

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).

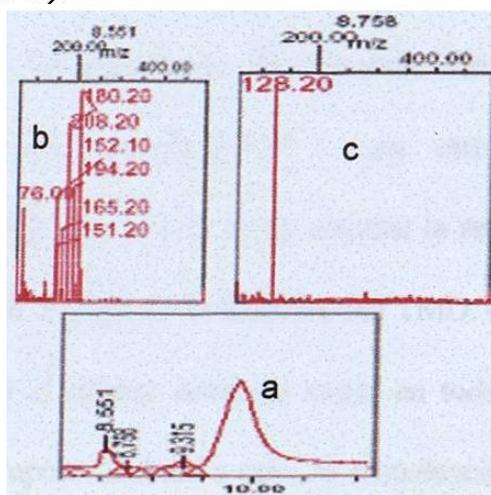


Figura 29. Coelución de naftaleno-antraquinona en mezcla 1

- 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.

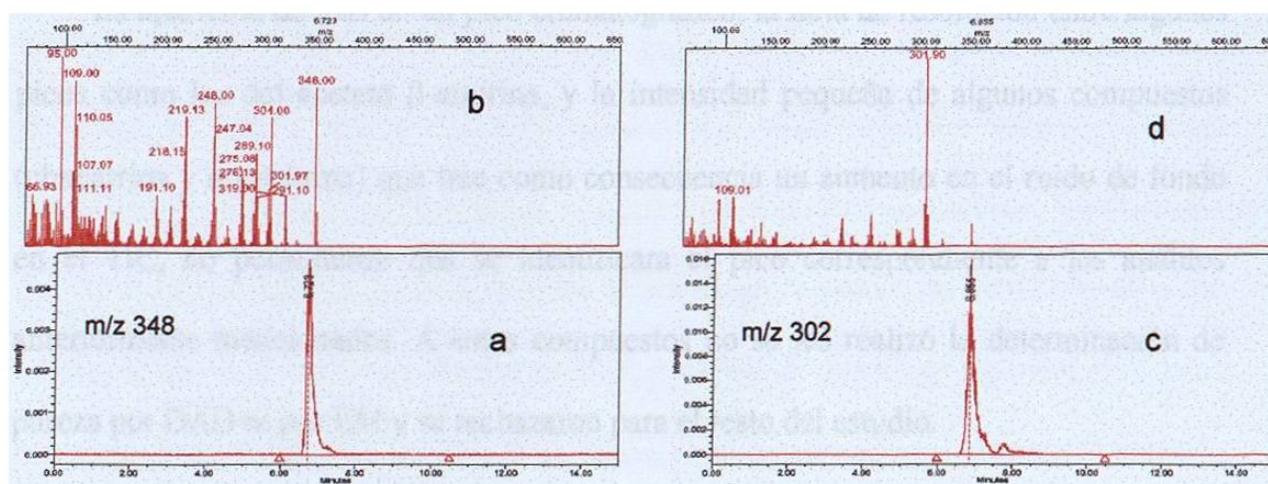


Figura 30. Coelución de camptotecina-quercetina en mezcla 11

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| 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

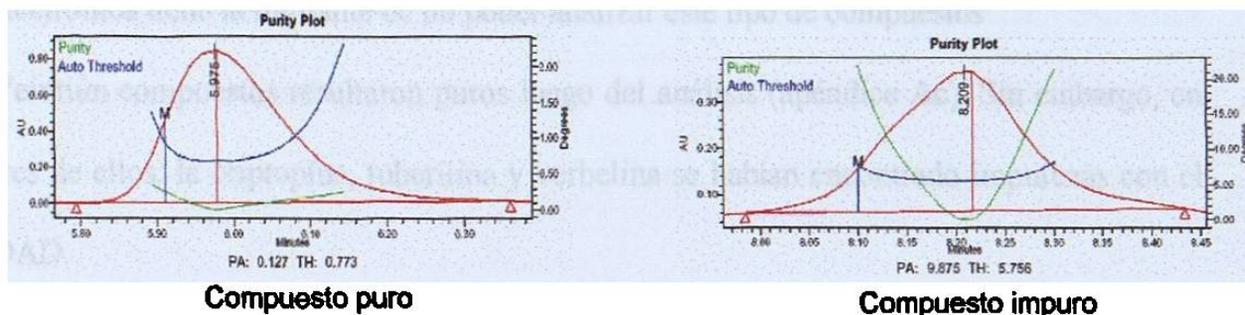


Figura 31. Ejemplo análisis por comparación de ángulo de pureza vs. el ángulo de umbral.

— 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.

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.

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.

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.**