%	≤ 2%
Verbenalina					
1	71.3472	74.6329	74.4578	74.1518	-
2	72.5347	74.1104	74.2689	74.1593	-
3	73.8351	73.7164	74.7336	71.9462	-
\bar{y}	72.57	74.1532	74.48	73.41	-
$ d_i $		1.58%	1.91%	0.84%	≤ 2%
\bar{y} fresco		72.66	74.36	74.46	-
$ d_i $		1.58%	1.91%	0.84%	≤ 2%
Verbascósido					
1	101.6363	78.5841	77.7941	73.5353	-
2	99.8966	77.0165	77.5552	74.8804	-
3	102.3738	77.1299	77.8624	73.1689	-
\bar{y}	101.30	77.57	77.73	73.86	-
$ d_i $		23.72%	23.56%	27.44%	≤ 2%
\bar{y} fresco		100.84	102.39	102.44	-
$ d_i $		23.27%	24.65%	28.58%	≤ 2%
7OGH					
1	82.6443	80.8868	84.2414	86.3271	-
2	83.2483	82.8643	84.7717	81.8375	-
3	86.1042	83.6168	86.1709	84.0155	-
\bar{y}	83.99	82.45	85.06	84.06	-
$ d_i $		1.54%	1.06%	0.06%	≤ 2%
\bar{y} fresco		82.10	83.52	84.56	-
$ d_i $		0.34%	1.53%	0.50%	≤ 2%



Tabla 46. Mediciones de estabilidad analítica de la muestra a 37°C en ausencia de luz.

Hastatósido	Inicial (y ₀) (µg/mL)	Tiempo de almacenaje (37°C en ausencia de luz)			Criterio de aceptación
		24 horas (y ₁) (µg/mL)	72 horas (y ₂) (µg/mL)	8 días (y ₃) (µg/mL)	
1	41.3619	43.8828	43.8828	43.7197	-
2	43.2369	42.4579	42.4579	43.2129	-
3	41.8241	41.8224	41.8224	44.6210	-
\bar{y}	42.14	42.45	42.45	43.21	-
$ d_i $		0.31%	0.31%	1.07%	≤ 2%
\bar{y} fresco		41.32	43.31	43.05	-
$ d_i $		0.31%	0.31%	1.07%	≤ 2%
Verbenalina					
1	71.3472	72.1596	72.3427	63.8608	-
2	72.5347	72.9369	73.3588	64.0409	-
3	73.8351	72.5524	71.7104	64.2596	-
\bar{y}	72.57	72.54	72.47	64.05	-
$ d_i $		0.02%	0.10%	8.51%	≤ 2%
\bar{y} fresco		72.66	74.36	74.46	-
$ d_i $		0.02%	0.10%	10.40%	≤ 2%
Verbascósido					
1	101.6363	98.7712	91.8790	56.6262	-
2	99.8966	98.3703	92.9437	57.2423	-
3	102.3738	101.8181	93.1698	56.5941	-
\bar{y}	101.30	99.65	92.66	56.82	-
$ d_i $		1.64%	8.63%	44.48%	≤ 2%
\bar{y} fresco		100.84	102.39	102.44	-
$ d_i $		1.19%	9.72%	45.62%	≤ 2%
7OGH					
1	82.6443	81.5581	85.7899	82.3469	-
2	83.2483	82.9965	84.6398	83.5342	-
3	86.1042	82.8847	85.0774	83.3910	-
\bar{y}	83.99	82.47	85.16	83.09	-
$ d_i $		1.51%	1.17%	0.90%	≤ 2%
\bar{y} fresco		82.10	83.52	84.56	-
$ d_i $		0.37%	1.64%	1.47%	≤ 2%



Tabla 47. Resultados finales de las pruebas de estabilidad analítica.

Compuesto a las 24 h	4°C ausencia de luz	4°C presencia de luz	t.a. ausencia de luz	t.a. presencia de luz	37°C ausencia de luz
Hastatósido	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Verbenalina	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Verbascósido	pasa	pasa	pasa	no pasa	pasa
7OGH	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Compuesto a las 72 h	4°C ausencia de luz	4°C presencia de luz	t.a. ausencia de luz	t.a. presencia de luz	37°C ausencia de luz
Hastatósido	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Verbenalina	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Verbascósido	pasa	no pasa	pasa	no pasa	no pasa
7OGH	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Compuesto a los 7 días	4°C ausencia de luz	4°C presencia de luz	t.a. ausencia de luz	t.a. presencia de luz	37°C ausencia de luz
Hastatósido	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa
Verbenalina	pasa	pasa	pasa	pasa	no pasa
Verbascósido	pasa	no pasa	pasa	no pasa	no pasa
7OGH	pasa	pasa	pasa	pasa	pasa

El verbascósido mostró ser el más inestable de los cuatro compuestos, reflejado principalmente en condiciones de presencia de luz, aún no se conoce el mecanismo exacto de su descomposición, sin embargo, los cromatogramas de las pruebas de estabilidad mostraron la aparición de un nuevo pico cromatográfico, asimismo los cromatofolios empleados para su evaluación mostraron, luego de pocos minutos de ser eluidos, que este compuesto genera color, lo que sugeriría una posible oxidación favorecida por la luz.

7.2.4 Cuantificación de compuestos marcadores en distintas colectas.

Se cuantificaron las cantidades correspondientes a los compuestos marcadores, contenidas en las partes aéreas de *V. carolina*, con el método descrito en el presente trabajo, en total se evaluaron seis colectas distintas, su procedencia se describe abajo.

Colecta 1. Colecta de plantas silvestres, adquiridas en el mercado de Sonora en 2012.

Colecta 2. Colecta proveniente de cultivo, adquirida en el mercado de Sonora en 2012.

Colecta 3. *Verbena carolina* proveniente de Hueyapan, Morelos, colectada en abril de 2005.

Colecta 4. Proveniente del Estado de México, coordenadas 19° 5' 17.64" N, 99° 33' 40.48" O. Altitud 2600 msm. Colectada en octubre de 2013.

Colecta 5. Proveniente del Estado de México, coordenadas 19° 5' 26.85" N, 99° 34' 41.41" O. Altitud 2800 msm. Colectada en octubre de 2013.

Colecta 6. Proveniente del Estado de México, coordenadas 19° 6' 51.45" N, 99° 35' 9.15" O. Altitud 2600 msm. Colectada en octubre de 2013.



Las respuestas analíticas correspondientes a cada compuesto fueron registradas e interpoladas en la curva de calibración de linealidad del sistema, asimismo se calculó la cantidad de cada compuesto contenido en las respectivas muestras, interpolando el valor promedio de tres lecturas efectuadas para cada colecta, se efectuó cada determinación por triplicado, el valor reportado corresponde al promedio de las mismas.

Los resultados fueron calculados mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{planta seca}}} \right) = \left(\frac{\text{Lectura ABC} \left(\frac{\mu\text{V}}{\text{s}} \right) - \beta_0}{\beta_1} \right) * \left(\frac{\text{factor de dilución}}{\text{mg de muestra}} \right)$$

Donde

Lectura ABC ($\mu\text{V/s}$): Respuesta analítica promedio de la muestra.

β_0 : Ordenada al origen de linealidad del sistema.

β_1 : Pendiente de linealidad del sistema.

Ejemplo para hastatósido (I)

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{planta seca}}} \right) = \left(\frac{865629.6667 - 23078.3081}{9427.5375} \right) * \left(\frac{10 \text{ mL}}{50 \text{ mg}} \right) = 11.44 \text{ mg/g}$$

Los resultados obtenidos para la cuantificación de los compuestos marcadores se muestran en la Tabla 48, Figura 17 y Gráfico 9.

Tabla 48. Cuantificación de compuestos marcadores en V. carolina.

Colecta	Hastatósido (mg/g de planta)	Verbenalina (mg/g de planta)	Verbascósido (mg/g de planta)	7OGH (mg/g de planta)
1	11.44	16.29	25.64	17.87
2	8.97	17.88	28.82	3.42
3	4.39	1.70	7.18	6.17
4	17.21	5.83	31.40	20.52
5	14.99	17.58	31.29	23.71
6	10.58	0.68	33.78	25.15

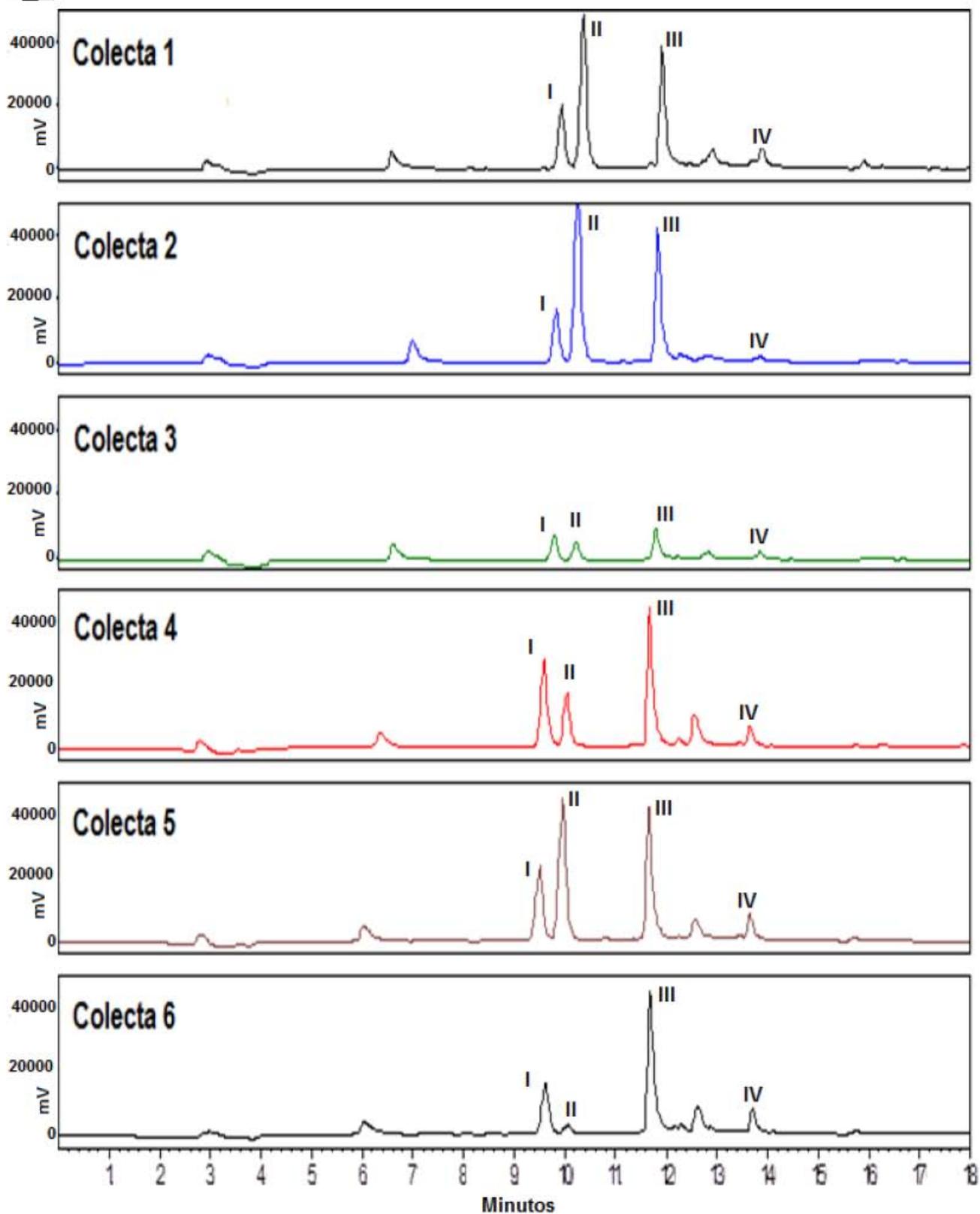


Figura 17. Cromatogramas comparativos de las seis colectas.

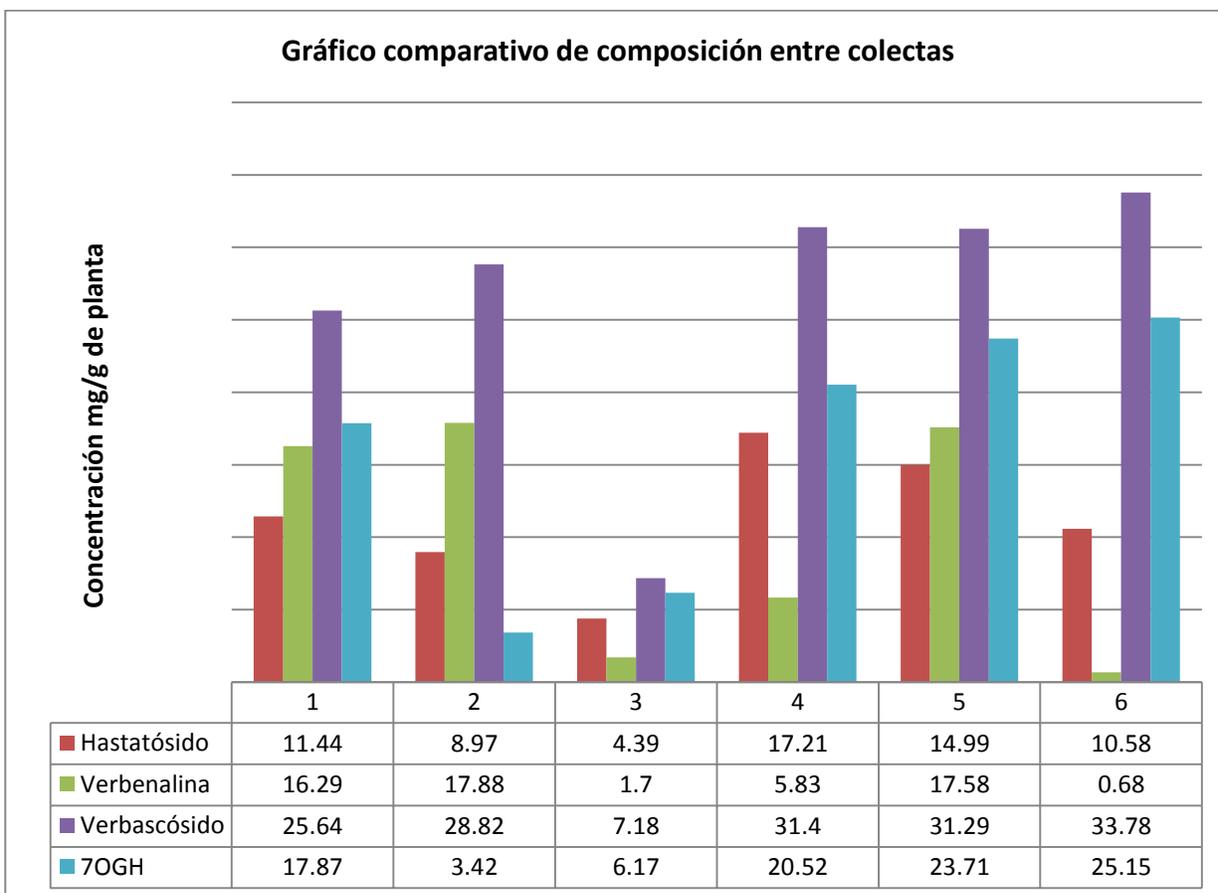


Gráfico 10. Gráficas comparativas de los contenidos metabólicos de las seis colectas.

Los resultados obtenidos de la cuantificación demuestran que la especie vegetal contiene una cantidad importante de los metabolitos secundarios (0.17 – 3.37% en peso), además se refleja que no existe una tendencia común entre la proporción de los componentes químicos evaluados para las seis colectas pero el verbascósido siempre se encontró presente en mayor concentración, las colectas 1 y 2 que fueron adquiridas en el Mercado de Sonora difieren principalmente en la concentración de 7OGH, siendo la 1 constituida de plantas silvestres y la 2 de plantas cultivadas, lo que podría sugerir que 7OGH se podría encontrar en mayor cantidad en plantas silvestres; la colecta 3 proveniente de Hueyapan, Morelos mostró una menor cantidad de los cuatro compuestos, pero un perfil cromatográfico cualitativamente equivalente a los de las otras colectas, lo que podría descartar inicialmente la descomposición de los compuestos marcadores debida al tiempo de almacenaje y presentar una menor concentración debida a las condiciones ambientales, principalmente temperatura, humedad y altitud. Las colectas 4, 5 y 6 muestran una mayor dispersión en el contenido de iridoideos, esto podría sugerir una variabilidad debida a las condiciones ambientales de la región donde fueron colectadas.



7.3 Evaluación de toxicidad aguda y determinación de DL₅₀

Como se indicó en el apartado 5.7, se evaluó la toxicidad de la planta empleando los rangos de dosis descritos por Lorke a 10, 100 y 1000 mg/kg de peso en la primera fase. En la segunda fase 1600, 2900 y 5000 mg/kg de peso, empleando tres animales para evaluar cada dosis y empleando en ambas fases un grupo control que fue administrado con solución de NaCl al 0.9% m/v, todos los animales fueron administrados por vía oral y en dosis única; los animales fueron privados de alimento durante 4 horas previo a la administración pero se mantuvo el suministro de agua.

Ninguno de los ratones evaluados en las dosis de 10, 100, 1000, 1600 y 2900 mg/kg de peso murió por causa de toxicidad, se confirmó su patrón de actividad y un aumento de peso progresivo a lo largo del estudio. Uno de los tres ratones que conformaron el grupo de dosis de 5000 mg/kg murió por toxicidad inducida por el extracto a las 24 de la administración y presentó un cuadro de hiperventilación previo a su muerte, se disectó para evaluar sus órganos internos, se observó que ninguno de los órganos observados (pulmones, corazón, hígado, estómago, intestinos y riñones) presentaba anomalías físicas visibles, la presencia de alimento en el estómago sugiere que el mismo se alimentó después del vaciamiento gástrico del extracto, los intestinos no mostraron presencia del mismo, lo que confirma que fue absorbido, sin mostrar alguna diferencia significativa.

Esto sugiere que el cuadro de toxicidad aguda inducido por la decocción de las partes aéreas de *V. carolina* se refleja a nivel del aparato respiratorio; ya que en ninguno de los niveles de dosis se observó la muerte de los tres animales, no se determinó la dosis mínima letal, ni la dosis subletal, por lo que la DL₅₀ se estima mayor a 5000 mg/kg de peso.

Por lo tanto el extracto por decocción de las partes aéreas de *V. carolina* queda clasificado en la categoría IV de la "Clasificación toxicológica según riesgos y valores de DL₅₀ aguda por vía oral" de la OECD⁴⁶ como "Producto que normalmente no ofrece peligro" debido a que su DL₅₀ es mayor a 5000 mg/kg de peso.

⁴⁶ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. (2001). Acute Oral Toxicity –Up- and –Down- procedure, Paris. No. 425



8. CONCLUSIONES

Se aislaron cuatro compuestos elegidos como marcadores de la especie vegetal *Verbena carolina* L., de ellos, tres habían sido documentados previamente, uno (7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina) no había sido aislado en la especie. Las estructuras de dichos compuestos fueron ratificadas y elucidadas respectivamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Se desarrolló un método para la cuantificación de los compuestos marcadores que demostró ser adecuado, lineal, exacto y preciso, lo que confirma la validación del mismo.

Entre las pruebas realizadas durante la validación del método, se efectuaron las pruebas de estabilidad analítica de la muestra, dos compuestos (hastatósido y 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina) demostraron ser estables a todas las condiciones y durante el periodo de tiempo en el que fueron sometidos, la verbenalina demostró ser estable en la mayoría de las condiciones, excepto a 37°C en ausencia de luz y tras siete días.

El verbascósido mostró ser estable durante todo el tiempo de estudio en condiciones de refrigeración (4°C) y temperatura ambiente en ausencia de luz, pero lábil al ser sometido a condiciones de iluminación, esto se refleja en el hecho de no pasar la prueba de estabilidad desde las primeras 24 horas a temperatura ambiente en presencia de luz, igualmente a las 72 horas y siete días a 4°C y temperatura ambiente con presencia de luz y 37°C en ausencia de luz. Esto demuestra que el verbascósido es fotolábil y por lo tanto se recomienda el uso de instrumental adecuado para evitar la exposición de dicho compuesto a la luz.

La cuantificación de los compuestos marcadores se efectuó en seis colectas de la especie vegetal, se detectaron cantidades importantes pero muy variables de cada compuesto en cada colecta, sin algún patrón predecible ni cantidad promedio esperable. Esto justifica el desarrollo de un método de cuantificación para los mismos y marca una pauta para un estudio de producción de dichos metabolitos en distintas condiciones climáticas, ambientales, entre otros, así como la evaluación biológica de los mismos para pruebas específicas relacionadas con el uso tradicional de la planta.

La evaluación de la toxicidad aguda por el método de Lorke demostró la inocuidad de la planta en ratones. Uno de los animales murió por efecto de toxicidad aguda, se estimó que la DL₅₀ es mayor a 5000 mg/kg de peso, dicha dosis está situada muy por encima de la cantidad recomendada en medicina tradicional (infusión o decocción de 1 a 2 g de partes aéreas de *V. carolina* en 250 mL de agua para un sujeto con peso promedio de 70 kg), a partir de esa cantidad de material vegetal seco se obtiene como residuo aproximadamente 10% del peso, lo que implica de 100 a 200 mg del extracto, al extrapolar esa posología, la cantidad suministrada quedaría comprendida entre 1.4 y 2.8 mg/kg de peso, la proporción que sería necesario administrar a un sujeto de 70 kg es más de 1700 veces la recomendada y por lo tanto se concluye que la droga vegetal es inocua. Esto aporta una medida de la confiabilidad y seguridad para la administración de los extractos de *V. carolina*, pero no constituye un estudio preclínico.



9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo justifican el desarrollo de un método de cuantificación para los compuestos aislados y marca una pauta para un estudio de producción de dichos metabolitos en distintas condiciones climáticas, ambientales, entre otros, así como la evaluación farmacológica de los mismos para pruebas específicas relacionadas con el uso tradicional de la planta.



10. BIBLIOGRAFÍA

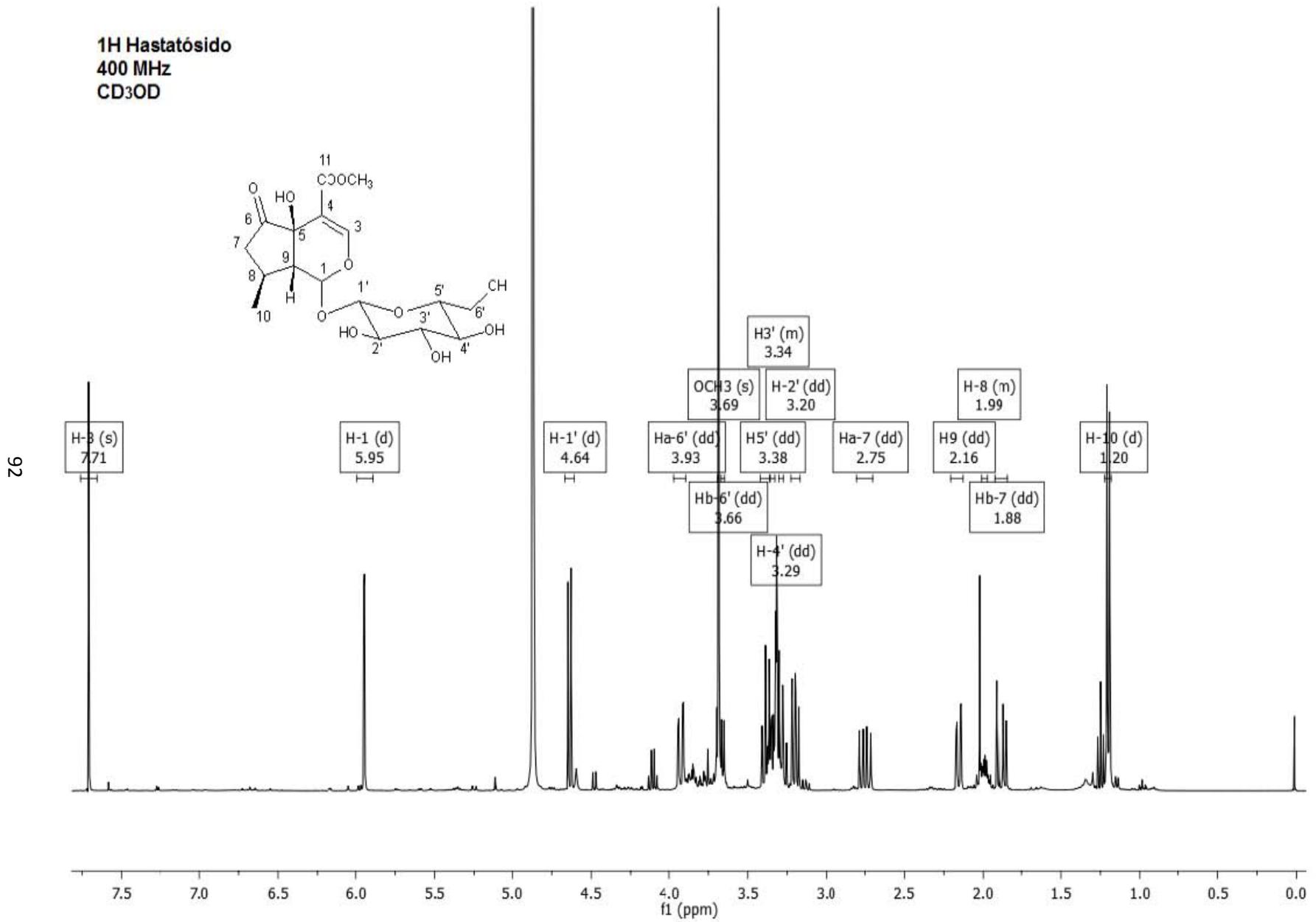
- 1 World Health Organization. (2013) "Medicina tradicional". World Health Organization, Geneva, Swiss
- 2 World Health Organization. (2000) "Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial". World Health Organization, Geneva, Swiss
- 3 Ríos, L. G. (2000). "Control de calidad de una droga de origen vegetal: *Iostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl". Tesis de maestría (Maestría en Ciencias Químicas), Facultad de Química, UNAM. México, DF.
- 4 De la Cruz, M. (1991) "Libellus Medicinalibus Indurum Herbis". Manuscrito azteca de 1552. Traducción latina de Juan Badiano. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores. México: Editorial fondo de cultura económica, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 5 México. (2001). Secretaría de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- 6 Wills, R., Bone, K. y Morgan, M. (2000). "Herbal products: active constituents, mode of action and quality control". *Nutrition Research Reviews*. **13**:47-77.
- 7 Rzedowski, J., Rzedowski, G. C. (2002). "Flora del Bajío y de regiones adyacentes". Fasc. 100. Instituto de ecología. Centro regional del bajío, México. pp. 118-139.
- 8 Thorne, R. F. (2000) The classification and geography of the flowering plants. Dicotyledons of the class Angiospermae (subclasses Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Asteridae and Lamidae). *Botanical Reviews*. **66**: 525. 2000.
- 9 Heywood, V. H. (1985). Las plantas con flores. Ed. Reverté. España. p 329.
- 10 Stevens, P.F. (2008). Angiosperm Phylogeny (documento en línea). Version 9, junio de 2008, disponible en URL: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Citado septiembre de 2013.
- 11 O'Leary, N., Múlgura, M., Morrone, O. (2007) "Filogenia del género *Verbena* (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". *American Journal of Botany*. **45**:103-105.
- 12 O'Leary, N., Múlgura, M., Morrone, O. (2007) "Filogenia del género *Verbena* (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". *American Journal of Botany*. **45**:118.
- 13 Arkadani, M., Mosaddegh, M., Shafaati, A. (2003). "Volatile Constituents from the Aerial Parts of *Verbena Officinalis* L. (Vervain). pp. 39-42.
- 14 Gamboa, C., Castro, O. (2004). "Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae)". *Phytochemistry (Elsevier)* **65**:2369-2372.
- 15 Deepak, M., Handa, S. (2000). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". *Phytochemical Analysis*. **11**:351-355.
- 16 Morales, R. A., (2009) "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)". Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.



17. Franke, A., Rimpler, H. (1987). "Vebraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*". *Phytochemistry*. **11**: 3015-3020.
18. Müller, A., Ganzera, M., Stuppner, H. (2004). "Analysis of the Aerial Parts of *Verbena officinalis* L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography". *Chromatographia*. **60**:193-197.
19. Ono, M., Oishi, K., Abe, H., Masuoka, C., Okawa, M., Ikeda, T., Nohara, T. (2006). "New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Verbena brasiliensis*" *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **54**(10): 1421-1424.
20. Casanova, E., García-Mina, J. M., Calvo, M. I. (2008). "Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". *Plant Foods Human Nutrition*. **63**: 93-97.
21. Chen, C-C., Huang, H-Y., Shen, C-C., Huang, Y-L., Ou, J-C. (2003). "Chemical constituents of *Verbena bonariensis*". *Chinese Pharmaceutical Journal*. **55**(1):65-70.
22. Valento, P., Andrade, P., Areias, F., Ferreres, F, Seabra, R. (1999). "Analysis of the Vervain Flavonoids by HPLC/Diode Array Detector Method. Its Application to Quality Control". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **47**:4579-4582.
23. Li, Y., Matsunaga, K., Kato, R., Ohizumi, Y. (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". *Journal of Natural Products*. **64**(6):806-808.
24. Aguila, M. A., et al. (2011). "Pruebas de identidad y pureza para el control de calidad de dos drogas vegetales medicinales: *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) y *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake (Asteraceae)", Tesis de licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
25. Bilia, A. R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2007). "HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**: 463-470.
26. García, A. R., et al. (2012). "Estudio químico complementario de las partes aéreas de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae), Tesis de licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
27. Rehecho, S., Hidalgo O., García-Iñiguez, M., Navarro, I. Astiasarán, I., Ansorena, D., Cavero, R.Y. Calvo, M.I. (2011). "Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L.". *Food Science and Technology*. **44**: 875-882.
28. UNAM., (2009). "BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. *Verbena carolina* L." Monografía en línea, disponible en URL <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbena&id=7509>.
29. *Verbena carolina* L. Integrated Taxonomic Information System ITIS report taxonomic serial No 32090, monografía en internet, disponible en URL http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32090 .
30. Gaedcke, F., et al. (2003). "Herbal Medicinal Products. Scientific and Regulatory Basis for Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation". CRC Press, New York. pp. 22-23.
31. El-Naggar, J., Beal, L. (1980). "Iridoids, A review". *Journal of Natural Products*, **43**:649-709.



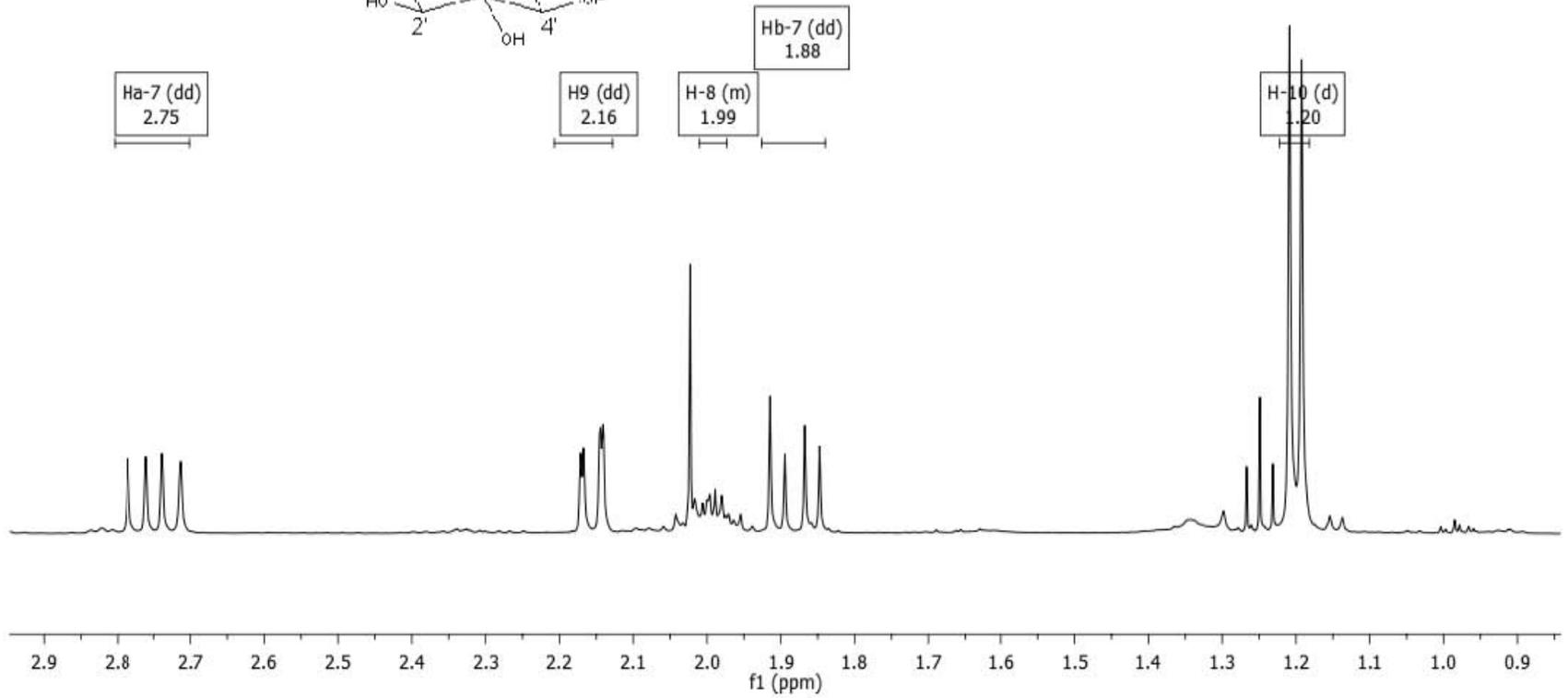
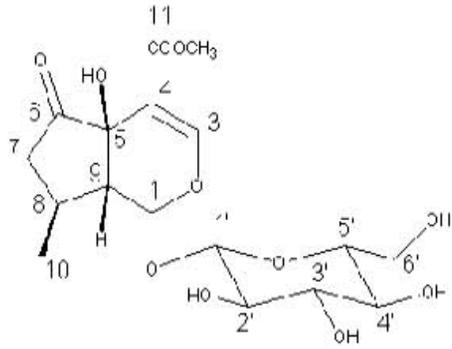
32. Villaseñor, M., (2007). "Bioactivities of Iridoids". *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. Bentham Science Publishers. **6**:307-314.
33. Sempaio-Santos, M., Kaplan, C.. (2001). "Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics". *Journal of Brazilian Chemical Society*. **12**(2): 144-153.
34. Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. (2007). "Naturally Ocurring Iridoids. A Review, Part 1". *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **55**(2): 159-222.
35. Jensen, S. R., (1992). "Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae". *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **79**: 284-302.
36. Dewick, P. M., (2009). "Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach". 3rd. Ed. p 207.
37. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1981). "Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods". *Advanced Food Research*. **27**: 149-242.
38. Bruneton, J. (2002). "Farmacognosia. Plantas medicinales" 2ª Ed, España. pp 306-341.
39. Törrönen, R., Häkkinen, S., Kärenlampi, S., Mykkänen, H. (1997). "Flavonoid and phenolic acids in selected berries". *Cancer Letters*. **114** (1-2): 191-192.
40. Li, Y. Q., Matsunaga, K., Kato, R., Ohizumi, Y. (1996). "Studies on the structure of isoostelbin". *Journal of Natural Products*, **31**(10): 761-763.
41. Harborne, J. B. (1975). *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* "The flavonoids" (part 2) pp 159-161, 693-696.
42. México. (2000). Secretaría de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
43. Alpizar, M., Hernández, E. (2004). "Formas farmacéuticas sólidas". Universidad Nacional Autónoma de México. pp 13, 17-18.
44. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002). "Guía para la validación de métodos analíticos".
45. Lorke, D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology*. **54**: 275-287.
46. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. (2001). Acute Oral Toxicity –Up- and –Down- procedure, Paris. No. 425.



Espectro 1. ¹H RMN del hastatósido (400 MHz, CD₃OD)



Hastatósido
1H 400 MHz
CD₃OD

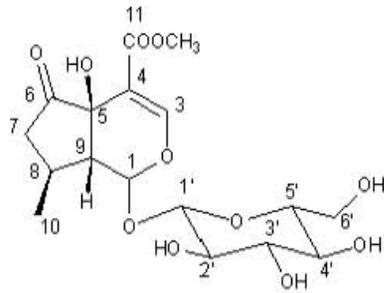


93

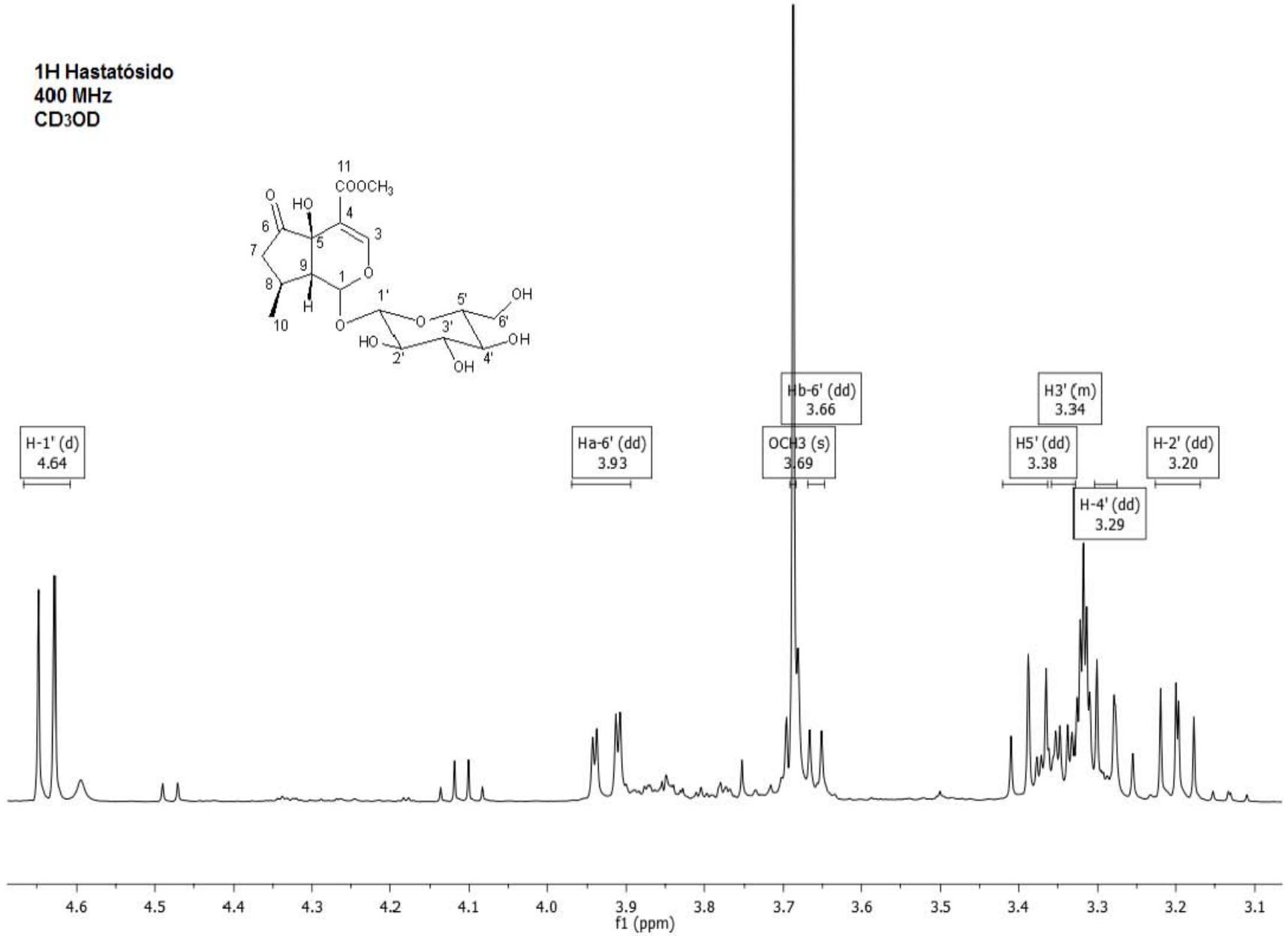
Espectro 2. ¹H RMN del hastatósido (400 MHz, CD₃OD) ampliación 1.



¹H Hastatósido
400 MHz
CD₃OD



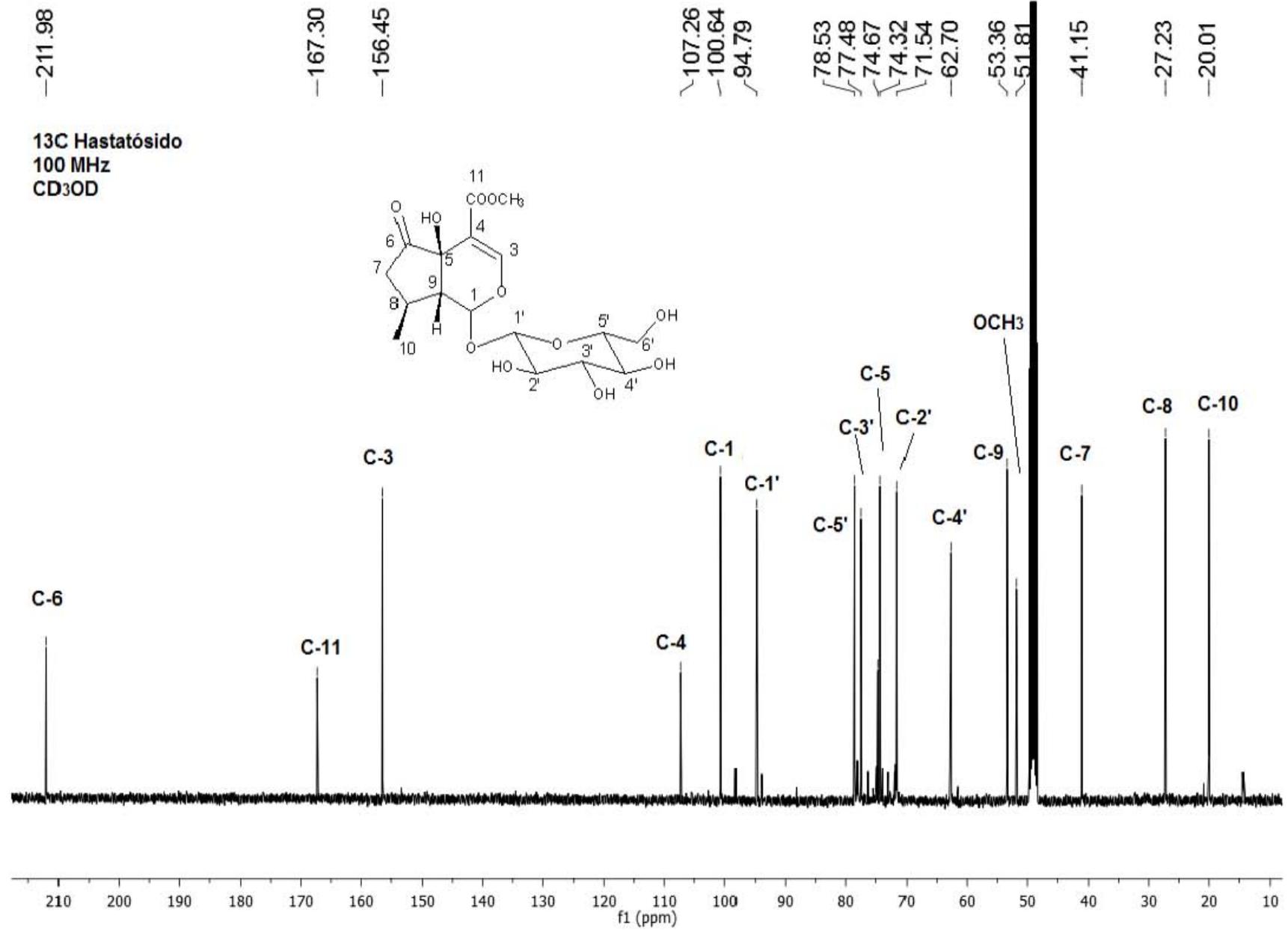
94



Espectro 3. ¹H RMN del hastatósido (400 MHz, CD₃OD) ampliación 2.



56

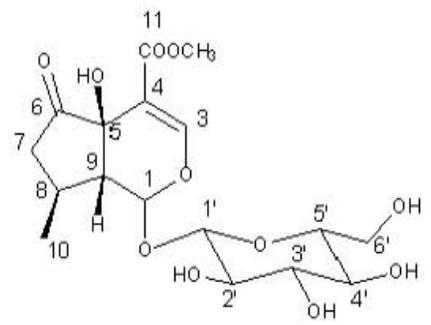


Espectro 4. ¹³C RMN del hastatósido (100 MHz, CD₃OD).

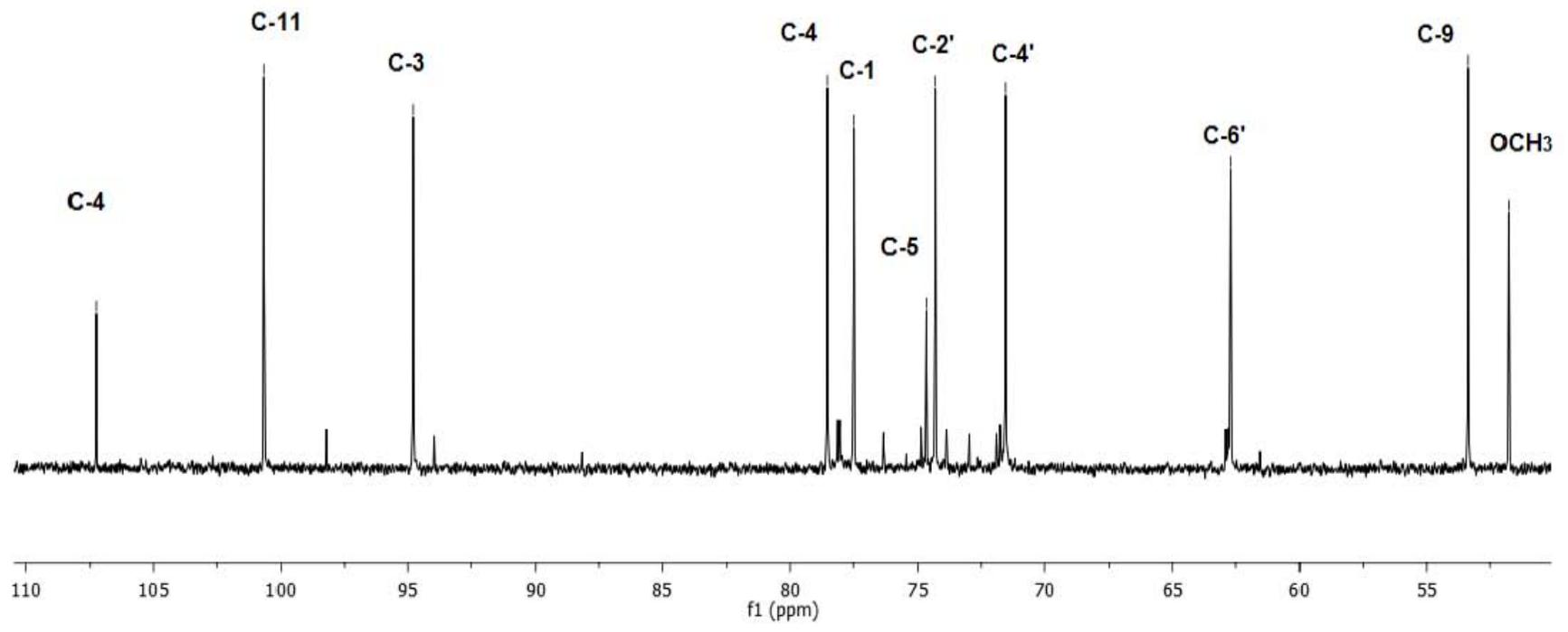


—107.26
—100.64
—94.79
—78.53
—77.48
—74.67
—74.32
—71.54
—62.70
—53.36
—51.81

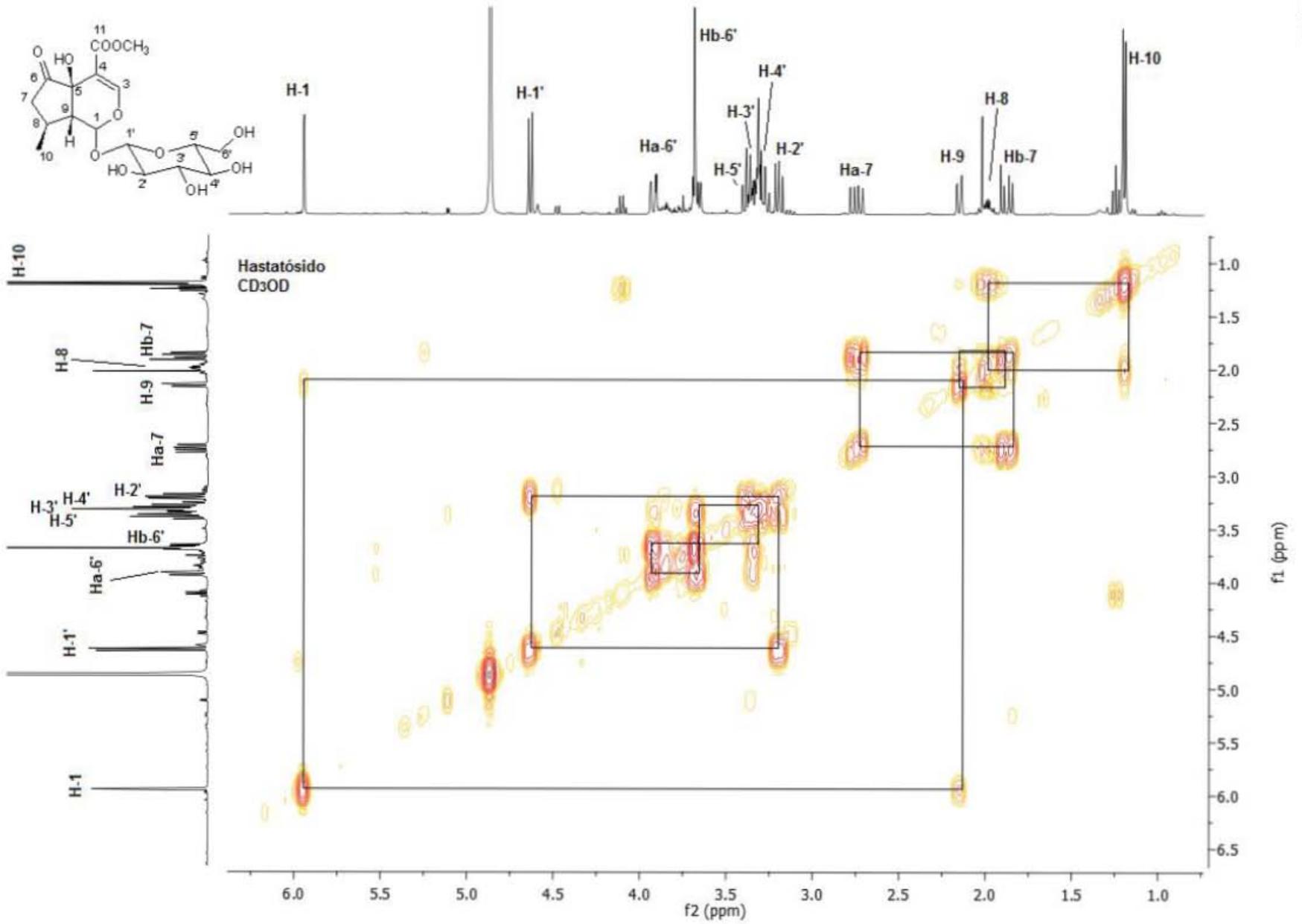
¹³C Hastatósido
100 MHz
CD₃OD



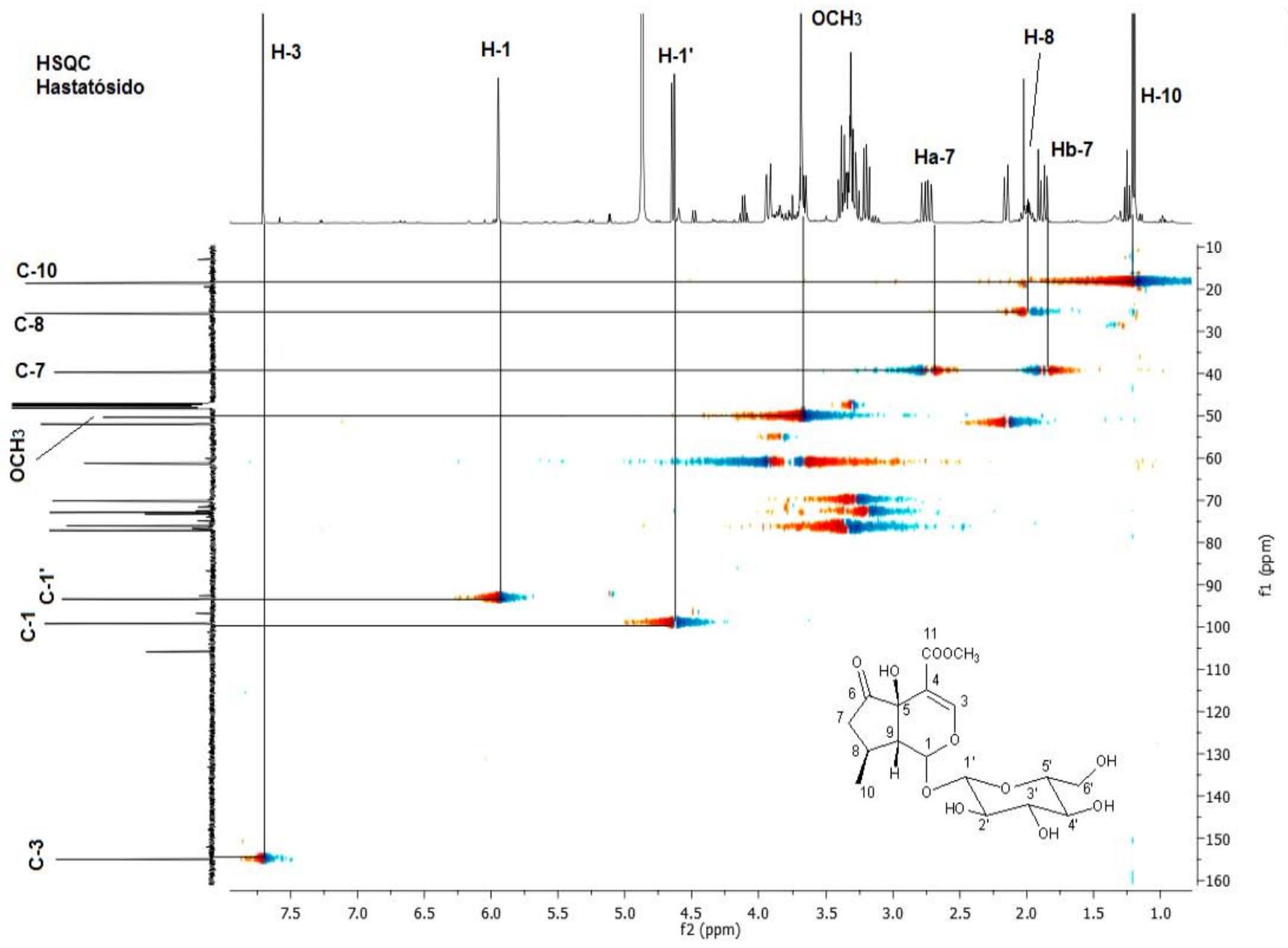
96



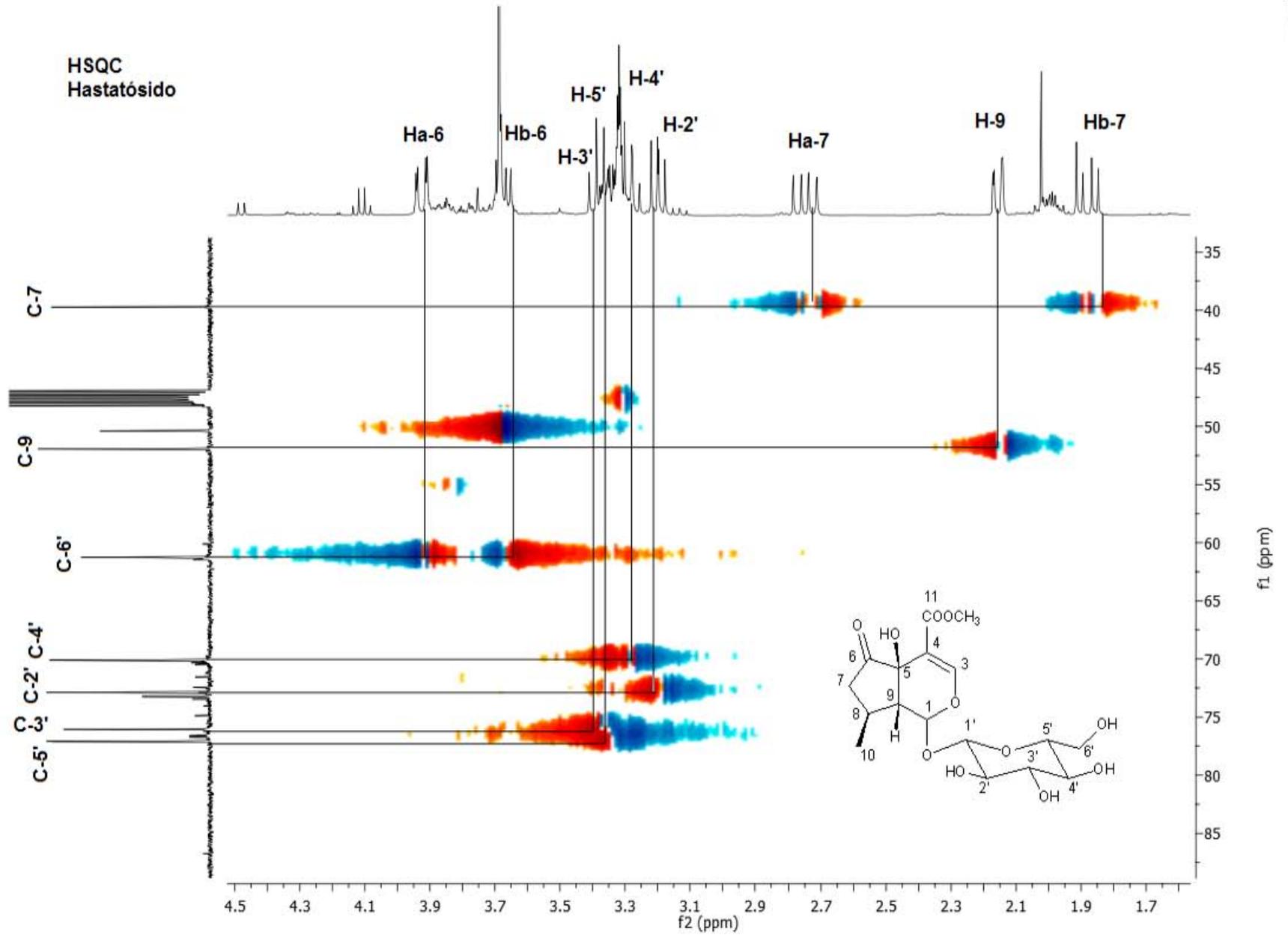
Espectro 5. ¹³C RMN del hastatósido (100 MHz, CD₃OD) ampliación.



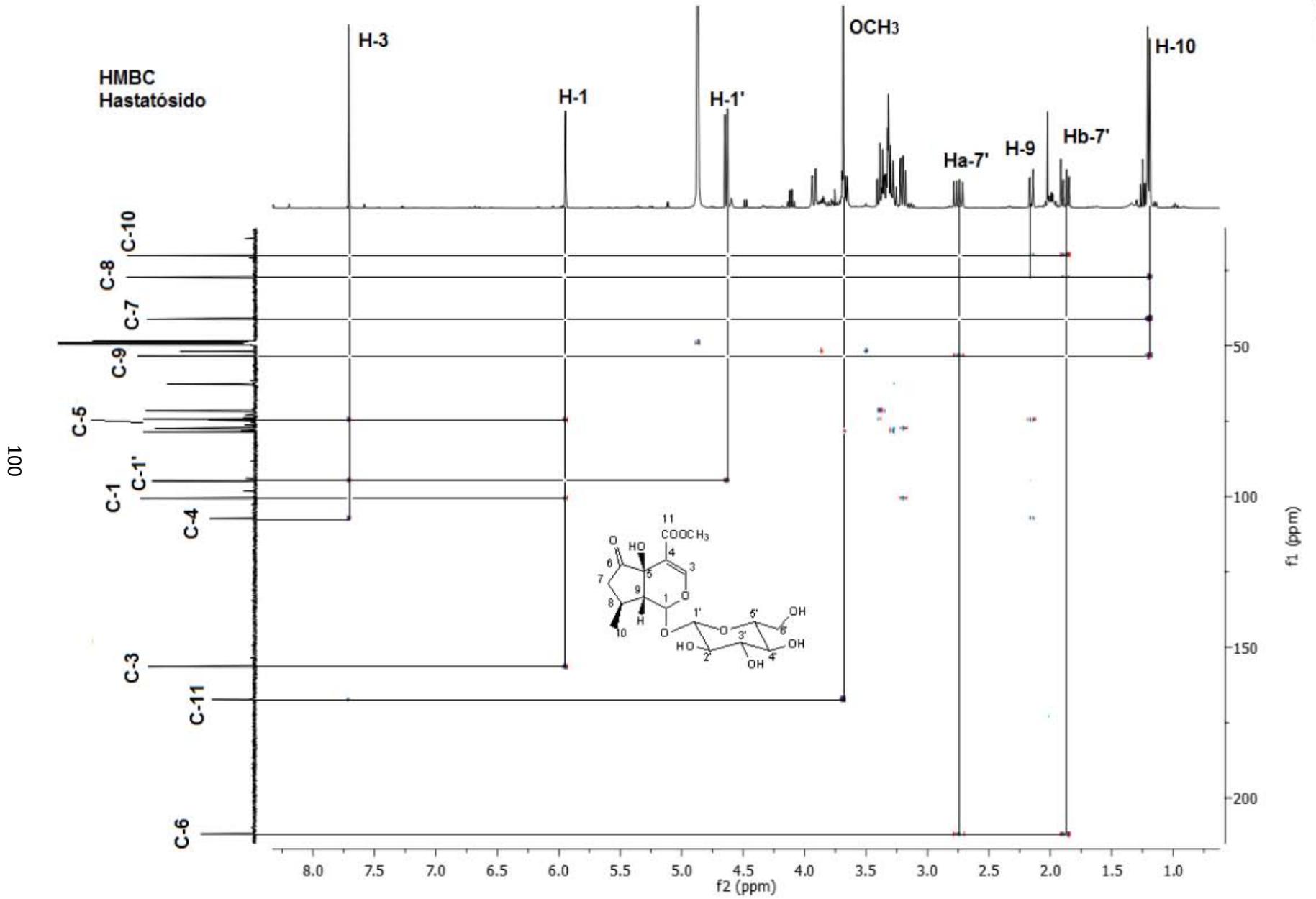
Espectro 6. ¹H COSY del hastatósido (CD₃OD)



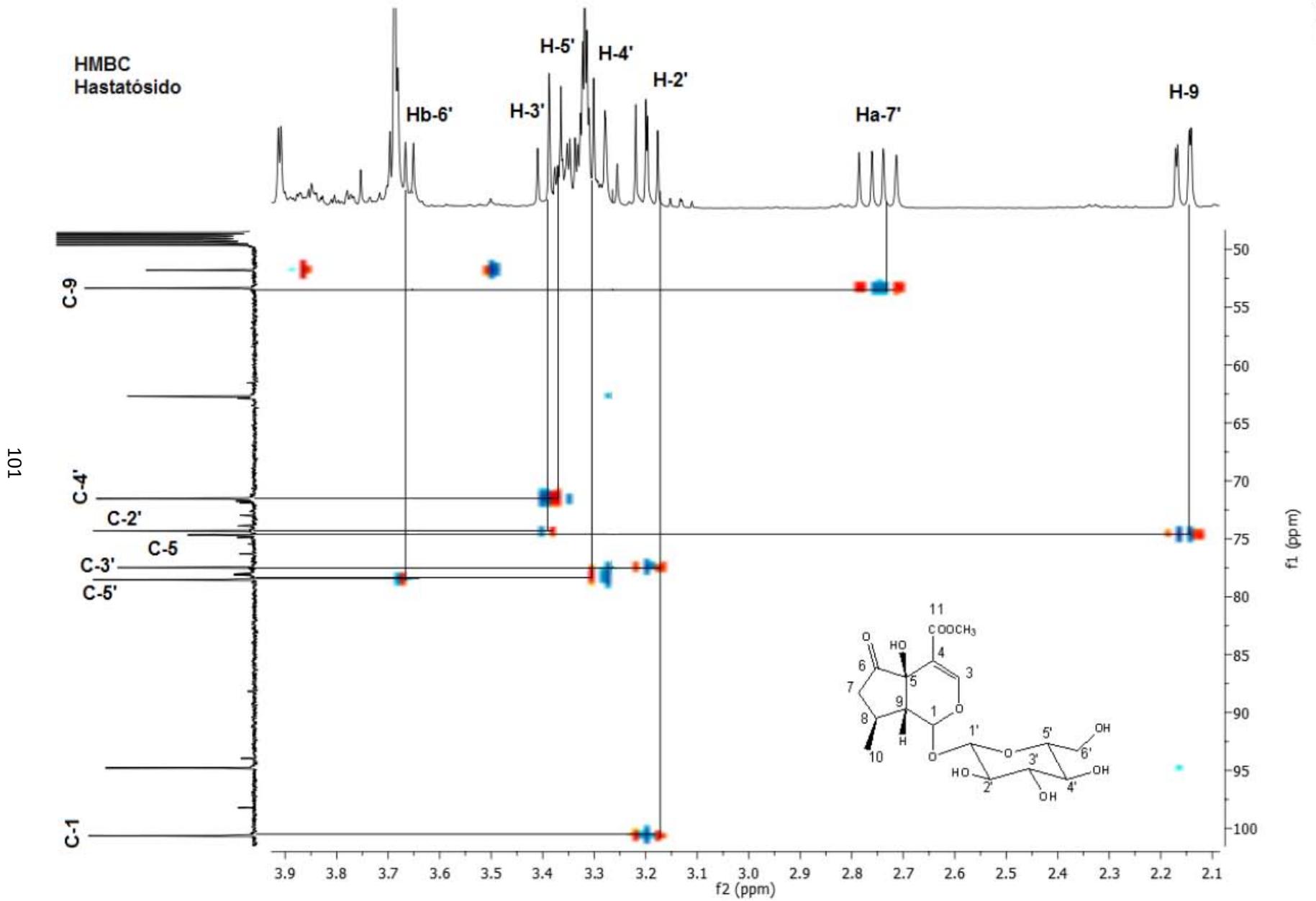
Espectro 7. HSQC del hastatósido.



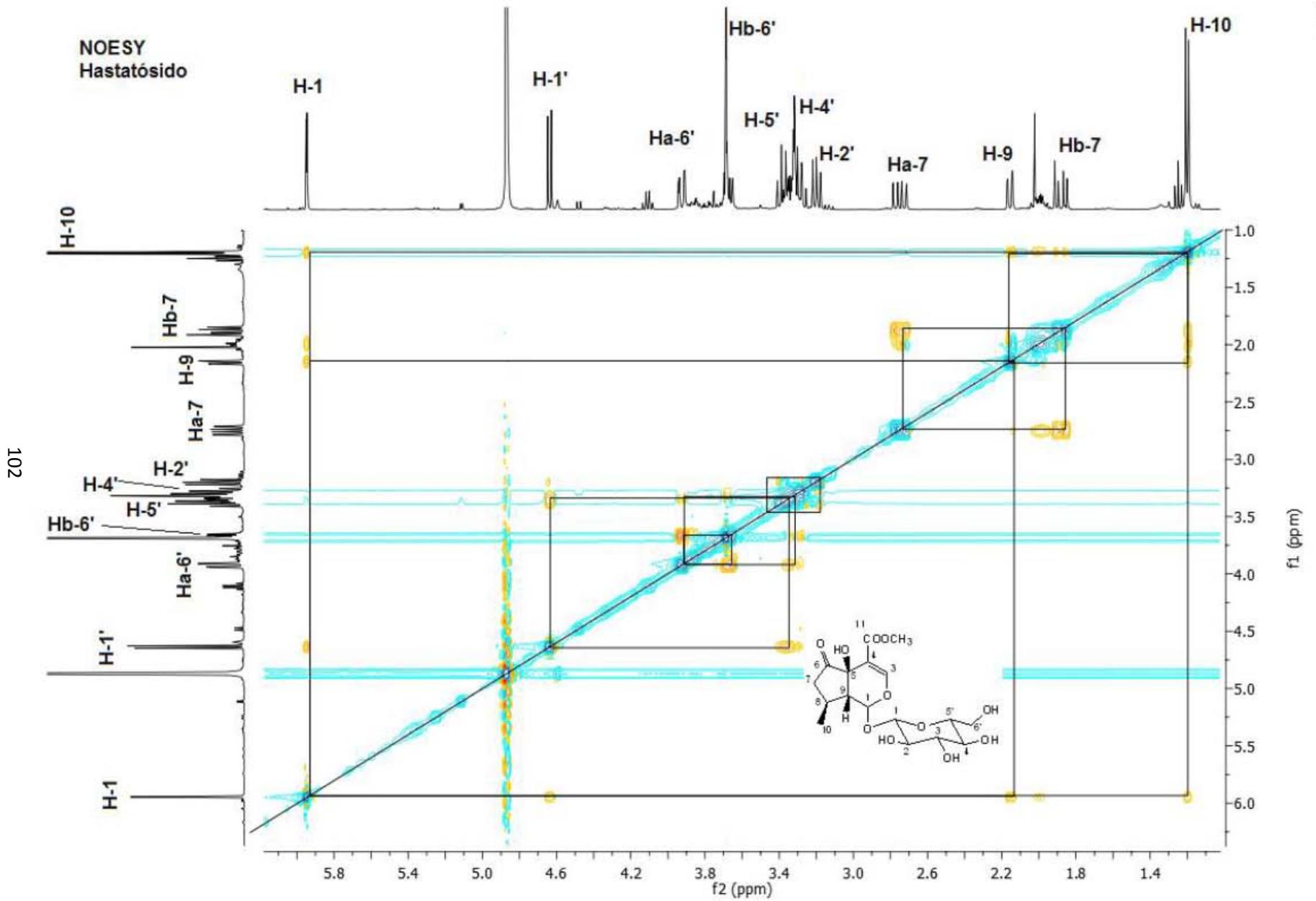
Espectro 8. HSQC del hastatósido (ampliación).



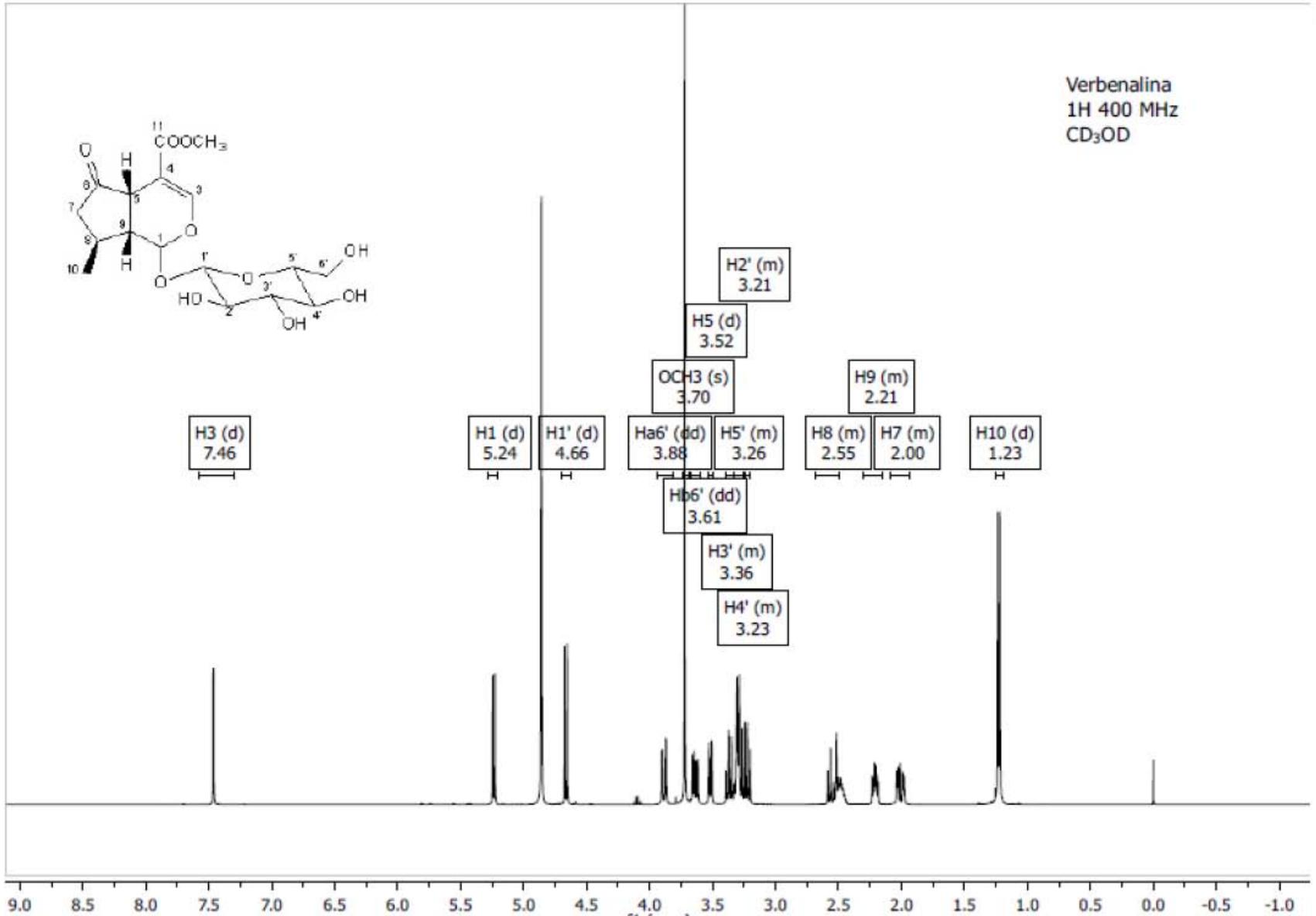
Espectro 9. HMBC del hastatósido.



Espectro 10. HMBC del hastatóside (ampliación).



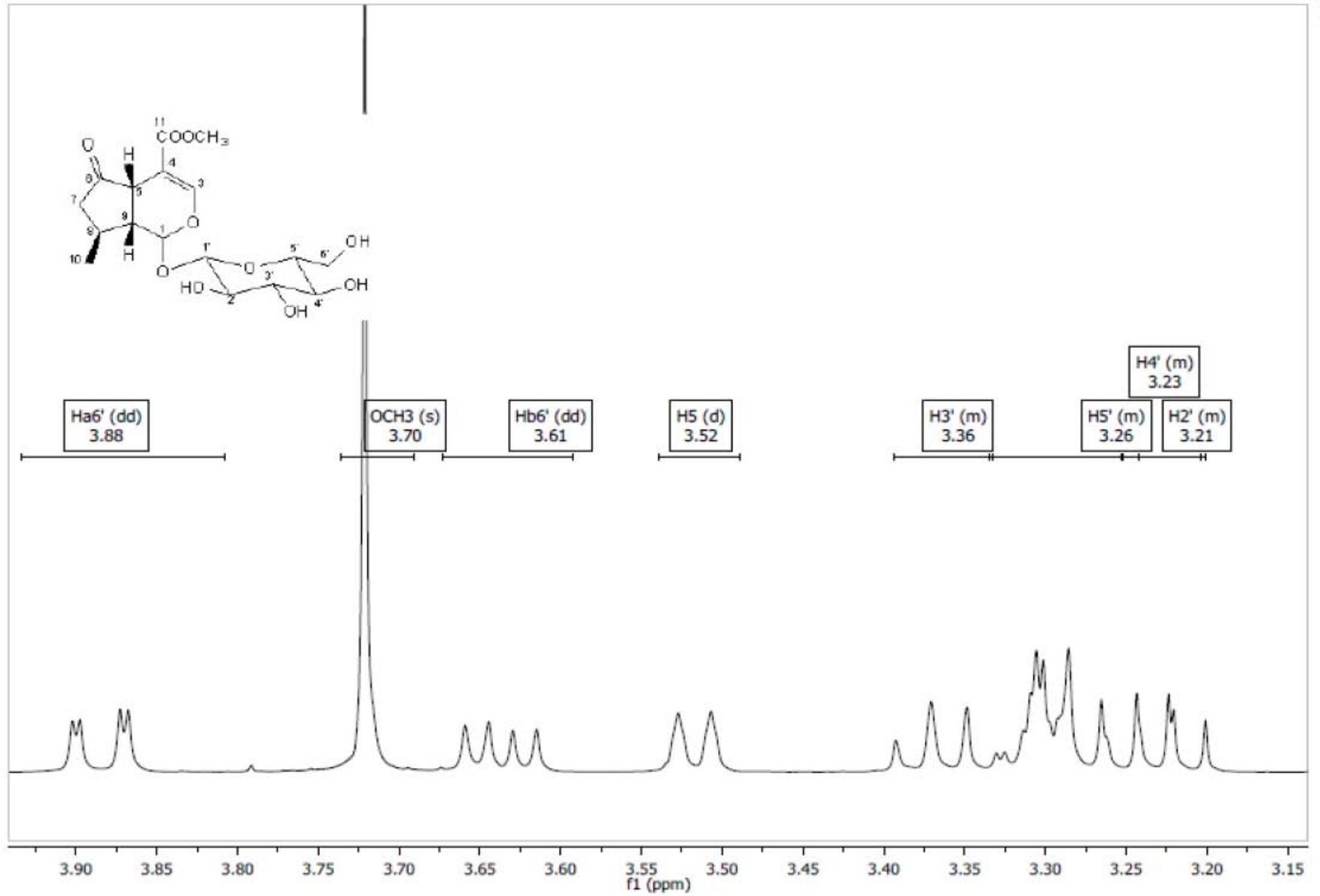
Espectro 11. NOESY del hastatósido.



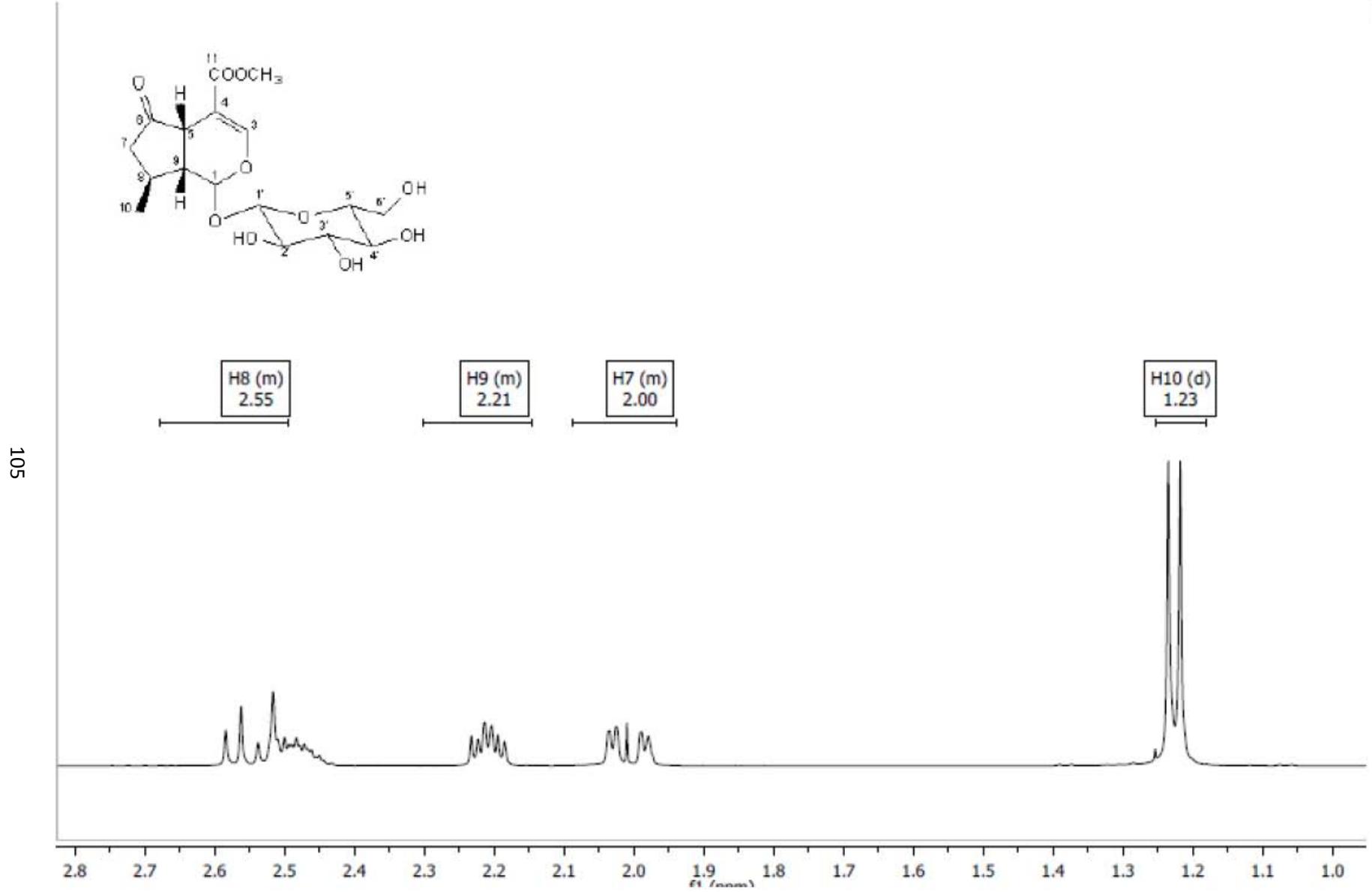
Espectro 12. ¹H de la verbenalina (400 MHz CD₃OD)



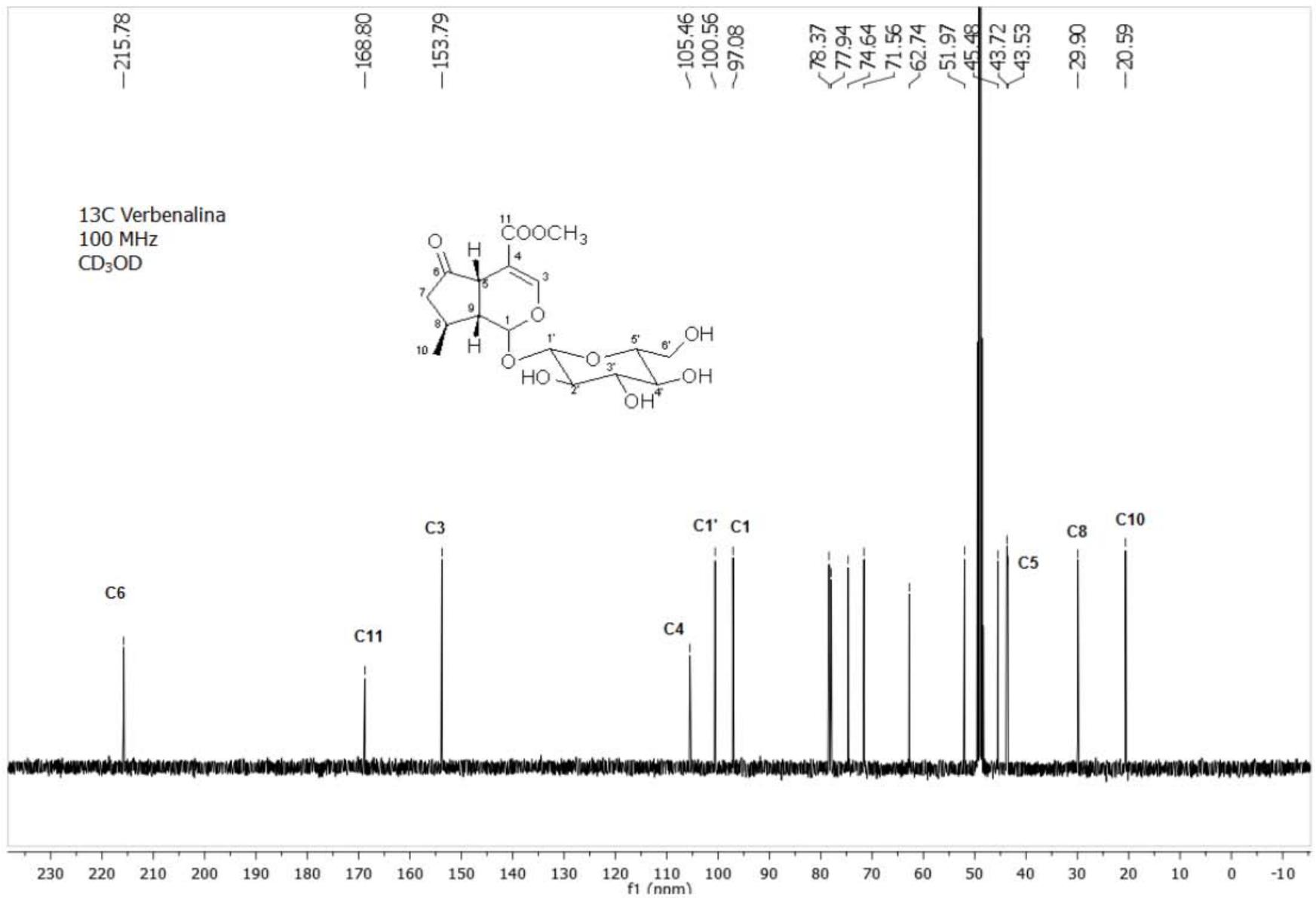
104



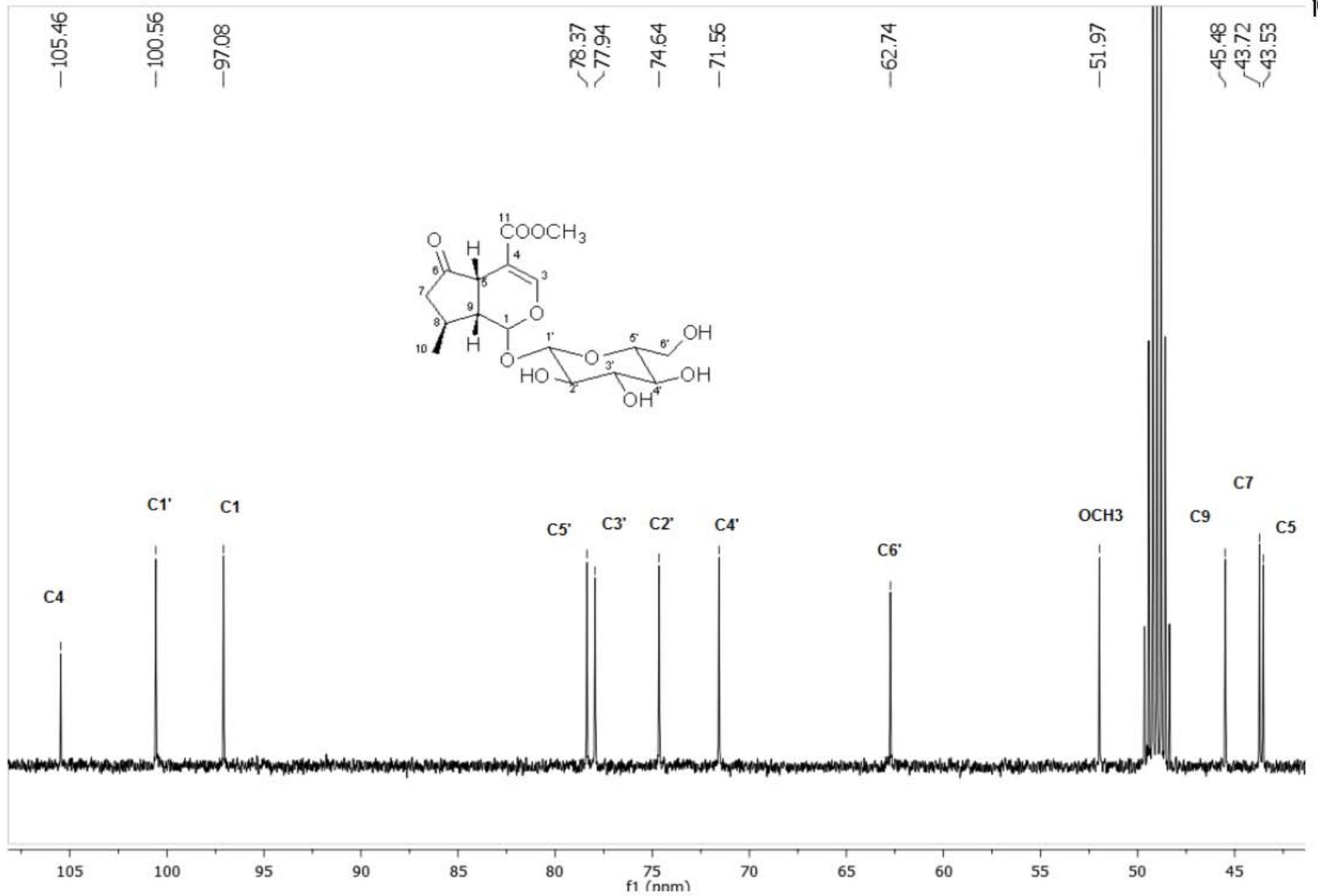
Espectro 13. ¹H de la verbenalina (400 MHz CD₃OD) ampliación 1



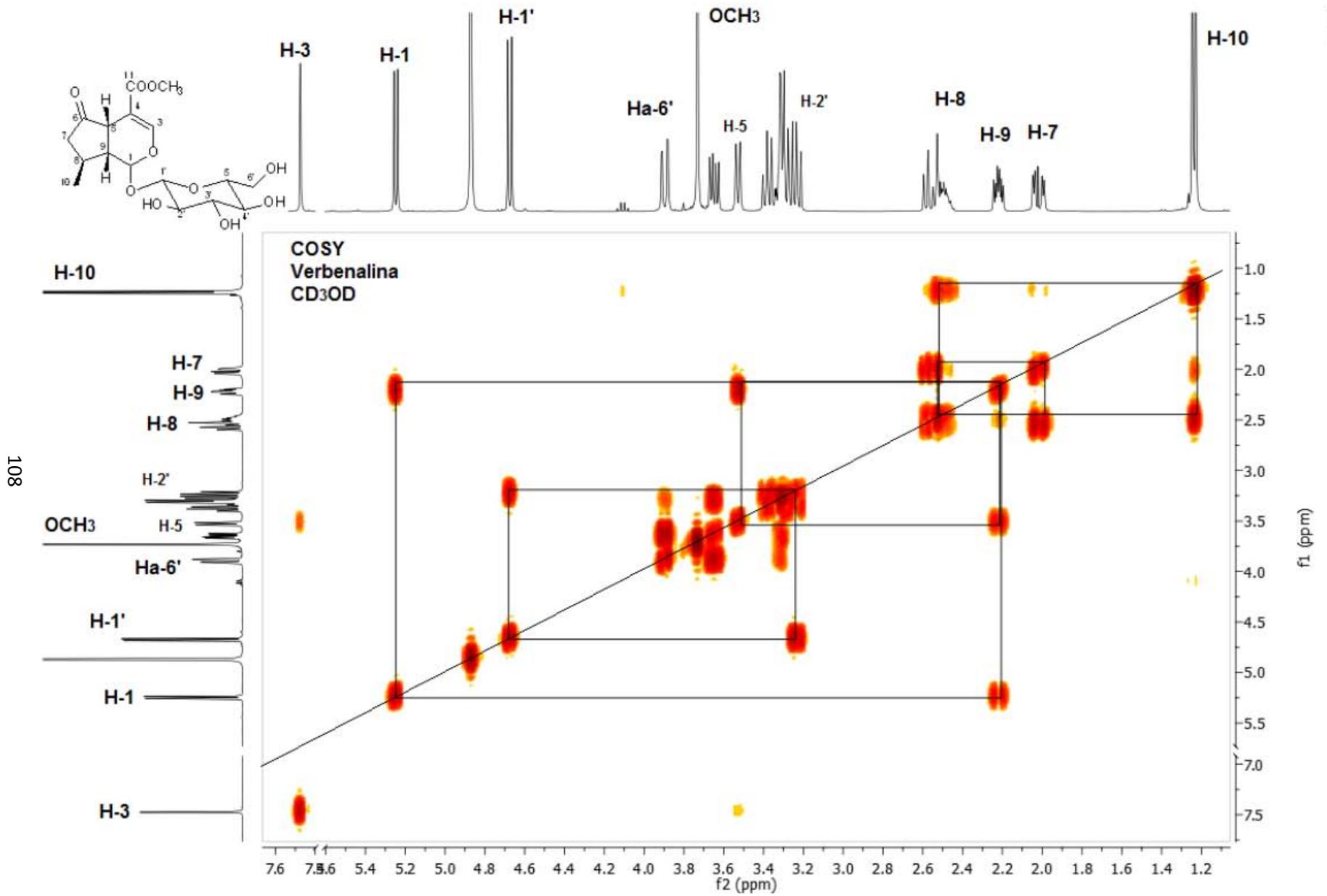
Espectro 14. ^1H de la verbenalina (400 MHz CD_3OD) ampliación 2



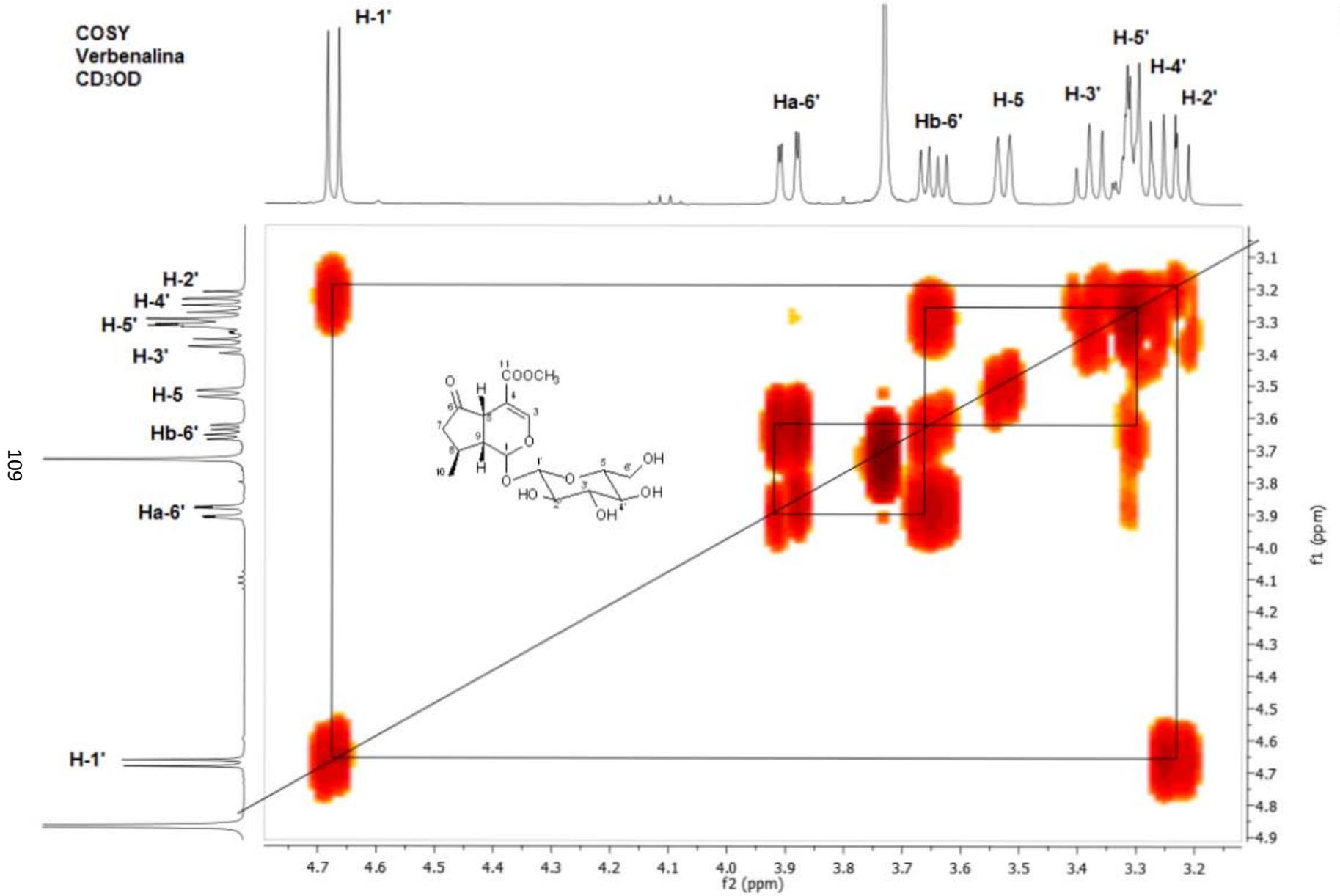
Espectro 15. ¹³C de la verbenalina (100 MHz CD₃OD)



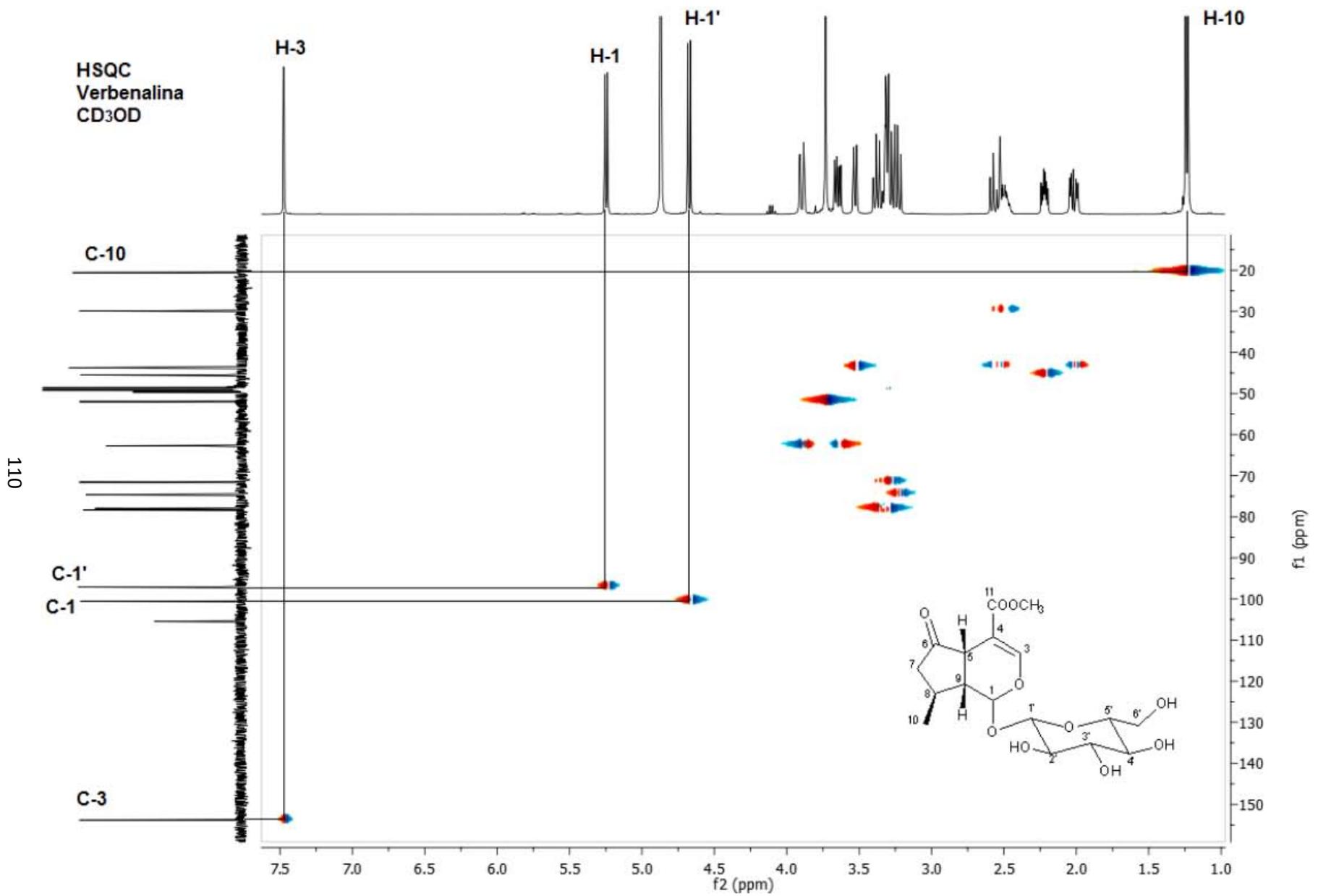
Espectro 16. ^{13}C de la verbenaquin (100 MHz CD_3OD) ampliación



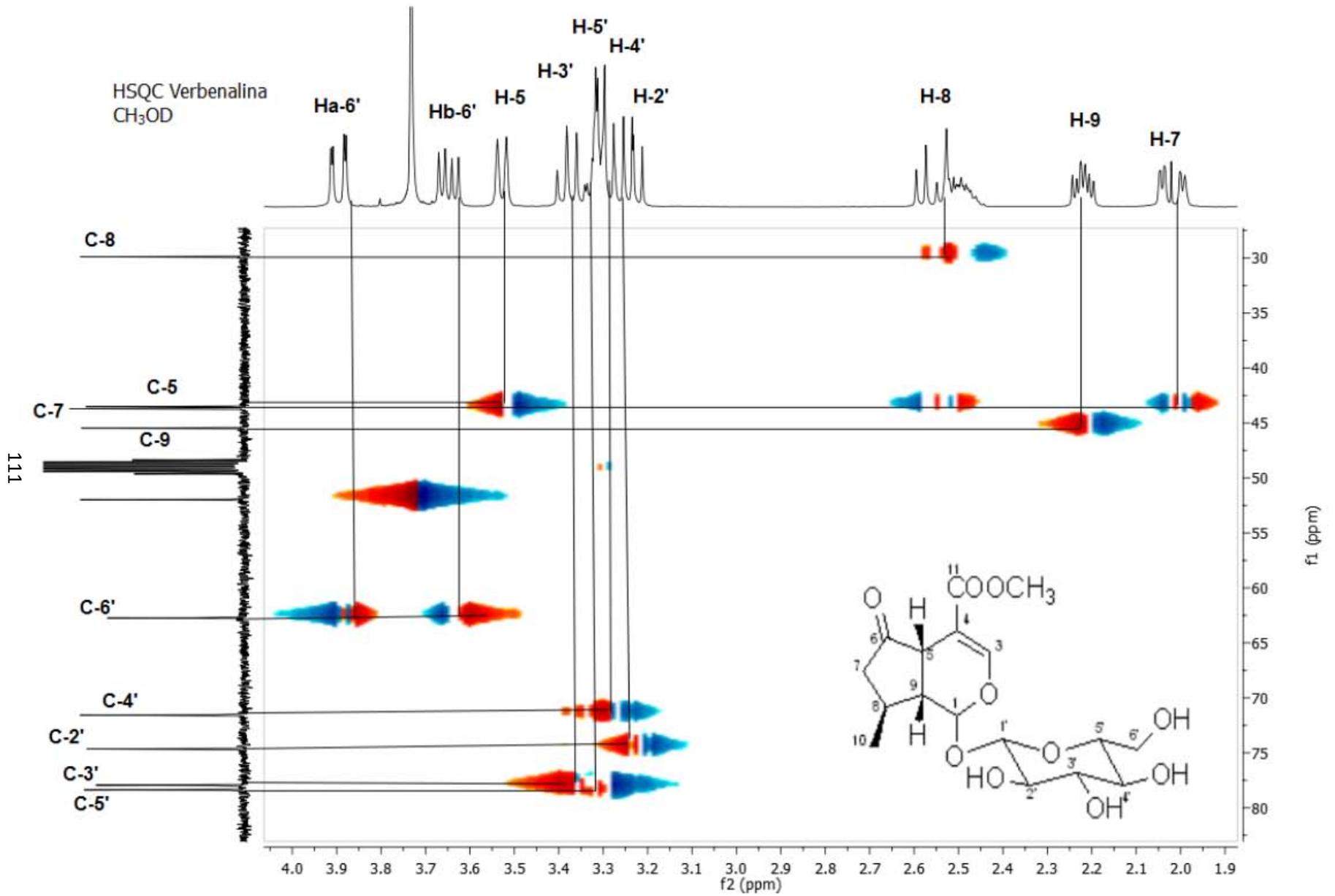
Espectro 17. ¹H COSY de la verbenalina (400 MHz CD₃OD)



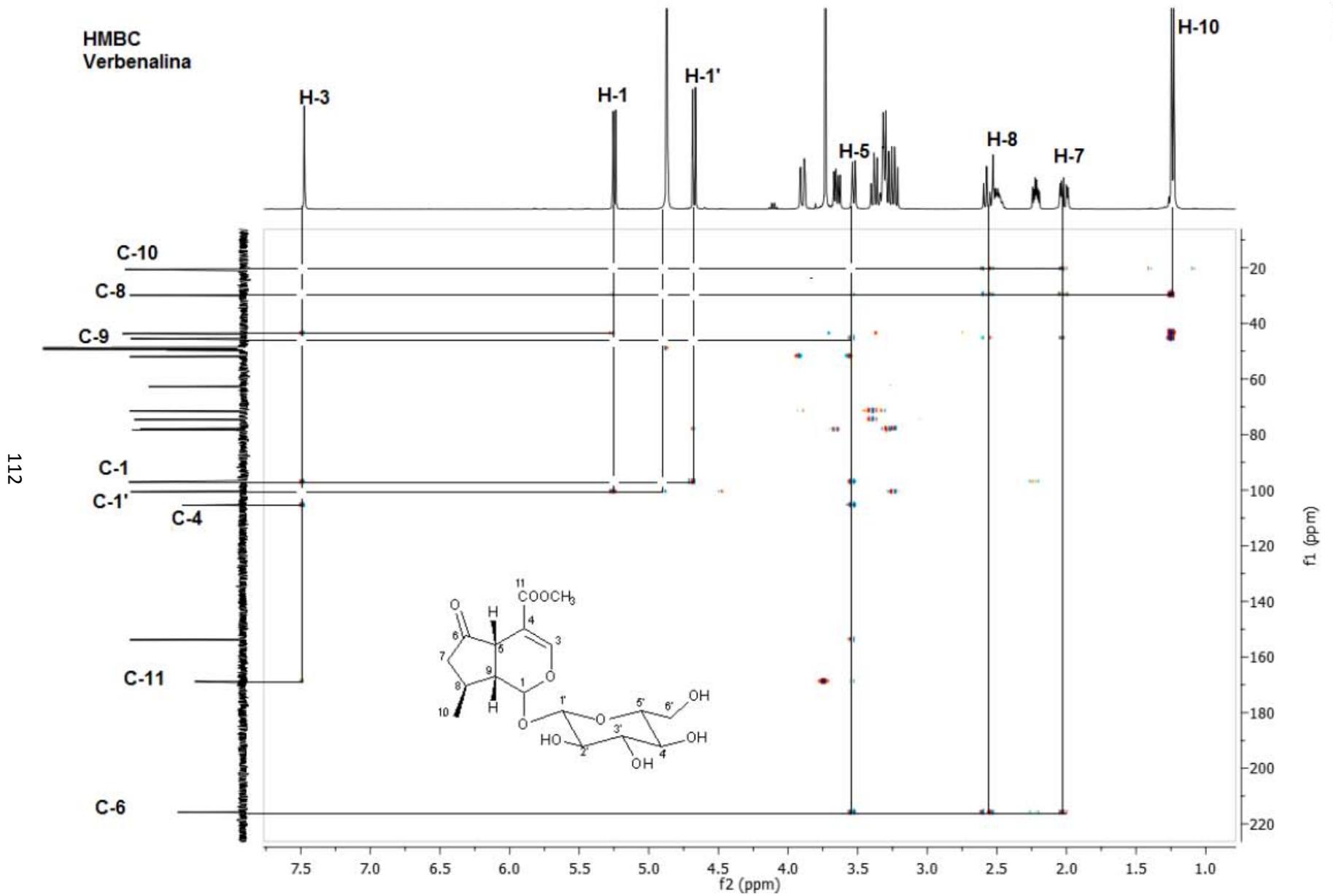
Espectro 18. ¹H COSY de la verbenalina (400 MHz CD₃OD) ampliación

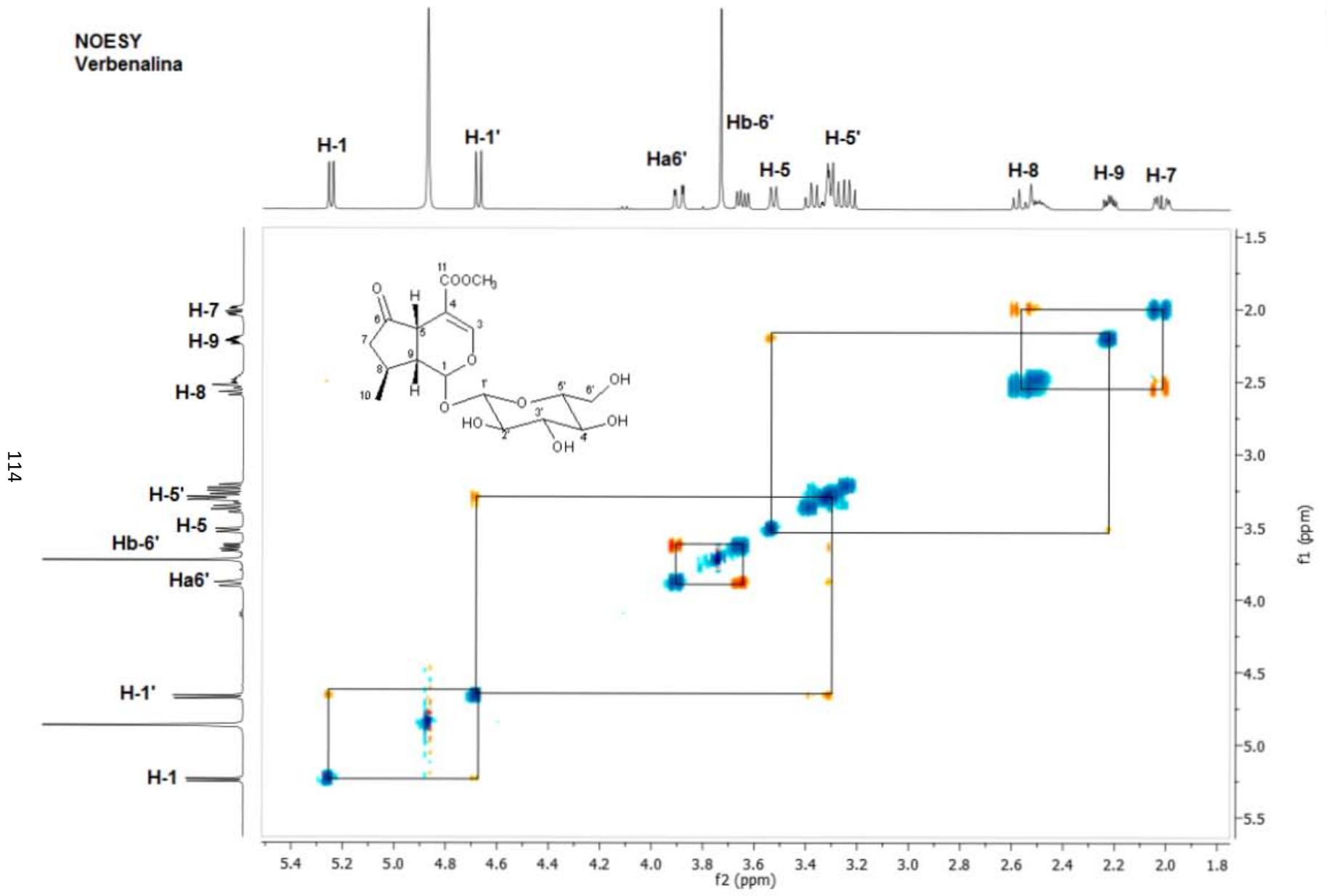


Espectro 19. HSQC de la verbenalina (100 MHz CD₃OD)



Espectro 20. HSQC de la verbenalina (100 MHz CD₃OD) ampliación



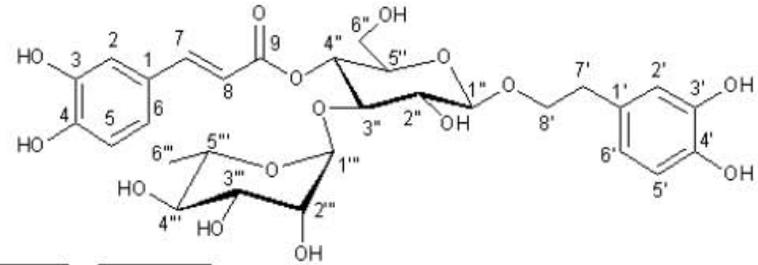


114

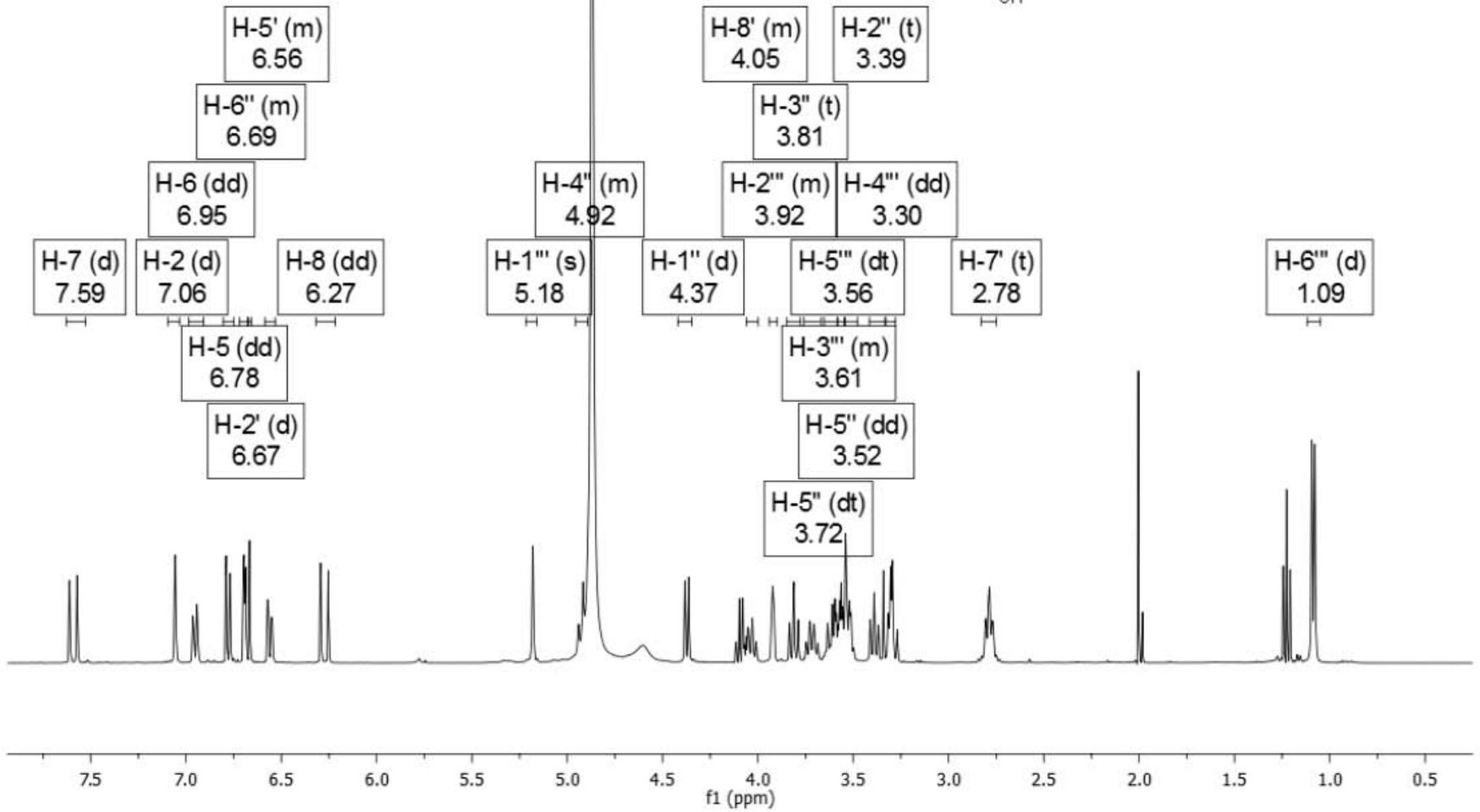
Espectro 23. NOESY de la verbenalina (400 MHz CD₃OD)



1H Verbascósido
400 MHz
CD₃OD



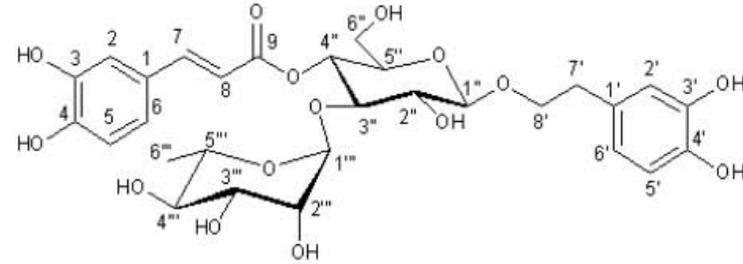
115



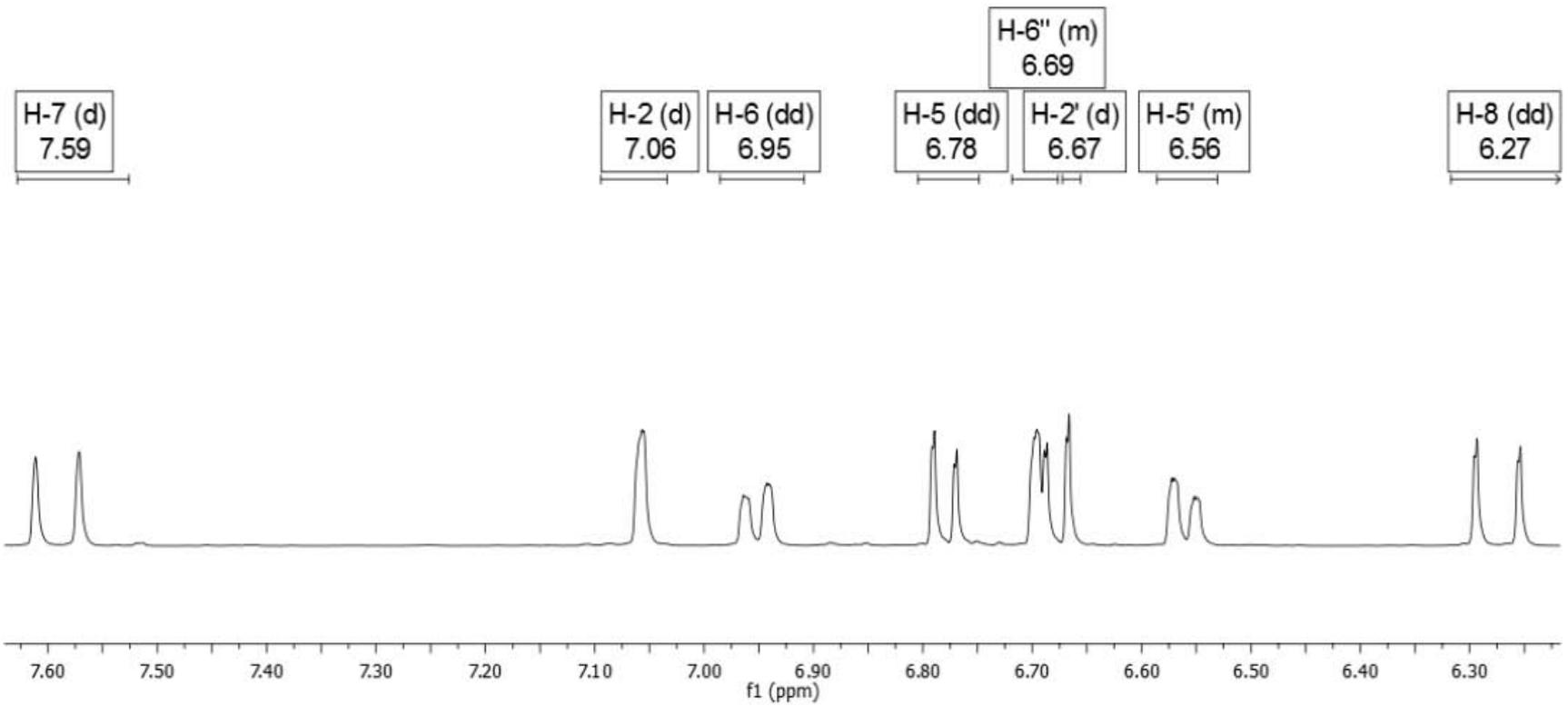
Espectro 24. ¹H 400 MHz del verbascósido CD₃OD.



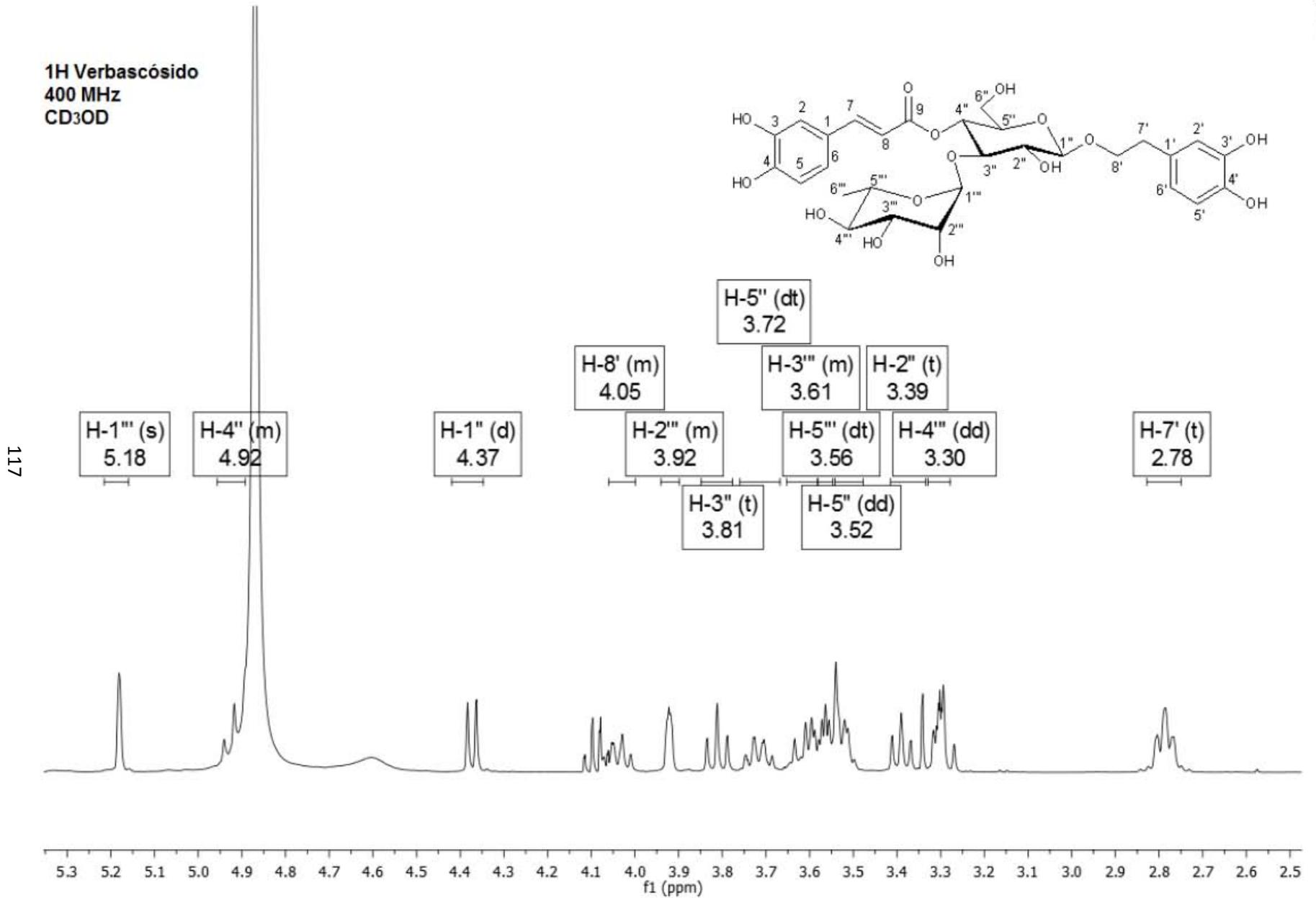
1H Verbascósido
400 MHz
CD₃OD



116

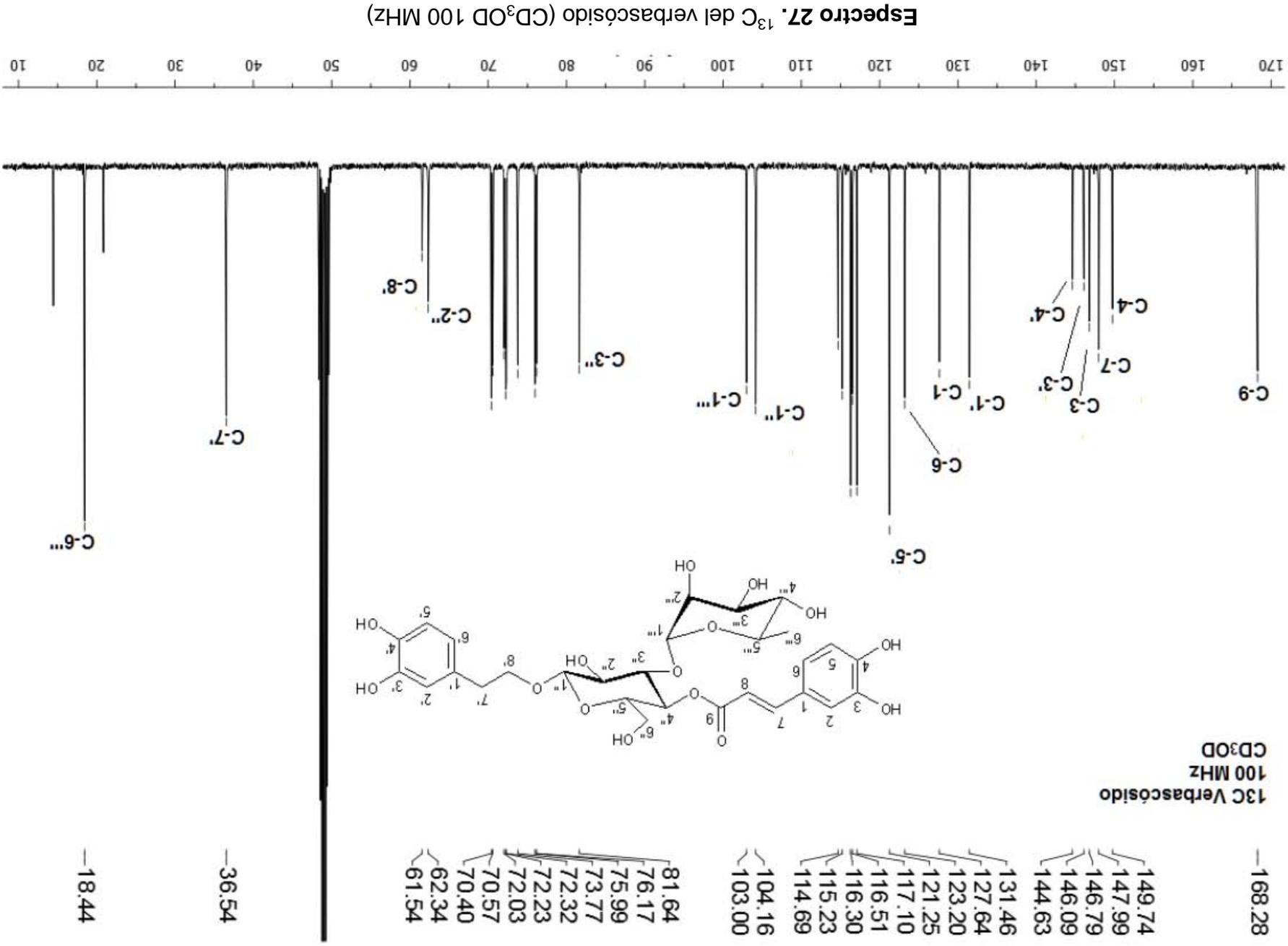


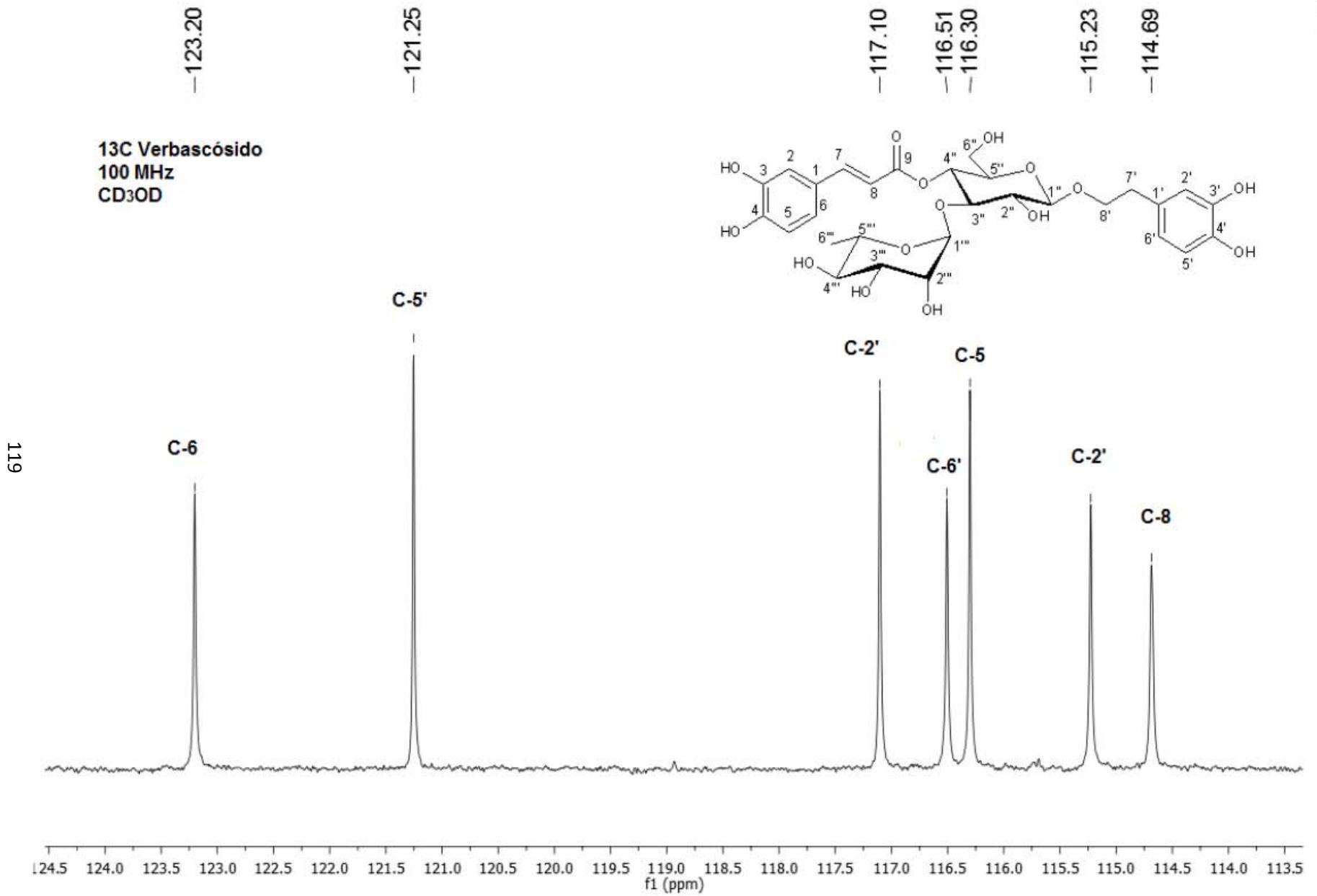
Espectro 25. ¹H 400 MHz del verbascósido CD₃OD (ampliación 1).



Espectro 26. ¹H 400 MHz del verbascósido CD₃OD (ampliación 2).

^{13}C Verbasósido
100 MHz
CD₃OD

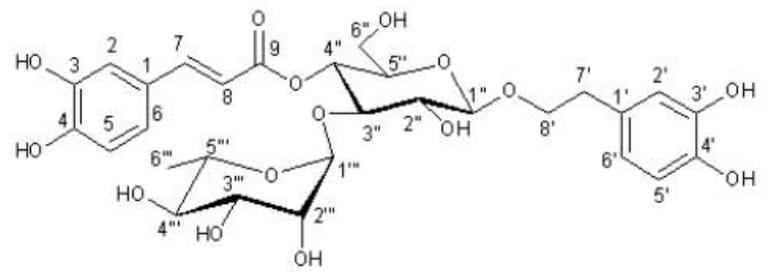




Espectro 28. ¹³C del verbascósido, CD₃OD 100 MHz (ampliación 1).



¹³C Verbascósido
100 MHz
CD₃OD



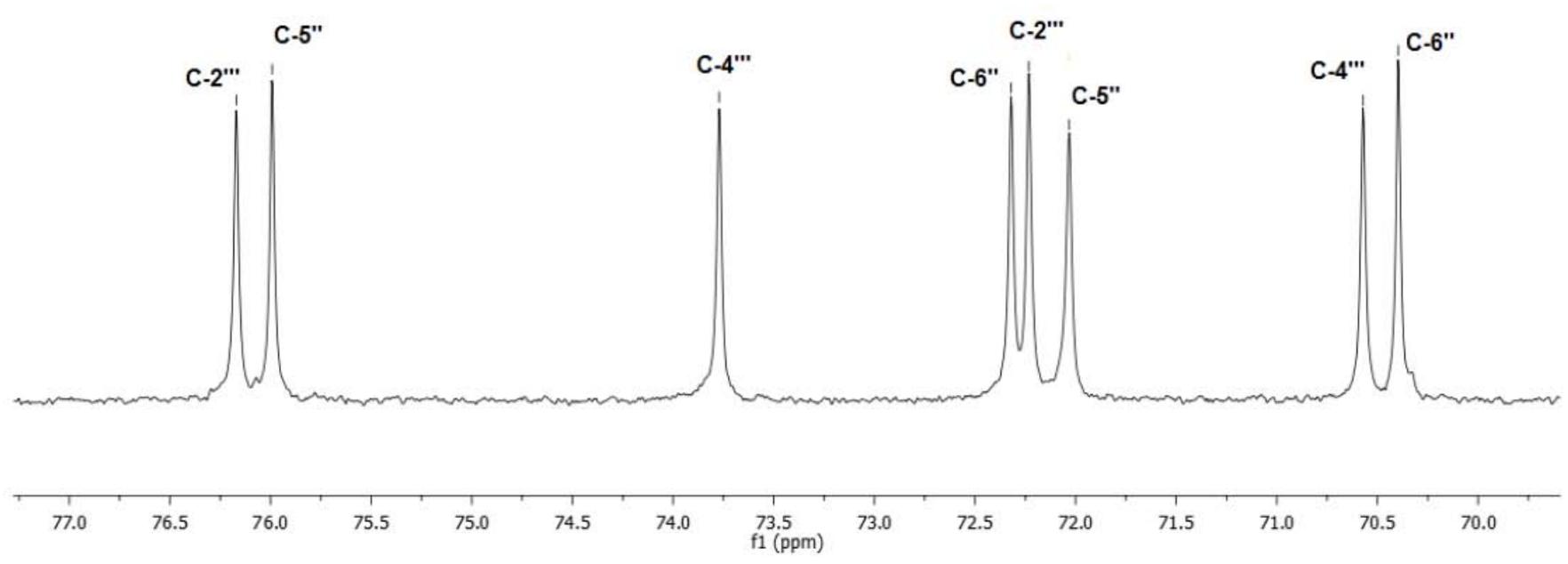
-76.17
-75.99

-73.77

-72.32
-72.23
-72.03

-70.57
-70.40

120



Espectro 29. ¹³C del verbascósido, CD₃OD 100 MHz (ampliación 2)

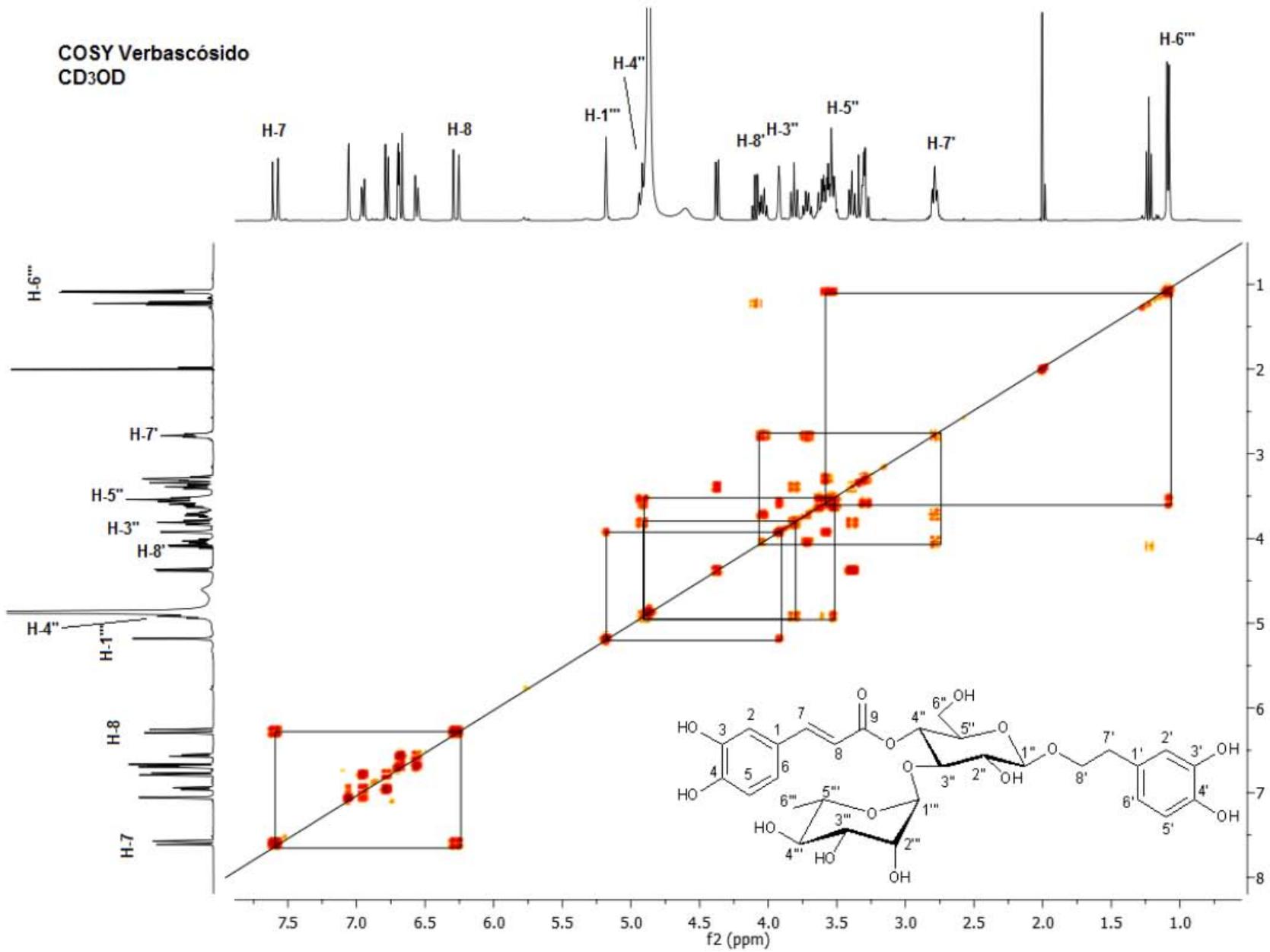


121

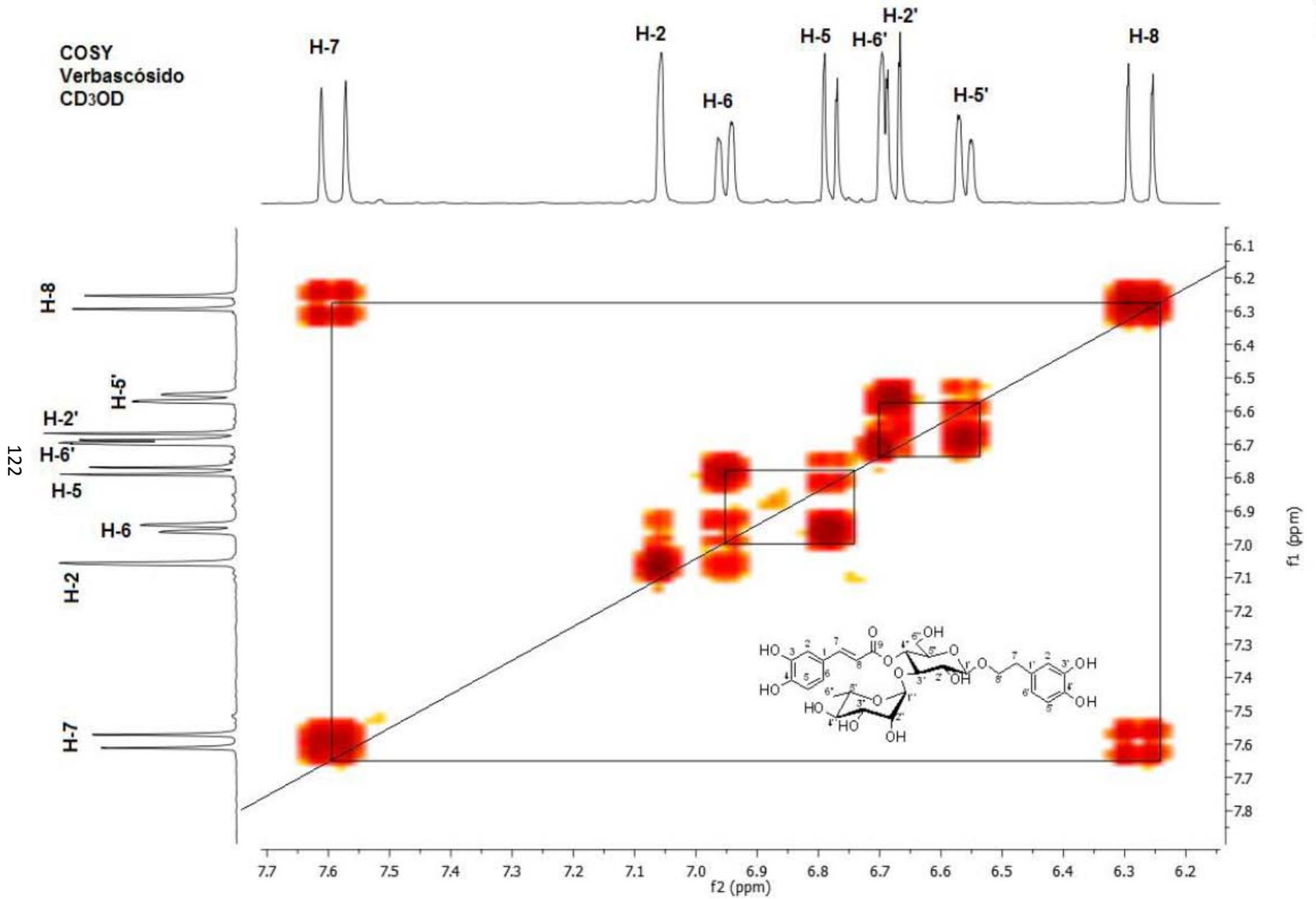
f1 (ppm)

ANEXOS

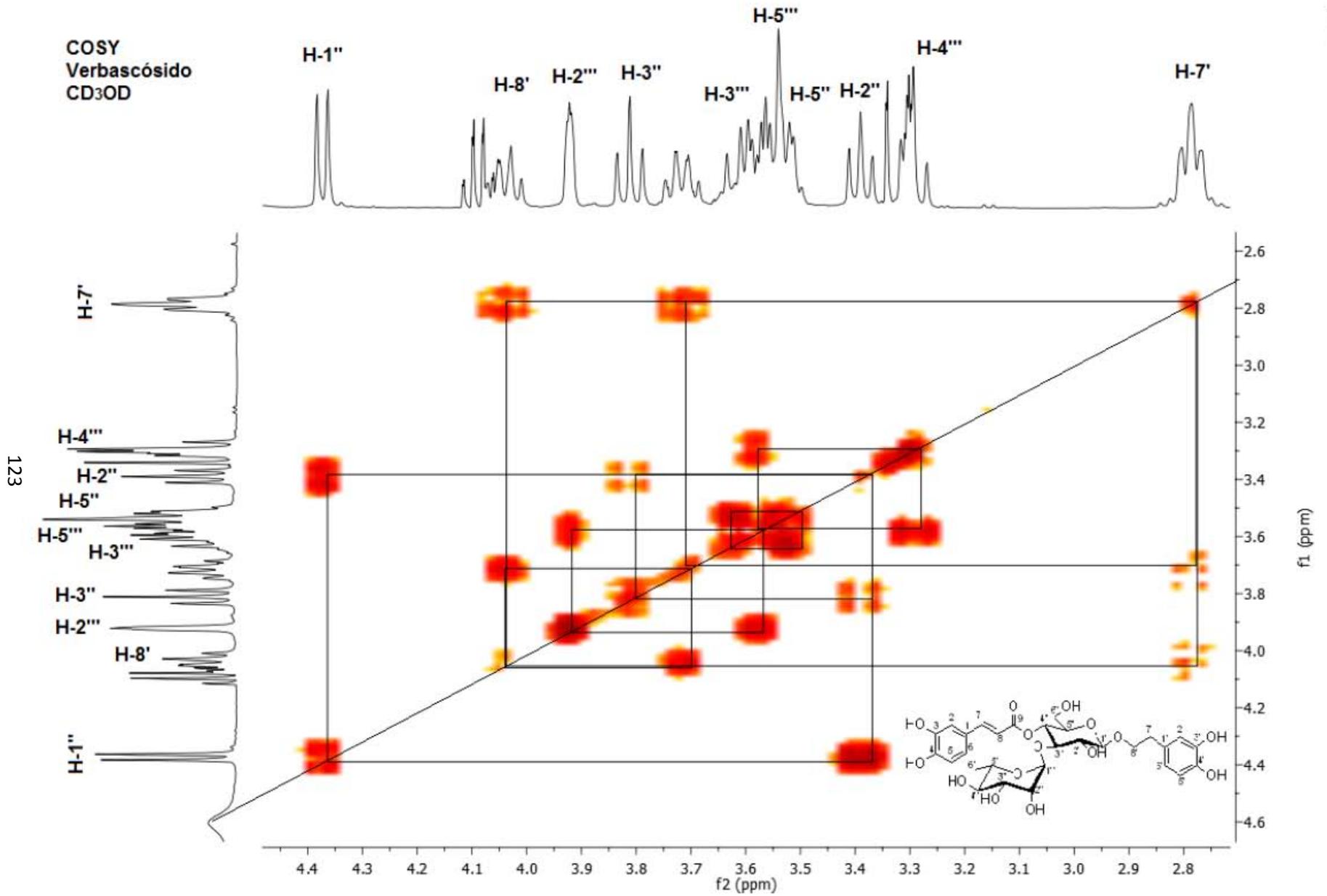
COSY Verbascósido
CD₃OD



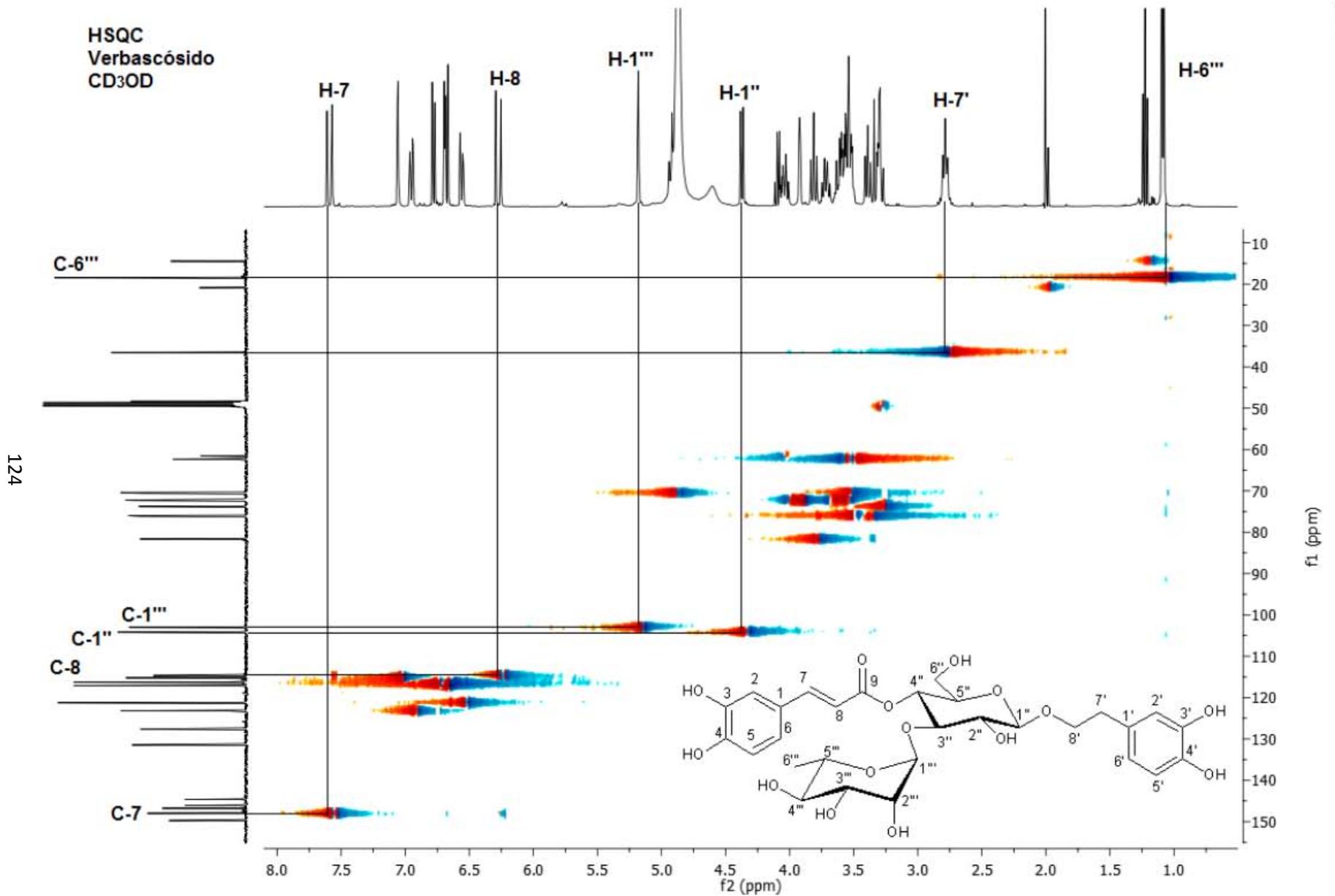
Espectro 30. ¹H COSY del verbascósido (CD₃OD)



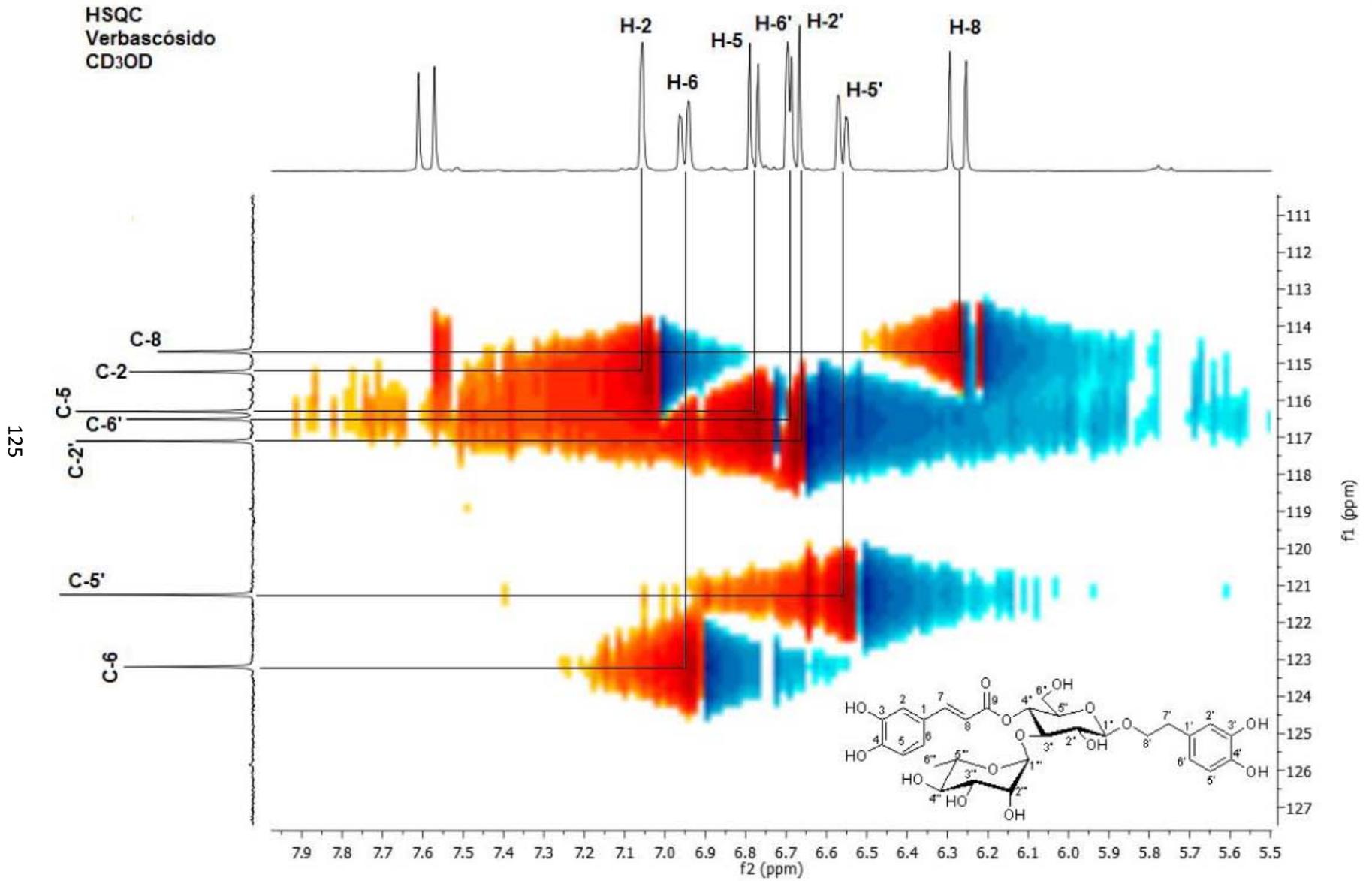
Espectro 31. ¹H COSY del verbascósido, CD₃OD (ampliación 1).



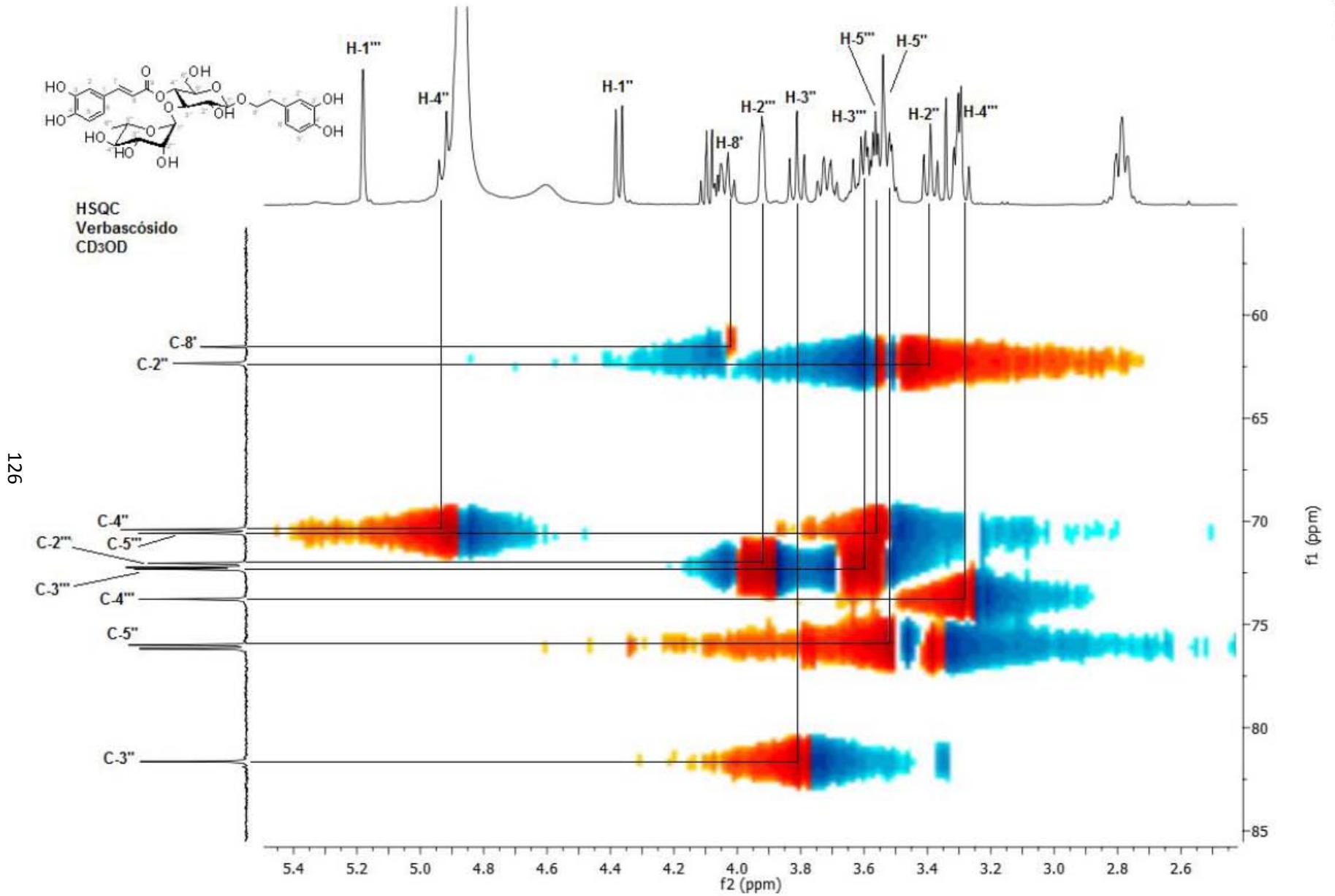
Espectro 32. ¹H COSY del verbascósido, CD₃OD (ampliación 2).



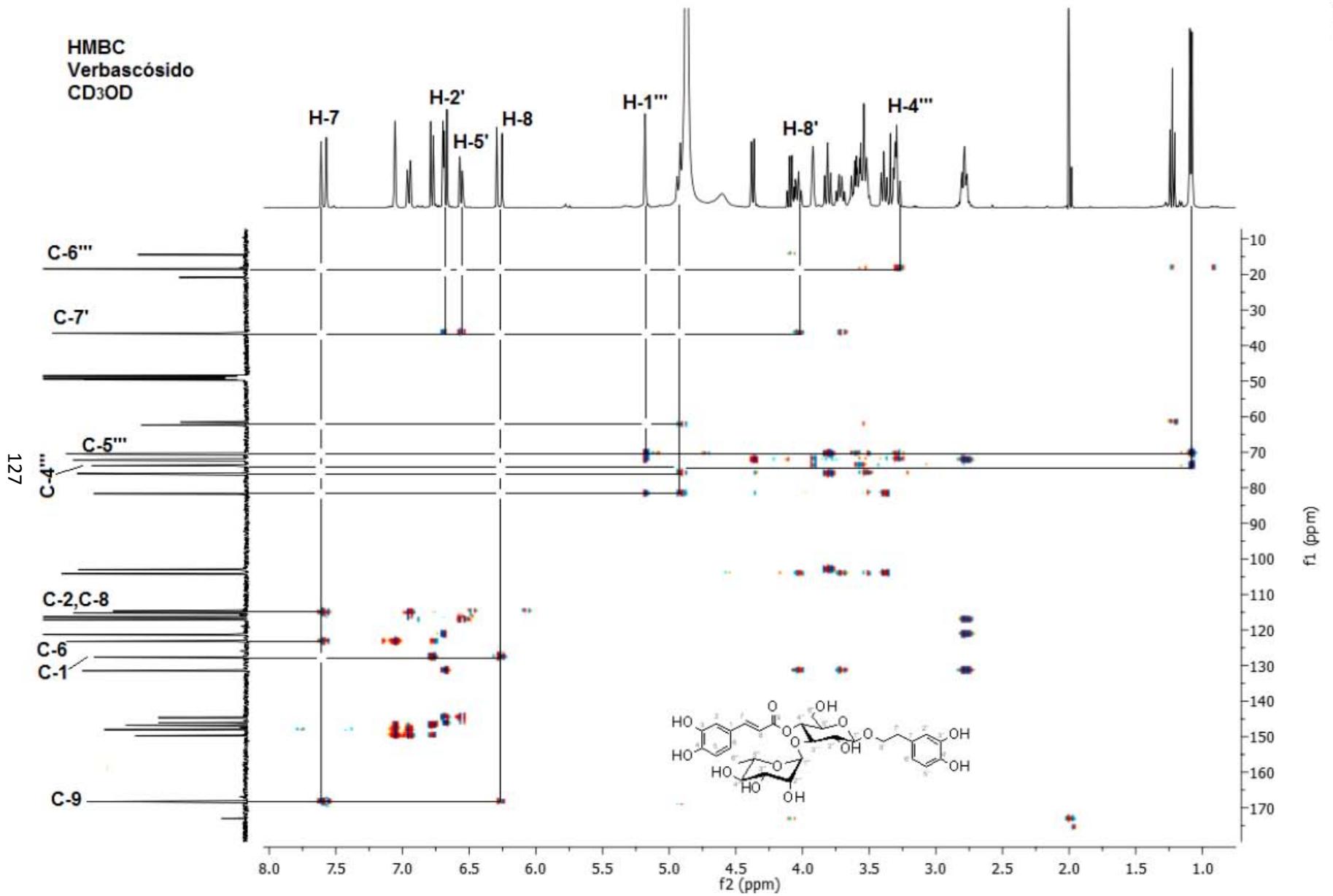
Espectro 33. HSQC del verbascósido (CD₃OD)



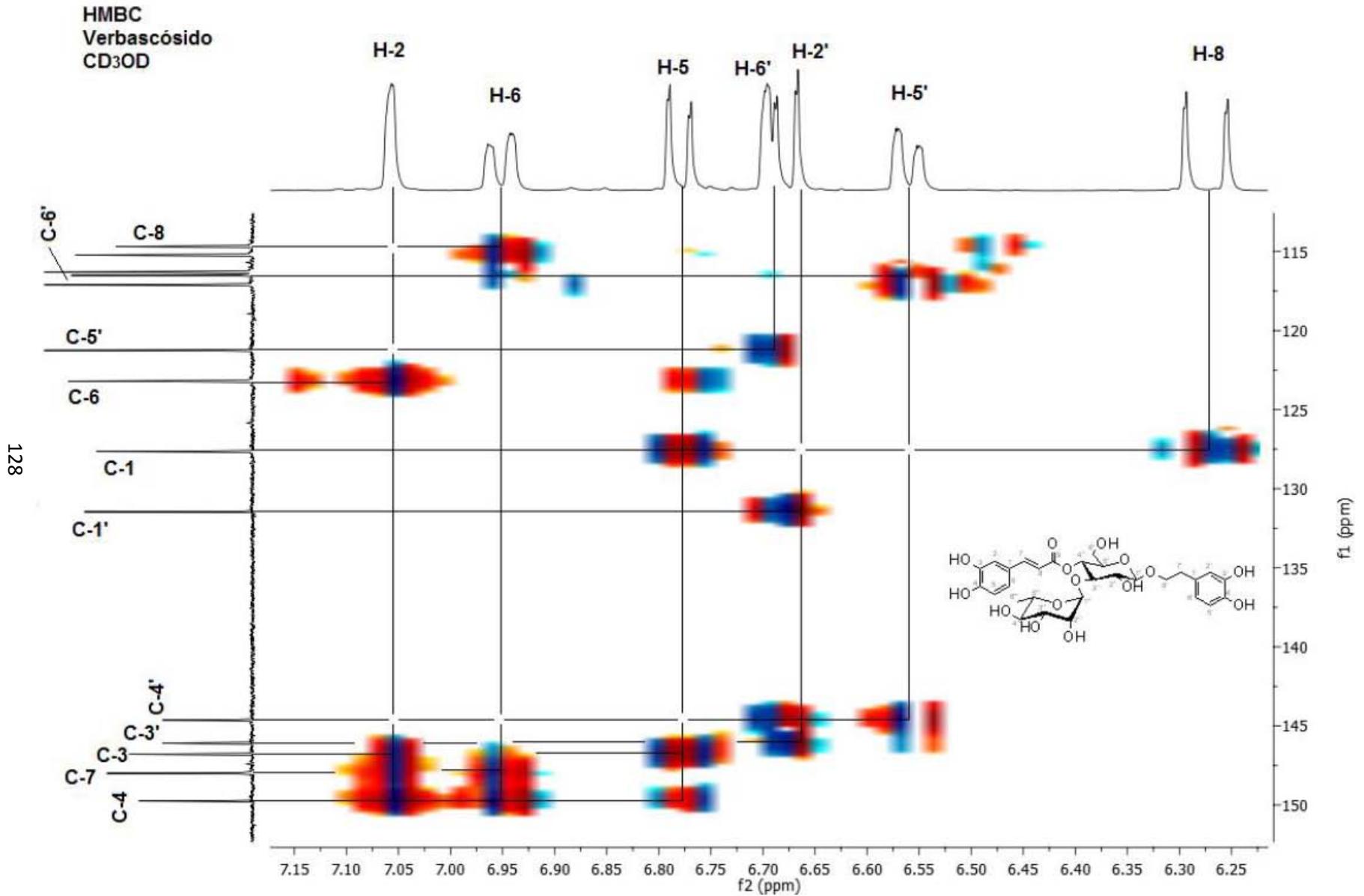
Espectro 34. HSQC del verbascósido, CD₃OD (ampliación 1).



Espectro 35. HSQC del verbascósido, CD₃OD (ampliación 2).



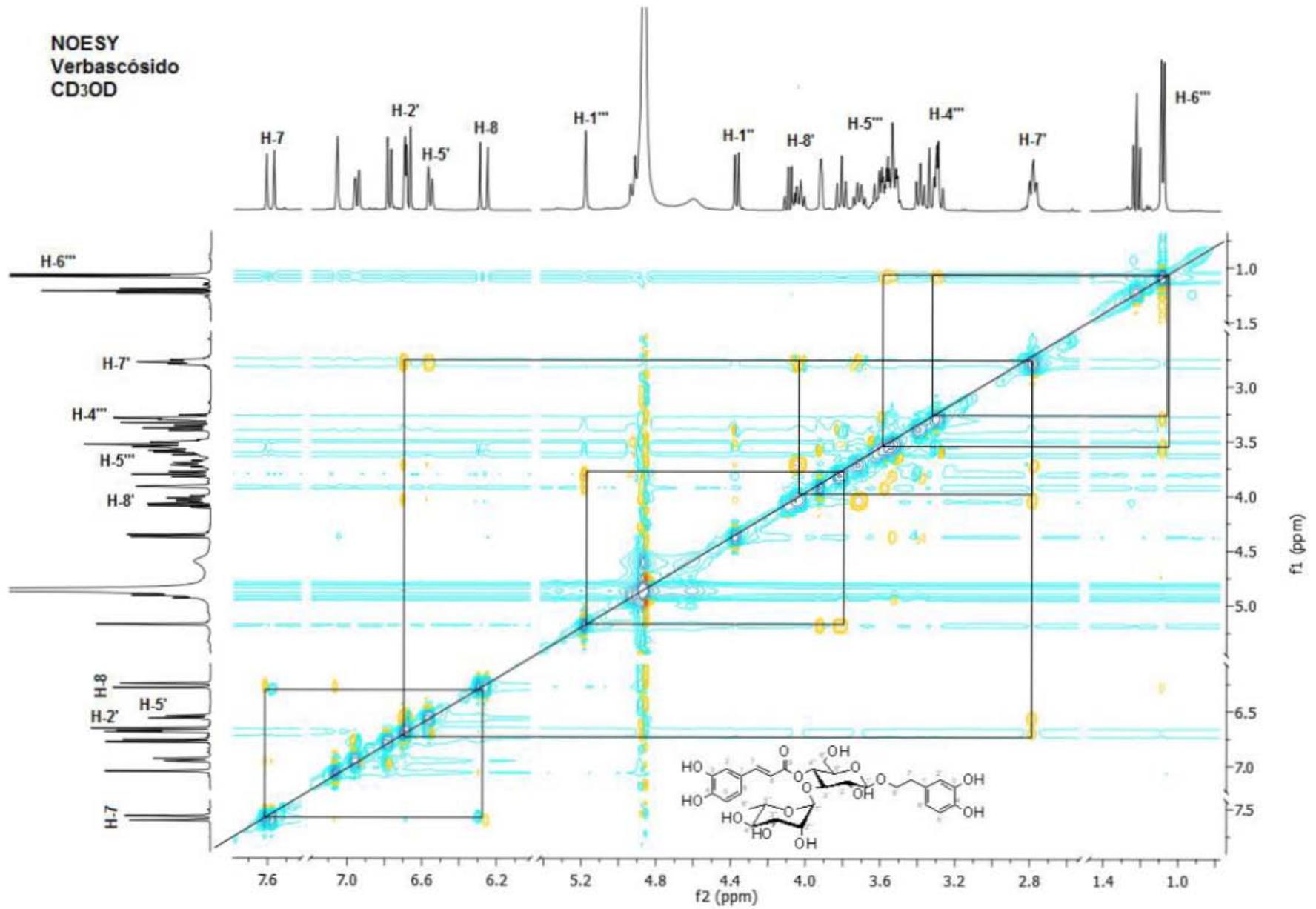
Espectro 36. HMBC del verbascósido, CD₃OD.



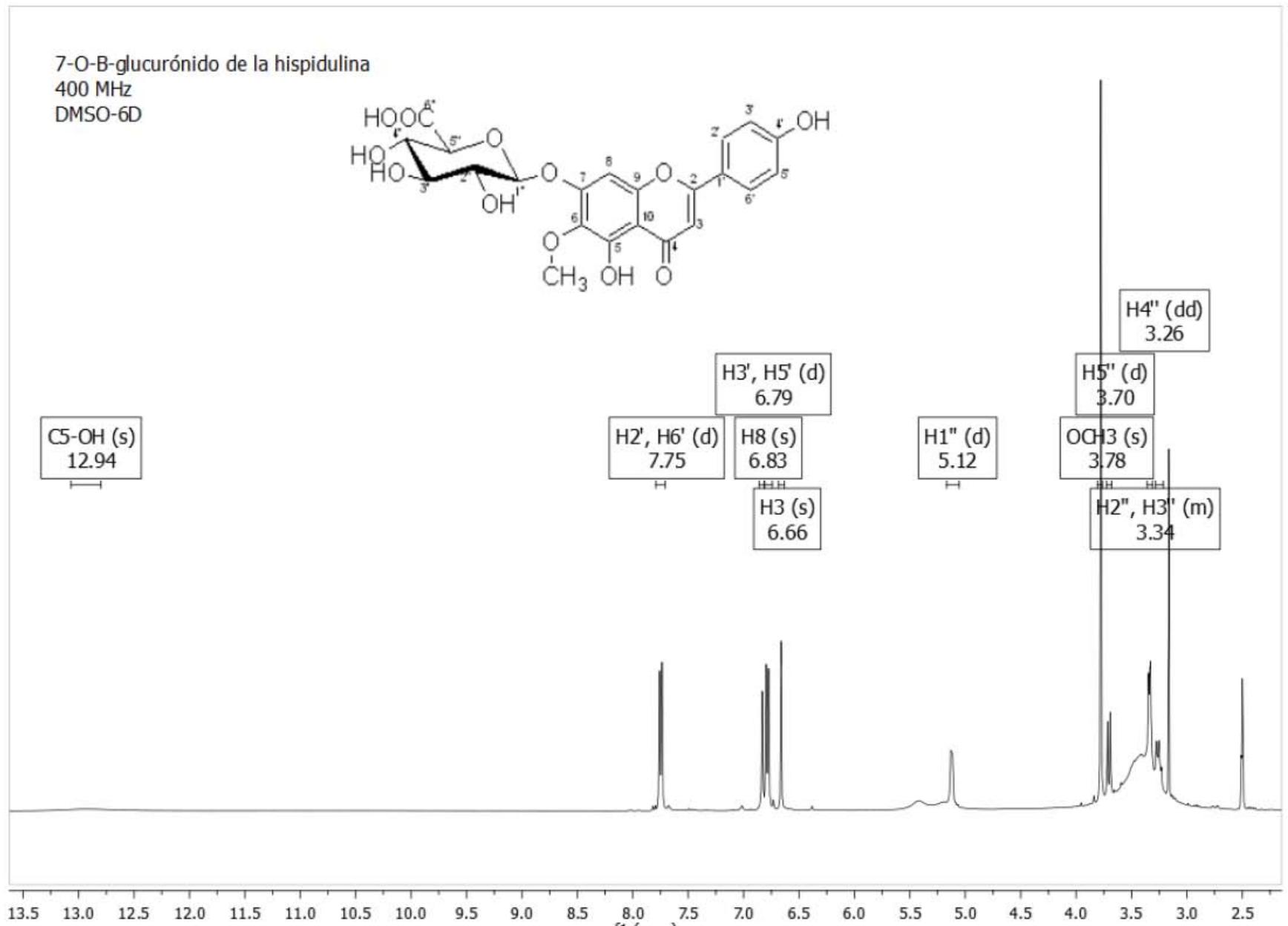
Espectro 37. HMBC del verbascósido, CD₃OD (ampliación).



129

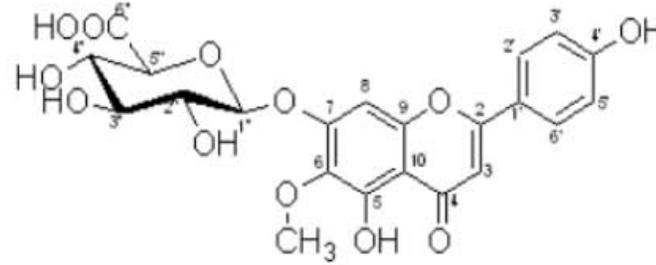


Espectro 38. NOESY del verbascósido, CD₃OD.





7-O-β-glucurónico de la hispidulina
400 MHz
DMSO-6D

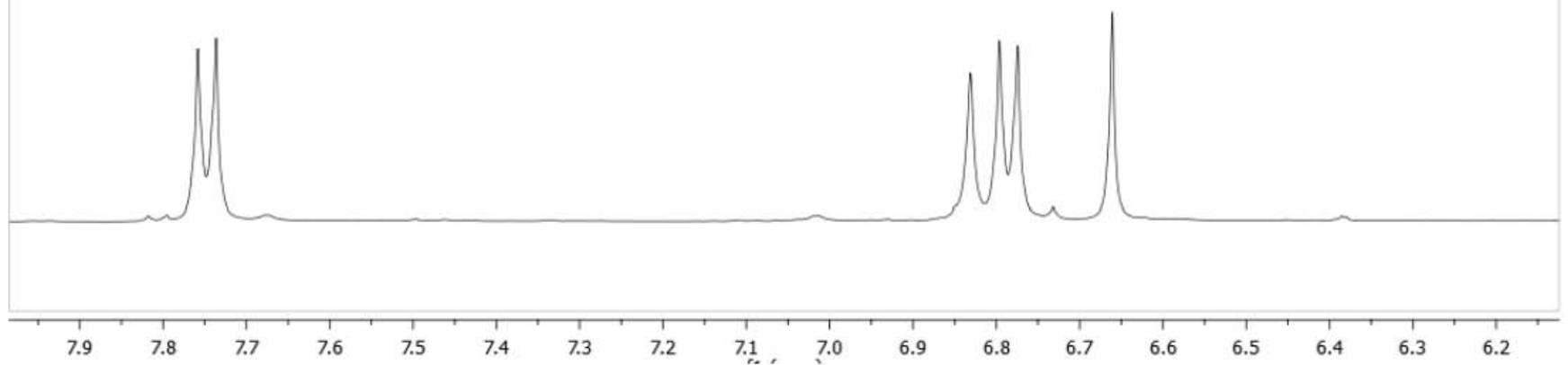


H2', H6' (d)
7.75

H3', H5' (d)
6.79

H8 (s)
6.83

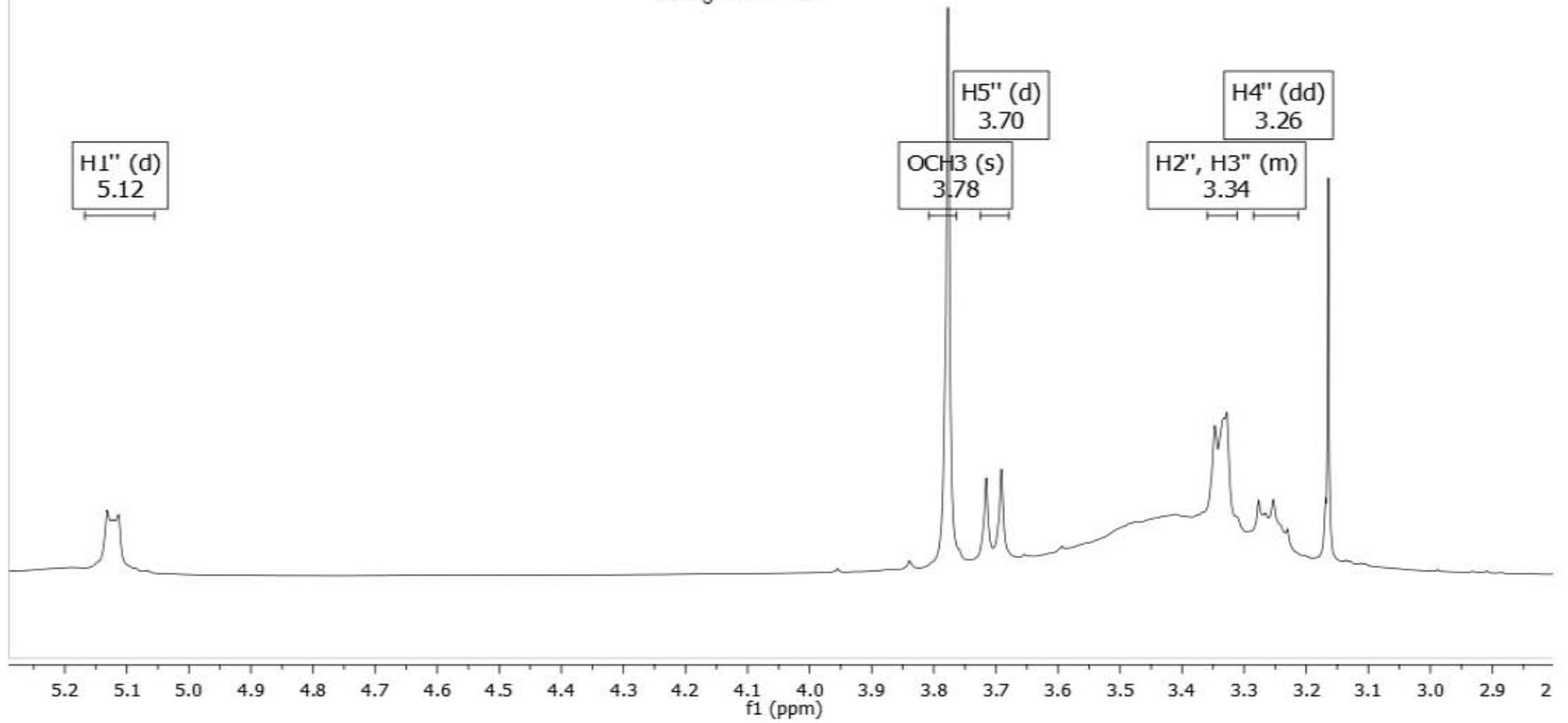
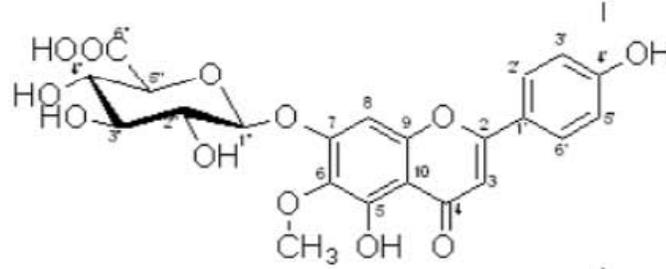
H3 (s)
6.66



Espectro 40. ¹H del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (400 MHz, DMSO-d6) ampliación 1

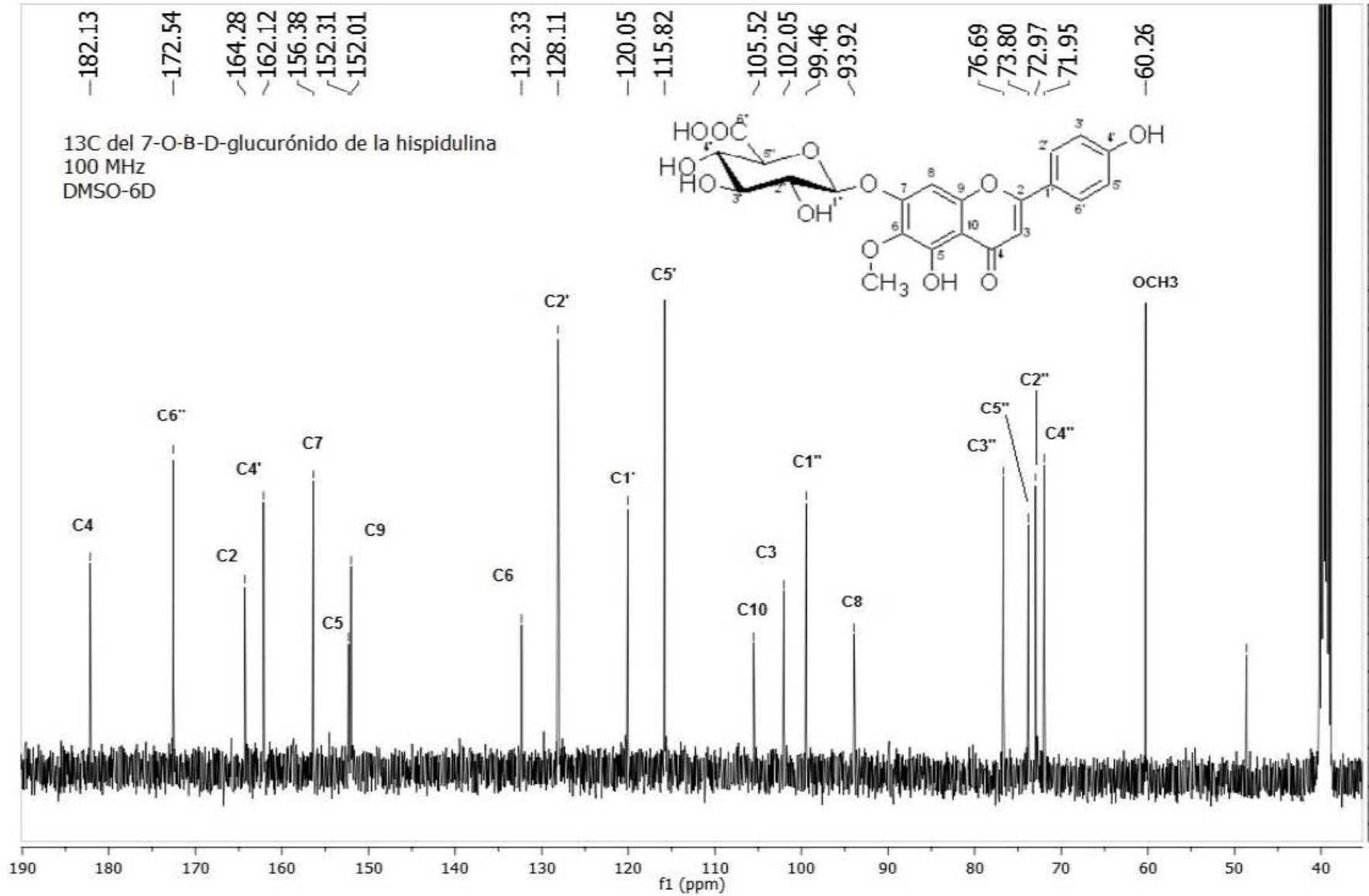


7-O-β-glucurónico de la hispidulina
400 MHz
DMSO-6D



132

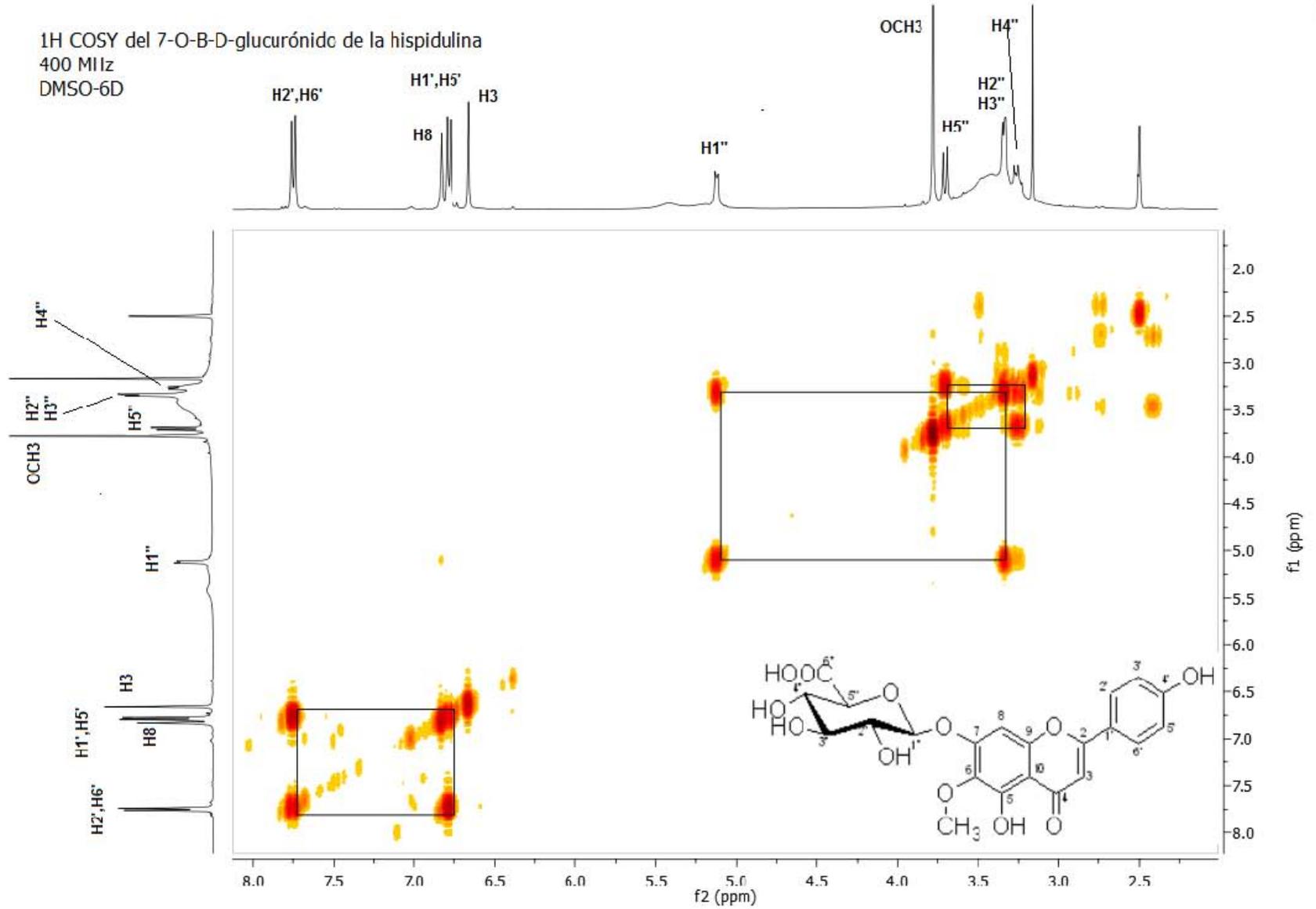
Espectro 41. ¹H del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (400 MHz, DMSO-d₆) ampliación 2



Espectro 42. ^{13}C del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (100 MHz, DMSO-d6)

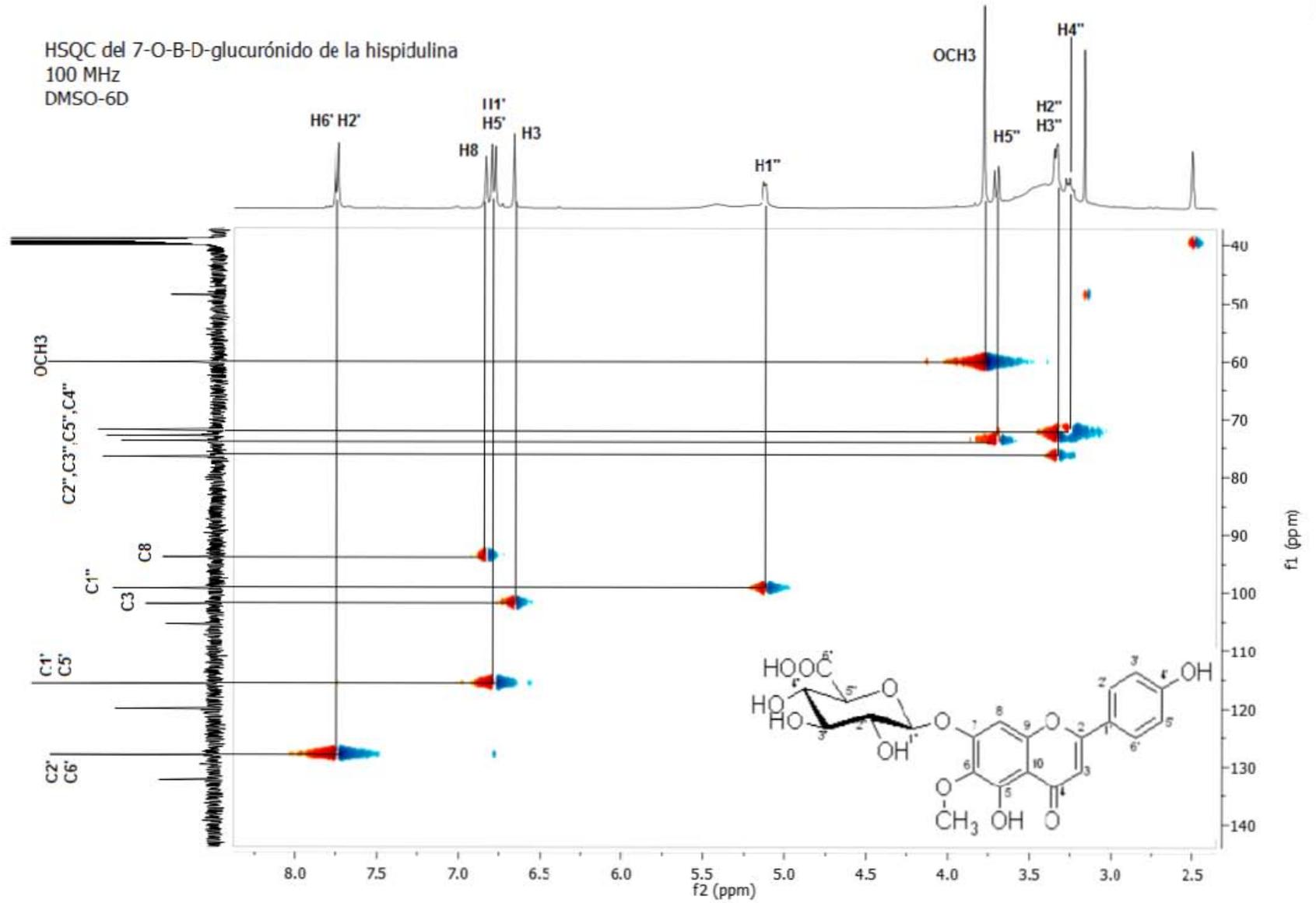


1H COSY del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina
400 MHz
DMSO-6D

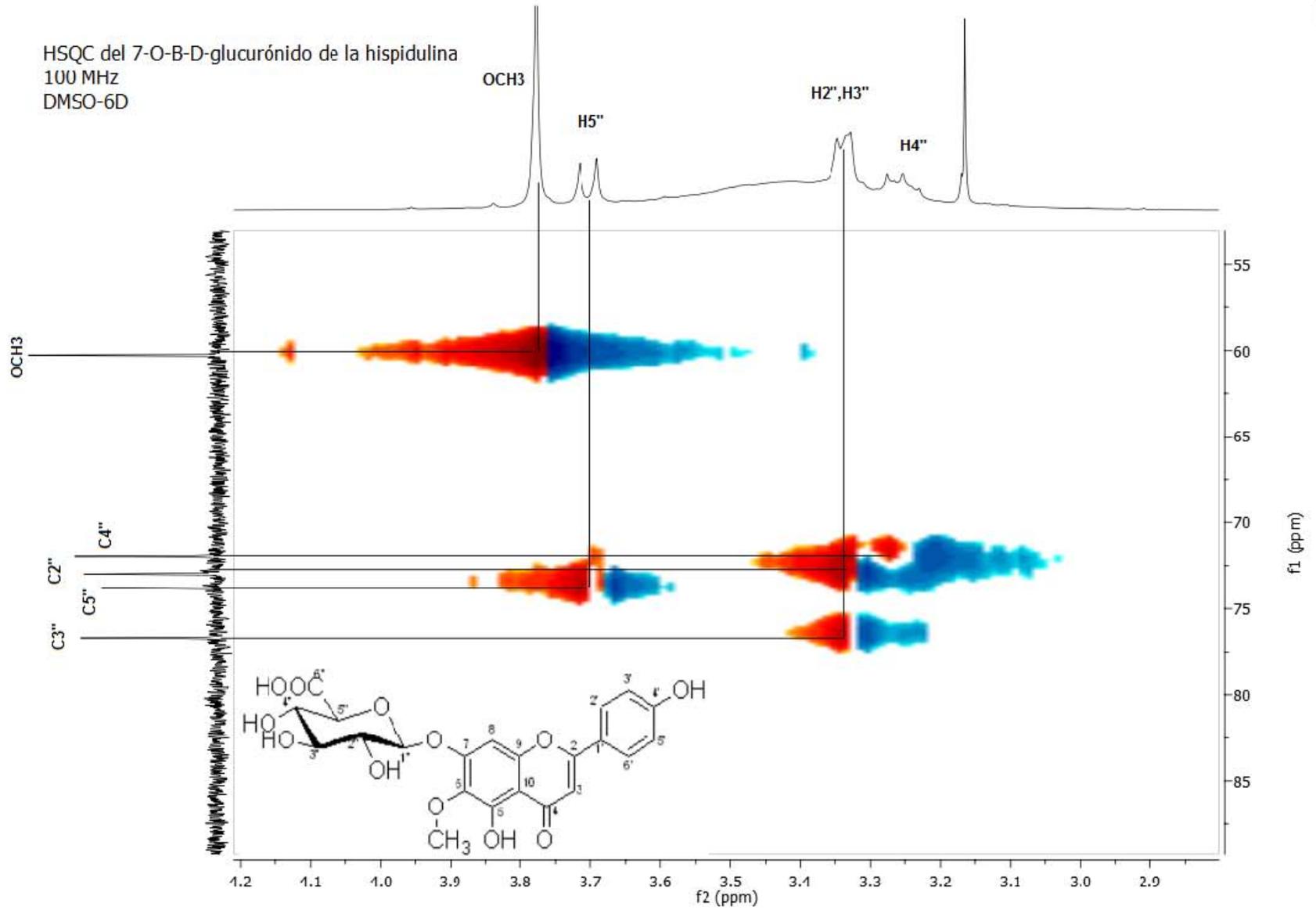


134

Espectro 43. ¹H COSY del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (DMSO-d6)



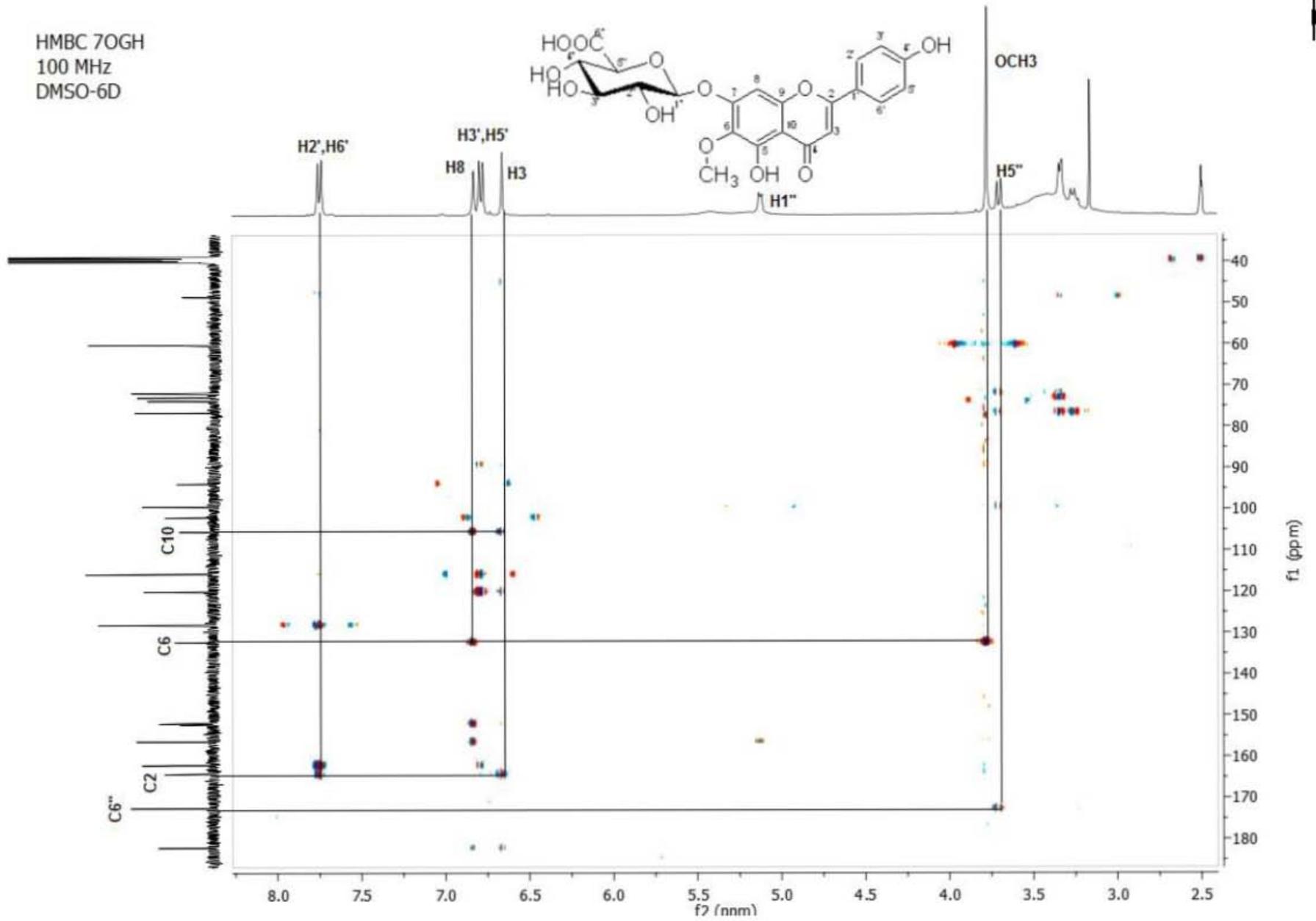
Espectro 44. HSQC del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina, (DMSO-d6)



Espectro 45. HSQC del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (DMSO-d6) ampliación



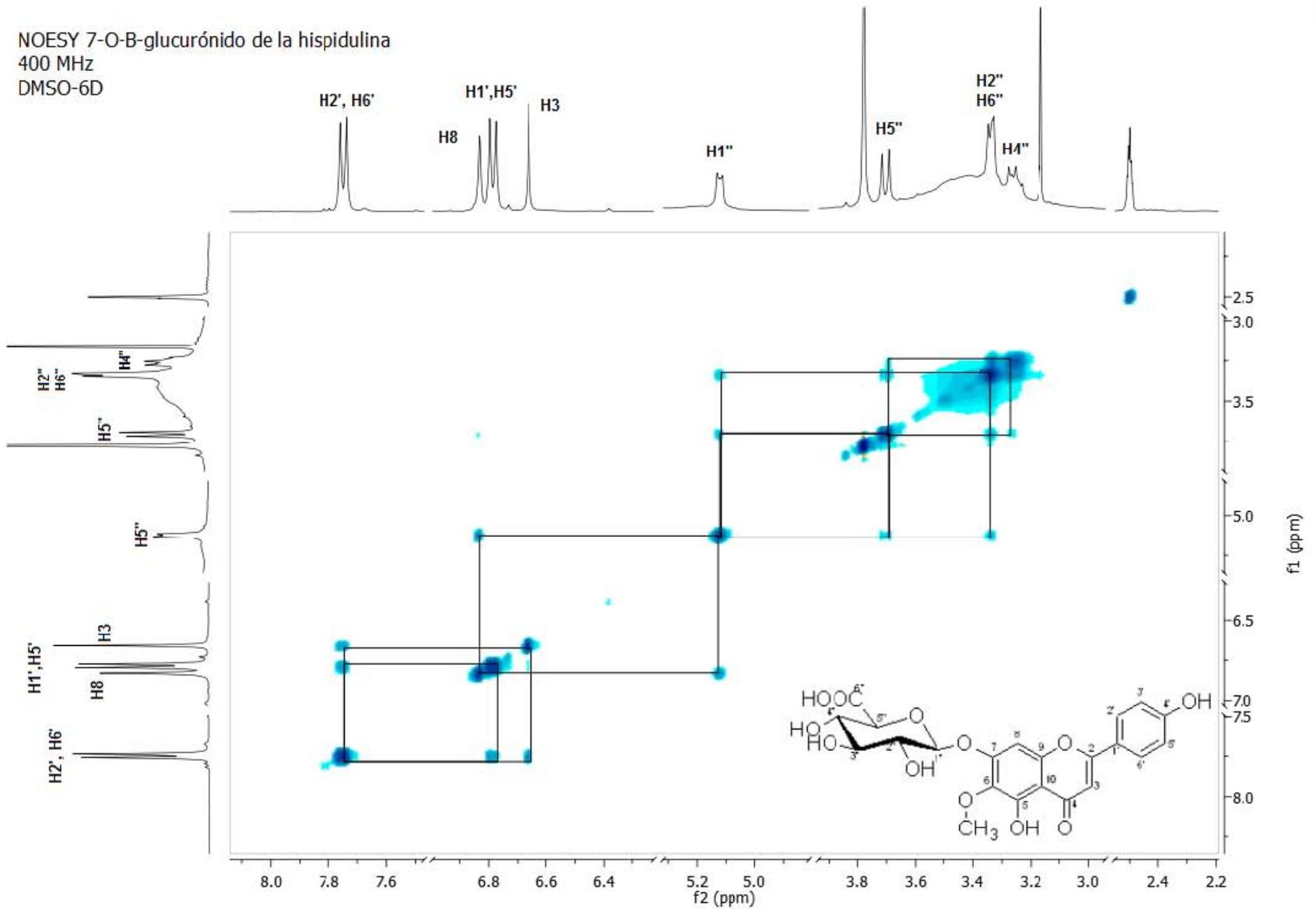
137



Espectro 46. HMBC del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (DMSO-d6)



NOESY 7-O-B-glucurónico de la hispidulina
400 MHz
DMSO-6D



Espectro 47. NOESY del 7-O-β-D-glucurónico de la hispidulina. (DMSO-d6)



Lista de fórmulas estadísticas empleadas en la validación

Adecuabilidad y precisión del sistema

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

Linealidad del sistema

Pendiente

$$b_1 = \frac{n(\sum xy) - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b1}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{b1} = S_{xy} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

Exactitud y repetibilidad del método

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

Linealidad del método

Pendiente

$$b_1 = \frac{n(\sum xy) - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b1}$$

Intervalo de confianza de la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$S_{b1} = S_{xy} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$



$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$$

Precisión del método

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

Estabilidad analítica de la muestra

Media aritmética del análisis inicial

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

Media aritmética para cada condición de almacenaje
Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial o el fresco

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

Donde:

\bar{y} = Media aritmética de la respuesta analítica

$\sum x$ = Sumatoria de x

$\sum y$ = Sumatoria de las respuestas analíticas

n = Número de datos

s = Desviación estándar

$\sum y^2$ = Sumatoria de los cuadrados de x

$\sum y^2$ = Sumatoria de los cuadrados de y

$\sum xy$ = Sumatoria del producto de x con y



CV = Coeficiente de variación

b_1 = Pendiente

b_0 = Ordenada al origen

r^2 = Coeficiente de determinación

IC(β_1) = Intervalo de confianza para la pendiente

IC(β_0) = Intervalo de confianza para la ordenada al origen

IC(μ) = Intervalo de confianza para la media poblacional

$t_{0.975, n-1}$ = t de student de tablas para n-1 grados de libertad con un nivel de confianza de 97.5%

$t_{0.975, n-2}$ = t de student de tablas para n-2 grados de libertad con un nivel de confianza de 97.5%

S_{b1} = Desviación estándar de la pendiente

$S_{y/x}$ = Desviación estándar de la regresión lineal

$CV_{y/x}$ = Coeficiente de variación debido a la regresión lineal

\bar{y}_i = Media aritmética de las respuestas de la condición de análisis

n_i = Número de datos de cada condición de análisis

$|d_i|$ = Diferencia absoluta de medias entre cada condición de almacenaje y el análisis inicial o el fresco

Tabla estadística de la distribución t de STUDENT

Grados de libertad	$t_{0.975}$	Grados de libertad	$t_{0.975}$	Grados de libertad	$t_{0.975}$
1	12.706	18	2.101	35	2.030
2	4.303	19	2.093	36	2.028
3	3.182	20	2.086	37	2.026
4	2.776	21	2.080	38	2.024
5	2.571	22	2.074	39	2.023
6	2.447	23	2.069	40	2.021
7	2.365	24	2.064	41	2.020
8	2.306	25	2.060	42	2.018
9	2.262	26	2.056	43	2.017
10	2.228	27	2.052	44	2.015
11	2.201	28	2.048	45	2.014
12	2.179	29	2.045	46	2.013
13	2.160	30	2.042	47	2.012
14	2.145	31	2.040	48	2.011
15	2.131	32	2.037	49	2.010
16	2.120	33	2.035	50	2.009
17	2.110	34	2.032	51	2.008