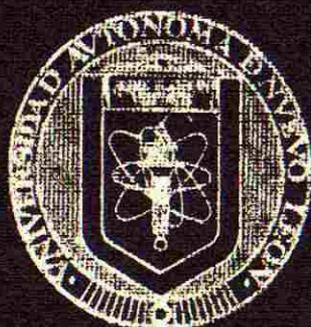


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE UN METODO POR CLAR-EM PARA
LA IDENTIFICACION DE COMPONENTES DE
EXTRACTOS DE PLANTAS BIOLÓGICAMENTE
ACTIVOS

Por

ADRIANA VALENTINA TIRADO CASTILLO

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación terminal
en Química Biomédica

Agosto, 2004



UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES

DIWATA

Q.C.C.B.

ADRIANA

VALENTINA

TRAIADO

CASULLINO



UANL

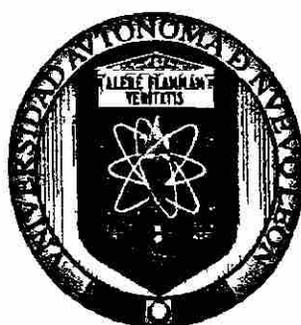
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CLAR-EM PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES DE EXTRACTOS DE
PLANTAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

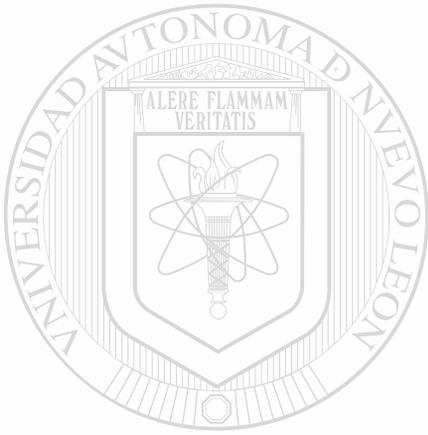
Por

ADRIANA VALENTINA TIRADO CASTILLO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación terminal
en Química Biomédica**

Agosto, 2004

TM
QK 865
.TS
2004



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

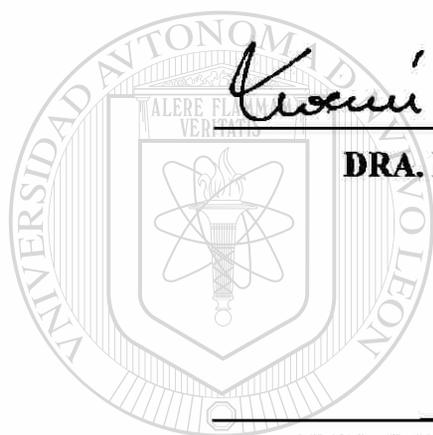


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CLAR-EM PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE COMPONENTES DE EXTRACTOS DE PLANTAS BIOLÓGICAMENTE
ACTIVOS**

Aprobación de la Tesis:



Noemí W de Torres

DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Directora de Tesis

Ma. de la Luz Salazar Cavazos

DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Co-Directora de Tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Adolfo Caballero Quintero

DR. ADOLFO CABALLERO QUINTERO
Co-Director de Tesis

D. Galarza Delgado

DR. DIONICIO GALARZA DELGADO
Subdirector de
Investigación y Estudios de Posgrado

**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CLAR-EM PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE COMPONENTES DE EXTRACTOS DE PLANTAS BIOLÓGICAMENTE
ACTIVOS**

Presentado por:

Q.C.B. ADRIANA VALENTINA TIRADO CASTILLO

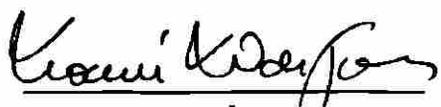
**Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica
de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo
León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres, la
coasesoría de la Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos y Dr. Adolfo
Caballero Quintero.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECTORA

CODIRECTORA

CODIRECTOR



**DRA. NOEMÍ WAKSMAN
DE TORRES**

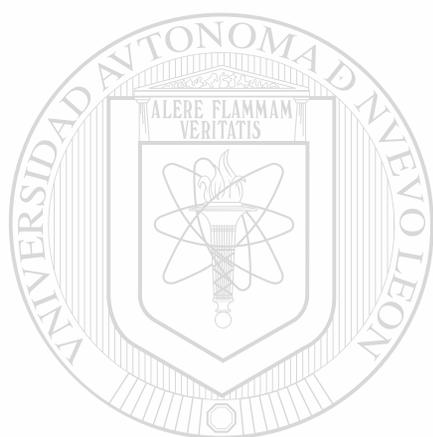


**DRA. MA. DE LA LUZ
SALAZAR CAVAZOS**



**DR. ADOLFO
CABALLERO QUINTERO**

***Dedicada con todo mi amor, respeto y
admiración a mis papis:
Roberto Tirado García y Elsa J. Castillo Cortés***



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres

Por todo el amor, el apoyo y la libertad que me han dado para que realice todo aquello que me he propuesto.

A la Dra. Noemí Waksman de Torres

Con cariño y respeto, por las enseñanzas, tiempo y paciencia que tuvo para que realizara la maestría.

A la Dra. Rocío Castro Ríos

Con admiración y cariño, por todo tu apoyo incondicional tanto en la realización de la tesis como en situaciones personales.

A Malato y Paola

Con todo mi cariño y agradecimiento, por ser mi soporte en los momentos difíciles, por su comprensión y por su afecto.

A Rosalba, Marce y Ade

Con cariño, porque siempre se dieron el tiempo para ayudarme cuando las necesité.

A mi comisión de tesis

Por sus sugerencias en la realización de esta tesis.

A CONACYT

Por la aprobación del Proyecto 36522-N y el apoyo económico brindado para la realización de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de los productos naturales	1
1.2 Importancia de los acoplamientos con CLAR	6
1.2.1 CLAR-UV/Vis	7
1.2.2 CLAR-IR	7
1.2.3 CLAR-RMN	8
1.2.4 CLAR-EM	9
1.2.4.1 Interfases CLAR-EM	10
1.2.4.1.1 Interfases de introducción directa	10
1.2.4.1.2 Interfases que eliminan el solvente	11
1.2.5 Sistemas de ionización	12
1.2.5.1 Ionización a presión atmosférica	12
1.2.5.1.1 APCI	12
1.2.5.1.2 ESI	13
1.2.5.2 Ionización electrónica (IE)	14
1.2.6 Bibliotecas por IE	16
1.3 Importancia	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo general	20
1.4.2 Objetivos específicos	20
2. MATERIAL Y METODOS	21
2.1 Material y equipo	21
2.1.1 Equipo	21

2.1.2	Compuestos de origen natural	22
2.1.2.1	Estándares	22
2.1.2.2	Compuestos obtenidos de origen natural no comerciales	24
2.1.2.3	Extractos bioactivos	27
2.1.2.4	Mezclas estándares de trabajo	27
2.1.3	Reactivos y Solventes	29
2.2	Métodos	30
2.2.1	Diseño de sistemas de separación e identificación de mezclas de estándares de origen natural por CLAR-DAD-EM	30
2.2.1.1	Análisis de mezclas a las condiciones iniciales de CLAR-EM	30
2.2.1.2	Optimización de temperatura de nebulización, temperatura de región de expansión y flujo de helio	31
2.2.1.3	Separación e identificación de mezclas de estándares. Condiciones finales	32
2.2.2	Verificación de la pureza por CLAR-DAD-EM	33
2.2.2.1	Determinación de la pureza del pico cromatográfico por UV/Vis con DAD	33
2.2.2.1.1	Superposición de espectros UV/Vis normalizados en diferentes puntos del pico cromatográfico	33
2.2.2.1.2	Análisis por comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo de umbral	34
2.2.2.2	Análisis por EM	34
2.2.3	Elaboración de una biblioteca alternativa de espectros de masas	35
2.2.4	Análisis preliminar de extractos activos obtenidos	

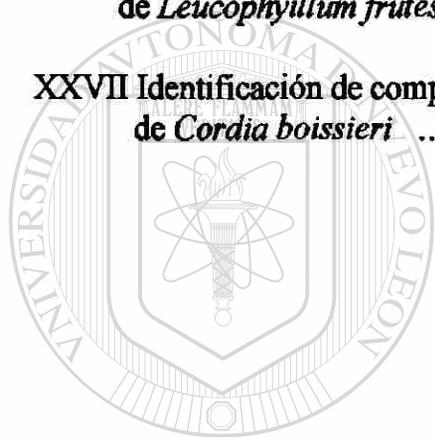
de plantas del departamento de Química Analítica	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Diseño de sistemas de separación e identificación de mezclas de estándares de origen natural por CLAR-DAD-EM	37
3.1.1 Análisis de mezclas a las condiciones iniciales de CLAR-EM	37
3.1.2 Optimización de temperatura de nebulización, temperatura de región de expansión y flujo de helio	44
3.1.3 Separación e identificación de mezclas de estándares. Condiciones finales	45
3.2 Verificación de la pureza por CLAR-DAD-EM	52
3.2.1 Determinación de la pureza del pico cromatográfico por UV/Vis con DAD	53
3.2.1.1 Superposición de espectros normalizados en diferentes puntos del pico cromatográfico	53
3.2.1.2 Análisis por comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo de umbral	53
3.2.2 Análisis por EM	54
3.3 Elaboración de una biblioteca alternativa de espectros de masas	55
3.4 Análisis preliminar de extractos activos obtenidos de plantas del departamento de Química Analítica	56

4. DISCUSIÓN	61
4.1 Diseño de sistemas de separación e identificación de mezclas de estándares de origen natural por CLAR-DAD-EM	62
4.1.1 Análisis de mezclas a las condiciones iniciales de CLAR-EM	62
4.1.2 Optimización de temperatura de nebulización, temperatura de región de expansión y flujo de helio	65
4.1.3 Separación e identificación de mezclas de estándares. Condiciones finales	67
4.2 Verificación de la pureza por CLAR-DAD-EM	69
4.2.1 Determinación de la pureza del pico cromatográfico por UV/Vis con DAD	70
4.2.2 Análisis por EM	72
4.3 Elaboración de una biblioteca alternativa de espectros de masas	73
4.4 Análisis preliminar de extractos activos obtenidos de plantas del departamento de Química Analítica	74 ®
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	83
5.1 Conclusiones	83
5.2 Perspectivas	86
BIBLIOGRAFÍA	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Mercado de preparados a base de plantas	2
II Medicamentos de origen natural	3
III Revisión artículos del Journal of Natural Products (2001)	17
IV Revisión artículos de la revista Phytochemistry (2001)	18
V Lista de estándares	22
VI Identificación de estándares de mezcla 1 por EM	39
VII Identificación de estándares de mezcla 2 por EM	40
VIII Identificación de estándares de mezcla 3 por EM	41
IX Identificación de estándares de mezcla 4 por EM	42
X Identificación de estándares de mezcla 5 por EM	42
XI Identificación de estándares de mezcla 6 por EM	43
XII Gradiente fase móvil	45
XIII Identificación de estándares de mezcla 7 por EM	48
XIV Identificación de estándares de mezcla 8 por EM	48
XV Identificación de estándares de mezcla 9 por EM	49
XVI Identificación de estándares de mezcla 10 por EM	49
XVII Identificación de estándares de mezcla 11 por EM	50
XVIII Identificación de estándares de mezcla 12 por EM	50
XIX Identificación de estándares de mezcla 13 por EM	51
XX Determinación de pureza por CLAR-DAD-EM	52

XXI Análisis por comparación del ángulo de contraste espectral vs. el ángulo de umbral	54
XXII Identificación de compuestos del Extracto de <i>Karwinskia parvifolia</i>	58
XXIII Identificación de compuestos de la Fracción 1 de <i>Leucophyllum frutescens</i>	58
XXIV Identificación de compuestos de la Fracción 2 de <i>Leucophyllum frutescens</i>	59
XXV Identificación de compuestos de la Fracción 3 de <i>Leucophyllum frutescens</i>	59
XXVI Identificación de compuestos de la Fracción 4 de <i>Leucophyllum frutescens</i>	60
XXVII Identificación de compuestos de la Fracción 6 de <i>Cordia boissieri</i>	60



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

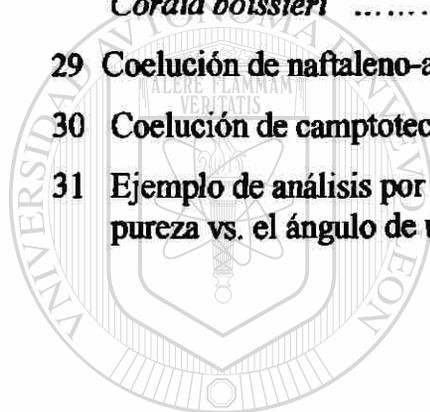


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras de estándares comerciales	23
2	Estructuras de compuestos de origen natural no comerciales	24
3	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 1	37
4	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 2	38
5	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 3	38
6	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 4	38
7	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 5	38
8	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 6	38
9	Optimización temperatura nebulización de aloina	44
10	Optimización temperatura región de expansión de aloina	44
11	Optimización flujo de helio de aloina	44
12	Optimización temperatura nebulización de mezcla de estándares	44 [®]
13	Optimización flujo de helio de mezcla de estándares	44
14	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 7	46
15	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 8	46
16	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 9	46
17	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 10	46
18	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 11	47
19	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 12	47
20	Cromatogramas DAD y TMD de mezcla 13	47
21	Cromatogramas DAD y TMD de extracto <i>Karwinskia parvifolia</i>	56
22	Cromatogramas DAD y TMD de fracción 1	

<i>Leucophyllum frutescens</i>	56
23 Cromatogramas DAD y TMD de fracción 2	
<i>Leucophyllum frutescens</i>	56
24 Cromatogramas DAD y TMD de fracción 3	
<i>Leucophyllum frutescens</i>	57
25 Cromatogramas DAD y TMD de fracción 4	
<i>Leucophyllum frutescens</i>	57
26 Cromatogramas DAD y TMD de fracción 5	
<i>Cordia boissieri</i>	57
27 Cromatogramas DAD y TMD de fracción 6	
<i>Cordia boissieri</i>	57
28 Cromatogramas DAD y TMD de fracción 7	
<i>Cordia boissieri</i>	57
29 Coelución de naftaleno-antraquinona en mezcla 1	63
30 Coelución de camptotecina-quercetina en mezcla 11	68
31 Ejemplo de análisis por comparación de ángulo de pureza vs. el ángulo de umbral	71



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ác.	Ácido
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CG	Cromatografía de gases.
CL	Cromatografía de líquidos.
Da	Dalton.
DAD	Detector de arreglo de diodos
EM	Espectrometría de masas
ESI	Electro nebulización
eV	Electrón volt
FM	Fase móvil
IE	Ionización electrónica
IR	Infrarrojo
IsoPA ₁	Isoperoxisomicina A ₁
min	minutos
mL	mililitro
µL	microlitro
m/z	Relación masa/carga
nm	nanómetros

PA₁	Perosixomicina A₁
PM	Peso molecular
ppm	partes por millón
PTA	Perfluorotributilamina
QA	Química Analítica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
sp.	Especie
spp.	Especies
TIC	“Total ion chromatogram”
TMD	ThermaBeam Mass Detector
t_r	Tiempo de retención
u.m.a.	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
Vs.	Versus

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Adriana Valentina Tirado Castillo

Fecha de graduación: Agosto del 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CLAR-EM PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES DE EXTRACTOS DE PLANTAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

Número de páginas: 89

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con orientación terminal en Química Biomédica

Área de estudio: Química Biomédica

Propósito y Método de Estudio. Analizar extractos de plantas involucra matrices que son inevitablemente complejas, por lo que se necesita un sistema eficiente de seguimiento de extractos para detectar compuestos que puedan ser potencialmente interesantes desde un punto de vista químico y biológico. Con el fin de eficientizar el aislamiento de compuestos nuevos que presenten una actividad biológica de interés, en este trabajo se desarrolló un método de separación e identificación rápido y sencillo para el análisis de extractos bioactivos de plantas. Primero, se establecieron las condiciones por CLAR-EM utilizando mezclas de estándares de origen natural. Después, para aumentar la probabilidad de encontrar un componente conocido en los extractos, se creó una biblioteca alternativa de espectros de masas con compuestos de origen natural no comerciales. Finalmente, el sistema diseñado se aplicó a extractos bioactivos obtenidos en el Departamento de Química Analítica. Las condiciones seleccionadas de CLAR fueron: Columna dC_{18} ; FM: A) ácido fórmico 0.1% en agua y B) ácido fórmico 0.1% en acetitrilo; gradiente lineal de 5 %-95 % de B; flujo FM: 0.3mL/min y tiempo de corrida 15 min. Las condiciones de EM fueron: voltaje de filamento a 70 eV; flujo He de 20 mm de altura del rotámetro; temperatura del nebulizador, región de expansión y cámara de ionización de 90°C, 75°C y 200°C, respectivamente.

Conclusiones y contribuciones. El sistema desarrollado fue útil para el análisis de mezclas de un número pequeño de compuestos. Sin embargo, para mezclas complejas es necesario optimizar las condiciones cromatográficas, debido a que al ir aumentando el número de compuestos, los de polaridades muy parecidas coeluyen y la identificación se dificulta. Este sistema de separación e identificación, así como la biblioteca creada, proporcionan información acerca del número y tipo de compuestos presentes en los extractos de plantas biológicamente activos, de manera que facilitará el trabajo en líneas de investigación con que cuenta el departamento de Química Analítica.

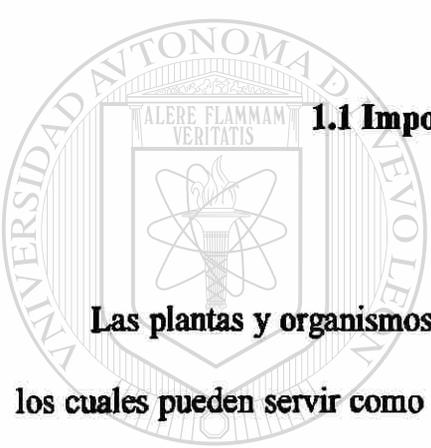
FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS


Dra. Noemí Waksman de Torres

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los productos naturales



Las plantas y organismos animales ofrecen una amplia diversidad de componentes, los cuales pueden servir como fármacos, así como revelar nuevos mecanismos de acción para el control de enfermedades infecciosas¹.

Desde los estudios estereoquímicos del ácido tartárico de Louis Pasteur, hace un siglo y medio, se ha observado repetidamente cómo el estudio cuidadoso de compuestos provenientes de productos naturales ha enriquecido, por un lado, el entendimiento de la química orgánica misma, y por otro, ha proporcionado un conocimiento profundo en fenómenos biológicos¹.

No es una coincidencia que los productos naturales hayan jugado, y siguen teniendo un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de agentes farmacéuticos y agroquímicos. Tres billones de años de evolución biológica han dado como resultado el

desarrollo de vías metabólicas que llevan a cabo la síntesis de hormonas, feromonas, agentes anti-bacterianos, anti-fúngicos, anti-protozoos y anti-insectos, así como muchos compuestos bioactivos que son capaces de adaptarse a la vida de los organismos que los producen².

En las últimas décadas, ha aumentado considerablemente el uso de productos naturales como agentes terapéuticos; esto se debe a que se considera que regresar a lo natural es la mejor manera de llevar una vida más saludable. En la Comunidad Europea, al igual que en otras áreas del mundo, la utilización de productos fitoterapéuticos sigue una línea ascendente que va más allá de una simple moda y no se debe solamente al creciente interés hacia los “tratamientos naturales” de los problemas de salud, sino también a la creciente evidencia sobre su seguridad y eficacia.

En la tabla I se presenta la estimación del mercado de los preparados a base de plantas medicinales en el mundo para 1999 y la proyección para el 2002; se puede notar el gran impacto que tienen estos productos en la economía mundial³.

3TABLA I

Mercado de preparados a base de plantas.

Zona	Mercado (Millones USD)	
	1999	2002
Europa	7 000	8 900
Asia	5 100	6 000
Japón	2 220	2 900
Norteamérica	3 800	4 500
Asia austral	120	140
África + Oriente medio	190	210
Latinoamérica	600	830
Europa del Este	370	400
Resto del mundo	200	300
TOTAL	19 580	24 180

Cerca del 25 % de los medicamentos prescritos a nivel mundial provienen de plantas; de éstos, 121 compuestos activos son considerados de uso diario. De las 252 medicinas consideradas como básicas y esenciales por la Organización Mundial de la Salud, 11 % son exclusivamente de origen de plantas y un gran número de los medicamentos sintéticos es obtenido de precursores naturales⁴.

Además, se estima que el 60 % de los medicamentos antitumorales y anti-infecciosos son de origen natural. Otros compuestos como la muscarina, fisostigmina, cannabinoides, y colchicina, son obtenidos de plantas, y son importantes herramientas utilizadas en estudios farmacológicos, fisiológicos y bioquímicos⁴.

Algunos ejemplos de medicamentos importantes aislados de plantas se presentan en la tabla II.

***TABLA II**
Medicamentos de origen natural.

Medicamento	Planta
Digoxina	<i>Digitalis spp.</i>
Quinina y quinidina	<i>Cinchona spp.</i>
Vincristina y vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>
Morfina y codeína	<i>Papaver somniferum</i>

El interés de los científicos en medicinas de origen de plantas es debido a varias razones:

- La medicina convencional a veces resulta ineficiente, ya que la terapia puede ser inefectiva y se pueden presentar efectos colaterales.
- El abuso del uso de medicamentos (automedicación).

- Uso incorrecto de medicinas sintéticas y/o productos naturales.
- Aparición de microorganismos fármaco-resistentes

Para cubrir la necesidad de encontrar nuevos medicamentos de fuentes naturales, los investigadores se han dado a la tarea de buscar nuevas estrategias de obtención de los mismos. La estrategia más común es la observación cuidadosa del uso de dichas fuentes en la medicina popular de diferentes culturas. Una vez que es seleccionado y clasificado el producto natural de interés, es sometido a un proceso adecuado de extracción. Este proceso se puede basar en la forma cómo el producto es empleado en la medicina popular, o ser llevado a cabo con extracciones usando solventes de diferente polaridad⁴.

Como paso posterior a la obtención de los extractos, actualmente se emplea el fraccionamiento biodirigido, estrategia que resulta muy útil para descubrir fracciones y/o compuestos activos. Para ello, una vez obtenidos los extractos, primero se analizan cualitativamente por medio de cromatografía en capa fina (CCF) u otro método cromatográfico y se realiza una evaluación general de su actividad biológica, seleccionando un bioensayo sencillo y adecuado a la actividad que se quiere evaluar. Los extractos que resultan activos para la actividad biológica en estudio, pueden contener una cantidad considerable de compuestos que pueden ser el o los responsables de dicha actividad. Posteriormente, se realiza el aislamiento y la purificación de los componentes activos, mediante algún método adecuado (puede ser alguna técnica cromatográfica, partición con solventes etc.); cada fracción y/o compuesto puro se somete de nuevo a un bioensayo para evaluar su actividad biológica y sólo aquellos que resulten de interés, se

someten a una evaluación minuciosa de su actividad biológica, así como de su toxicidad incluyendo estudios tanto *in vitro* como *in vivo*⁴.

La pureza de los compuestos activos aislados se verifica, y se procede a la determinación de su estructura empleando métodos espectroscópicos, tales como UV, IR, EM y RMN, entre otros. En el caso de no obtener compuestos puros, se caracteriza la fracción activa determinando no sólo la proporción de los compuestos en la mezcla, sino también la identidad de los mismos⁴.

Los estudios en medicina tradicional han denotado su gran avance en el aislamiento y purificación de metabolitos bioactivos, por lo que, el fraccionamiento biodirigido es un factor determinante en la obtención de resultados satisfactorios. La gran ventaja de este método es el ahorro en tiempo, ya que sólo se someten al proceso de separación los extractos que demuestren alguna actividad biológica en particular; de lo contrario, se tendría que invertir mucho tiempo en el aislamiento de todos componentes presentes en los extractos. Sin embargo, hay que considerar la posibilidad que después de realizar todo el proceso del fraccionamiento, el compuesto o fracción que hayamos separado podría ya estar reportado en la literatura o a la venta en el mercado. Desde este punto de vista es útil contar con métodos que nos permitan identificar dichos compuestos en los primeros pasos del fraccionamiento para evitar realizar trabajo que no aporte algo nuevo y relevante a la ciencia.

1.2 Métodos de análisis de extractos de plantas por CLAR

Analizar extractos de plantas involucra matrices que son inevitablemente complejas, por lo que se necesita un eficiente sistema de seguimiento de esos extractos para detectar compuestos que puedan ser potencialmente interesantes desde un punto de vista químico. Un reconocimiento de los metabolitos de plantas en la etapa más temprana de la separación es esencial para evitar la pérdida de tiempo en el aislamiento de compuestos comunes que no tienen importancia química o biológica.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es usada rutinariamente en fitoquímica como técnica de elección para el aislamiento preparativo de productos naturales, así como para controlar la pureza de los componentes aislados⁵.

Cuando CLAR está acoplada a diferentes métodos espectroscópicos, resulta ser no sólo la mejor técnica para la separación eficiente de extractos de productos naturales, sino que además permite una rápida determinación estructural de los componentes de las plantas. Con estas técnicas acopladas, se optimiza el aislamiento, así como el tiempo consumido y eficiencia del proceso.

Los sistemas de detección con los que se ha acoplado CLAR son ultravioleta-visible (UV/Vis), infrarrojo (IR), espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN).

1.2.1 CLAR-UV/Vis.

A pesar de que el uso de detectores UV/Vis con arreglo de diodos permite obtener el espectro de absorción completo de cada pico cromatográfico y de esta manera detectar exitosamente la coelución de compuestos, no es posible hacer una identificación absoluta de las sustancias basado únicamente en la comparación de espectros UV/Vis.

Al respecto, hay que mencionar que el detector de arreglo de diodos reconoce sólo ciertos cromóforos característicos en moléculas de complejidad variable; por lo tanto, una gran parte de una molécula compleja puede resultar transparente al detector de UV-Vis, de modo que se puede obtener un espectro similar al de moléculas más simples. Además, tiene la desventaja de que no es un detector universal⁶.

1.2.2 CLAR-IR

Con el detector de IR el espectro obtenido es característico de toda la molécula, ciertos grupos de átomos dan origen a bandas a las mismas frecuencias o cerca de ellas, sin importar el resto de la estructura de la molécula. Este acoplamiento primero estuvo limitado a trabajar con fase normal porque los solventes utilizados en fase reversa absorben en el IR en un intervalo amplio, lo que limitaba la aplicabilidad del acoplamiento. Después se diseñaron interfases donde se elimina el solvente, la muestra seca se deposita en un disco de germanio y luego es introducida al espectrofotómetro de

IR. Sin embargo, el depósito de analito puede ser no homogéneo y esto trae como consecuencia una respuesta desigual de transmitancia⁷.

1.2.3 CLAR-RMN

La resonancia magnética nuclear acoplada a CLAR es una herramienta muy poderosa y relativamente novedosa para la obtención indudable de la estructura de moléculas. Es un método con el que se ahorra tiempo en la separación y elucidación de compuestos y mezclas desconocidas; es de baja sensibilidad por lo que requiere una concentración considerable de la muestra. Generalmente, las condiciones cromatográficas en CLAR-RMN son las mismas que para una cromatografía convencional, pero se emplean solventes deuterados, lo que aumenta significativamente los costos del análisis. Otro problema es la pureza de los solventes, la mayoría de los solventes para CLAR tienen pequeñas cantidades de impurezas (a menudo aditivos estabilizadores). Estas impurezas son transparentes en el UV y, por lo tanto, no afectan los resultados cromatográficos, pero sí son detectados por RMN⁸. Otra desventaja de este acoplamiento es que la instrumentación es muy cara (alrededor de quinientos mil dólares).

1.2.4 CLAR-EM

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que permite efectuar la elucidación estructural de sustancias utilizando una pequeña cantidad de muestra. Para ello, se hace uso de las propiedades de partículas cargadas (iones) que son más rápidas y fáciles de medir que las partículas neutras⁹.

Esta técnica data de 1910 y surge como consecuencia del estudio de tubos de rayos catódicos. En ese momento comienzan sus aplicaciones utilizando sistemas de ionización por impacto electrónico y, posteriormente por fotones, los cuales emplean analizadores magnéticos y eléctricos para moléculas en fase gaseosa, cuyo peso molecular no supera los 800 Da. Esta limitación en el estado de agregación de la muestra y, por lo tanto, en el peso molecular, circunscribía su aplicación a moléculas no polares y termoestables⁹. En los últimos años, se han desarrollado sistemas de ionización que utilizan la muestra en fase condensada, y por lo tanto pueden abarcar hasta pesos moleculares de quince mil o veinte mil Da, utilizando alto vacío y temperatura ambiente. La importancia de EM y el acoplamiento a una técnica tan versátil como lo es la CLAR, fueron factores determinantes para el desarrollo de técnicas de ionización a presión atmosférica, sin vacío ni temperatura, lo cual posibilitó el análisis de moléculas polares de muy alto peso molecular⁹.

Otro gran adelanto de los últimos años ha sido el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem o espectrometría de masas-masas, es decir, el uso de dos o más analizadores conectados en serie. Una de las aplicaciones de esta técnica es el análisis de

las secuencias genéticas de los iones, es decir, determinar la secuencia padre-hijo en cada una de las fragmentaciones producidas.

Es así que, la espectrometría de masas está hoy en condiciones de analizar cualquier tipo de molécula, polar o no polar en intervalos de pesos moleculares que van de la unidad hasta cien mil Da o más.

1.2.4.1 Interfases CLAR-EM

El potencial del acoplamiento de CLAR-EM fue reconocido por la gran variedad de compuestos analizables en CL, que incluyen moléculas termolábiles y de baja volatilidad que no son adecuados para el análisis por cromatografía de gases. Sin embargo, el problema principal de este tipo de acoplamiento es el alto flujo de líquido que dificulta mantener el alto vacío que requiere la EM. Para solucionar este problema, a lo largo de los años se han desarrollado un gran número interfases. En general, las interfases se pueden clasificar en las que eliminan el solvente antes de la ionización, y aquellas que introducen el solvente a la fuente de ionización¹⁰.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.4.1.1 Interfases de introducción directa. Entre este tipo de interfases se encuentran la ionización a presión atmosférica (APCI) y electro nebulización (ESI), las cuales, actualmente son las más utilizadas. Trabajan a presión atmosférica y combinan en un solo paso la introducción e ionización de la muestra. Estas dos interfases se describen con los sistemas de ionización en los puntos 1.2.5.1.1 y 1.2.5.1.2

1.2.4.1.2 Interfases que eliminan el solvente. Algunos tipos de estas interfases comprenden al “moving wire, moving belt” y el “particle beam”.

El “moving wire” y “moving belt” usan como superficie de transporte un cable y un listón de acero inoxidable, respectivamente. Para la remoción del solvente y la evaporación del analito dentro del EM, se calienta el cable o el listón. La pequeña área superficial del alambre permite la deposición de una cantidad muy pequeña del total del eluato¹⁰. La gran desventaja de estas interfases es que son dispositivos mecánicos, necesitan una instalación cuidadosa y un manejo adecuado para la obtención de buenos resultados. El desarrollo de nuevas interfases han hecho al “moving belt” y “moving wire” obsoletos.

El “particle beam” tiene un dispositivo de nebulización capaz de formar microgotas de tamaño homogéneo de las cuales se produce una efectiva desolvatación del analito. Los componentes volátiles del aerosol son evaporados y eliminados en un jet separador de dos etapas, mientras que las partículas con momento más alto y los agregados moleculares son transportados a la fuente de ionización. Dentro de la fuente, éstos se colapsan debido a colisiones con la superficie caliente de la fuente y son liberados a la fase gaseosa por evaporación^{10,11}.

Uno de los factores más importantes por lo que se sigue utilizando esta interfase es la facilidad de acoplamiento a sistemas de ionización electrónica, lo que permite obtener bibliotecas de espectros de masas de compuestos separados con una instrumentación convencional de CLAR.

1.2.5 Sistemas de ionización.

Como ya se mencionó anteriormente, el acoplamiento de CLAR-EM proporciona el medio para la detección selectiva de los componentes de interés; además son detectores que muestran una alta sensibilidad porque son sensibles a flujo de masa, pueden ser utilizados para propósitos cuantitativos y son universales⁹.

Existen diferentes tipos de sistemas de ionización que se seleccionan dependiendo de las características de los compuestos a analizar, el propósito del análisis y el objetivo que se desea cumplir.

1.2.5.1 Ionización a presión atmosférica.

Las técnicas API más utilizadas son ESI y APCL. En general, estos sistemas se utilizan cuando se conoce la identidad de la molécula a analizar, debido a que son técnicas de ionización suaves, es decir, no producen fragmentación de la molécula y dependen de las condiciones de trabajo de cada instrumento; por lo tanto, no se pueden emplear como técnicas estándar para identificación de compuestos desconocidos.

1.2.5.1.1 APCL La fuente original consiste en una cámara de evaporación a presión atmosférica donde es introducido un gas acarreador caliente (N_2) para ayudar a la evaporación y transporte del analito. En esta área ocurre la ionización del gas, que mediante una descarga eléctrica produce un plasma reactivo a presión atmosférica que origina los iones del analito. Estos iones son transferidos al espectrómetro de masas y analizados^{10, 11, 14}.

Las modernas interfases de APCI utilizan un nebulizador neumático de calentamiento y una aguja de alto voltaje que produce una descarga responsable de inducir la ionización del solvente^{10,14}.

Es un tipo de ionización suave que tiene la ventaja de dar información sobre el PM de la molécula, es una técnica robusta y tiene buena sensibilidad. No obstante, ofrece poca información estructural y puede producirse degradación térmica de los compuestos termolábiles^{10,11,14}.

1.2.5.1.2 ESL Se produce un aerosol aplicando un campo eléctrico fuerte a presión atmosférica a un líquido que pasa con un flujo lento a través de un tubo capilar. Este campo induce una acumulación de cargas en la superficie del líquido al final del capilar, que se rompe produciendo gotas cargadas. Por medio de una cascada de rupturas, se forman gotas cada vez más pequeñas hasta que el campo eléctrico sobre su superficie se hace lo suficientemente grande como para producir la desorción de los iones, los cuales pasan al analizador del EM, donde se obtiene el espectro de masas de la muestra original^{10,11,14}.

Las 3 características principales del ESI son¹⁰:

- a) Es una técnica de ionización suave que produce iones moleculares protonados (o desprotonados) de compuestos polares, no polares, de masas altas y termolábiles con una increíble eficiencia.

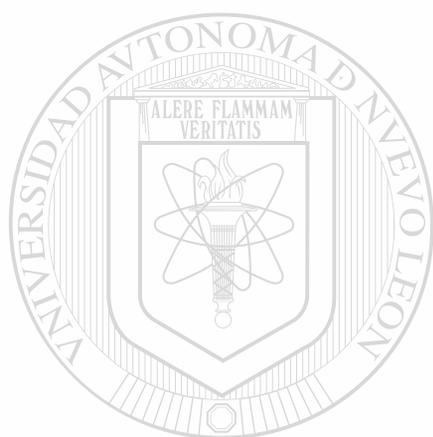
- b) Se forman iones multicargados, el número de cargas va aumentando conforme aumenta el peso molecular; lo que permite el análisis de moléculas de muy alto PM, como proteínas.
- c) Es especialmente adecuado para el análisis de compuestos ionizados en la fase líquida.

Las limitaciones del ESI son: que las especies múltiplemente cargadas requieren interpretación y transformación matemática; no es útil para compuestos sin carga, y de baja polaridad como los esteroides; es muy sensible a contaminantes tales como metales alcalinos o compuestos básicos; y las corrientes de iones son relativamente bajas.

1.2.5.2 Ionización electrónica (IE).

En el caso de la IE, la muestra a estudiar se encuentra volatilizada y es impactada por electrones con una energía que varía de los 20 a los 70 eV, según se quieran observar sólo iones moleculares o también iones fragmento (generalmente con una sola carga). Es un método que transfiere una cantidad de energía suficientemente alta como para producir una buena cantidad de iones fragmento. Las fragmentaciones se producen a partir del ion molecular o de iones fragmento involucrando la ruptura de una unión simple o la ruptura de dos uniones con pérdida, en general, de una molécula neutra. Esta eliminación de la molécula neutra puede efectuarse directamente, es decir, sin producir modificación de la estructura restante; o con reordenamiento, es decir, que átomos de la molécula original que no se encontraban unidos terminan unidos luego del reordenamiento^{9, 11, 14}.

La ionización por impacto electrónico es utilizada rutinariamente como criterio para la identificación de compuestos, porque produce un número de fragmentos iónicos característicos de cada grupo funcional de la molécula. Además, tiene la ventaja de que los espectros de masas obtenidos por IE son muy reproducibles, lo que permite generar bibliotecas de espectros de masas¹⁴. Por ejemplo, de un cromatograma se escoge un pico, se realiza el espectro de masas y por comparación con una biblioteca o interpretación de su espectro de masas, se puede obtener la identidad del pico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.6 Bibliotecas por IE

Las bibliotecas de espectros de masas por IE son una herramienta poderosa en la elucidación estructural de compuestos. En general, la búsqueda se realiza reduciendo el espectro de masas del compuesto analizado a un número pequeño de los picos más significativos y éstos se comparan con los espectros, también reducidos, que se encuentran en la biblioteca; se obtiene una primera selección de espectros en función de la intensidad relativa de los iones y su parecido con los de la biblioteca. Los espectros coincidentes son ordenados teniendo en cuenta el resto de los iones presentes y su intensidad relativa¹⁴.

El uso de bibliotecas de espectros de masas es muy importante para los investigadores que trabajan con productos naturales ya que de éstos se aíslan una numerosa cantidad de sustancias de polaridad muy variada como alcaloides, flavonoides, glicósidos, esteroides, saponinas, terpenoides, acetogeninas, quinonas, etc. Como un ejemplo de esto, en las tablas III y IV se muestran los resultados de una consulta realizada a dos de las revistas más importantes en productos naturales, para así tener noción de cuantos compuestos se aíslan anualmente de la naturaleza. En esta revisión se encontró que se aislaron alrededor de mil trescientos cuarenta compuestos nuevos, de los cuales mil doscientos ochenta y dos provienen exclusivamente de productos vegetales.

¹²TABLA III

Revisión artículos del Journal of Natural Products (2001)

Producto natural	Origen	Géneros y especies	Cantidad	Tipo de compuestos
Productos marinos	Algas	<i>Sargassum</i> sp. <i>Laurencia</i> sp. <i>Plocamium</i> sp.	15	Diterpenos Monoterpenos Bromosésquiterpenos
	Corales	<i>Clavularia</i> sp. <i>Montipora</i> sp. <i>Virgularia</i> sp.	24	Alcaloides Diterpenos Diacetilenos Sesquiterpenoides
	Esponjas	<i>Clathria</i> sp. <i>Aplysina</i> sp. <i>Erylus novilis</i> <i>Axinella</i> sp.	60	Alcaloides Diterpenos Sesterterpenos Esteroles Saponinas Hidroquinonas Triterpen-monosacáridos Lactonas Sesquiterpenoides Quinonas
Productos vegetales	Raíz, hojas, tallo, flor y fruto	<i>Vitex rotundifolia</i> <i>Mallotus repandus</i> <i>Cestrum nocturnum</i> <i>Limpia turbinata</i> <i>Clusia havetiodes</i> <i>Senecio miser</i> <i>Miconia lepidota</i> Entre otras	711	Triterpenoides Lignanos Flavonoides Triterpen glicósidos Lipopéptidos Sesquiterpenos Alcaloides Diterpenos Lactonas Antraquinonas Sesterterpenos Naftopiranonas Saponinas Xantonas
Microorganismos	Hongos	<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Nigrosabulum</i> sp. <i>Flamulina</i> sp. <i>Lactarium</i> sp. <i>Suillus</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp.	21	Péptidos cíclicos Sesquiterpenos Antraquinonas Benzofurano Alcaloides
	Bacterias	<i>Cyanobacteria</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp.	13	Lactonas Furanona Péptidos cíclicos

¹³TABLA IVRevisión artículos de la revista *Phytochemistry* (2001)

Producto natural	Origen	Géneros y especies	Cantidad	Tipo de compuestos
Productos vegetales	Raíz, hojas, tallo, flor y fruto	<i>Medicago sativa</i> <i>Calophyllum dispar</i> <i>Coelogyne cristata</i> <i>Iryanthera jurvensis</i> <i>Petunia hybrida</i> <i>Acarospora gobiensis</i> <i>Buxus papillosa</i> <i>Helicteres isora</i> <i>Entre otras</i>	571	Diterpenoides Alcaloides Triterpenoides Flavonoides Naftalenglicósidos Lignanglicósidos Sesquiterpenos Esteroles
Productos marinos	Algas	<i>Laurencia</i> sp. <i>Bifurcaria bifurcata</i>	6	Diterpenos Acetogeninas
Microorganismos	Hongos	<i>Physisporinus</i> sp. <i>Lactarium volemus</i> <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Coniothrium minitans</i> <i>Guanomyces</i> sp. <i>Phoma lingam</i>	18	Esteroles Pyrones Epóxidos Naftopirranonas Dioxopiperazinas

En general, las bibliotecas proveen gran información en el análisis de mezclas de compuestos desconocidos, además que son muy útiles para una adecuada confirmación de la presencia de algún componente de interés. Sin embargo, las bibliotecas comerciales más utilizadas sólo contienen de cincuenta mil a doscientos mil espectros de masas, mientras que hay más de doce millones de compuestos conocidos; por lo tanto, existe la necesidad de aumentar el número de compuestos de las bibliotecas de acuerdo a las necesidades de cada usuario. Además, los resultados de la identificación de compuestos con alguna biblioteca de espectros de masas no deben tomarse como la verdad absoluta; la decisión final de la identidad del compuesto debe hacerse por el operador después de un análisis minucioso de la información obtenida¹⁴.

1.3 Importancia

Considerando la gran diversidad de plantas y de compuestos nuevos aislados de las mismas, es esencial contar con el apoyo de una técnica de análisis rápida, versátil y sencilla como lo es CLAR-DAD-EM. Esto permite, además, conocer la composición de los extractos previa al fraccionamiento y purificación de los mismos.

Para ello, resulta necesario el estandarizar la técnica y contar con una biblioteca propia de espectros de masas para así facilitar la identificación selectiva de productos naturales biológicamente activos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General.

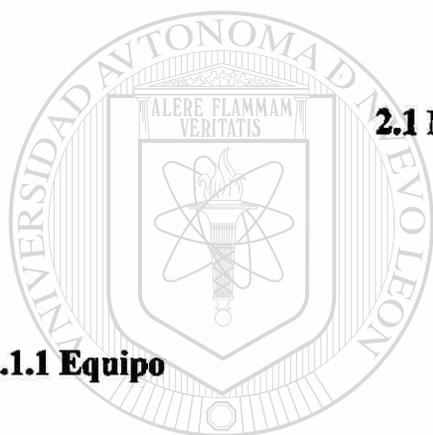
Diseñar una estrategia de análisis de productos naturales por CLAR-DAD-EM para su posterior aplicación en la identificación de compuestos de extractos bioactivos de plantas.

1.4.2. Objetivos específicos.

1. Diseñar sistemas de separación e identificación por CLAR-DAD-EM de mezclas de compuestos naturales estándares.
2. Verificar la pureza por CLAR-DAD-EM de compuestos conocidos de origen natural.
3. Elaborar una biblioteca alternativa de espectros de masas con los compuestos anteriores.
4. Aplicar el método desarrollado y la biblioteca generada, para el análisis preliminar de extractos activos de plantas obtenidos en el departamento de Química Analítica.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS



2.1 Material y Equipo general

2.1.1 Equipo

UANL

Waters Integrity System (Milford, MA, EUA) constituido por:

- Software Millennium 32 versión 4.00.
- Cromatógrafo de Líquidos: Alliance Waters 2690 equipado con automuestreador, sistema de desgasificación en línea y sistema de gradiente cuaternario.
- Detector UV-Vis de Arreglo de Diodos: Waters 996.
- Espectrómetro de masas: Waters ThermoBeam Mass Detector.

2.1.2 Compuestos de origen vegetal

2.1.2.1 Estándares.

En la tabla V se listan los estándares adquiridos comercialmente y en la figura 1 se muestran las estructuras de dichos estándares.

TABLA V

Lista de estándares

Estándares	Casa comercial
Quercetina	TCI american
Apigenina	Aldrich
Rutina 95%	Aldrich
Cafeína	Aldrich
Camptotecina	Aldrich
Kaempferol	TCI
Naftaleno 99%	Merck
Antraquinona	Eastman Organic Chemicals
Antrona	Sigma
Aloina 70%	Sigma
Emodina 97%	Sigma
Terpineol	H&R
Terpinoleno	H&R

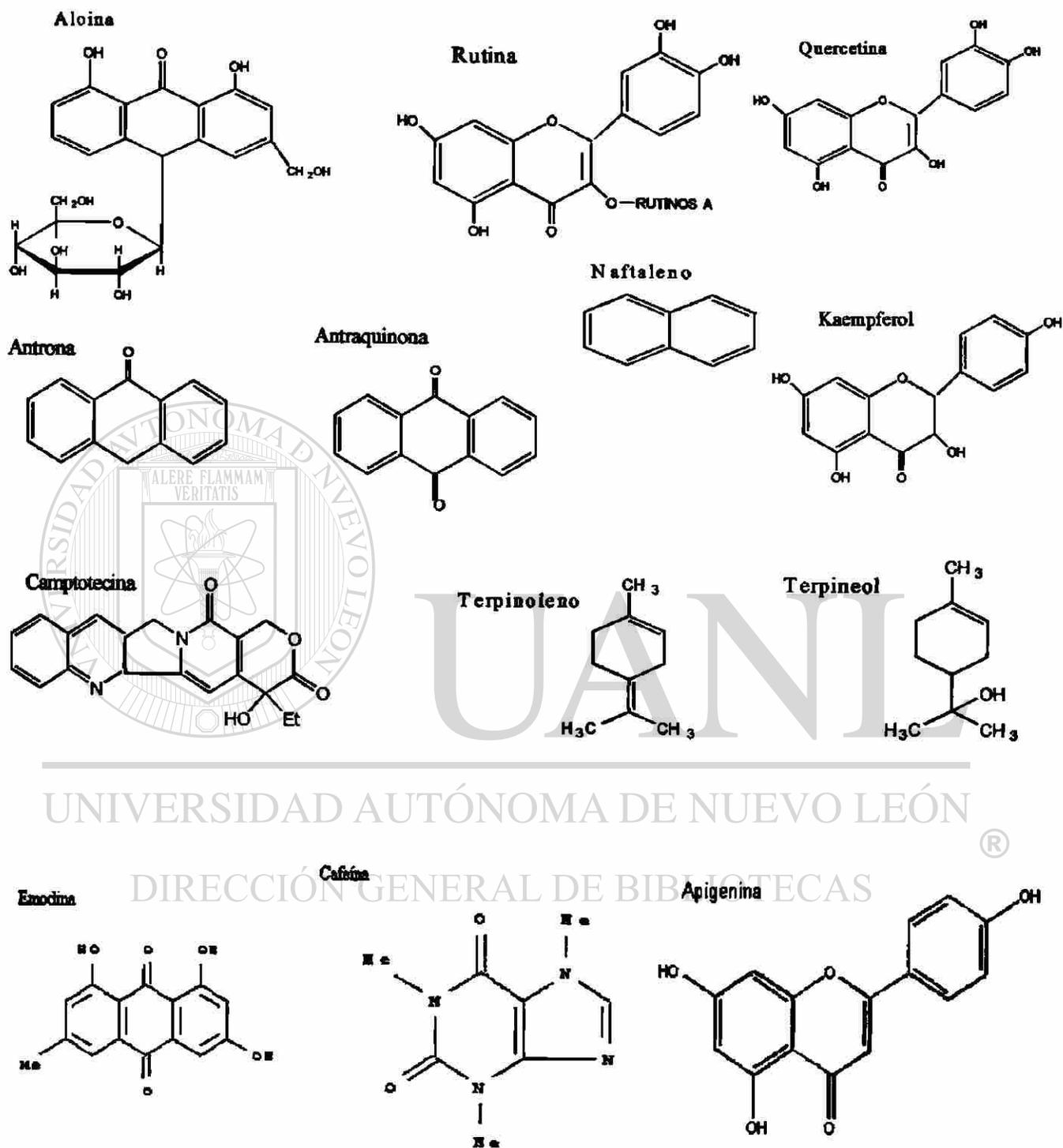


Figura 1. Estructuras de estándares comerciales

2.1.2.2 Compuestos obtenidos de origen natural no comerciales

Kukulkanina A, baileyolina, kukulkanina B, acetato β -amirina, verbelina, kokusagenina, quercitrina, uvadiol, chaparrina, partenina, ácido ursólico, betulina, eugarzasadina, desacetato matricarina, diosgenina, esmilagenina, bonducelina, tenulina, tuberilina y pristimirina fueron donados por la Dra. E. Guajardo de la colección del Dr. Xorge Domínguez de ITESM (figura 2). Ácido vainílico, protopina, ouabaina, criptopina, santonina, ácido siríngico y ácido p-cumárico los proporcionó la Dra. Julia Verde de la Facultad de Ciencias Biológicas de U.A.N.L. Peroxisimicina A₁ y T-496 se adquirieron del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de U.A.N.L. (figura 2) Por último, la cocaína la otorgó el Laboratorio de Química Forense de la dirección de Servicios Periciales de la PGJ sección Nuevo León (figura 2).

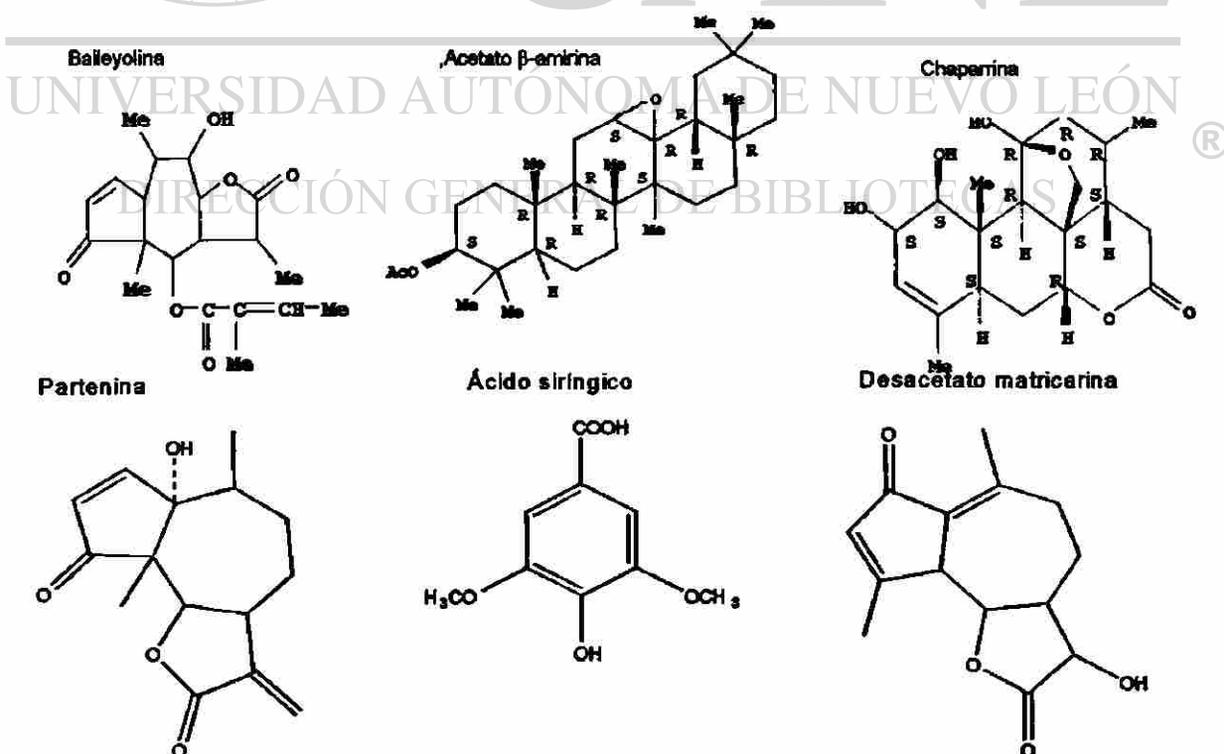


Figura 2. Estructuras de compuestos de origen natural no comerciales

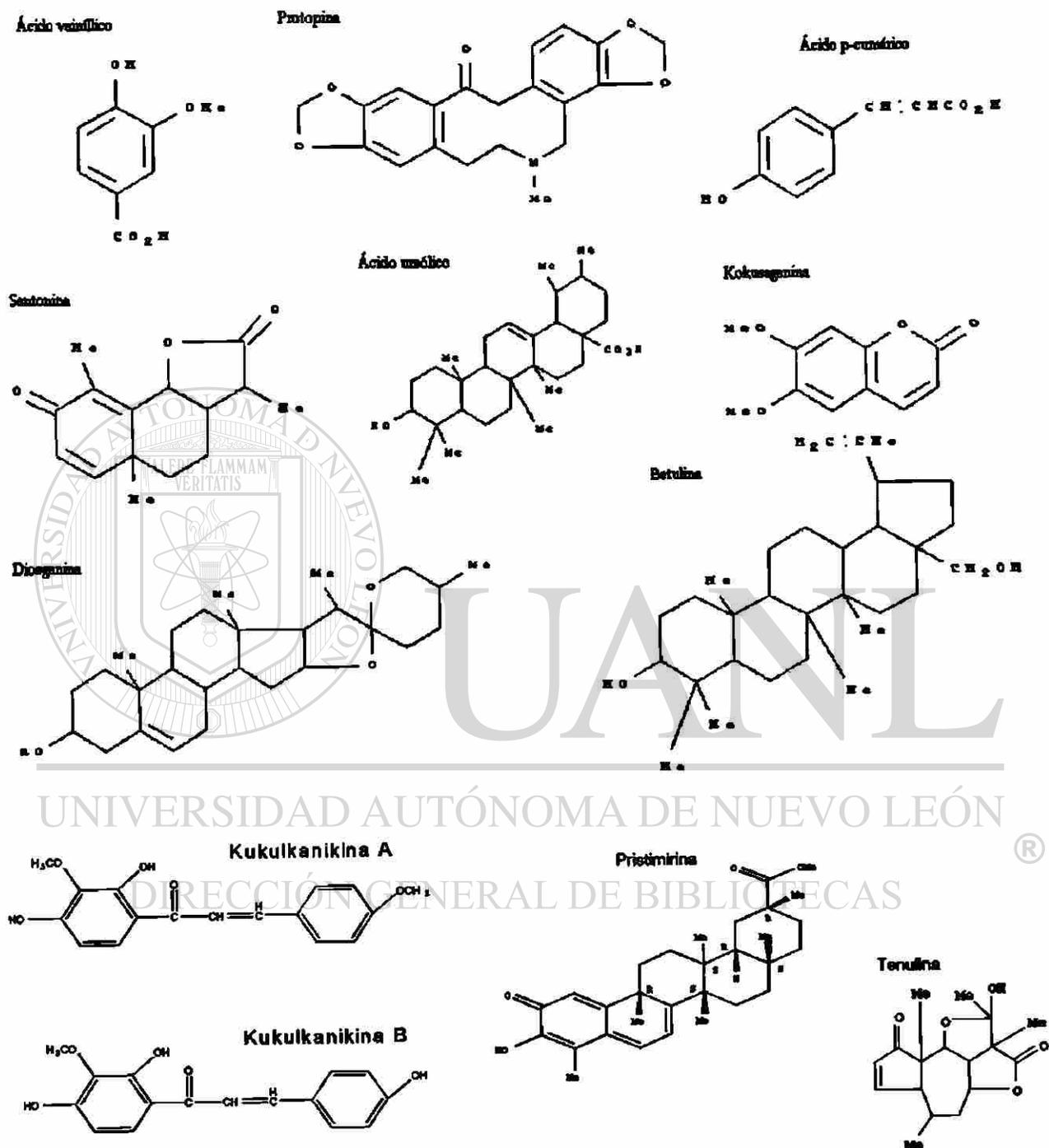


Figura 2 Continuación.

2.1.2.3 Extractos bioactivos

Extracto de acetato de etilo obtenidos de fruto de *Karwinskia parvifolia*.

Fracciones hexano:acetato de etilo en distintas proporciones obtenidos de raíz de *Leucophyllum frutescens*.

Fracciones provenientes de un extracto hexano:acetato de etilo (3:2) obtenidos de hojas de *Cordia boissieri*.

2.1.2.4 Mezclas estándares de trabajo

Mezcla 1: Apigenina 200 ppm, camptotecina 200 ppm, emodina 100 ppm, kaempferol 1500 ppm, quercetina 1500 ppm, antrona 1500 ppm, antraquinona 1500 ppm, aloína 6000 ppm y naftaleno 6000 ppm.

Mezcla 2: emodina 700 ppm, camptotecina 700 ppm, apigenina 700 ppm, antrona 500 ppm, antraquinona 500 ppm, naftaleno 6000 ppm, quercetina 200 ppm, terpineol 100 ppm y kaempferol 100 ppm.

Mezcla 3: antraquinona 1000 ppm, cocaína 1000 ppm, aloína 1000 ppm, quercetina 1000 ppm, antrona 1000 ppm, camptotecina 1000 ppm, kaempferol 1000 ppm y terpinoleno 4000 ppm.

Mezcla 4: cocaína 1000 ppm, terpinoleno 4000 ppm, naftaleno 3000 ppm, quercetina 1500 ppm y camptotecina 1500ppm.

Mezcla 5: camptotecina 500 ppm, kaempferol 500 ppm, antraquinona 500ppm y naftaleno 1000 ppm.

Mezcla 6: kaempferol 1000 ppm, quercetina 1000 ppm, antraquinona 1000 ppm, antrona 1000 ppm, terpinoleno 4000 ppm, cafeína 1000 ppm, aloína 2000 ppm.

Mezcla 7: camptotecina 1500 ppm, kaempferol 500 ppm, antraquinona 500ppm y terpinoleno 4000 ppm.

Mezcla 8: rutina 1000 ppm, apigenina 1000 ppm y terpineol 4000 ppm.

Mezcla 9: rutina 1500 ppm, kaempferol 500 ppm, terpinoleno 4000 ppm.

Mezcla 10: aloína 1000 ppm, kaempferol 500 ppm, quercetina 500 ppm, naftaleno 1000 ppm, antraquinona 500 ppm y terpinoleno 4000 ppm.

Mezcla 11: camptotecina 1000 ppm, antraquinona 1000 ppm, kaempferol 500 ppm, quercetina 500 ppm, terpinoleno 4000 ppm, cocaína 500 ppm y naftaleno 2000 ppm.

Mezcla 12: cocaína 500 ppm, camptotecina 1000 ppm, kaempferol 500 ppm, antrona 500 ppm, terpinoleno 4000 ppm.

Mezcla 13: cafeína 500 ppm, apigenina 400 ppm, emodina 500 ppm y terpinoleno 4000 ppm.

Todas las mezclas se disolvieron en acetonitrilo y fueron filtradas previo a su inyección al cromatógrafo.

2.1.3 Reactivos y Solventes

Helio, alta pureza 99.995 %, AGA.

Ácido fórmico, 98-100 % de pureza, Merck.

Acetonitrilo, alta pureza, Omnisolv EMD.

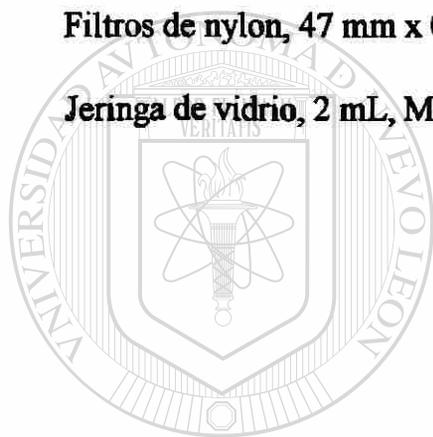
Agua, grado HPLC, TEDIA.

Metanol, grado HPLC, Fisher Scientific.

Filtros de membrana, 13 mm x 0.45 μ m, Pall Corporation.

Filtros de nylon, 47 mm x 0.45 μ m, Pall Corporation.

Jeringa de vidrio, 2 mL, Micro-Mate.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



2.2 Métodos

2.2.1 Diseño de sistemas de separación e identificación de mezclas de estándares de origen natural por CLAR-DAD-EM.

2.2.1.1 Análisis de mezclas a las condiciones iniciales de CLAR-EM.

Las condiciones iniciales fueron¹⁵:

CLAR:

Columna Polarity dC_{18} 3 μm 2.1 x 50 mm

Fase móvil: A) ácido fórmico 0.1% en agua, B) ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo.

Gradiente lineal: 5% - 95% de B en 12.5 min.

Flujo de FM: 0.3 mL/min.

Volumen de inyección: 20 μL

Barrido de longitudes de onda: 210 a 450 nm

EM:

Intervalo de m/z: 60-650 u.m.a. o 60-1000 de acuerdo a los PM de los analitos.

Calibración: Perfluorotributilamina (PTA).

Filamento: 70 eV.

Adquisición de datos: modo de barrido completo a una velocidad de 1 espectro por segundo.

Flujo He: 20 mm.

Temperatura del nebulizador: 75°C

Temperatura región de expansión: 75°C

Temperatura de cámara de ionización: 200°C.

Todos los estándares se analizaron individualmente para conocer su tiempo de retención utilizando las condiciones iniciales de CLAR-DAD-EM. Para la primer parte de este estudio, se hicieron diferentes mezclas (de la mezcla 1 a la mezcla 7) de acuerdo a su naturaleza química y tiempo de retención, para analizarlas posteriormente.

2.2.1.2 Optimización de temperatura de nebulización, temperatura de región de expansión y flujo de helio.

Para mejorar la respuesta de los analitos en EM se optimizaron el flujo de He, la temperatura del nebulizador y la temperatura de región de expansión.

La optimización de estos tres parámetros se realizó inicialmente con un solo estándar (aloína) debido a la baja respuesta presentada por este compuesto, y posteriormente, con la mezcla 10.

En el caso de la aloína, la introducción de la muestra se realizó por inyección en flujo, mientras que para la mezcla 11 se utilizó la columna cromatográfica. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Temperatura de nebulización. Se trabajó en un intervalo de temperatura de 75°C a 100°C con variaciones de 5°C; se mantuvieron fijos la temperatura de la región de expansión a 75°C y el flujo de He en 20 mm.

Temperatura de región de expansión. Se fue aumentando gradualmente 5°C, empezando desde una temperatura de 75°C hasta alcanzar 100°C; la temperatura de nebulización y el flujo de He (20 mm) se mantuvieron fijos.

Flujo de helio. De acuerdo a las dimensiones de la columna utilizada el proveedor especifica el flujo de helio recomendable. Los flujos fueron de 15; 20 y 25 mm de altura en el rotámetro. Se fue aumentando el flujo en 5 unidades, de 15 mm a 25 mm, se dejaron fijas las temperaturas de nebulización y de la región de expansión que produjo la máxima respuesta del o los compuestos analizados, según fuese el caso.

2.2.1.3 Separación e identificación de mezclas de estándares.

Con las condiciones óptimas de CLAR-DAD-EM se inyectaron 10 µL de las mezclas ocho a la catorce realizando la adquisición de datos con el DAD e inmediatamente después con el EM.

Se analizó el cromatograma por DAD y TIC para evaluar la separación de los componentes y después se procedió a la identificación.

Para la identificación de los compuestos, se obtuvo el espectro de masas de cada pico del cromatograma obtenido mediante barrido de todas las masas (TIC); se seleccionó el ion con mayor intensidad en el espectro y posteriormente se obtuvo el cromatograma a la m/z de dicho ion. Se hizo una combinación de espectros de la parte central del pico y se le restó el ruido de fondo antes y después del mismo. El espectro de masas resultante de la combinación fue comparado con los espectros de masas contenidos en la biblioteca Wiley-Nist, con los siguientes parámetros:

- I. Tipo de búsqueda: mezcla.
- II. Rango de masas: 60-650 u.m.a.
- III. Número de puntos tomados para la combinación de espectros: 10.
- IV. Doble búsqueda del espectro en la biblioteca Wiley: si.
- V. Número de compuestos probables para reportar: 3.

2.2.2 Verificación de la pureza por CLAR-DAD-EM.

Se analizaron individualmente los veintinueve compuestos de origen natural no comerciales obteniendo los cromatogramas tanto de CLAR-DAD como CLAR-EM empleando las condiciones óptimas. Como criterio de pureza de la muestra se consideró el número de picos cromatográficos obtenidos, así como la resolución entre los mismos.

2.2.2.1 Determinación de la pureza del pico cromatográfico por UV/Vis con DAD.

Para determinar si los picos cromatográficos obtenidos correspondían a un solo compuesto o a la coelución de varias sustancias, se realizó el análisis de los espectros tanto UV/Vis como de masas.

2.2.2.1.1 Superposición de espectros UV/Vis normalizados en diferentes puntos del pico cromatográfico. Se tomaron cinco puntos a través del pico cromatográfico y se obtuvo el espectro de absorción UV-Vis de 210 a 450 nm para cada punto. Se

normalizaron los espectros y se superpusieron. Si los espectros de absorción presentaban alguna diferencia, se consideró que el compuesto estaba impuro.

2.2.2.1.2 Análisis por comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo de umbral. Para confirmar los resultados obtenidos con la superposición de espectros se realizó la comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo umbral. Esta comparación se hizo con la función *pureza* del software Millennium 32 con las siguientes especificaciones:

- I. Parámetros de contraste espectral: límite de longitud de onda de 210 a 450 nm e intervalo de ruido de 0 a 4 min.
- II. Parámetros de pureza: ángulo de solvente de 0.5 grados y criterio de umbral como autoumbral.

2.2.2.2 Análisis por EM.

Para determinar la pureza del pico cromatográfico por EM se obtuvo el cromatograma del barrido de masas (TIC), se analizó el espectro de masas y se seleccionaron las dos o tres m/z más abundantes para cada compuesto. Se extrajeron los cromatogramas a las m/z seleccionadas y se observaron sus tiempos de retención. Se consideró que un compuesto estaba puro si los tiempos de retención de los picos en el cromatograma TIC y a las diferentes m/z coincidían.

Además, del cromatograma TIC se obtuvo el espectro de masas combinado en tres zonas a lo largo del pico. La primera abarcó la parte izquierda del pico con un intervalo de 0.2 min; la segunda, alrededor del ápice con un intervalo de 0.2 min; y la tercer zona

en la parte derecha del pico con un intervalo de 0.2 min; esos espectros fueron superpuestos. Si en los espectros de masas obtenidos no existía diferencia significativa en cuanto a los fragmentos observados y abundancias relativas, se confirmaba la pureza de ese pico.

2.2.3 Elaboración de una biblioteca alternativa de espectros de masas.

Se inyectaron 10 μL de los estándares individuales a una concentración de 500 ppm. Para los compuestos de origen natural se utilizaron los espectros de masas obtenidos en el punto 2.2.2.

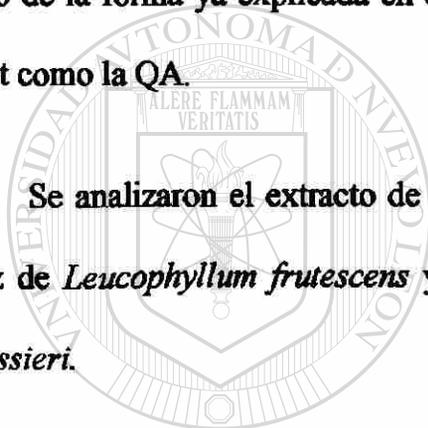
Del cromatograma obtenido del barrido de masas (TIC) tanto de los compuestos que resultaron puros como de los estándares, se extrajo el cromatograma a la m/z del pico base, se hizo una combinación de espectros de la parte central del pico y se restó el ruido de fondo. El espectro de masas obtenido fue añadido a la biblioteca QA.

2.2.4 Análisis preliminar de extractos activos obtenidos de plantas disponibles en el departamento de Química Analítica.

Para los extractos bioactivos se utilizaron las mismas condiciones óptimas de CLAR-EM del punto 2.2.1.3, a excepción del intervalo de masas que fue de 60 a 1000 u.m.a.

La comparación e identificación de los compuestos presentes en los extractos se hizo de la forma ya explicada en el punto 2.2.1.3 y se utilizó tanto la biblioteca Wiley-Nist como la QA.

Se analizaron el extracto de *Karwinskia parvifolia*, las fracciones provenientes de raíz de *Leucophyllum frutescens* y las fracciones provenientes de las hojas de *Cordia boissieri*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Diseño de sistemas de separación e identificación de mezclas de estándares de origen natural por CLAR-EM.

3.1.1 Análisis de mezclas a las condiciones iniciales de CLAR-EM.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos por DAD y por TMD de las mezclas analizadas (mezclas 1 a la 6). Las tablas de la VI a la IX corresponden a los datos obtenidos de la comparación de espectros de masas de los compuestos presentes en las mezclas contra la biblioteca Wiley-Nist, bajo las condiciones iniciales de análisis.

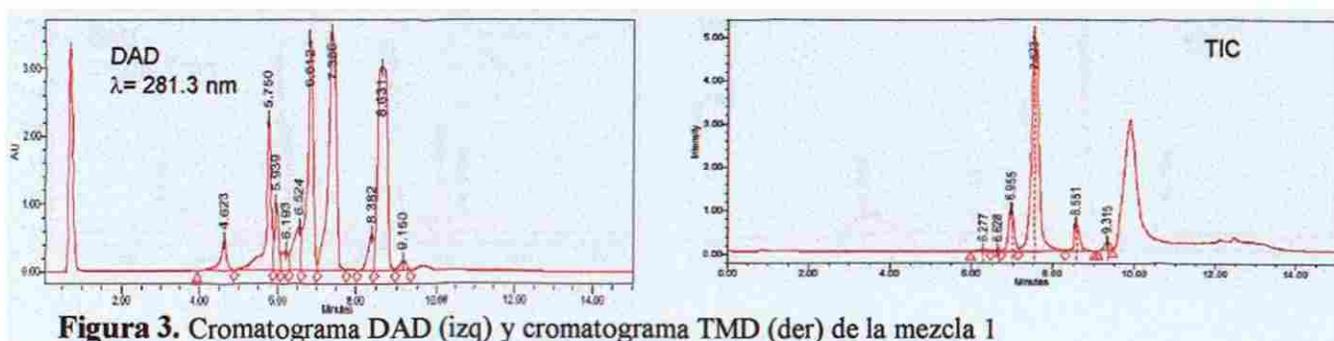


Figura 3. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 1

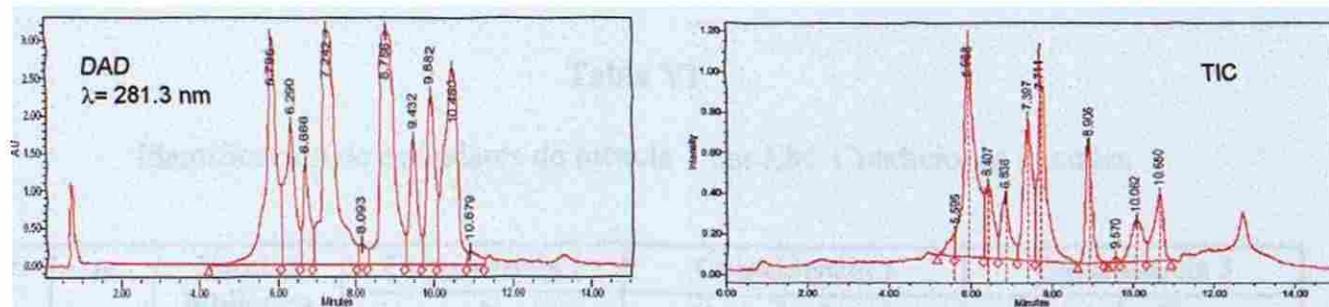


Figura 4. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 2

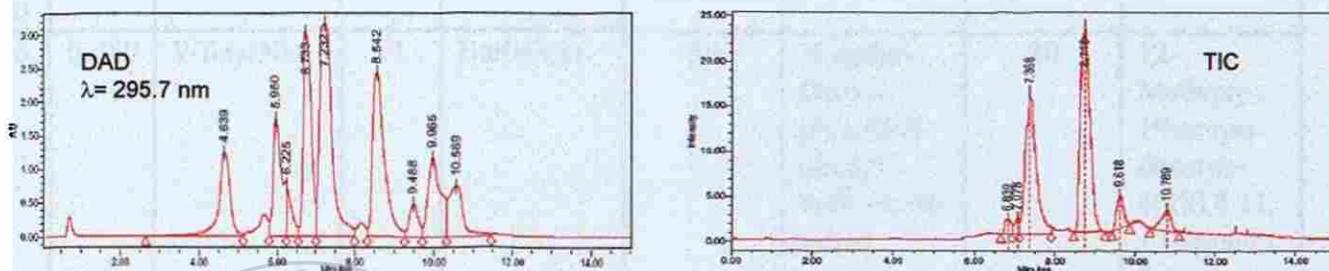


Figura 5. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 3

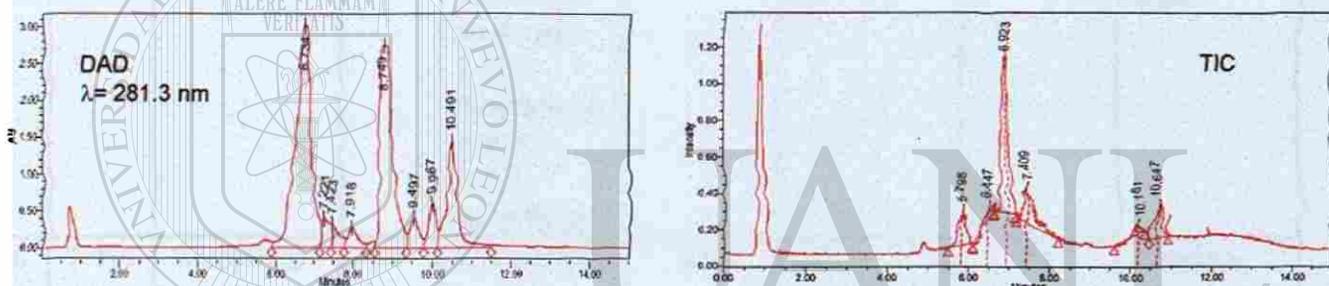


Figura 6. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 4

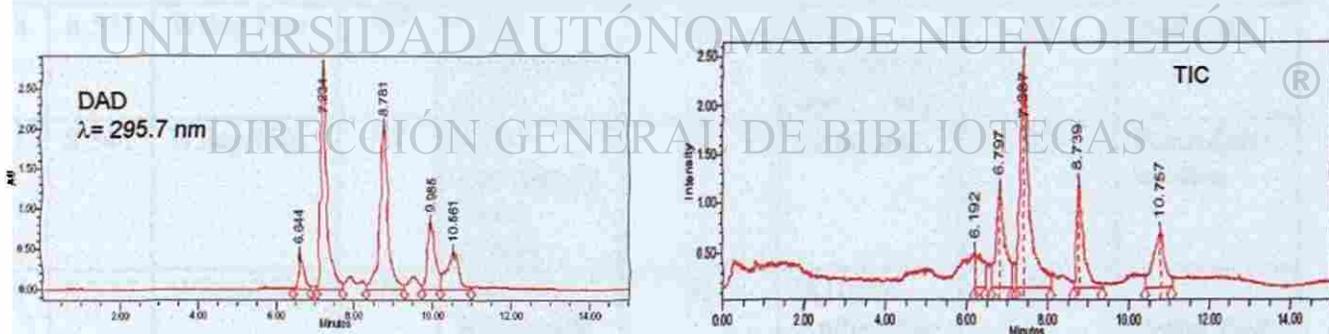


Figura 7. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 5

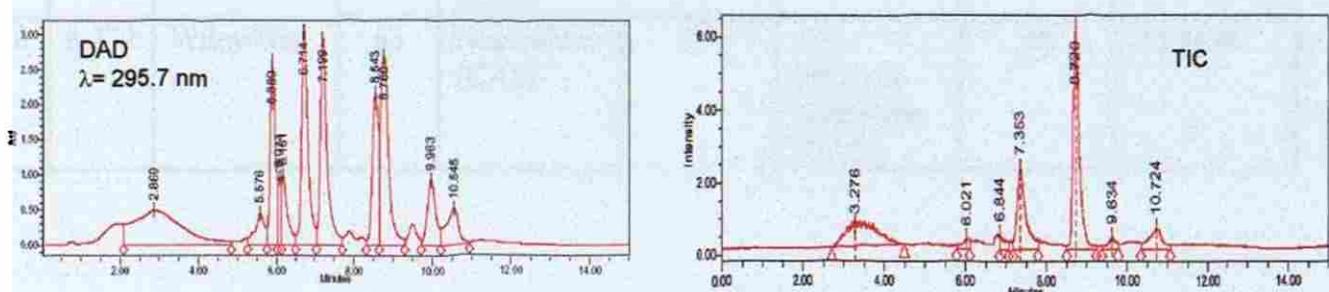


Figura 8. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 6

Tabla VI

Identificación de estándares de mezcla 1 por EM. Condiciones iniciales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
348								
270								
256	6.280	Wiley/Nist	51	Barbaloin	50	N(alpha)-Benzyl glycin)-N-phenyl hydroxamic acid	20	12-Methoxy-19-norpodocarpa-4(18),8,11,13-tetraen-3-one
302	6.948	Wiley/Nist	69	4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-	42	Quinindoline	19	Isoquercitrine
286	7.487	Wiley/Nist	94	Kaempferol	61	2-Styrylnaphtho[2,1-b]thiophene	56	Flavone-tetraol
208	8.531	Wiley/Nist	97	9,10-Anthracene dione	94	9H-Fluoren-9-one (CAS)	94	Anthrone
194	8.541	Wiley/Nist	97	9,10-Anthracene dione (CAS)	82	Anthrone	81	Benzo[c]cinoline
194	9.327	Wiley/Nist	71	1H-Benzimidazole, 2-phenyl- (CAS)	31	9(10H)-Anthracene (CAS)	29	1-Phenanthrenol
128	8.772	Wiley/Nist	63	Naphtalene (CAS)	63	1H-Indene, 1-methylene (CAS)	58	Azulene

Tabla VII

Identificación de estándares de mezcla 2 por EM. Condiciones iniciales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
348	6.723	Wiley/Nist	93	Camptothecin	67	1,4-dimethoxy-2-(prop-1'-enyl)-3-(prop-2''-enyl)antraquinone	67	4,6,7-Triphenyltriazolo[4,5-c]pyridine
286	7.434	Wiley/Nist	63	4H-1Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl-	61	3,8,9-Trimethoxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one	56	9-oxo-9,10,11,12-tetrahydrobenzo[b]fluoranthene
270	7.403	Wiley/Nist	61	4-Hydroxy-3,3',4-trimethoxystilbene	61	5-Fluoro-1-hydroxy-4-methoxy-2-methylanthracene-9,10-dione	56	9-oxo-9,10,11,12-tetrahydrobenzo[b]fluoranthene
270	8.854	Wiley/Nist	94	9,10-anthracenedione-1,3,8-trihydroxy-6-methyl-	94	1,4,5-Trihydroxy-2-methylanthracene-9,10-dione	92	9,10-Anthracenedione,1,3,8-trihydroxy-6-methyl-
208	8.805	Wiley/Nist	95	9,10-Anthracenedione,1,3,8-trihydroxy-6-methyl-	91	9,10-Anthracenedione-1,3,8-trihydroxy-6-methyl-	71	1,4,5-Trihydroxy-2-methylanthracene-9,10-dione
194	9.564							
93	7.730	Wiley/Nist	91	Camphene	91	3-Cyclohexene-1-methanol, alpha, alpha, 4-trimethyl-(CAS)	76	Alpha-Terpinyl propionate
93	10.650	Wiley/Nist	95	(+)-4-Carene	95	Alpha-terpinolene	94	(+)-2-Carene

Tabla VIII

Identificación de estándares de mezcla 3 por EM. Condiciones iniciales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
82	5.814	Wiley/Nist	50	Allopseudo cocaine	42	Cocaine	42	Allopseudo cocaine
256	6.289	Wiley/Nist	18	Barbalion				
348								
302	7.255	Wiley/Nist	74	4H-1Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-	71	4H-1Benzo pyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxy phenyl)-3,5,7-trihydroxy-	68	4H-1Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-
286	7.475	Wiley/Nist	67	Triethylammonio-N-diphenyl phosphinoyl imide	54	Kaempferol	50	Kaempferol
208	8.739	Wiley/Nist	31	9H-Fluoren-9-one	31	Benzo[c]cinnoline	29	1H-Phenalen-1-one
208	9.570	Wiley/Nist	72	Anthrone	72	Anthrone	71	1H-Benzimidazole,2-phenyl-(CAS)
194	8.598	Wiley/Nist	91	9,10-Anthracenedione (CAS)	91	9,10-Anthracenedione	91	9,10-Anthracenedione
194	9.665	Wiley/Nist	74	Anthrone	54	Anthrone	51	9H-Fluoren-9-one
93	10.653	Wiley/Nist	95	(+)-4-Carene	95	(+)-2-Carene	93	Cyclohexen,1-methyl-4-1-methylethyldiene

Tabla XI

Identificación de estándares de mezcla 6 por EM. Condiciones iniciales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
194	3.269	Wiley/Nist	94	Caffeine				
256	6.288	Wiley/Nist	54	E-4-[hydroxyl[1(E)-2-phenylethenyl]methylene				
302	6.845	Wiley/Nist	59	3,4:8,9-Dibenzopyran e	59	Quinindoline	59	2,3-Diethyl-5-methoxy-7-acetoxy naphthoquinone
286	7.357	Wiley/Nist	91	Kaempferol	68	2-(4-hydroxyphenyl)3,5,7-trihydroxybenz[e]-1,4pyran-4-one	63	Flavone-tetraol
194	8.688	Wiley/Nist	76	9H-fluorene,2-ethyl-(CAS)	68	2-Methyl-1H-benz[f]inden-1-one	68	Anthrone
194	9.602	Wiley/Nist	81	Anthrone	79	Benzo[c]cinnoline,4 methyl	71	9-Phenanthrenol
208	8.739	Wiley/Nist	89	Anthrone	60	1-Phenanthrenol	58	3,4-Benzocycloundec-3-ene-1,5-diyne
93	10.745	Wiley/Nist	93	Alpha-terpinolene	88	3-Carene	88	Trans-Ocimene

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.1.2 Optimización de temperatura de nebulización, temperatura de región de expansión y flujo de helio.

Las figuras 9 a la 13 presentan los datos de intensidad de respuesta obtenidos de los experimentos de optimización de parámetros del EM. En las figuras 9, 10 y 11 se muestran las gráficas para aloina, en las figuras 12 y 13 las gráficas para la mezcla 10.

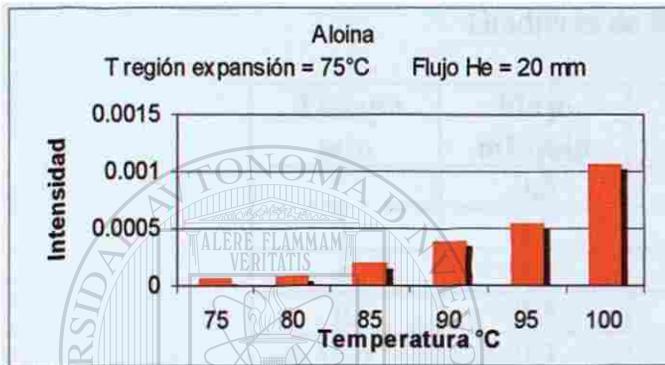


Figura 9. Optimización temperatura de nebulización

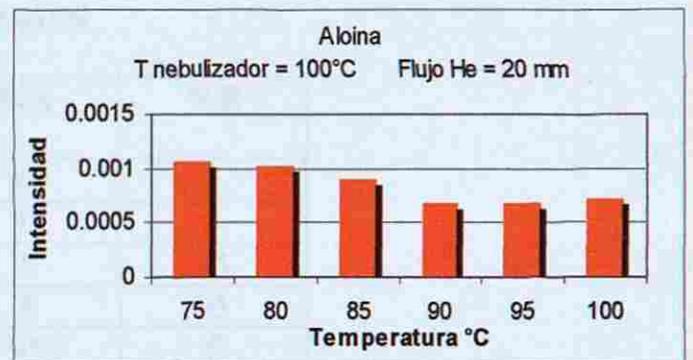


Figura 10. Optimización temperatura de región de expansión

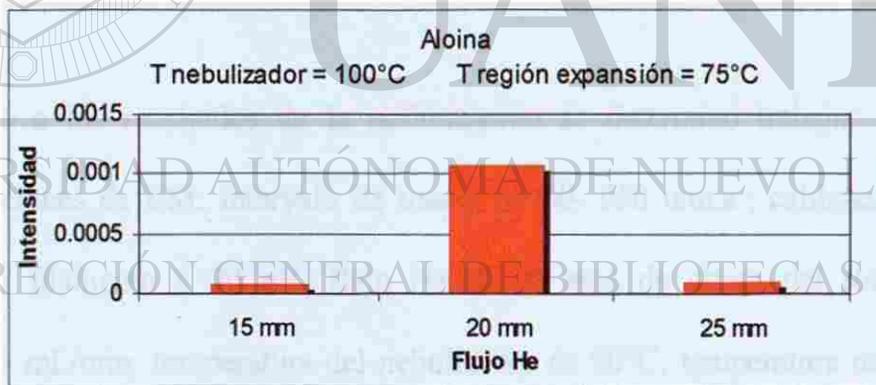


Figura 11. Optimización del flujo de He

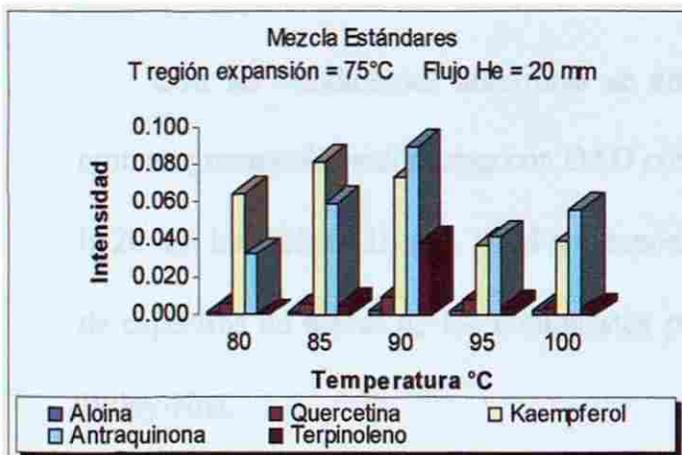


Figura 12. Optimización temperatura de nebulización

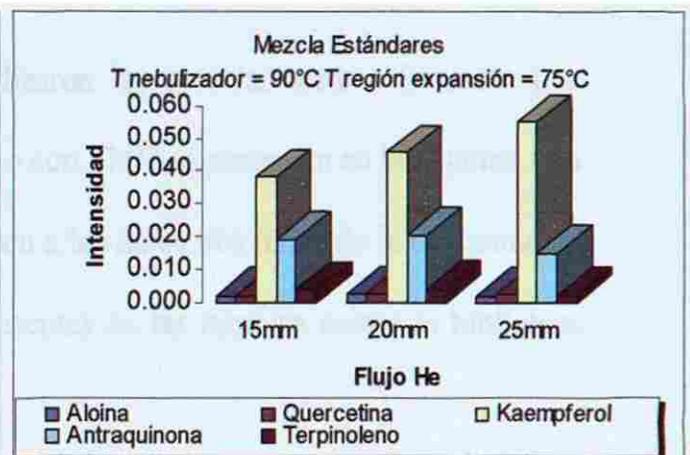


Figura 13. Optimización del flujo de He

3.1.3 Separación e identificación de mezclas de estándares. Condiciones finales.

A continuación se presentan las condiciones de CLAR utilizadas:

Columna Polarity dC₁₈, 3 μm 2.1 x 50 mm

FM: A) ácido fórmico 0.1% en agua y B) ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo.

Tabla XII

Gradiente de fase móvil

Tiempo min	Flujo mL/min	%A	%B
	0,3	95	5
1	0,3	95	5
8	0,3	5	95
10	0,3	5	95
12.5	0,3	95	5
15	0,3	95	5

— De acuerdo a los resultados de la optimización se determinó trabajar con las siguientes condiciones de EM: intervalo de masas de 60- 650 u.m.a.; calibración con PTA; voltaje de filamento a 70 eV; flujo He de 20 mm de altura del rotámetro, equivalente a 0.3 mL/min; temperatura del nebulizador de 90°C; temperatura región de expansión de 75°C y temperatura cámara de ionización de 200°C.

Con las condiciones anteriores se analizaron las mezclas siete a la trece. Los cromatogramas obtenidos tanto con DAD como con TMD se presentan en las figuras 14 a la 20. En las tablas XIII a la XVII corresponden a los datos obtenidos de la comparación de espectros de masas de los compuestos presentes en las mezclas contra la biblioteca Wiley-Nist.

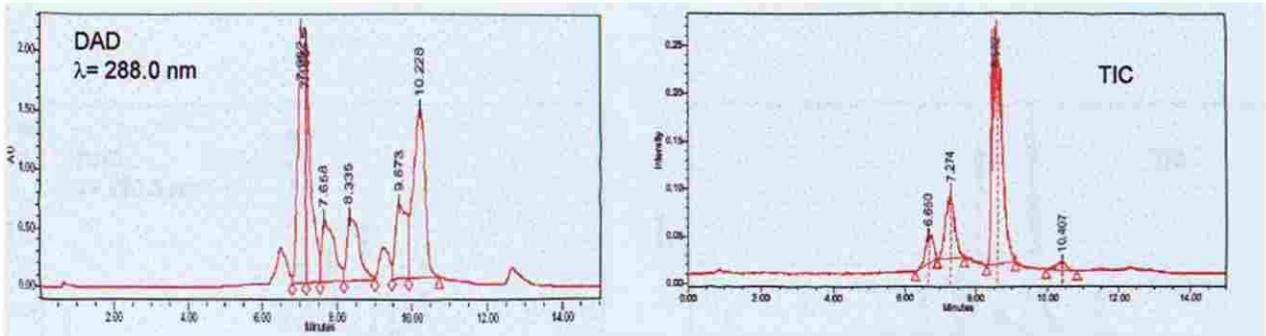


Figura 14. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 7

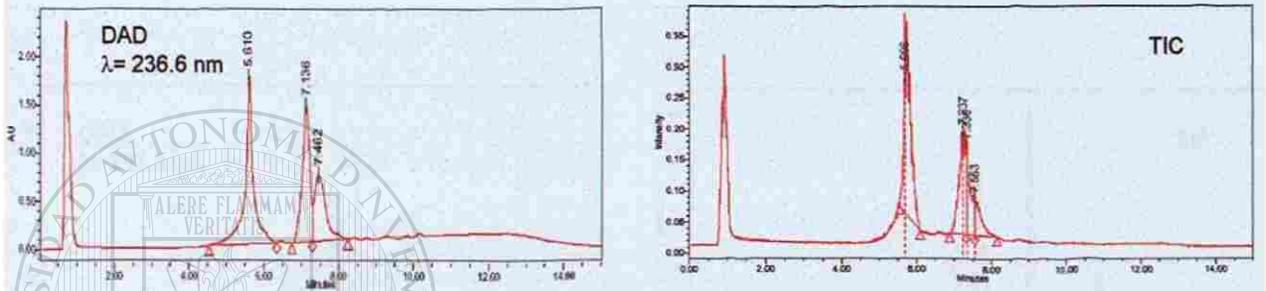


Figura 15. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 8

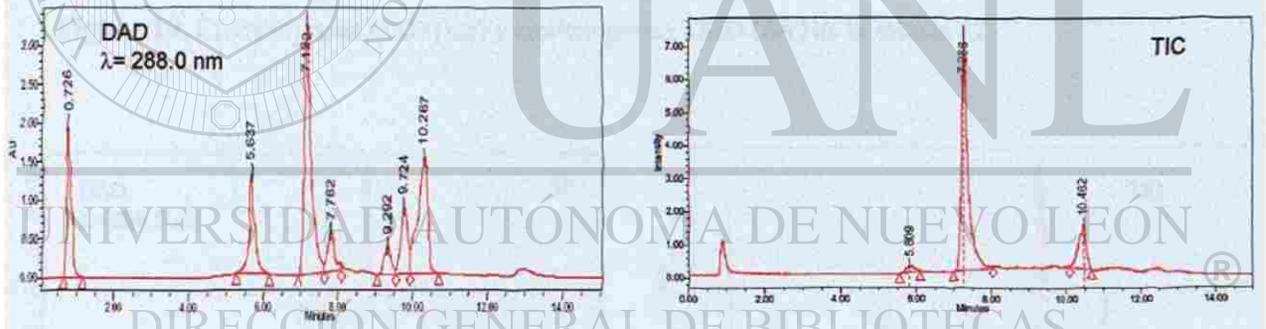


Figura 16. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 9

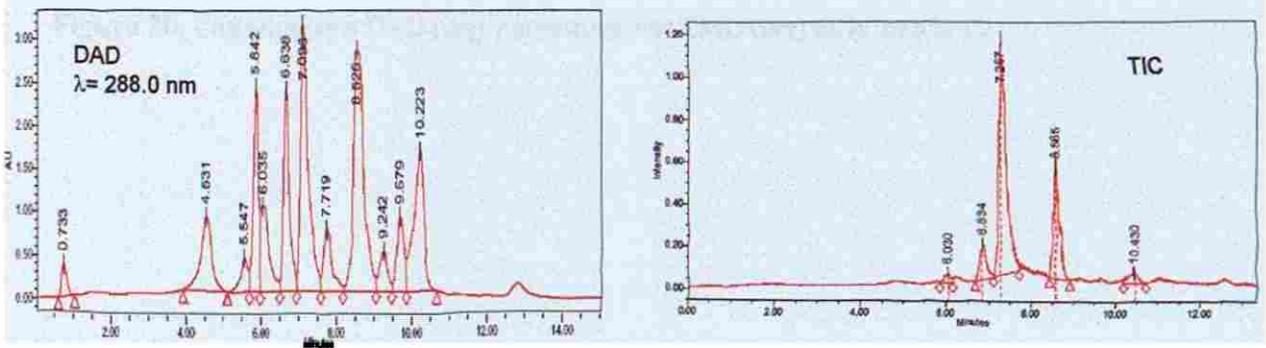


Figura 17. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 10

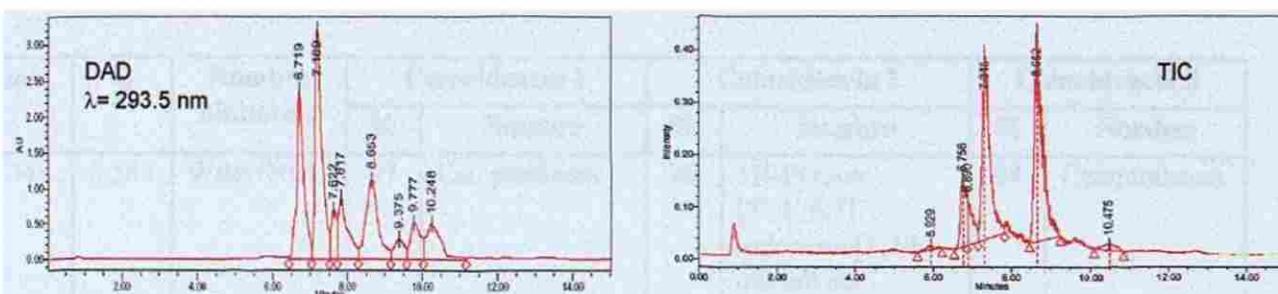


Figura 18. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 11

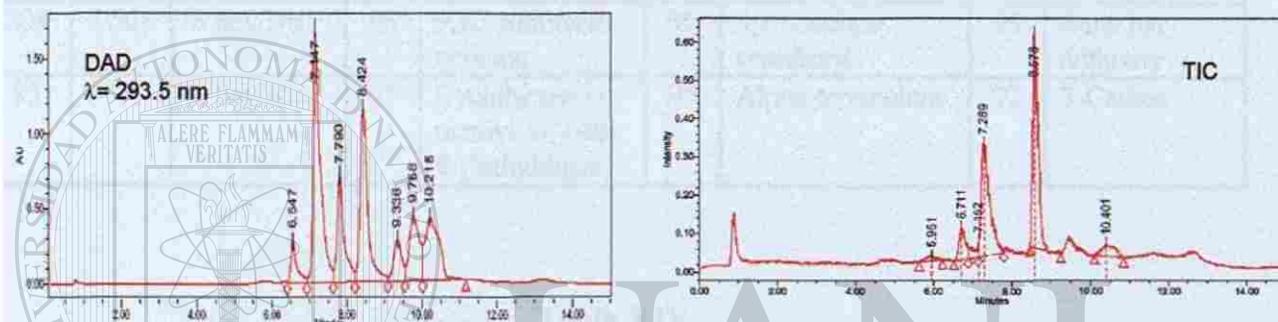


Figura 19. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 12

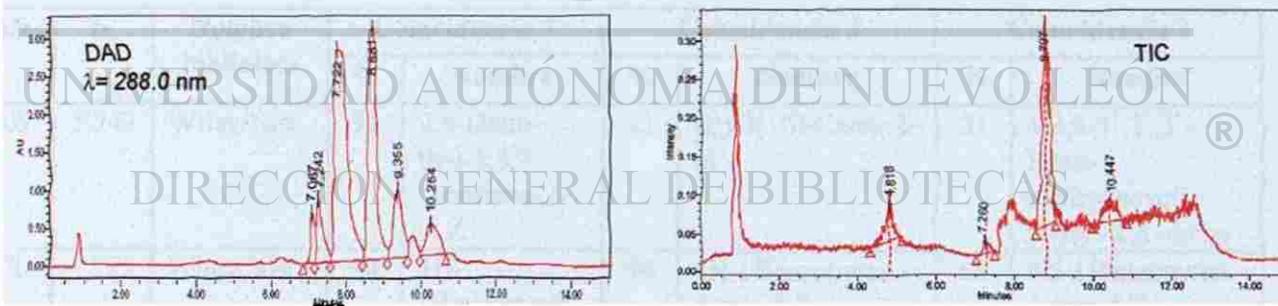


Figura 20. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la mezcla 13

Tabla XIII

Identificación de estándares de mezcla 7 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
348	6.583	Wiley/Nist	97	Camptothecin	95	1H-Pyrano [3',4';6,7] indolizino[1,2-b] quinoline-3,14(4H, 12H)-dione, 4-ethyl-4-hydroxy-,(S)	94	Camptothecin
286	7.241	Wiley/Nist	94	Kaempferol	93	Campferol	91	Kaempferol
208	8.561	Wiley/Nist	96	9,10-Anthracenedione	95	9,10-Anthracenedione	93	9-methyl anthrone
93	10.398	Wiley/Nist	95	Cyclohexen,1-methyl-4-(1-methylethyldiene)	95	Alpha-terpinolene	93	3-Carene

Tabla XIV

Identificación de estándares de mezcla 8 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
109	5.742	Wiley/Nist	31	2,6-Dimethyl-3,5,7-octatriene-2-ol,Z	21	(E)-3(10)-Caren-2-ol	21	1,2,3-1',2',3'-Hexamethylbicyclopentyl-2,2'-diene
270	7.295	Wiley/Nist	94	4H-1Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-	94	4H-1Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-	68	4H-1Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-
93	7.618	Wiley/Nist	76	3-Cyclohexene-1-methanol, alpha,alpha,4-trimethyl,(S)	76	Alpha-terpinyl propionate	76	Cyclofenchene

Tabla XV

Identificación de estándares de mezcla 9 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
109	5.781	Wiley/Nist	22	5-Hexen-2-yn-1-ol	10	Undeca-3,4-diene-2-one		
286	7.206	Wiley/Nist	71	Campherol	68	Kaempferol	67	2-(4-hydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxybenzo[e]-1,4-pyran-4-one
93	10.370	Wiley/Nist	91	Gamma-terpinene	91	Alpha-terpinolene	91	Alpha-terpinolene

Tabla XVI

Identificación de estándares de mezcla 10 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
256	6.209	Wiley/Nist	59	(N(alpha)-Benzylglycin)-N-phenylhydroxydroxamic acid	59	Tetrahydrobenz[a]aceanthrylene		
302	6.776	Wiley/Nist	95	4H-1Benzo pyran-4-one, 2-(3,4-dihydro-xyphenyl)-3,5,7-trihydroxy	91	Quercetin	68	4H-1Benzo pyran-4-one, 2-(3,4-dihydro-xyphenyl)-3,5,7-trihydroxy
286	7.232	Wiley/Nist	95	Kaempferol	93	Campferol	93	Kaempferol
208	8.507	Wiley/Nist	94	9,10-Anthracene-dione	94	9,10-Anthracene-dione (CAS)	94	9,10-Anthracene-dione
93	10.419	Wiley/Nist	85	Alpha-terpinolene	85	Alpha-terpinolene	76	Cyclohexen,1-methyl-4-(1-methylethyldiene)

Tabla XVII

Identificación de estándares de mezcla 11 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
182	5.892	Wiley/Nist	95	Cocaine	95	Cocaine	94	Cocaine
348	6.723	Wiley/Nist	96	1H-Pyrano[3',4';6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione, 4-ethyl-4-hydroxy	95	Camptothecin	21	Podocarp-13-en-12a-ol
302	6.855	Wiley/Nist	93	4H-1Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-	92	Camptothecin	53	1,4-dimethoxy-2-(prop-2"-enyl)anthraquinone
286	7.303	Wiley/Nist	94	Kaempferol	91	Campherol	91	Kaempferol
208	8.647	Wiley/Nist	96	9,10-Anthracenedione (CAS)	95	9,10-Anthracenedione	95	9,10-Anthracenedione
93	10.404	Wiley/Nist	93	(+)-4-Carene	93	(+)-2-Carene	93	Alpha-terpinolene

Tabla XVIII

Identificación de estándares de mezcla 12 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
194	5.880	Wiley/Nist	94	Cocaine	94	Cocaine	94	Cocaine
348	6.676	Wiley/Nist	95	Camptothecin	93	1H-Pyrano[3',4';6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione, 4-ethyl-4-hydroxy	21	12,13-dimethoxypodocarpa-8,11,13-trien-19-ol
286	7.274	Wiley/Nist	95	Kaempferol	95	Kaempferol	67	campherol
194	8.587	Wiley/Nist	89	9,10-Anthracenedione	89	Anthrone	89	9,10-Anthracenedione (CAS)
194	9.467	Wiley/Nist	93	Anthrone	93	Anthrone	75	9(10H)-Anthracenone
93	10.431	Wiley/Nist	95	Cyclohexen,1-methyl-4-(1-methyl ethyldiene)-	94	Alpha-terpinolene	91	Bicyclo[4,1,0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-

Tabla XIX

Identificación de estándares de mezcla 13 por EM. Condiciones finales

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
194	4.796	Wiley/Nist	93	Caffeine	93	Caffeine	91	Caffeine
270	7.188	Wiley/Nist	51	3-(2-Methoxyphenyl)-5-methoxy-1-isobenzofuranone	19	4H-1Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl-	12	4',5,7-Trihydroxyflavone
270	8.802	Wiley/Nist	96	9,10-Anthracenedione, 1,3,8-trihydroxy-6-methyl-	91	1,4,5-Trihydroxy-2methylantracene-9,10-dione	71	9,10-Anthracenedione, 1,3,8-trihydroxy-6-methyl-
93	10.492	Wiley/Nist	94	Bicyclo[4,1,0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-	93	Cyclohexen, 1-methyl-4-(1-methyl-2-propenyl)-	91	Alpha-terpinolene

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2 Verificación de la pureza por CLAR-DAD-EM.

En la tabla XX se presentan los compuestos que resultaron puros tanto con el DAD como con el EM.

Tabla XX

Determinación de pureza por CLAR-DAD-EM

Compuestos	Puros	Compuestos impuros
Ácido p-cumárico	Kukulkanina A	Acetato β -amirina ^a
Ácido siríngico	Kukulkanina B	Baileyolina ^a
Ácido ursólico	Ouabaina	Chaparrina ^a
Ácido vainílico	Partenina	Criptopina ^b
Betulina	Pristimirina	Esmilagenina ^c
Bonducelina	Protopina	Quercitrina ^a
Desacetato matricarina	Santonina	Tuberilina ^b
Diosgenina	Tenulina	Verbelina ^b
Eugarzasadina	Uvadiol	
Kokusagenina		

a: aparecían dos o más picos en el cromatograma DAD y TIC.

b: pico cromatográfico impuro por UV-Vis, puro por EM.

c: sólo analizado por EM.

3.2.1 Determinación de pureza por UV/Vis con DAD.

3.2.1.1 Superposición de espectros normalizados en diferentes puntos del pico cromatográfico.

Compuestos puros: ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido vainillico, bonducelina, desacetato matricarina, eugarzasadina, kokusagenina, kukulkanina A, kukulkanina B, ouabaina, partenina, pristimirina, protopina, santonina y tenulina. Las figuras se presentan en el apéndice Aa.

Compuestos impuros: criptopina, tuberculina y verbelina. Las figuras se presentan en el apéndice Ab.

Compuestos que no absorben UV: ácido ursólico, betulina, diosgenina, esmilagenina y uvadiol.

3.2.1.2 Análisis por comparación del ángulo de contraste espectral contra el

ángulo de umbral.

En la tabla XXI se presentan los ángulos de pureza y el de umbral de cada compuesto analizado.

Tabla XXI

Análisis por comparación del ángulo de contraste espectral vs. ángulo de umbral

Compuesto	Ángulo de pureza	Ángulo de umbral
Ácido p-cumárico	0.108	0.678
Ácido siríngico	0.286	1.657
Ácido vainílico	0.077	2.493
Bonducelina	0.421	1.196
Criptopina	1.494	0.383
Desacetato matricarina	0.127	0.773
Eugarzasadina	1.193	5.362
Kokusagenina	0.265	0.744
Kukulkanina A	0.335	1.114
Kukulkanina B	0.276	0.516
Ouabaina	0.190	0.384
Partenina	2.223	13.889
Pristimirina	0.165	13.894
Protopina	0.172	1.305
Santonina	0.607	1.273
Tenulina	0.293	24.489
Tuberilina	9.875	5.756
Verbelina	1.266	0.683

Un compuesto se considera puro si su ángulo de pureza es menor al de umbral¹⁶.

3.2.2 Análisis por EM.

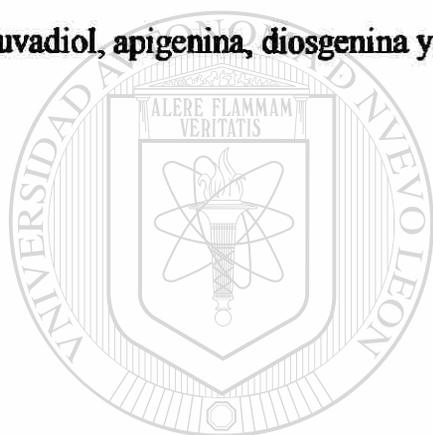
Compuestos puros: ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ursólico, ácido vainílico, betulina, bonducelina, criptopina, desacetato matricarina, diosgenina, eugarzasadina, kokusagenina, kukulkanina A, kukulkanina B, partenina, pristimirina, protopina, santonina, tenulina, tuberilina, uvadiol y verbelina. Figuras en apéndice Ac.

Compuestos impuros: acetato β -amirina, baileyolina, chaparrina, esmilagenina y quercitrina. Figuras en apéndice Ad.

Compuesto para el cual no se obtuvo respuesta en TMD: Ouabaina

3.3 Elaboración de una biblioteca alternativa de espectros de masas.

Se añadieron treinta y un compuestos a la biblioteca QA: ácido p-cumárico, betulina, eugarzasadina, pristimirina, ácido p-cumárico, bonducelina, kaempferol, protopina, ácido siríngico, cafeína, kokusagenina, quercetina, ácido ursólico, camptotecina, kukulkanina A, santonina, ácido vainillico, cocaína, kukulkanina B, T-496, antraquinona, desacetato matricarina, naftaleno, tenulina, antrona, emodina, partenina, uvadiol, apigenina, diosgenina y peroxisomicina A1.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4 Análisis preliminar de extractos activos obtenidos de plantas disponibles en el departamento de Química Analítica.

En las figuras 21 a la 28 se presentan los cromatogramas obtenidos con el DAD y el EM. Las tablas XXII a la XXVII corresponden a la comparación de espectros de masas de cada pico contra las bibliotecas Wiley-Nist y QA.

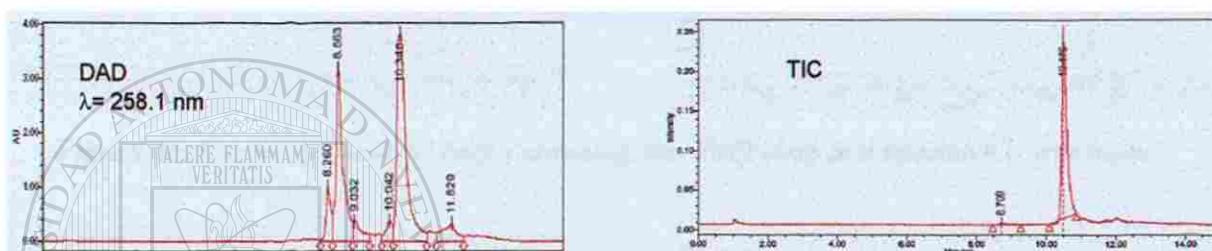


Figura 21. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) del extracto de *Karwinskia parvifolia*

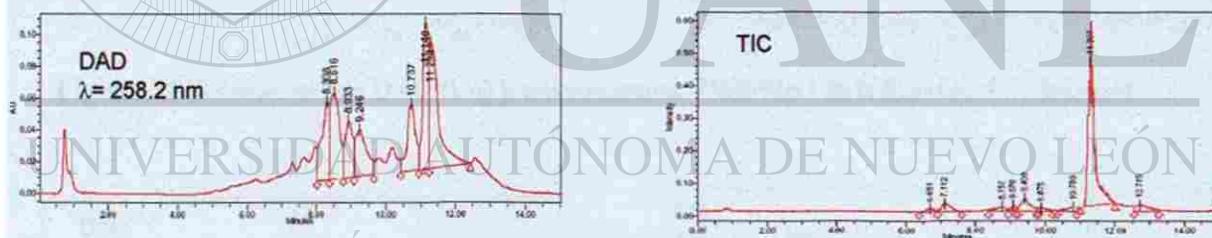


Figura 22. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 1 *L. frutescens*

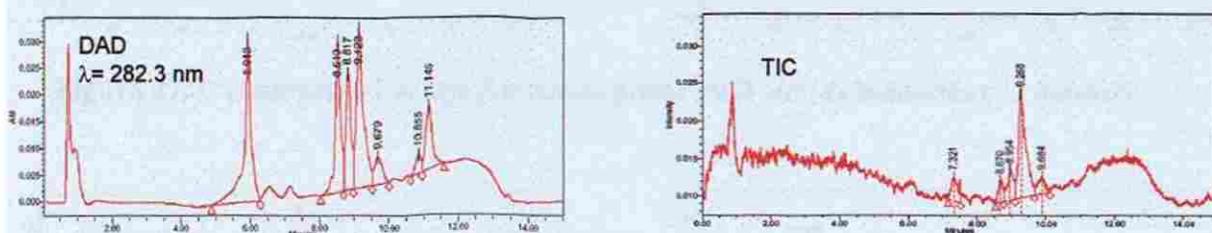


Figura 23. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 2 *L. frutescens*

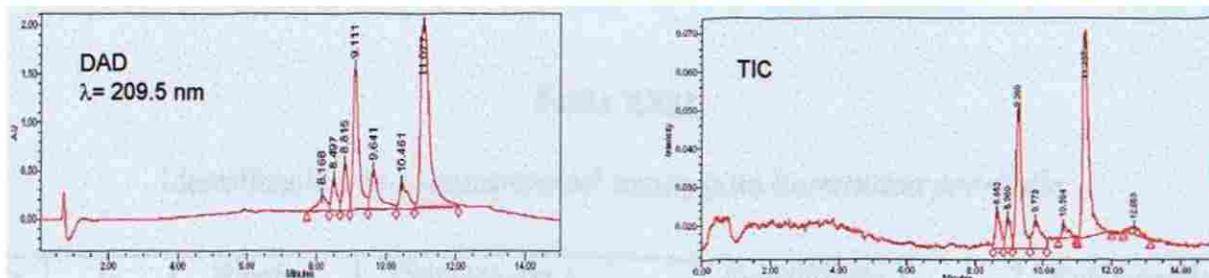


Figura 24. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 3 *L. frutescens*

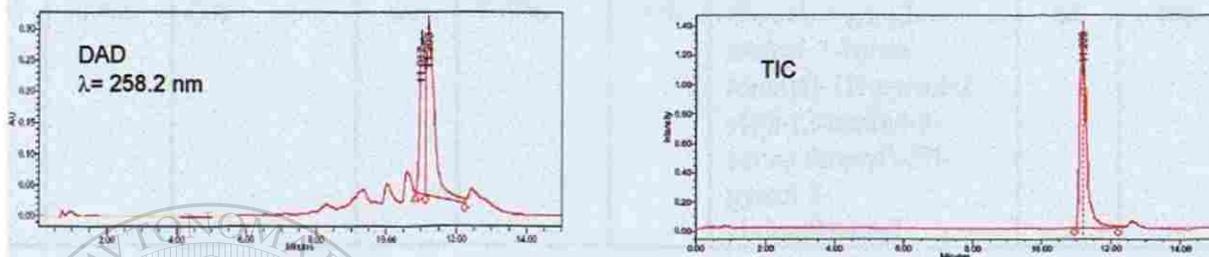


Figura 25. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 4 *L. frutescens*

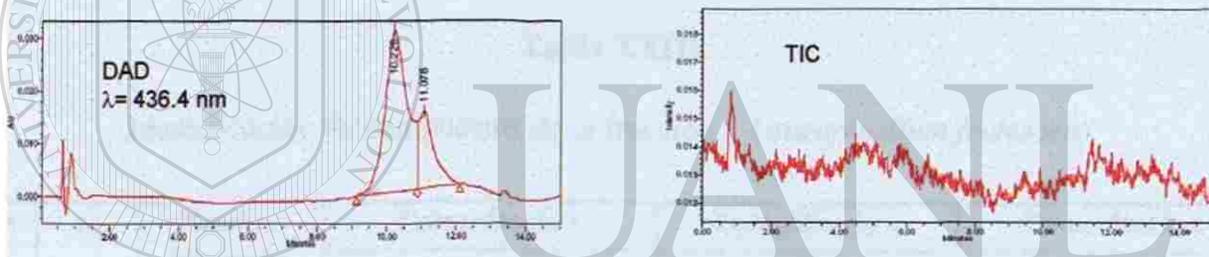


Figura 26. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 5 *C. boissieri*

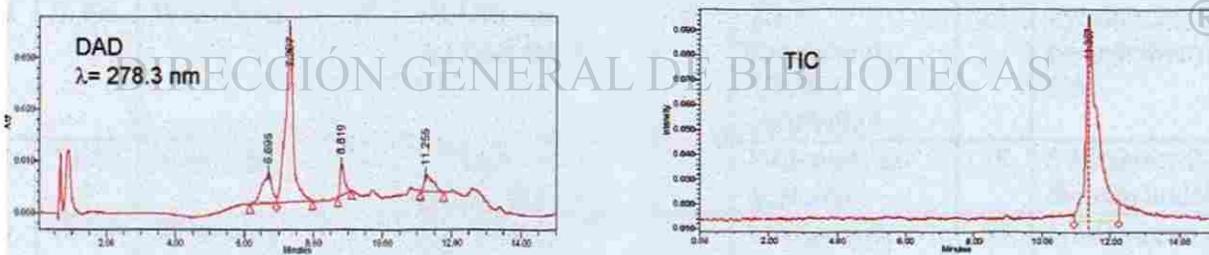


Figura 27. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 6 *C. boissieri*

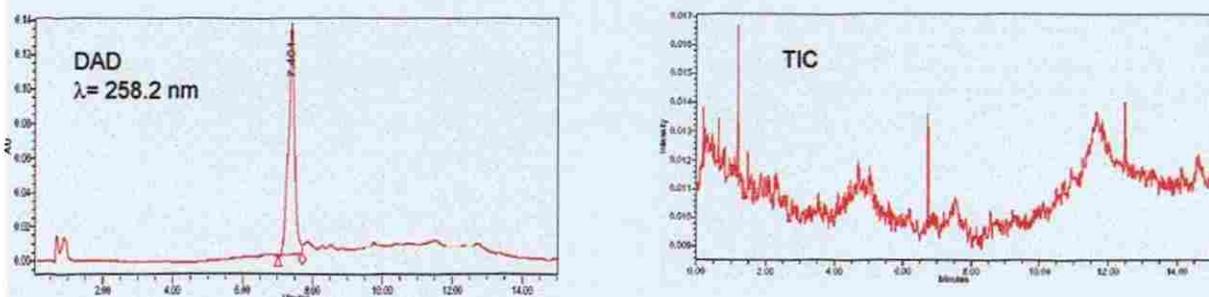


Figura 28. Cromatograma DAD (izq) y cromatograma TMD (der) de la fracción 7 *C. boissieri*

Tabla XXII

Identificación de compuestos del extracto de *Karwinskia parvifolia*

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
496	8.694	QA	55	PA1 L84	10	T-496		
496	10.460	QA	93	T-496	69	Phenol, 4-[[5-(2-methyl-3-benzofuranyl)-1H-pyrrol-2-yl][5-(2-methyl-3-benzofuranyl)-2H-pyrrol-2-ylidene]methyl	68	t-496

Tabla XXIII

Identificación de compuestos de la fracción 1 *Leucophyllum frutescens*

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
179	8.757							
179	9.069							
179	9.395	Wiley/Nist	22	5H-Dibenzo (a,d)cyclohepten-5-ol	21	2H-1-Benzopyran, 3,4,5,8, a-tetramethyl-	21	Pyridine, 2-phenylethynyl)-CAS
202	11.307	Wiley/Nist	18	5-Methoxy-2,3-dimethylindole	18	3-Methylthioquinoline	18	5-Methoxy-2,3-dimethylindole
149	12.718	Wiley/Nist	75	2,4-Dimethyl-7-ethyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]-oct-ene	72	1,2-Benzene dicarboxylic acid, 3-nitro-CAS	65	1,2-Benzene dicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl)

Tabla XXIV

Identificación de compuestos de la fracción 2 *Leucophyllum frutescens*

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
149	8.672	Wiley/Nist	95	5,5'-(tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diyl)bis-1,3-benzodioxole	72	Asarinin	54	Isosamin
179	8.949	Wiley/Nist	29	Acridine	29	5H-Dibenzo (a,c)cyclohepten-5-ol	29	Benzaldehyde glyceryl acetal 2
179	9.274	Wiley/Nist	23	5H-Dibenzo (a,d) ciclohepten-5-ol	21	9H-Fluorene,9butyl-9-methyl	18	9H-Fluorene,9butyl-9-methyl-CAS
175	9.798	Wiley/Nist	29	Benzo[b]thiophene,7-ethyl-2-propyl-	21	5-Methoxy-2,3-dimethyl indole	21	3-Methylthioquinoline
175	11.267							

Tabla XXV

Identificación de compuestos de la fracción 3 *Leucophyllum frutescens*

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
175	8.653	Wiley/Nist	96	1,3-Benzo dioxole 5,5'-(tetrahydro-1H, 3H-furo [3,4-c]furan-1,4-diyl)bis-	95	5,5'-(tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diyl)bis-1,3-benzodioxole	91	Asarinin
175	8.929	Wiley/Nist	65	Asarinin	50	5,5'-(tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diyl)bis-1,3-benzodioxole	50	1,3-Benzo dioxole 5,5'-(tetrahydro-1H,3H-furo [3,4-c]furan-1,4-diyl)bis-
179	9.285	Wiley/Nist	23	2-Oxopentacyclo [7.6.0.0.(3,8).1(1,9)trideca-4,6,10,12-tetraene	11	Ethanone,1-(9,10-dihydro-9-anthracenyl	11	9-Acetyl-9,10-dihydro-anthracene
175	9.802	Wiley/Nist	31	3-Methylthioquinoline	31	Isoquinolin-6,7-diol, 1-methyl	29	Indian,1,1,6,7-tetramethyl
175	11.267							

Tabla XXVI

Identificación de compuestos de la fracción 4 *Leucophyllum frutescens*

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
175	11.209	Wiley/Nist	19	1-Naphthalenol, 5,6,7,8-tetrahydro-2,5-dimethyl-8-(1methylethyl)-				
149	12.590	Wiley/Nist	68	1,2-Benzene dicarboxilic acid, bis(2-ethyl hexyl) ester.	65	Bis(2-ethyl hexyl) phthalate	61	1,2-Benzene dicarboxilic acid, dioctyl ester.

Tabla XXVII

Identificación de compuestos de la fracción 6 *Cordia boissieri*

m/z	t _R	Nombre biblioteca	Coincidencia 1		Coincidencia 2		Coincidencia 3	
			%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
95	11.365	Wiley/Nist	75	1H-Inden-1-ol, 2,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,4,7a-trimethyl	74	(-)-Neoclovone(1), dihydro	74	4-Isopropenyl-4,7-dimethyl-1-oxaspiro [2.7]octane

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estableció como objetivo general diseñar una estrategia de análisis de productos naturales por CLAR-DAD-EM, para su posterior aplicación en la identificación de los compuestos presentes en extractos de plantas biológicamente activos. Para lograrlo se establecieron las condiciones cromatográficas, las condiciones de detección por UV/Vis y las condiciones de identificación por espectrometría de masas, para una serie de mezclas de estándares puros que contenían como mínimo un componente representativo de las diferentes familias químicas de compuestos más comunes en extractos de plantas (compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides y esteroides). Posteriormente, se hizo una biblioteca de espectros de masas con compuestos de origen natural no comerciales, esto con el objetivo de aumentar la probabilidad de encontrar compuestos conocidos en los extractos bioactivos con que cuenta el Departamento de Química Analítica. Finalmente, se aplicó la técnica para el análisis de extractos bioactivos.

4.1 Diseño de sistemas de separación e identificación de mezclas de estándares de origen natural por CLAR-DAD-EM.

4.1.1 Análisis de mezclas a las condiciones iniciales de CLAR-EM.

En un estudio previo realizado por Cremin y cols.¹⁵, se reportó un sistema rápido de separación e identificación de compuestos presentes en extractos de plantas; se utilizó CLAR para la separación de los componentes y “evaporative scattering light detector” como sistema de detección. En este artículo se reporta la exitosa identificación de ochenta y ocho compuestos; sin embargo, el detector mencionado anteriormente, es extremadamente costoso. Por lo que, teniendo como antecedente este trabajo, se seleccionaron las condiciones cromatográficas reportadas para iniciar nuestro estudio con el equipo que disponemos en el Departamento de Química Analítica.

Primero, se trabajó solamente en la separación de los componentes por CLAR con detector de arreglo de diodos, con una columna Atlantis dC18 5 μm 4.6 x 150 mm, y con la fase móvil mencionada en la sección 2.2.1. Después, surgió la necesidad de cambiar la columna, ya que dicha columna requería un flujo de 1 mL/min, el cual no es compatible con la interfase del espectrómetro de masas; esto debido a que flujos tan grandes aumentan demasiado la presión del sistema.

Como se indica en la sección experimental (2.1.2.4), se analizaron las mezclas de estándares puros (mezcla 1-6), con las condiciones iniciales propuestas.

En todos los casos se observó que aunque no hubiera una buena separación se lograron identificar los compuestos; sin embargo, la identificación no tenía el mismo grado de dificultad para los distintos compuestos.

Como ejemplo de lo anterior, podemos mencionar la mezcla 1: aparecen diez picos en el cromatograma DAD con poca resolución (figura 3); mientras que en el EM solamente aparecieron siete picos (figura 3), uno de ellos correspondiente a la fase móvil ya que en todos los ensayos hechos hasta ese momento aparecía ese pico en t_R de 10 min aproximadamente. De los nueve compuestos presentes, se lograron identificar seis de ellos por EM (tabla VI). La aloina se identificó con una coincidencia de 51 %; la quercetina con 69 %; el kaempferol con 94%; la antraquinona con 97 %; la antrona con 31 % y el naftaleno con 63 % comparados contra los espectros de la biblioteca Wiley-Nist. El naftaleno y la antraquinona se lograron identificar aun cuando los dos compuestos coeluyen (figura 29).

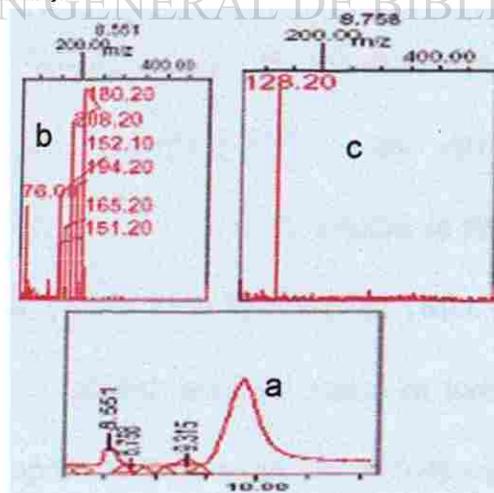


Figura 29. Coelución de naftaleno-antraquinona en mezcla 1

- a) cromatograma a m/z 128
- b) b) espectro de masas de antraquinona
- c) c) espectro de masas naftaleno

La antraquinona se identificó con una coincidencia mayor a 90 % tanto en el cromatograma obtenido a la m/z 208 (pico base) como el obtenido a m/z 194; sin embargo, la biblioteca arrojó dos compuestos con porcentajes altos de coincidencia, lo que llevó a hacer un análisis detallado del espectro de masas para conocer la identidad del pico. La antrona se identificó con un porcentaje muy bajo. La camptotecina, apigenina y emodina no se lograron identificar.

En general, en el análisis de las seis mezclas se obtuvieron buenos porcentajes de coincidencia para el kaempferol, antraquinona y terpinoleno (tabla VI a la XI). No obstante, para la aloina y naftaleno, fue necesario el uso de concentraciones de seis mil ppm para lograr que se detectaran por EM. Además, en este punto, para algunos compuestos como la quercetina y antrona, sus porcentajes de coincidencia eran variables, lo cual resultaba extraño ya que el tipo de ionización utilizada (ionización electrónica) es muy reproducible¹⁴.

Como se puede ver, con las condiciones iniciales, en algunos casos, aunque los compuestos no estuvieran bien resueltos en el sistema cromatográfico, algunos de ellos se lograron identificar con una coincidencia alta. Sin embargo, consideramos necesario, por un lado, disminuir los límites de detección, y por otro, corregir la falta de reproducibilidad de nuestro método. Con el fin de mejorar la sensibilidad del método se optimizaron las condiciones de trabajo de la interfase del TMD. Para el segundo caso, se observó que no se alcanzaba el mismo nivel de vacío en todas las mediciones de la cámara de ionización y cuadrupolo. Debido a esto, la abundancia de los iones variaba y

por lo tanto, los porcentajes de coincidencia también. Esto se solucionó manteniendo siempre encendido el EM.

4.1.2 Optimización de temperatura de nebulización, temperatura de región de expansión y flujo de helio.

Al comienzo del trabajo se utilizaron concentraciones de 200 ppm y no se observaba respuesta alguna en el TMD, se incrementó la concentración de todos los estándares a alrededor de 1000 ppm; sin embargo, aún no se obtenía respuesta para la aloina y ni para el naftaleno. Para esos estándares se decidió aumentar su concentración hasta 6000 ppm. De esta manera, se prepararon mezclas con concentraciones entre 500-6000 ppm de acuerdo a la respuesta de cada estándar (capítulo 2, sección 2.1.2.4). A pesar de la alta concentración de la aloina y el naftaleno, sus intensidades seguían siendo bajas por lo que se procedió a la optimización de los parámetros del detector de masas.

El primer parámetro optimizado fue la temperatura de nebulización, después la temperatura de región de expansión y al final el flujo de He. Como se puede observar en las figuras 9, 10 y 11 de los resultados, el parámetro que contribuye en mayor grado al incremento de la intensidad de la respuesta es la temperatura de nebulización, ya que los cambios en este parámetro provocan la mayor variación en la intensidad del pico, seguido del flujo de He, y por último la temperatura de región de expansión.

Se escogió la aloina para la optimización, por ser el compuesto que más dificultad presentó para su identificación. La máxima intensidad de respuesta de éste compuesto se presentó a una temperatura de nebulización 100°C, a una temperatura de región de expansión de 75°C y un flujo de He de 20 mm. Por lo tanto, éstas fueron, en principio, las condiciones del TMD seleccionadas para trabajar las mezclas. Sin embargo, al empezar a analizarlas se observó que la intensidad de respuesta de todos los compuestos disminuía y algunos de ellos no se lograban identificar. Por lo tanto, se volvieron a optimizar, utilizando una mezcla, los parámetros más significativos que permitieron el incremento de la intensidad de los picos.

La mezcla utilizada para este propósito fue la número 10 y de acuerdo con los resultados presentados en las figuras 12 y 13, se observa que para la temperatura de nebulización de 90°C y flujo de He de 20 mm se obtuvo la mayor respuesta de la aloina, quercetina, antraquinona y terpinoleno; mientras que para el kaempferol su máxima respuesta fue a 85°C y 25 mm de flujo de He.

Como la finalidad de la optimización era aumentar la intensidad de respuesta de los compuestos menos sensibles para mejorar la determinación de su identidad, y ya que la disminución en la respuesta del kaempferol no afectó la identificación del compuesto, las condiciones de TMD seleccionadas fueron: 90°C de temperatura de nebulización, 20 mm de flujo de He y 75°C de temperatura de región de expansión (la seleccionada para la aloina). La temperatura de región de expansión no se optimizó por ser el factor que menos afecta en la sensibilidad del detector.

Después de optimizar estos parámetros, se pudo encontrar impurezas en algunos estándares como la antrona, que resultó ser una mezcla de antraquinona y antrona.

4.1.3 Separación e identificación de mezclas de estándares. Condiciones finales.

Con las condiciones optimizadas del TMD se analizaron las mezclas 7 a la 13. Todos los estándares, excepto la rutina, ya estaban reportados en la biblioteca Wiley-Nist. Con todas las mezclas se obtuvieron resultados similares.

Para las mezclas con un número pequeño de estándares (mezclas 7, 8, 9 y 13), en el cromatograma DAD (figura 14, 15, 16 y 20) algunos picos aparecieron con buena resolución; sin embargo, otros picos no se lograron separar; además se detectaron otros picos que eran impurezas de algunos de los estándares utilizados. La identificación de los compuestos ya reportados en la biblioteca (quercetina, kaempferol, terpinoleno y emodina) fue buena (tabla XIII, XIV, XV y XIX). Para compuestos con una intensidad de pico mayor de 0.002 unidades, se obtuvieron porcentajes de coincidencia arriba del 90 %. Los picos con intensidades menores a la anterior se identifican con porcentajes de 50 a 70%, ejemplo de ello es la apigenina (tabla XIX, t_R 7.188 min). En las mezclas 8 y 9 se añadió un compuesto (rutina) que no está almacenado en la biblioteca Wiley-Nist; éste es un compuesto polar, por lo que se esperaba que no diera señal en el TMD; esto fue con la finalidad de saber como podría afectar al análisis la presencia de un compuesto de esta naturaleza. En el cromatograma DAD, de las dos mezclas (figura 15 y 16), se observó el pico a t_R de la rutina (5.637 min) y en el TIC apareció un pico a 5.809 min; en la

comparación de espectros, como se esperaba, se obtuvo una coincidencia menor a 30 % (tabla XIV y XV) y el espectro de masas era muy diferente a los de los compuestos probables.

En las mezclas complejas, algunos compuestos coeluyeron. Ejemplo de ello, es la mezcla 11, donde la camptotecina y quercetina aparecen como un único pico tanto en el cromatograma DAD (6.719 min, figura 19) como en el TIC (6.800 min, figura 19). Al adquirir el cromatograma a la m/z del pico base tanto de la camptotecina (348 u.m.a., figura 30a) como de la quercetina (302 u.m.a., figura 30c) se lograron identificar con un porcentaje de coincidencia mayor a 90 (tabla XVII); sin embargo, al observar el espectro de masas de los dos compuestos estaban contaminados uno con el otro. En el espectro de masas de la camptotecina (figura 30b) aparece el ion molecular y pico base de la quercetina (302), así mismo, en el espectro de masas de la quercetina (figura 30d) aparece el ion molecular de la camptotecina (348 u.m.a.), además de otros picos menos importantes correspondientes al espectro de la camptotecina.

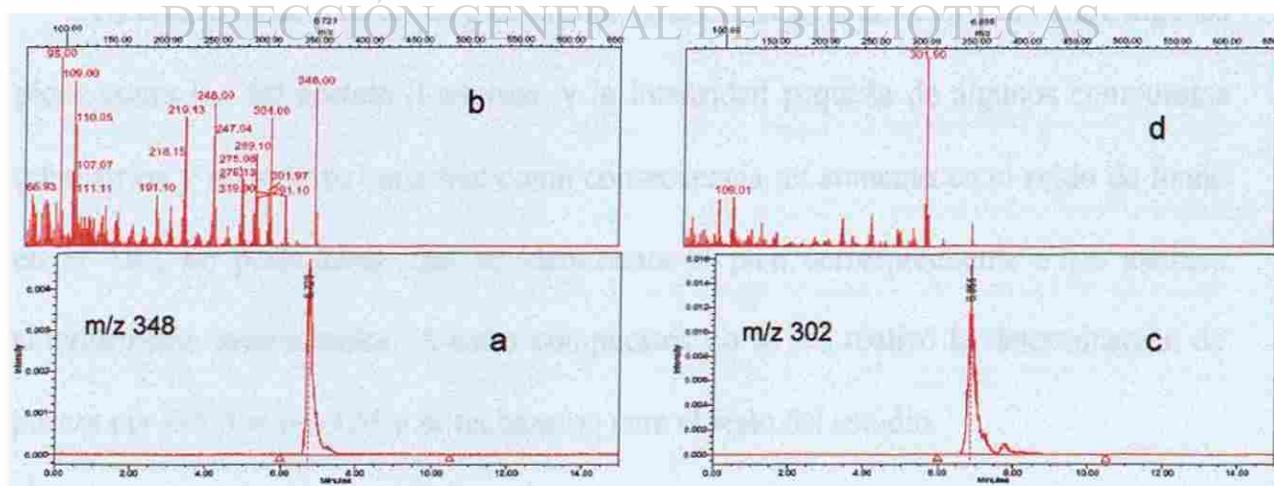


Figura 30. Coelución de camptotecina-quercetina en mezcla 11

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| a) cromatograma a m/z 348 | c) cromatograma a m/z 302 |
| b) espectro de masas de camptotecina | d) espectro de masas de quercetina |

Con esto se demuestra la importancia de revisar el espectro de masas para detectar posibles impurezas, así como el contar con un analista bien capacitado para la interpretación de los mismos.

4.2 Verificación de la pureza por CLAR-DAD-EM.

Una vez establecidas las condiciones de análisis, se aplicó el método a la verificación de pureza de los compuestos de origen natural no comerciales.

De los veintisiete compuestos analizados, se encontró que cuatro de ellos presentaban más de un pico cromatográfico tanto con el DAD como con el TMD, estos compuestos fueron: acetato β -amirina, baileyolina, chaparrina y quercitrina (Apéndice Ab).

La aparición de más de un pico cromatográfico, la falta de resolución entre algunos picos como los del acetato β -amirina, y la intensidad pequeña de algunos compuestos (chaparrina y quercitrina) que trae como consecuencia un aumento en el ruido de fondo en el TIC, no permitieron que se identificara el pico correspondiente a los analitos anteriormente mencionados. A estos compuestos no se les realizó la determinación de pureza por DAD ni por EM y se rechazaron para el resto del estudio.

Se procedió a determinar la pureza por DAD y EM de los compuestos restantes.

4.2.1 Determinación de pureza por UV/Vis con DAD.

Como ya se mencionó, para los compuestos que presentaron en el cromatograma un solo pico, la determinación de la pureza se realizó por superposición de espectros normalizados en diferentes puntos del pico cromatográfico. De los diecisiete compuestos que se pudieron analizar por UV/Vis, trece presentaron espectros de absorción idénticos en cinco diferentes puntos del pico y fueron clasificados como puros, estos fueron: kukulkanina B, desacetato matricarina, ouabaina, ácido vainílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, eugarzasadina, kokusagenina, pristimirina, bonducelina y protopina (apéndice Aa); tres de los compuestos analizados presentaron variación en el espectro de absorción de uno de los puntos del pico cromatográfico: kukulkanina B, tenulina (apéndice Aa) y verbelina (apéndice Ab); por esto no se pudo determinar su pureza únicamente con el espectro de absorción y se procedió a analizarlos tanto por comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo de umbral como por EM.

El análisis por comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo de umbral se basa en la técnica de contraste espectral, la cual compara el espectro de absorción del ápice contra el espectro de absorción de todos los puntos del pico a lo largo del pico cromatográfico (incluyendo él mismo) y los convierte en vectores. La dirección del vector está determinada por la relación de absorbancia a todas las longitudes de onda. La diferencia en dirección de los vectores es el ángulo de contraste espectral. Con cada comparación del ángulo de contraste se adquiere el ángulo umbral, éste es el máximo ángulo de contraste espectral entre espectros y puede ser atribuido al ruido de fondo y variaciones en el solvente¹⁶. El promedio de los ángulos de contraste espectral se reporta

como el ángulo de pureza y el de los ángulos de umbral como ángulo de pureza de umbral.

Un compuesto se considera puro si su ángulo de pureza es menor al ángulo de pureza de umbral¹⁶. Figura 31

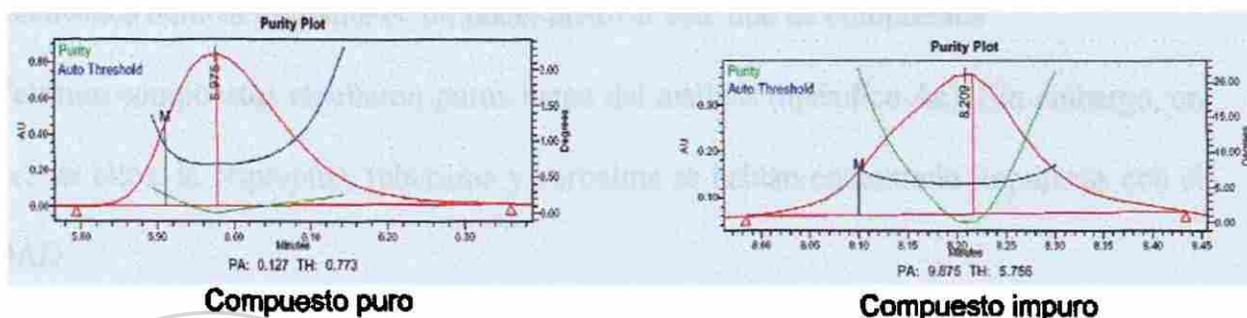


Figura 31. Ejemplo análisis por comparación de ángulo de pureza vs. el ángulo de umbral.

— Compuesto analizado
— Umbral

Para determinar la pureza con el DAD es necesario utilizar tanto la superposición de espectros normalizados como la comparación del ángulo de contraste y de umbral; con esta técnica de análisis se pudo corroborar la pureza de los compuestos que dieron resultados dudosos por medio de la superposición de espectros mencionada anteriormente. Los espectros de absorción de la kukulkanina A, tenulina y verbelina habían presentado variación en uno de los puntos del pico; sin embargo, por comparación del ángulo de contraste espectral contra el ángulo de umbral los dos primeros resultaron puros mientras que la verbelina resultó impura.

4.2.2 Análisis por EM.

De los veintisiete compuestos analizados, uno de ellos, la ouabaina, no se logró detectar, este problema es atribuido a que el compuesto es polar; y la ionización electrónica tiene la limitante de no poder analizar este tipo de compuestos

Veintiún compuestos resultaron puros luego del análisis (apéndice Ac). Sin embargo, en tres de ellos: la criptopina, tuberilina y verbelina se habían encontrado impurezas con el DAD.

La razón por la cual en esta técnica resultaron puros esos compuestos se debe a que el software utilizado no permite determinar la pureza de forma automática. Para determinar la pureza se obtuvieron algunos cromatogramas (ver punto 2.2.2.2) y se compararon visualmente sus tiempos de retención. Además, se compararon los espectros de masas solamente en tres puntos diferentes del pico del cromatograma TIC, esto podría arrojar error porque pudiera ser que en otras zonas del pico, el espectro de masas tuviera diferencias; no obstante, sería un gasto excesivo de tiempo el comparar los espectros de masas de todos los puntos que conforman el pico cromatográfico. Como la comparación de espectros de masas también es visual, pequeñas variaciones pueden no ser detectables por la complejidad de espectro de algunos compuestos. Por lo tanto, el resultado de la pureza por EM siempre se debe complementar con el resultado del DAD.

Sin embargo, la EM resultó ser una herramienta muy importante en la determinación de la pureza de los compuestos que no absorbieron en la región UV/Vis ya que pudimos detectar las impurezas en uno de ellos (esmilagenina, apéndice Ad).

4.3 Elaboración de una biblioteca alternativa de espectros de masas.

La creación de la biblioteca QA surgió como una necesidad, ya que las bibliotecas comerciales tienen un número pequeño de compuestos provenientes de productos naturales. Actualmente, esta biblioteca, que se inició con el presente trabajo, cuenta con un número total de treinta y un espectros de masas de diferentes compuestos de origen natural.

Contar con mayor número de compuestos ayudaría a aumentar la probabilidad de encontrar un componente idéntico o semejante en los extractos bioactivos de plantas que se trabajan en el departamento de Química Analítica; esto permitiría el ahorro de tiempo en la purificación de los extractos bioactivos, ya que si se identificara un compuesto ya reportado en la literatura y que fuera el responsable de la actividad biológica, no se perdería tiempo, esfuerzo y recursos en su aislamiento.

4.4 Análisis preliminar de extractos activos obtenidos de plantas disponibles en el Departamento de Química Analítica.

En los últimos años en la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L., se ha estudiado una sustancia extraída de plantas del género *Karwinskia* denominada peroxisomicina A₁. Este compuesto se ha considerado como un posible agente antineoplásico, ya que ha demostrado que tiene toxicidad selectiva entre células de origen benigno y células neoplásicas, ambas de origen humano¹⁷.

La PA₁ fue aislada por primera vez por Dreyer y cols. en 1975 a partir del fruto de *Karwinskia humboldtiana*, la llamaron T-514, de acuerdo a su peso molecular. También aislaron otras toxinas que denominaron en base a sus pesos moleculares como: T-544, T-496 y T-516¹⁸. Posteriormente, se hicieron estudios químicos y toxicológicos de otras especies de *Karwinskia*, como *K. parvifolia*, donde se comprobó la presencia de los compuestos anteriormente citados, además, de dos diastereoisómeros de PA₁ que llamaron peroxisomicina A₂, peroxisomicina A₃ y dos isómeros de posición de la PA₁ que llamaron isoperoxisomicina A₁ e isoperoxisomicina A₂^{19,20}.

Por medio del método desarrollado en el presente trabajo, en el extracto de *K. parvifolia* se encontraron seis picos en el cromatograma DAD no bien resueltos (figura 21). Los picos a t_R 8.260, 8.563 y 9.032 min no están resueltos; además que el de 8.563 tiene un hombro, lo que evidencia que está contaminado con otro compuesto. El pico de 10.042 min no está bien separado del pico que aparece a 10.345 min. Por último, en 11.892 min se observa un pico pequeño. En el cromatograma TIC del mismo extracto,

solamente se observaron dos picos (figura 21). Uno a 8.709 min y a 10.476 min, correspondientes a las señales de 8.563 min y 10.345 del cromatograma DAD, respectivamente. Se adquirió el cromatograma a la m/z 496 por ser un ion importante que comparten los dos compuestos; en este cromatograma aparecieron los mismos picos que en el TIC; se obtuvo el espectro de masas de cada pico combinando varios puntos para obtener un espectro representativo de cada compuesto (ver sección 2.2.1.3), y se comparó cada espectro con los existentes en la biblioteca Wiley-Nist y QA. En la tabla XXII del capítulo 3 se presenta la identificación de estos compuestos. El pico de 8.563 min se identificó como peroxisomicina A₁ lote 84, con un porcentaje de coincidencia de 55; esto en base a la biblioteca QA; solamente se obtuvo un compuesto probable. El porcentaje bajo de coincidencia puede deberse a dos circunstancias: la primera, que como se observó en el cromatograma DAD el pico no está puro; considerando que ya se conoce que en fase reversa, la PA₁ tiene un tiempo de retención semejante a uno de sus isómeros de posición, la isoperoxisomicina A₁²¹, además de un espectro de masas diferente, por lo que este compuesto podría ser la impureza en cuestión. El otro factor es que la intensidad del pico es muy pequeña, y el ruido de fondo es grande, esto interfiere en la identificación debido a que el espectro de masas de la PA₁ que se encuentra en la biblioteca QA tiene menos ruido de fondo. El pico a 10.460 min se identificó (tabla XXII, capítulo 3) como T-496 (primer compuesto probable), con una coincidencia de 93 %, en la biblioteca QA. El segundo compuesto probable fue un derivado fenólico, en la biblioteca Wiley-Nist con un 69 % de coincidencia. Como tercer compuesto probable, se obtuvo la t-496 de la biblioteca QA con un 68 %. Cabe aclarar que la t-496 es el mismo compuesto que T-496, y fue guardado en la biblioteca cuando el instrumento todavía no había alcanzado el vacío

recomendable de la cámara de ionización y cuadrupolo, por lo tanto, este espectro presenta diferencias en las abundancias relativas de los picos en el espectro de masas con respecto al espectro de la T-496; de ahí la diferencia en el porcentaje de coincidencia. Con esto, se hace notar la importancia de hacer el análisis con las mismas condiciones tanto cromatográficas como del detector de masas; ya que, como se puede ver en estos resultados, es un factor determinante para la identificación de compuestos.

Una de las líneas de investigación del departamento de Química Analítica es el aislamiento biodirigido de productos naturales con actividad farmacológica; dentro de ella se están realizando dos tesis doctorales. La primera lleva por nombre: "Evaluación de plantas del Noreste de México con actividad contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes"; se evaluaron extractos metanólicos de varias plantas de la región recolectadas, la mayor parte de ellas, con criterio etnofarmacológico. El extracto metanólico de la corteza de raíz de *L. frutescens* resultó particularmente atractivo para realizar el aislamiento biodirigido, debido a la actividad demostrada contra una cepa de *M. tuberculosis* resistente a cinco antituberculosos²².

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al extracto metanólico crudo de raíz de *L. frutescens*, se le hizo una extracción líquido-líquido con hexano; el extracto hexánico (fracción 1) se fraccionó por medio de cromatografía de líquidos al vacío con hexano:acetato de etilo en diferentes proporciones. Las fracciones obtenidas fueron: fracción 2 (10:1), fracción 3 (15:1) y fracción 4 (20:1), las cuales se analizaron por el método de CLAR-DAD-EM desarrollado en este trabajo.

En el cromatograma DAD de la fracción 1 (figura 22, capítulo 3) se observaron trece picos diferentes con poca resolución. En el cromatograma TIC (figura 22, capítulo

3), sólo se observaron nueve de los picos del DAD, ocho de los cuales aparecen con muy baja intensidad. Se procedió a la identificación de cada pico de la manera descrita en el punto 2.2.1.2. Las señales con t_R de 6.681 y 7.112 min son contaminación ya que al analizar todos los estándares, mezclas y hasta la FM aparecen esos picos con baja intensidad; tienen un espectro de masas muy sencillo cuyo pico base es 142 u.m.a. En algunos cromatogramas TIC no aparecen a simple vista, pero al extraer el cromatograma a la m/z 142 sí se pueden observar. El cromatograma obtenido a la m/z de pico base correspondientes a las señales con t_R 9.875 y 10.789 min, aparecían con una intensidad tan pequeña que se confundían con el ruido de fondo. Los picos con t_R de 8.757 y 9.069 min no se lograron identificar, esto podría deberse a que estos compuestos no estén en las bibliotecas o que por la intensidad baja que presentaron, sus espectros de masas tengan múltiples iones debido al ruido. En el capítulo 3, se encuentra la tabla XXIII, correspondiente a la comparación de espectros de masas de los picos. Las señales con t_R 9.395 y 11.307 min arrojaron porcentajes de coincidencia por debajo del 30 %; esto sugiere que los espectros de masas de los compuestos de la biblioteca Wiley son diferentes a los de los compuestos presentes en la fracción. El pico de 12.718 min se obtuvo un porcentaje un poco más alto (del 70 %); sin embargo, los posibles compuestos presentan un espectro de masas diferente al del pico de interés. Por lo tanto, ningún compuesto presente en la fracción 1 se logró identificar con ninguna de las dos bibliotecas.

En el cromatograma DAD de la fracción 2, se observaron once picos no bien resueltos (figura 23, capítulo 3). En el cromatograma TIC se observaron seis picos; la línea base se observaba muy irregular (figura 23, capítulo 3). Los picos con t_R de 8.670,

8.954, 9.884 y 9.268 min no están resueltos; los primeros tres podrían confundirse con el ruido. Alrededor del minuto 11.500 aparece una loma que podría ser un pico muy ancho o simplemente el ruido de fondo. De la señal con t_R 8.672 min, se obtuvo el espectro de masas, se observó cual era el pico base y se obtuvo el cromatograma a la m/z 149. Después de la comparación de espectros contra las dos bibliotecas, se logró identificar el pico con un 95 % de coincidencia, como asarinina. Cabe aclarar que aunque los 3 compuestos probables son la asarinina, el porcentaje de coincidencia de dos de ellos es más bajo, pero está por arriba del 50 % (tabla XXIV, capítulo 3), porcentaje aceptable para el cual se recomienda examinar el espectro de masas correspondiente. La diferencia en porcentajes de coincidencia podría deberse a que en la biblioteca Wiley están guardados más de un espectro de masas para el mismo compuesto; éstos presentan variaciones ya que son diferentes analistas los que donan dichos espectros, por lo tanto, están hechos con diferentes instrumentos, además, que está realizada por cromatografía de gases. Con esto, se recalca una vez más, la necesidad de contar con una biblioteca propia de espectros de masas para obtener resultados fidedignos en un menor tiempo de análisis. Después, de comparar el espectro de masas de la señal de interés contra los espectros de masas de los tres compuestos probables, y debido al porcentaje de coincidencia tan alto, se pudo identificar el pico como asarinina. Esto es particularmente interesante, ya que en estudios previos se aislaron lignanos fitotóxicos relacionados con la asarinina de los extractos hechos de hojas de esta planta²³. En el cromatograma a la m/z de 179 se obtuvieron dos señales, con t_R 8.949 min y 9.274 min. En el cromatograma a la m/z de 175, aparecieron también dos picos; uno a 9.798 min y el otro a 11.267 min. Para los cuatro picos, se descartaron los tres compuestos probables que arrojó la biblioteca

Wiley-Nist, ya que se obtuvieron porcentajes de coincidencia menores a 30, además que los espectros de masas de cada pico difieren notablemente con los de los compuestos de la biblioteca, lo que explica el bajo porcentaje de coincidencia.

Tanto en el cromatograma DAD como en el TIC de la fracción 3 se observaron siete picos (figura 24, capítulo 3). Sin embargo, la señal correspondiente a 8.168 min del cromatograma DAD no se observa en el TIC y, en éste apareció un pico a 12.653 min que no se observó en el DAD. En el cromatograma a la m/z 175 se observaron cinco señales, sin embargo, sólo en cuatro de ellos, la comparación arrojó compuestos con espectros de masas semejantes, ya que el pico a 9.802 min tiene un pico base a 179 u.m.a (tabla XXV). En la comparación de los espectros de masas de cada uno de los picos de t_R 8.635 y 8.929 min con los de las bibliotecas, se obtuvieron tres compuestos probables, almacenados en la biblioteca Wiley-Nist, correspondientes a la asarinina (tabla XXV). En el primer pico, los porcentajes de coincidencia fueron arriba del 90 %, mientras que para el segundo compuesto fue entre 50 al 65 %; sin embargo, a pesar de la gran diferencia entre los porcentajes, al realizar la comparación visual de los espectros de masas de cada pico contra el espectro de la asarinina, no se encontró diferencia alguna. Cabe aclarar que aunque ambos picos hayan sido identificados como asarinina, se trata de diferentes compuestos ya que presentan distintos tiempos de retención; sin embargo, ambos deben estar estructuralmente muy relacionados a dicho compuesto. Los picos a 9.802 y 11.267 min no se pudieron identificar ya que en el primero, los espectros de masas de los compuestos probables diferían considerablemente al espectro del pico y los porcentajes de coincidencia estuvieron por debajo del 30 % (tabla XXV). El espectro de masas correspondiente al segundo pico, no se encontró en ninguna de las bibliotecas, lo que nos

indica la limitación en el número de compuestos provenientes de productos naturales que se encuentran en ellas. En el cromatograma a la m/z 179 se observó un pico a 9.285 min del cual no se supo la identidad por presentar porcentajes de coincidencia muy bajos.

En la fracción 4 se observaron ocho picos cromatográficos por UV-Vis pero en el cromatograma TIC solamente aparecieron dos señales (figura 25, capítulo 3). En el cromatograma a la m/z 175 apareció un pico a 11.209 min. No se pudo conocer la identidad del pico, ya que solamente se obtuvo un compuesto probable con un porcentaje de coincidencia de 19 % (tabla XXVI); además, el espectro de masas correspondiente resultó ser muy distinto al del compuesto probable. De igual manera, el pico a 12.590 min que se observó en el cromatograma a la m/z 149, no está reportado tanto en la biblioteca Wiley-Nist como en la QA ya que el resultado de la comparación de espectros arrojó tres compuestos probables, y al observar sus espectros de masas no correspondían con el espectro del pico de interés, a pesar que sus porcentajes de coincidencia estuvieron en 60 % (tabla XXVI), por lo tanto se pudieron identificar.

Otros de los proyectos en los que se está trabajando en el Departamento de Química Analítica enmarcados dentro de la misma línea de investigación (aislamiento biodirigido de productos naturales con actividad farmacológica), tiene como objetivo encontrar compuestos con actividad contra microorganismos del tracto respiratorio. Después de una evaluación de varias plantas regionales sobre cepas sensibles y resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, se seleccionó la planta *Cordia boissieri* para el aislamiento biodirigido²⁴.

Se extajeron las hojas de *C. Boissieri* con acetato de etilo, el extracto crudo resultó ser activo contra *Staphylococcus aureus*. Ese extracto se separó por columna flash con hexano:acetato de etilo. Una de las fracciones obtenidas resultó activa contra el microorganismo y se le hizo otra separación con una columna lobar de sílica gel. Se obtuvieron tres fracciones: dos con hexano:acetato de etilo a diferentes proporciones (aquí llamadas fracciones 5 y 6) y la otra con acetato de etilo:metanol (aquí fracción 7). Las tres resultaron activas contra *S. aureus*.

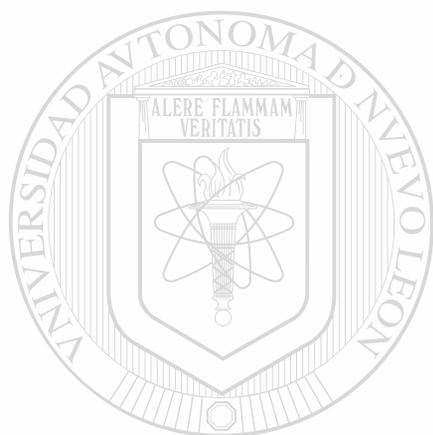
En la fracción 5 se observaron dos picos muy anchos en UV-Vis, sin respuesta en el TMD (figura 26, capítulo 3).

En la fracción 6 se observaron cuatro señales en UV-Vis, y sólo una por TMD (figura 27, capítulo 3). En el cromatograma a la m/z 95 apareció un pico a 11.365 min; los compuestos probables tenían un porcentaje de coincidencia mayor a 70; sin embargo, el espectro de masas de cada uno de los compuestos probables resultó no ser idéntico al del pico cromatográfico de interés, por lo que seguramente se trata de una sustancia diferente.

En la fracción 7 sólo se observó un pico cromatográfico en UV-Vis con una absorbancia pequeña y en el TMD no se obtuvo respuesta (figura 28, capítulo 3).

En resumen, la aplicación del método desarrollado fue probada en el análisis de los extractos de tres plantas: *Karwinskia parvifolia*, *Leucophillum frutescens* y *Cordia boissieri*. En el extracto de *K. parvifolia* se identificaron dos compuestos cuyos espectros de masas previamente habían sido almacenados en la biblioteca QA (PA₁ y T-496). En la

mayoría las fracciones de *L. frutescens* se logró identificar la asarinina. Con esto se demuestra que el método desarrollado puede cumplir su objetivo. No obstante, en las fracciones de *C. boissieri* se obtuvo una respuesta muy pobre en el TMD. Esto se debe a que en los primeros dos extractos los compuestos son poco polares y en el extracto de *C. boissieri* los compuestos son polares; se sabe que el tipo de ionización que utilizamos no permite analizar compuestos polares, por lo que no se obtuvo respuesta en EM. Además, los límites de detección altos, dificultan la detección de señal en el TMD si las concentraciones de los compuestos son bajas.



UANL

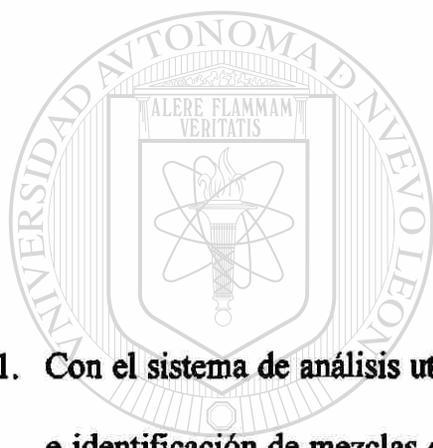
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



5.1 Conclusiones

1. Con el sistema de análisis utilizado se obtuvieron buenos resultados en la separación e identificación de mezclas de un número pequeño de estándares. Sin embargo, para mezclas complejas es necesario optimizar las condiciones cromatográficas, debido a que al ir aumentando el número de compuestos, los de polaridades muy parecidas coeluyen y la identificación se dificulta.
2. Para determinar la pureza de una sustancia es indispensable utilizar las dos técnicas empleadas (DAD y EM), ya que como se pudo ver en los resultados, son complementarias. Ejemplo de ello es la criptopina, para la cual por EM no se detectaron impurezas (apéndice Ac) mientras que por DAD resultó impura (apéndice

Aa). Así mismo, la EM es esencial en el caso de sustancias que no presentan absorción en la región UV/Vis.

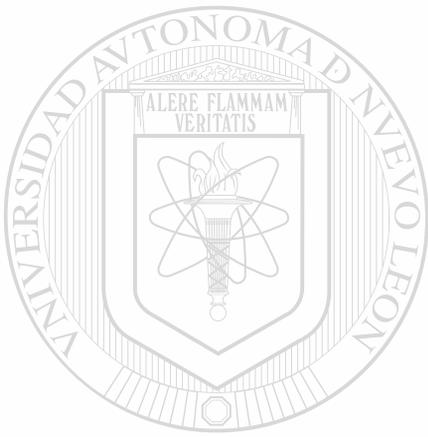
3. Con los resultados obtenidos en la separación e identificación de mezclas, un porcentaje de coincidencia de 90 % es indicativo que sea ese compuesto o un compuesto estructuralmente muy parecido. Un porcentaje de coincidencia de 50 % nos indica que el compuesto podría estar impuro o que su intensidad es tan baja que su espectro tiene mucho ruido de fondo. Sin embargo, al obtener porcentajes entre 50 y 90% se hace necesario analizar el espectro de masas, ya que como vimos en el caso de la mezcla 11, la camptotecina y quercetina a pesar de colegir, presentaron porcentajes altos. Por último, porcentajes de coincidencia por debajo de 50% hacen poco probable que se trate del compuesto identificado.

4. Aunque la EM es una técnica muy sensible, el tipo de interfase ("Particle beam") con el que se trabajó tiene límites de detección altos, lo que trae como consecuencia que los compuestos que estén a concentraciones bajas no pueden ser detectados por el espectrómetro de masas empleado. Para mejorar los límites de detección se recomienda optimizar las condiciones de la interfase para cada extracto en particular.

5. Tanto el sistema de separación e identificación empleado como la biblioteca creada, proporcionan información acerca del número y tipo de compuestos presentes en los extractos de plantas biológicamente activos, de manera que facilitará el trabajo en las líneas de investigación con que cuenta el departamento de Química Analítica. No

obstante, surge la necesidad de aumentar el número de compuestos de la biblioteca para eficientizar el análisis de dichos extractos.

6. Si bien, este método de análisis es muy útil, es imprescindible que el analista sea capaz de interpretar la información obtenida, ya que pueden existir falsas identificaciones.



UANL

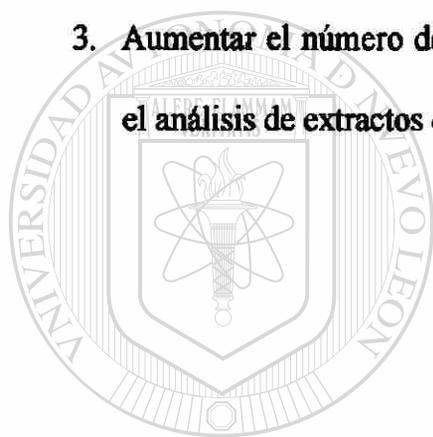
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2 Perspectivas

1. Optimizar las condiciones cromatográficas para el análisis de mezclas complejas.
2. Mejorar los límites de detección mediante la optimización de las condiciones de la interfase para cada extracto en particular.
3. Aumentar el número de espectros de masas de la biblioteca QA para eficientizar el análisis de extractos de plantas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

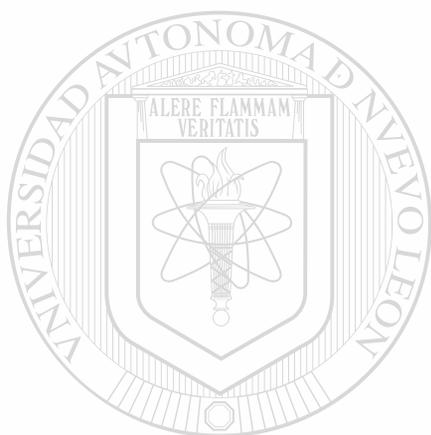


BIBLIOGRAFÍA

1. Blumenthal M., Busse W., Goldberg A., Gruenwald J., Hall T., Riggins C., Rister R.; "The complete german commission e monographs. Therapeutic guide to herbal medicines"; American Botanical Council, 8-31 (1998).
2. Rahman, A. (Ed.); "Studies in Natural Products Chemistry"; Editorial Elsevier **22** (2000).
3. Revista de Fitoterapia **2**, 101-121 (2002).
4. Rates, S.M.K.; Toxicon **39**, 603-613 (2001).
5. K. Hostettmann; J.-L. Wolfender; S. Rodríguez; Planta Medica **63**, 2-10 (1997).
6. Silverstein, R.; Bassler G. C.; Morrill, T. C.; "Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos"; Editorial Diana, 243-268 (1980).
7. Kok S.J.; Schoenmakers P.J.; "Characterization of polymers by gradient polymer elution chromatography"; Introduction on Gradient Polymer Elution Chromatography; Kok ChemWare (2002).
8. Lindon, J.C. et al., "Direct coupling of chromatographic separations to NMR spectroscopy". Prog. NMR Spectros. **29**, 1-49 (1996).
9. Alicia M. Seldes, Gabriela M. Cabrera; "La espectrometría de masa, sus posibilidades y sus nuevas fronteras"; Universidad de Buenos Aires.
10. J. Abian; Journal of Mass Spectrometry **34**, 157-168 (1999).

11. Hoffmann, E.; Charette, J.; Stoobant, V.; "Mass Spectrometry. Principles and Applications"; John Wiley & sons, 9-37, 99-126 (1999).
12. Journal of Natural Products 64 (2001). Volumen completo.
13. Phytochemistry 56 (2001). Volumen completo.
14. Niessen, W.M.A.; "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry"; Chromatographic Science series 79; 2nd edition, 31-66, 233-279 (1999).
15. Cremin, Zeng; Analytical Chemistry 74 (21), 5492-5500 (2002).
16. Waters 996 PDA Detector Operator's guide; 5.1-5.10 (1999).
17. Piñeyro, A.; Martínez, L.; González, R.; Toxicology 92, 217 (1994).
18. Dreyer, D.; Arai, I.; Bachean, C.; Anderson, W., Smith, R. and Daves, D.; "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". J. Am. Chem. Soc. 97, 4985-4990. (1975).
19. Waksman, N.; Ramírez, R.; "Isolation of a new dimeric anthracenones from *Karwinskia parvifolia*". Rev. Latinoam. Quím. 23 (1) y 22 (4):25-27 (1992).
20. Rivas, V.; Waksman, N.; "Cytotoxic Hydroxyanthracenones from fruits of *Karwinskia parvifolia*"; Natural Product Letters 15 (4), 243-251 (2001).
21. Osorio, A.; Salazar, M.; Piñeyro, A.; Waksman, N.; Journal of Chromatography B 783, 85-92 (2002).
22. Molina, G.; Becerril, P.; Said, S.; Waksman, N.; "Evaluación de la actividad antituberculosa *in vitro* de extractos de plantas del norte de México usando una cepa multidrogoresistente. Fraccionamiento biodirigido de extractos metanólicos de *Leucophyllum frutescens*"; V Congreso Internacional de Química. VII Congreso Regional de Estudiantes de Química (2004).

23. Rimando, A.; Dayan, F.; Mikell, J.; Moraes, R.; “Phytotoxic Lignans of *Leucophyllum frutescens*”; *Natural Toxins* 7, 39-43 (1999).
24. Pérez, A.; Becerril, P.; Said, S.; Waksman, N.; “Actividad antimicrobiana de extractos de plantas del noreste de México contra *S. aureus*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*”; *Revista de la Sociedad Química de México* 47 (2003).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



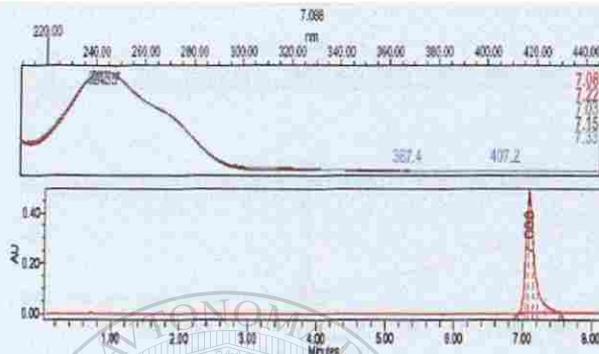
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE A.

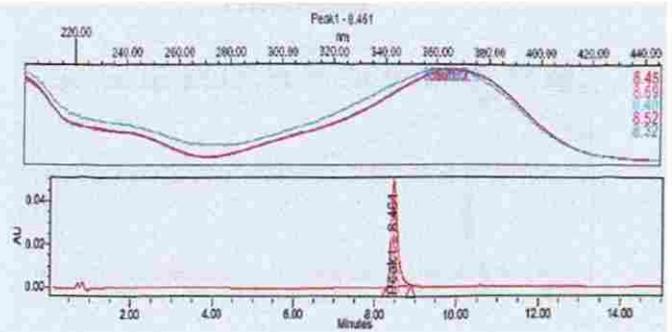
Verificación de pureza

a. Compuestos puros UV-Vis

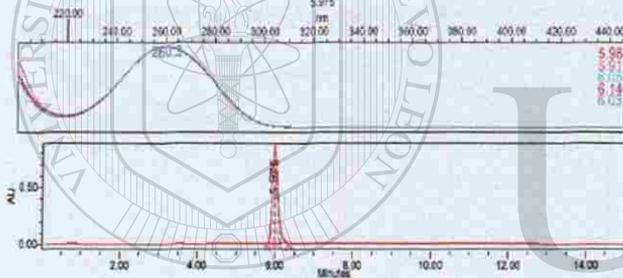
Santonina



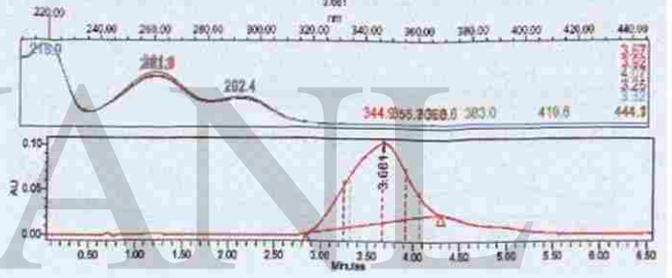
Kukulkanina A



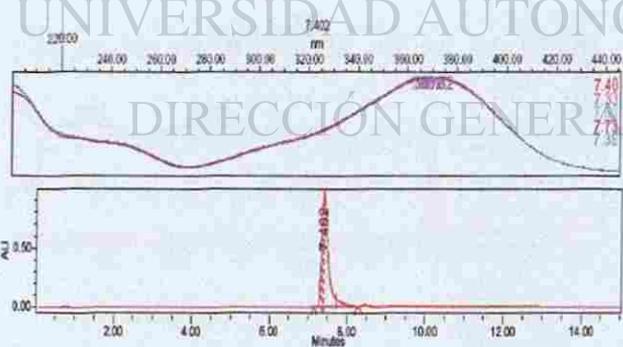
Desacetato matricarina



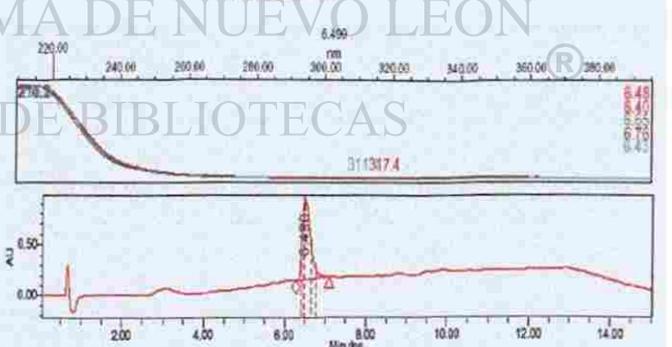
Ácido vainílico



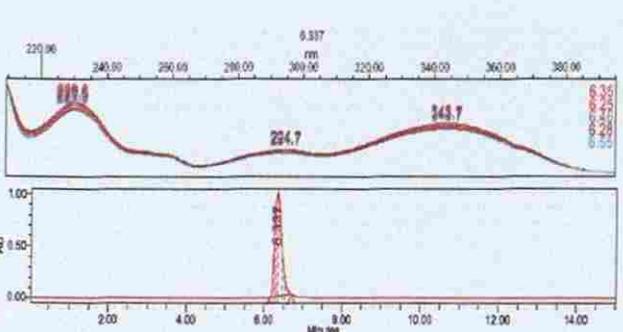
Kukulkanina B



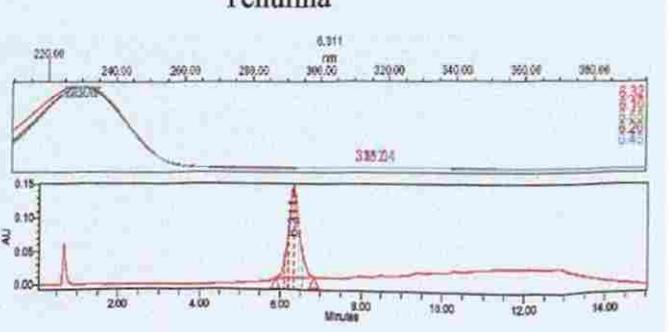
Partenina



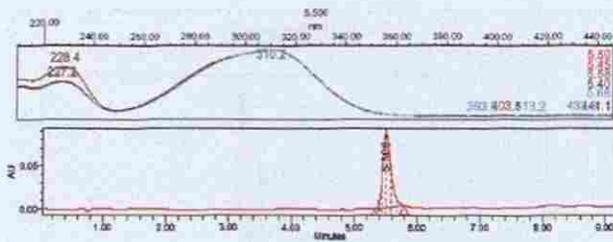
Kokusagenina



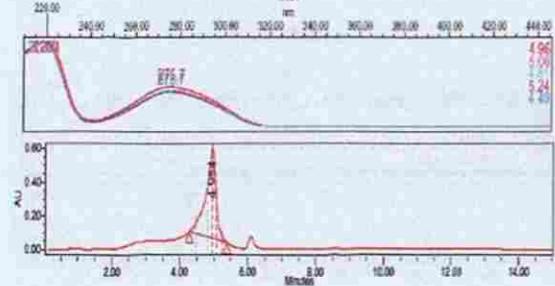
Tenulina



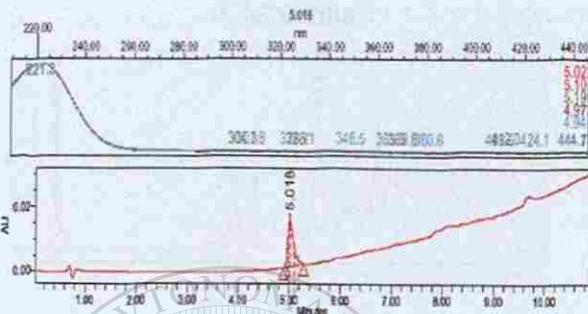
Ácido p-cumárico



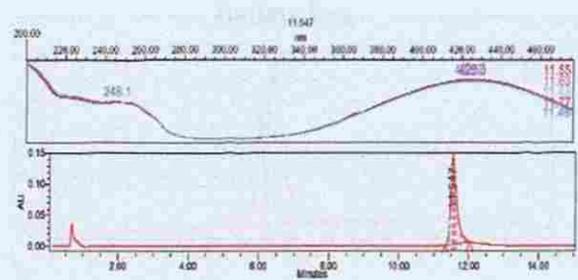
Ácido siríngico



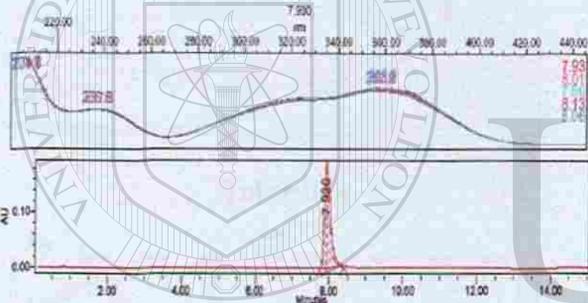
Ouabaina



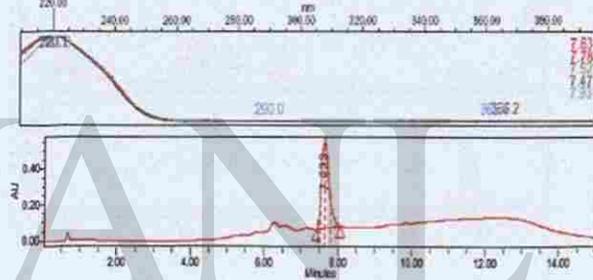
Pristimirina



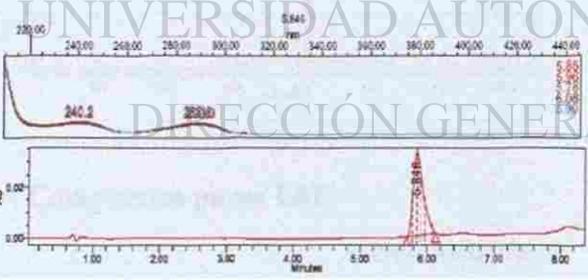
Bonducelina



Eugarzasadina

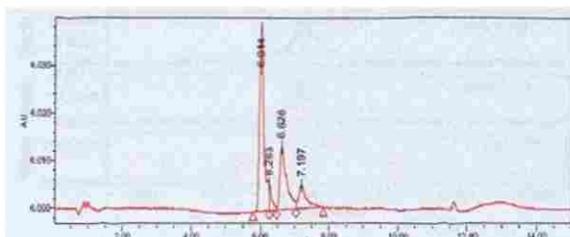


Protopina

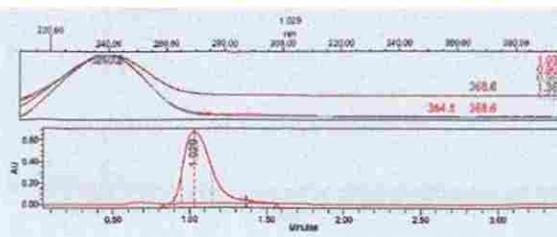


b. Compuestos impuros UV-Vis.

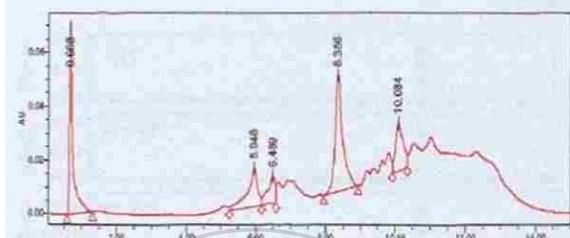
Quercitrina



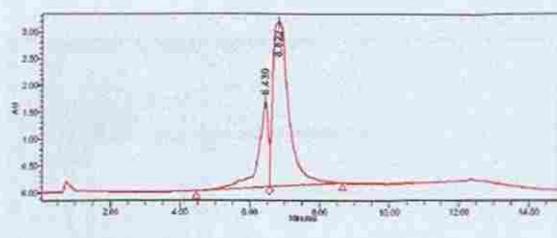
Verbelina



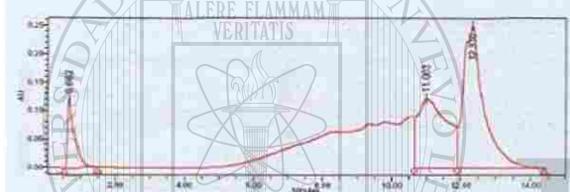
Chaparrina



Baileyolona



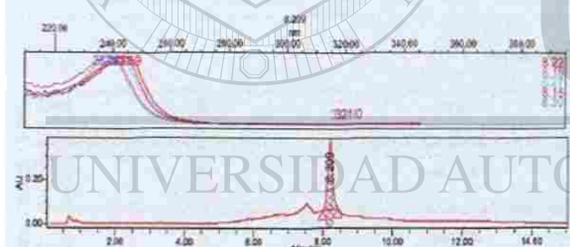
Acetato β -amirina



Criptopina



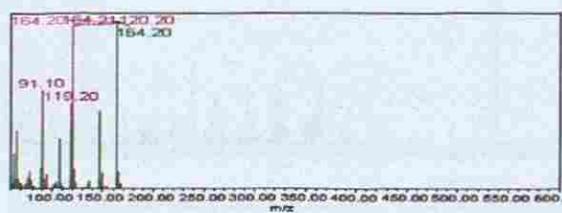
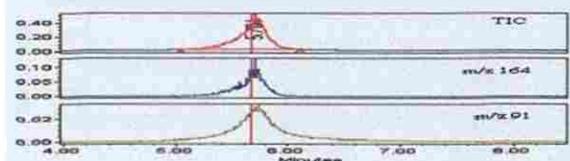
Tuberilina



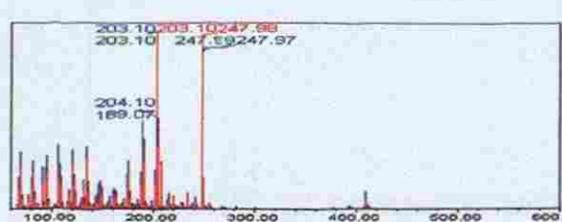
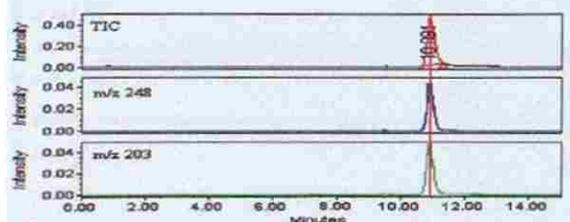
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

c. Compuestos puros EM.

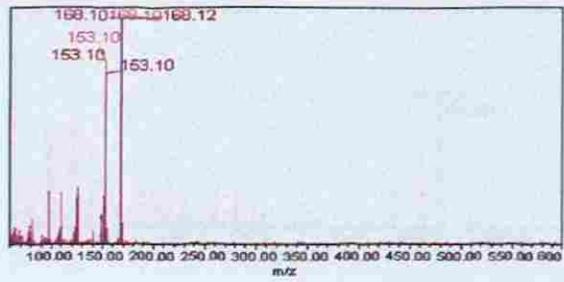
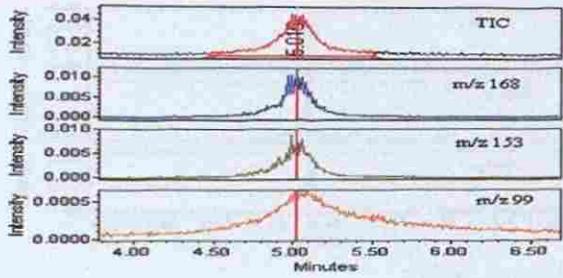
Ácido p-cumárico



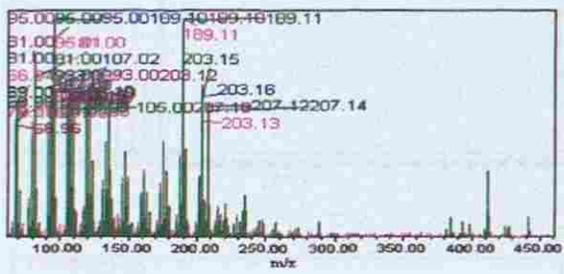
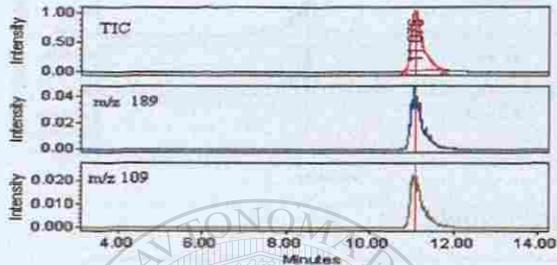
Ácido ursólico



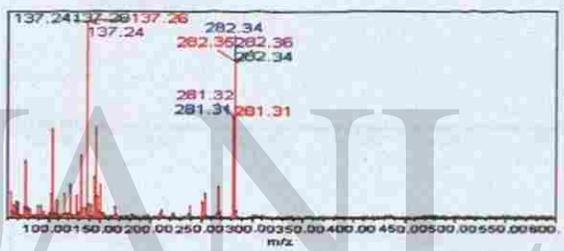
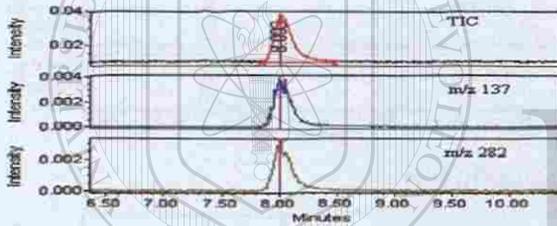
Ácido vainílico



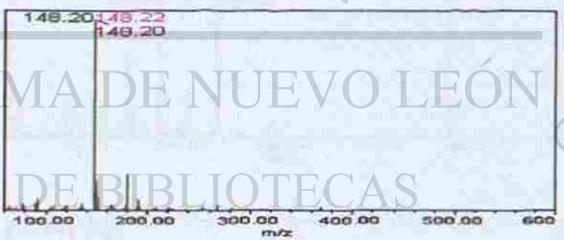
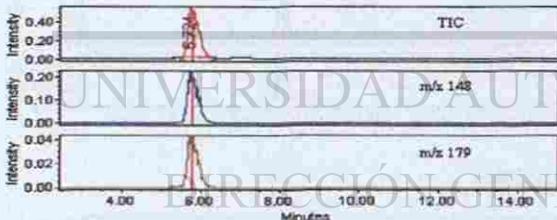
Betulina



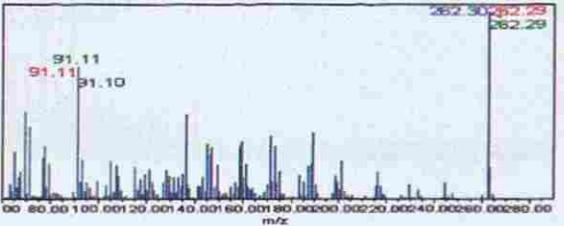
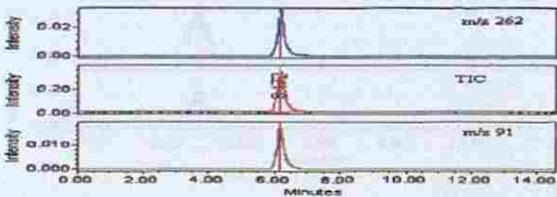
Bonducelina



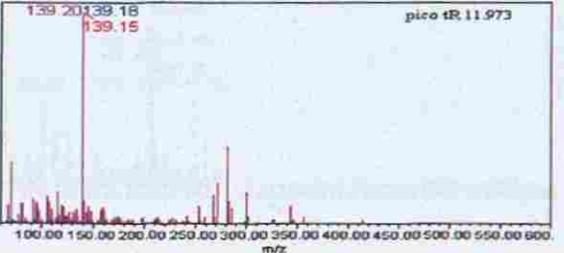
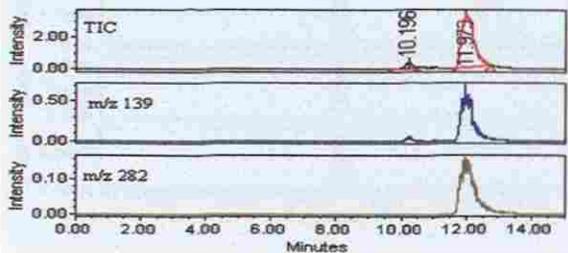
Criptopina



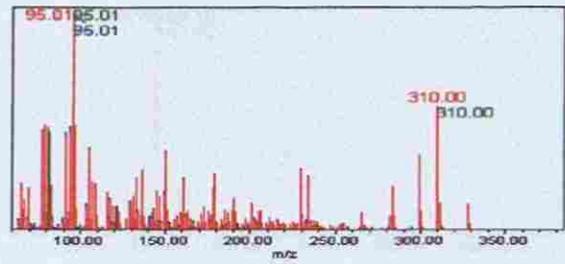
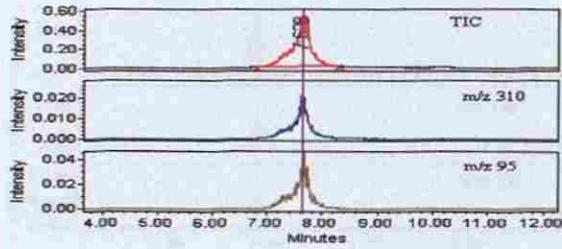
Desacetato matricarina



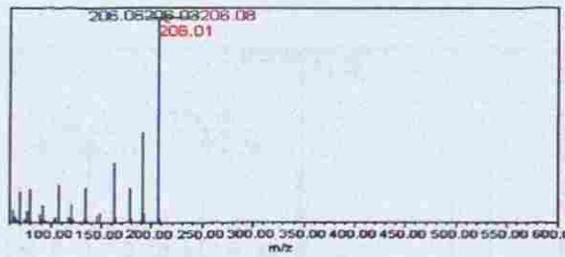
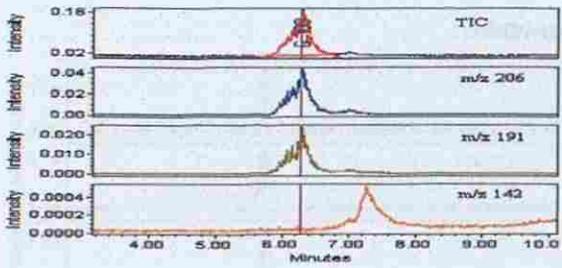
Diosgenina



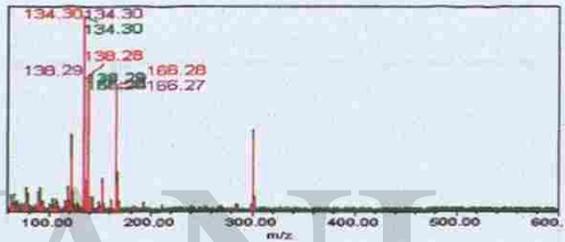
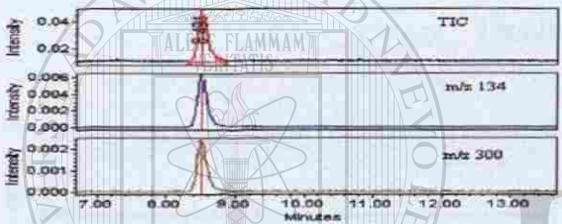
Eugarzasadina



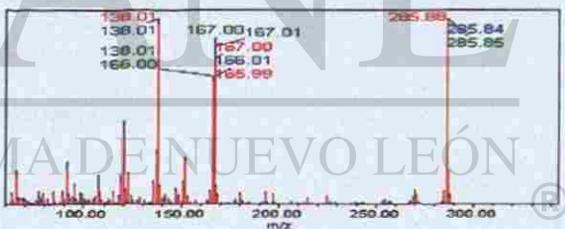
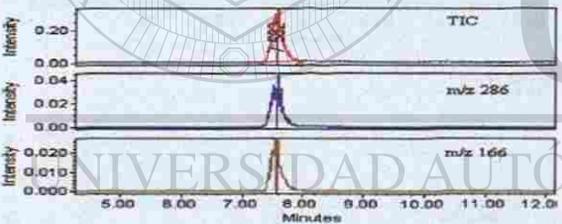
Kokusagenina



Kukulkanina A

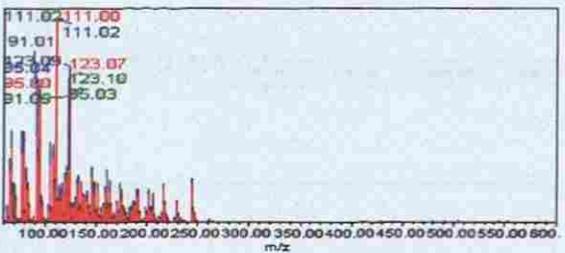
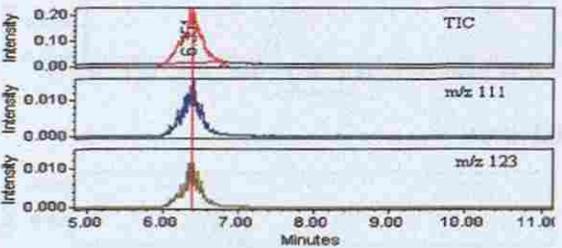


Kukulkanina B

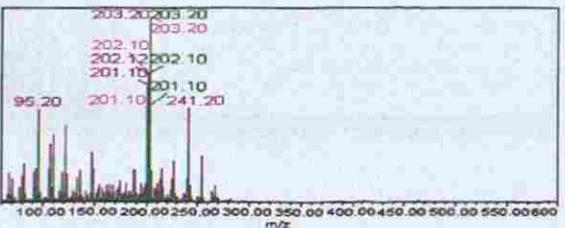
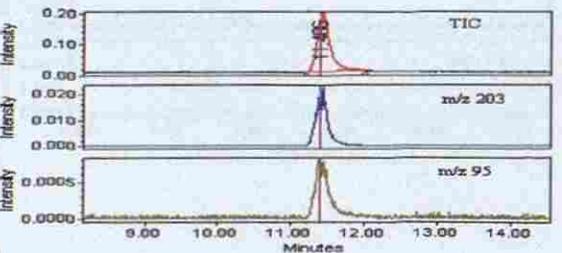


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

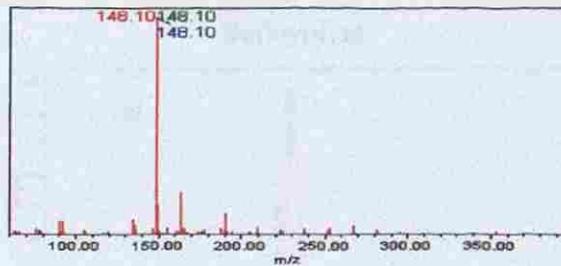
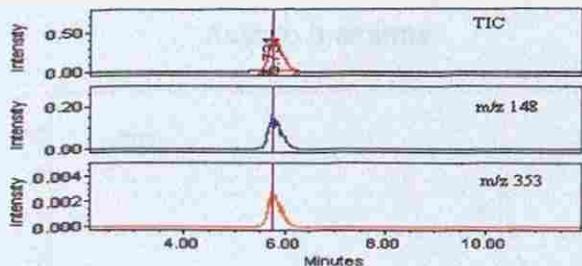
Partenina



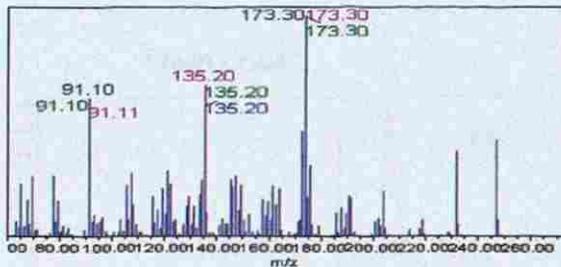
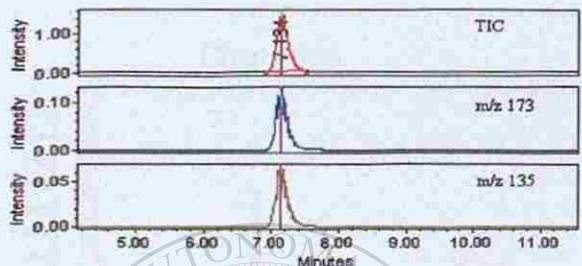
Pristimirina



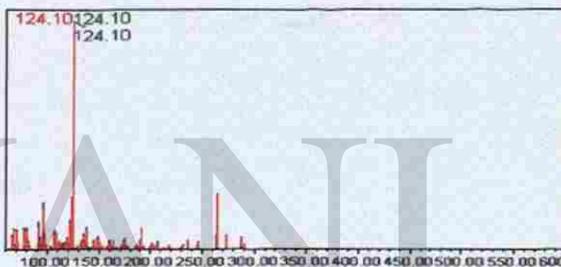
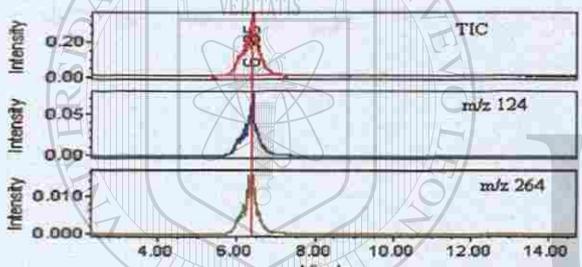
Protopina



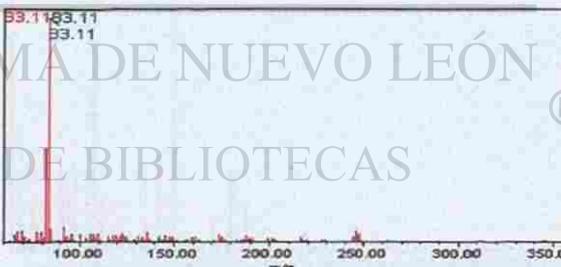
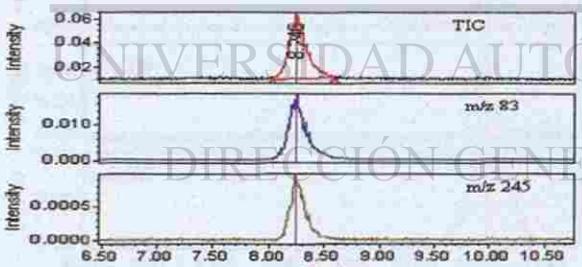
Santonina



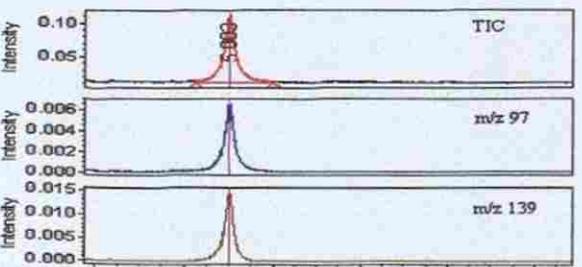
Tenulina



Tuberilina

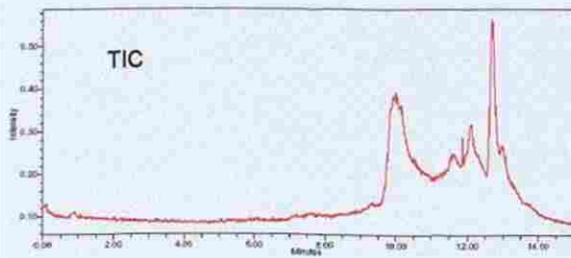


Verbelina

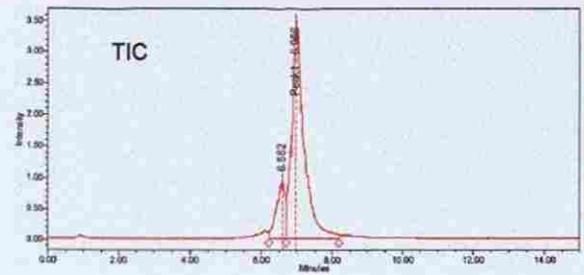


d. Compuestos impuros EM

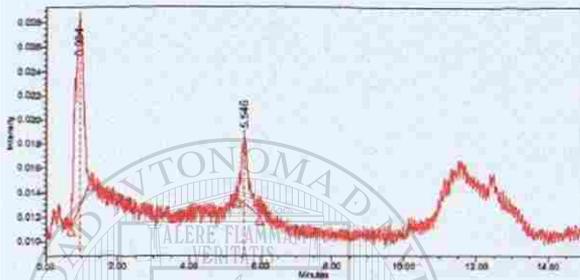
Acetato b-amirina



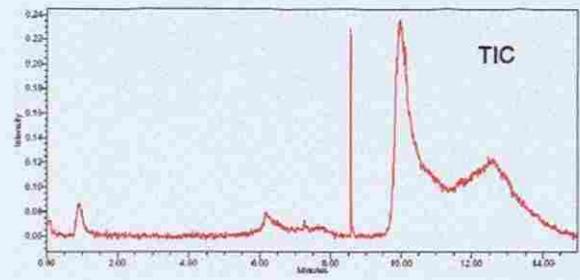
Baileyolina



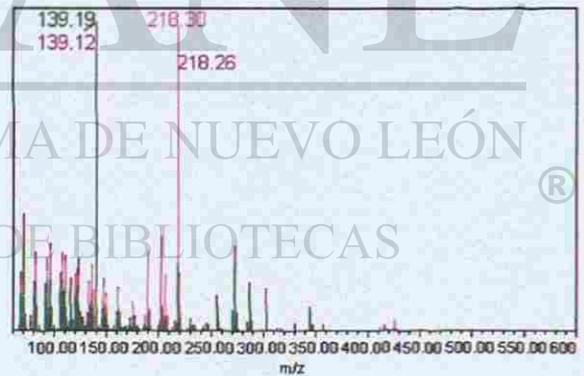
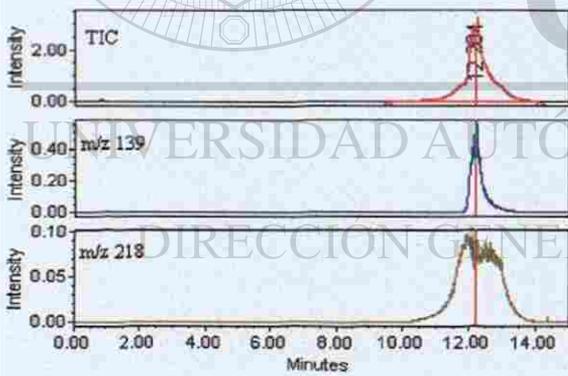
Chaparrina

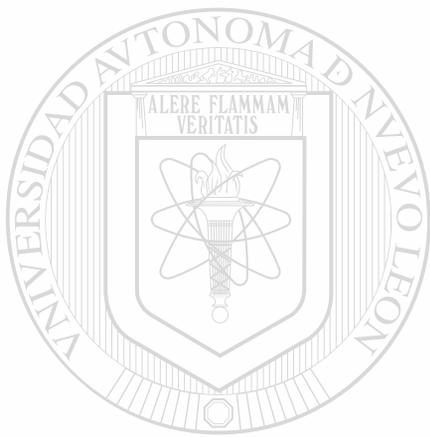


Quercitrina



Esmilagenina





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



