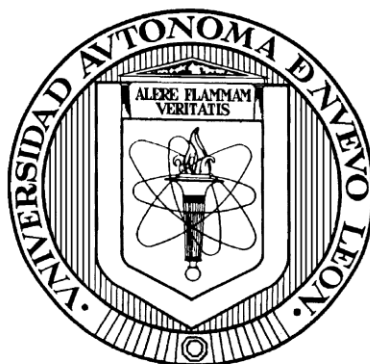


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**APLICACIÓN DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ESTABLECER LA
HUELLA DACTILAR CROMATOGRÁFICA DE *Morinda panamensis* Y
DETERMINAR SU CORRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA**

Por

M. en C. TANIA ISOLINA CORAL MARTÍNEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias con Orientación en Química Biomédica**

NOVIEMBRE DE 2013

**APLICACIÓN DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ESTABLECER LA
HUELLA DACTILAR CROMATOGRÁFICA DE *Morinda panamensis* Y
DETERMINAR SU CORRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA**

Presentado por:

M.C. Tania Isolina Coral Martínez

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos, la dirección externa del Dr. Gonzalo J. Mena Rejón y la Co-dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres.

**Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos
Directora**

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO 1	9
INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Medicina Tradicional Herbolaria	9
1.1.1 Generalidades.....	9
1.1.2 Familia Rubiaceae.....	12
1.2 Control de calidad de productos herbales	21
1.2.1 Perfil cromatográfico	24
1.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	26
1.3 Quimiometría	27
1.3.2 Técnicas de análisis multivariante	30
1.4 Antecedentes.....	33
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	37
1.7 OBJETIVO GENERAL	38
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
CAPÍTULO 2	39
MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1 Equipos y Materiales	39
2.2 Programas Computacionales.....	40
2.3 Solventes y Reactivos.....	40
2.4 Muestra vegetal.....	41
2.5 Métodos.....	43
2.5.2 Condiciones Cromatográficas.....	44
2.5.3 Desarrollo del proceso de extracción aplicado a hojas de <i>Morinda panamensis</i>	45
2.5.4 Validación de los métodos cromatográficos.....	46
2.5.5 Análisis de las muestras de <i>Morinda panamensis</i> y <i>citrifolia</i>	54
2.5.6 Análisis Quimiométrico	55
CAPÍTULO 3	58

RESULTADOS.....	58
3.1 Desarrollo y Validación del Método Analítico	58
3.1.1 Condiciones Cromatográficas.....	58
3.1.2 Proceso de Extracción	62
3.1.3 Validación del método cromatográfico para la determinación de las huellas dactilares de <i>Morinda panamensis</i>	64
3.2 Modelo quimiométrico de <i>Morinda panamensis</i>	70
3.2.1 Pretratamiento de los datos	70
3.2.2 Análisis de PCA	73
3.4 Determinación de ácido ursólico	82
3.4.1 Validación del método analítico para la determinación de ácido ursólico.	83
3.4.1.2. Precisión y exactitud.....	83
3.5 Correlación de las huellas dactilares con la actividad antidiabética	86
CAPÍTULO 4	88
DISCUSIÓN.....	88
4.1 Condiciones cromatográficas.....	89
4.8 Análisis de predicción de la actividad antidiabética	97
CAPITULO 5	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
5.1 Conclusiones	99
5.2 Perspectivas	100
BIBLIOGRAFIA.....	101

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1.1	Clasificación taxonómica del género <i>Morinda</i> .	12
1.2	Parámetros para evaluar la calidad de productos herbales.	21
2.1	Recolectas de <i>Morinda panamensis</i> (MP) y <i>citrifolia</i> (MC).	41
2.2	Variables empleadas para el desarrollo de las condiciones cromatográficas.	43
2.3	Variables modificadas para la determinación de la robustez.	47
2.4	Diseño Plackett-Burman para la determinación de la robustez.	48
3.1	Condiciones empleadas en el desarrollo del sistema cromatográfico para el análisis de hojas de <i>Morinda panamensis</i> .	58
3.2	Programa de gradiente de elución empleado para el análisis de extractos de hojas de <i>Morida panamensis</i> .	59
3.3	Valores de tR correspondientes a las 23 señales obtenidas.	60
3.4.	Valores de α calculados para las 23 señales obtenidas con el sistema cromatográfico desarrollado.	61
3.5	Resultados obtenidos empleando la agitación en vortex.	62
3.6	Resultados obtenidos empleando la agitación en ultrasonido.	62
3.7	Precisión intradía del sistema cromatográfico empleando como parámetro de evaluación la altura y el tiempo de retención de los picos.	64
3.8	Precisión intermedia del sistema cromatográfico empleando como parámetro de evaluación la altura de los picos.	64
3.9	Precisión intermedia del sistema cromatográfico empleando como parámetro de evaluación la altura de los	65

	picos.	
3.10	Resultados de Robustez del método analítico empleando como parámetro de evaluación el tiempo de retención.	66
3.11	Resultados de Robustez del método analítico empleando como parámetro de evaluación las áreas.	67
3.12	Resultados de la estabilidad del extracto de <i>Morinda panamensis</i> .	69
3.13	Regiones de trabajo utilizadas para el análisis por PCA.	72
3.14	Comparación de Modelos de PCA.	78
3.15	Muestras empleadas como parte del grupo de clasificación para la construcción del modelo SIMCA.	79
3.16	Resultados de la validación del método por CLAR-DAD para la cuantificación del ácido ursólico en extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> .	83
3.17	Datos de la cuantificación de ácido ursólico en muestras de <i>Morinda panamensis</i> y <i>Morinda citrifolia</i> .	84

LISTA DE FIGURAS

	Nombre	Página
1.1	Estructura química de los metabolitos de <i>Morinda panamensis</i> .	17
1.2	Estructura química del ácido ursólico.	18
2.1	Mapa de las zonas de recolecta de muestras de <i>Morinda panamensis</i> y <i>citrifolia</i> .	42
3.1	Cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico desarrollado.	61
3.2	Procedimiento de extracción establecido para hojas de <i>Morinda panamenis</i> .	64
3.3	Gráfico de estabilidad del extracto de <i>Morinda panamensis</i> , en donde \bar{X} es el promedio del número total de señales, y DE es la desviación estándar.	70
3.4	Pretratamientos realizandos a los datos de los cromatogramas crudos de los 135 extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> .	71
3.5	Zonas de trabajo empleadas para la construcción del modelo quimiométrico por PCA. A) M1, B) M2, C) M3.	75
3.6	Gráficos de doble dimensión del PCA de los extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> . A) Gráfico de scores o muestras. B) Gráfico de loadings o variables.	75
3.7	Gráficos lineal de loadings o variables del PCA de los extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> .	77
3.8	Gráficos de doble dimensión del PCA de los extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> . A) Gráfico de scores. B) Gráfico de loadings.	76
3.9	Gráficos lineal de loadings o variables del PCA de los extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> .	76
3.10	Gráficos de doble dimensión del PCA de los extractos	77

	de hojas de <i>Morinda panamensis</i> . A) Gráfico de scores o muestras. B) Gráfico de loadings o variables.	
3.11	Gráficos lineal de las variables (T_R) del PCA de los extractos de hojas de <i>Morinda panamensis</i> .	78
3.12	Gráfico de clasificación de muestras de <i>Morinda panamensis</i> .	80
3.13	Cromatograma del ácido ursólico registrado por CLAR.	81
3.14	Curva de calibración de ácido ursólico.	82
3.15	Gráfica de ajuste del bloque X al modelo de PLS.	85
3.6	Gráfica de ajuste del bloque X al modelo de PLS.	86

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Medicina Tradicional Herbolaria

1.1.1 Generalidades

Las plantas siempre han sido fuente de alimento, vestido, material de construcción, energía y medicina para el género humano; por lo tanto es natural que el hombre desde las épocas primitivas comenzara a identificarlas y

seleccionarlas, de acuerdo a sus necesidades, haciendo énfasis en aquellas que afectan la salud, ya sea de forma positiva o negativa. (Delgado G. 2006).

La medicina tradicional herbolaria surge con los ancestros, quienes observaron que el consumo de ciertas plantas generaba efectos específicos, como el alivio o la desaparición de ciertas enfermedades o simplemente un mejoramiento en la salud (Mian-Ying W. 2002).

Actualmente, la medicina tradicional herbolaria es utilizada en diversas culturas alrededor del mundo para ayudar a promover, mantener y restaurar la salud humana (Robinson M. 2011). En los países en desarrollo y especialmente en las zonas rurales es frecuente el uso de la medicina tradicional para el cuidado de la salud y el tratamiento de diversas enfermedades, debido a su disponibilidad y bajo costo (Mathivanan N. 2005).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 70 y 95% de los habitantes en la mayoría de los países en desarrollo, en especial en Asia, África y América Latina, utilizan la medicina tradicional como recurso primario en cuanto a las necesidades de salud. Por otra parte, en algunos países industrializados como Canadá, Francia, Alemania e Italia, también es común el uso de la medicina tradicional pero bajo el título de medicina complementaria, alternativa o no convencional, reportándose que entre el 70 y 90% de la población ha utilizado este tipo de medicina (Robinson M. 2011).

En América, mucho antes de la llegada de los europeos, ya se tenía un amplio conocimiento del empleo de plantas desde un punto de vista artesanal, alimenticio y medicinal (Delgado G. 2006). Brasil y Colombia ocupan los primeros lugares en megadiversidad de flora debido a sus climas tropicales y templados, México ocupa el tercer lugar y es amplio el conocimiento que existe sobre las plantas medicinales. Existen cerca de 21,600 especies de plantas vasculares y más de 3,350 de estas forman parte de la flora medicinal; un buen testimonio de la eficacia y valor cultural de la mayoría de estas especies es su persistencia en mercados mexicanos contemporáneos. A pesar de su riqueza y variedad, sólo un pequeño porcentaje de la flora medicinal mexicana ha sido investigado desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico. De este modo, el potencial de las plantas medicinales mexicanas como una fuente de compuestos bioactivos permanece inexplorado. (Mata R. 2001).

En Yucatán, la medicina tradicional herbolaria se encuentra fuertemente arraigada; esto es debido a que desde la época colonial se han descrito diversos recetarios que indican el empleo de las especies vegetales como remedio para curar enfermedades que se encuentran descritas en los Libros de Chilam Balam, el Libro Judío y el Libro de medicinas muy seguro, entre otros (Gubler R. 1996). Hoy en día las plantas medicinales siguen siendo un elemento importante en el cuidado de la salud; para ello los habitantes yucatecos emplean principalmente

especies vegetales originarias de la península, sin embargo, en los últimos años se ha detectado en los registros del Banco de Datos Etnobotánicos de la Península de Yucatán, la incorporación de especies no nativas, las cuales son consumidas por la población en general, debido a sus efectos sobre la salud, tal es el caso de *Morinda citrifolia* y *Morinda panamensis*, ambas pertenecientes a la familia Rubiaceae (Arellano J. 2003, Pérez-Novelo 2008).

1.1.2 Familia Rubiaceae

La familia Rubiaceae es cosmopolita, pero cuenta con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Es una de las más diversas a nivel mundial, ya que ocupa el cuarto lugar, después de *Asteraceae*, *Orchidaceae* y *Poaceae*, con alrededor de 10,700 especies. Algunas especies se extienden hacia regiones templadas y aún frías, pero están completamente ausentes en la región ártica. En las regiones templadas predominan especies de hábito herbáceos, en tanto que en los trópicos se hallan preferentemente arbustos y árboles de bajo porte. (Mendoza H. 2004).

Estudios realizados sobre los constituyentes de esta familia muestran una gran diversidad de metabolitos como antraquinonas, naftoquinonas, flavonoides y sus glicósidos, iridoides, alcaloides, cumarinas y triterpenos. (Da Silva V. 2006).

1.1.2.1 Género *Morinda*

El género *Morinda* es un género pantropical con cerca de 80 especies. En América se encuentran unas 26 especies que se distribuyen en todo el neotrópico y región extratropical de Norteamérica, desde el sureste de Estados Unidos (Florida), México hasta Panamá (Mendoza H. 2004, Chízmar C. 2009). En la Tabla 1.1 se muestra la clasificación taxonómica del género *Morinda*:

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica del género *Morinda*.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superfilo	Espermatofita
Filo	Magnoliofita
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Morinda</i> L.

Entre las especies que más destacan de este género están *M. tinctoria*, utilizada como alimento, como planta medicinal y como fuente de tintes; *M. lucida*, usada como planta medicinal en África, *M. officinalis*, *M. parvifolia*, *M. royoc* y *M. umbellata* (Nelson S. 2006). En Malasia una especie muy usada es *M. elliptica*, las

hojas se utilizan para tratar dolores de cabeza, cólera, diarrea y fiebre (Nordin J. 2003). En varios países africanos se utiliza la especie *M. morindoides* para el tratamiento de la malaria, diarrea, amibiasis, hemorroides, gonorrea y dolores reumáticos. (Meite S. 2009).

En México, el uso de especies vegetales también resulta ser una práctica común, y aunado al fenómeno de la globalización, han originado que las personas tengan a disposición diversos productos para el cuidado de la salud entre los que destaca el uso de *Morinda citrifolia*, cuyas hojas y fruto son utilizados principalmente para el tratamiento de la diabetes, hipertensión y cáncer (Hirazumi A. 1996, McClatchey W. 2002).

1.1.2.1.1 *Morinda citrifolia* (Noni)

Morinda citrifolia, "también conocida como Noni", tiene múltiples usos en la medicina tradicional de la India e islas del Pacífico; por más de 2000 años, los polinesios utilizaban las raíces, cortezas, tallos, hojas, flores y frutos de la planta sola o combinando distintas partes de la misma planta con diferentes fines medicinales; entre estos está su uso para aliviar distintos tipos de padecimientos como artritis, diabetes, presión arterial alta, dolores musculares y menstruales, dolores de cabeza, enfermedades del corazón, SIDA, cáncer, úlceras gástricas, depresión, senilidad, mala digestión, arteriosclerosis, problemas vasculares, adicción a las drogas, enfermedades respiratorias entre ellas la influenza. (Wang M. 2002).

Los productos de esta planta, principalmente el jugo del fruto, han adquirido una gran popularidad y desde el año 1990 se han distribuido ampliamente como suplementos dietéticos herbales y botánicos; siendo uno de los productos más vendidos en los Estados Unidos de Norteamérica, de acuerdo a datos estadísticos publicados por la revista de asuntos nutricionales en el 2006 (Deng Y. 2007).e incluso ha sido aprobado por la Comisión Europea como un nuevo alimento debido a los efectos benéficos que posee.

Los frutos de esta planta pueden crecer hasta un tamaño aproximado de 12 cm, presentan un olor desagradable y un sabor jabonoso cuando se encuentra maduro; sus hojas son elípticas de 10 a 18 cm de longitud, de 4 a 10 cm de ancho, acuminadas y suaves al tacto (Sang S. 2001). Los frutos maduros son utilizados en remedios caseros para curar heridas externas e infecciones. Las investigaciones muestran el consumo de frutos cocidos o crudos por los pobladores de Polinesia y Australia (Potterat O. 2007). El jugo del fruto del Noni es una medicina alternativa con gran demanda para el tratamiento de diferentes tipos de padecimientos, para prevenir enfermedades o para mejorar las condiciones de salud (Pawlus A. 2005).

Las hojas de Noni han sido consumidas como vegetales por múltiples grupos culturales debido a sus beneficios nutricionales, por ejemplo en Polinesia es común cocinar el pescado junto con las hojas de Noni y comerlos juntos, o comer

las hojas crudas o mezcladas con arroz. El amplio consumo de hojas de Noni, con propósitos alimenticios y medicinales, en las provincias de Tailandia, ha llevado a considerar un problema de salud pública la contaminación de esta planta por emisiones de metales pesados (West B. 2007). En algunos países se emplean las hojas vía tópica para aliviar las lesiones causadas por mordedura de serpientes, dolores musculares, heridas y úlceras (Siddiqui B. 2003). Se ha encontrado que algunos compuestos aislados de las hojas presentan actividad antioxidante. Entre los compuestos encontrados en las hojas está el β -caroteno, por lo que es consumido en la isla Kiribati para combatir la ceguera nocturna de los niños. Por lo anterior, las hojas de Noni han sido incluidas en la tabla de composición de alimentos para el este asiático y las islas del Pacífico, emitido por la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (West B. 2007). En el 2008, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) tras una profunda investigación, emitió una opinión científica acerca de la seguridad de las hojas de *M. citrifolia* para el consumo humano, en donde la conclusión fue que el consumo de hojas de Noni es seguro (EFSA 2008).

Se han reportado un gran número de compuestos presentes en hojas, raíces, tallos y frutos para esta especie, entre los cuales destacan: flavonoides, quinoides, monoterpenos, triterpenos, iridoides, esteroides, carotenos, cumarinas y otros a los cuales se les atribuyen diversas actividades biológicas (Loonjang K. 2004).

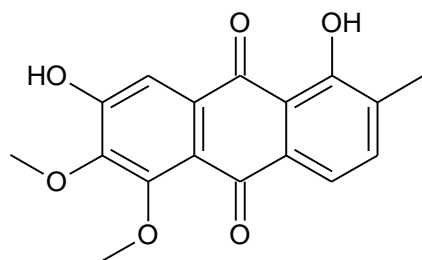
1.1.2.1.2 *Morinda panamensis*

La especie *Morinda panamensis* también es conocida como canche, concha de huevo, palo de peine, yema de huevo, y can-y-che o k`ani-chi` en maya. Algunos especímenes pueden ser muy similares a los especímenes de *M. citrifolia*, por lo que se le ha catalogado como "falso Noni". Es un árbol de 3 a 6 metros de alto cuyo tronco tiene 10 cm de diámetro, sus hojas son elípticas y acuminadas, de longitud de 10 a 18 cm, de 4 a 10 cm de ancho y suaves al tacto; posee una corola blanca o rosácea de 1.5 cm de largo y frutos de 1 a 1.5 cm de diámetro de color verdoso y flores de aroma dulce (Robbrecht E. 2006). La corteza es delgada y de color marrón oscuro y la madera de color amarillo oscuro, moderadamente dura (Standley P. 1975). El fruto es sincarpo de 1 a 4 cm de diámetro de color blanco-café al madurar y presenta varias semillas.

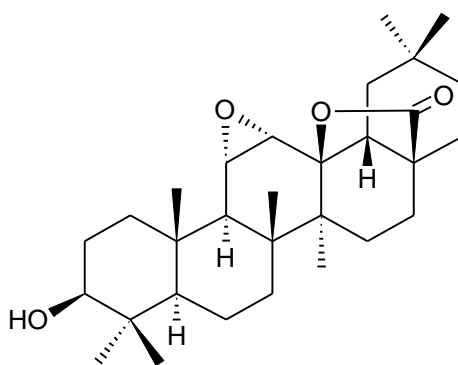
Existen pocos reportes acerca del uso etnobotánico de *M. panamensis*; se sabe que es una especie comestible en varios países Centroamericanos (Chízmar C. 2009). En Yucatán, se ha introducido como parte de las especies vegetales cultivadas en varios huertos familiares; esto está reportado por dos estudios florísticos y etnobotánicos realizados en varios huertos localizados en Mérida y otro municipio, los cuales indicaron que el 16 % de las especies vegetales identificadas son utilizadas con fines medicinales y entre estas especies se encuentra *M. panamensis* (Ávila D. 2007, Pérez I. 2008). Esta situación ha provocado una confusión en el uso de esta planta como remedio herbal para el tratamiento de diversos padecimientos debido a la similitud morfológica que

presenta con *M. citrifolia* y a las propiedades medicinales atribuidas a ésta (Varga A. 2011).

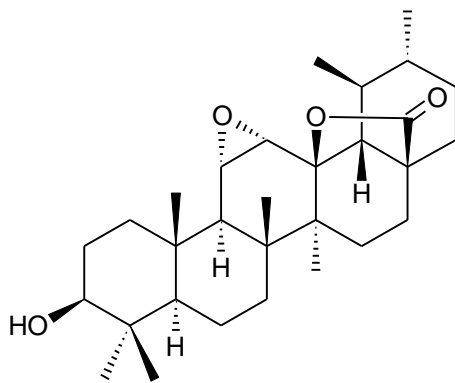
En el 2012, se realizaron estudios fitoquímicos a partir de extractos con diclorometano de los frutos de *M. panamensis*, se identificaron varios compuestos que están presentes en *M. citrifolia*; sin embargo, también se encontraron algunos metabolitos entre los cuales están el 1,7-dihidroxi-2-metil-5,6-dimetoxiantraquinona, 3β -hidroxi-11 α ,12 α -epoxiolean-28 β -olida y 3β -hidroxi-11 α ,12 α -epoxiurs-28,13 β -olida (Figura 1.1) que podrían ser útiles para realizar una diferenciación entre las especies *M. panamensis* y *M. citrifolia* (Ceballos J. 2012) y en cuanto a las hojas de esta especie, se aislaron e identificaron siete compuestos: el ácido ursólico, el loliólido y el isololiólido, estos dos últimos derivados de la degradación biológica de los carotenoides, un iridoide, la escopoletina y dos antraquinonas. El loliólido y el isololiólido son reportados por primera vez para una especie del género *Morinda* y también fue aislado el iridoide 1-hidroxi-3,4,4a,7a-tetrahidro-1*H*-espiro[ciclopenta[c]piran-7,2'-oxiran]-4-carboxilato de metilo, el cual no había sido reportado previamente en la literatura. Cabe mencionar que el ácido ursólico y la escopoletina son moléculas muy ubicuas en el reino vegetal, las cuales han sido reportados previamente en otras especies del género *Morinda* y son conocidos por tener una gran variedad de actividades biológicas y farmacológicas. (Espitia L. 2012, 98, 99).



1,7-dihidroxi-2-metil-5,6-dimetoxiantraquinona



3β-hidroxi-11α,12α-epoxiolean-28β-olida



3β-hidroxi-11α,12α-epoxiurs-28,13β-olida

Figura 1.1 Estructuras químicas de los metabolitos encontrados en frutos de *Morinda panamensis*.

Ácido Ursólico

El ácido ursólico (Figura 1.2) también conocido como urson, prunol, micromerol y malol (ácido 3(β)-3-hidroxi-urs-12-en-28-oico) es una sapogenina triterpénica pentacíclica que puede aparecer en forma de aglicona o de ácido libre. Este compuesto ha sido aislado de numerosas especies con diversos orígenes filogenéticos y forma parte fundamentalmente de la cera que recubre frutos y hojas (Ferrer A. 2007).

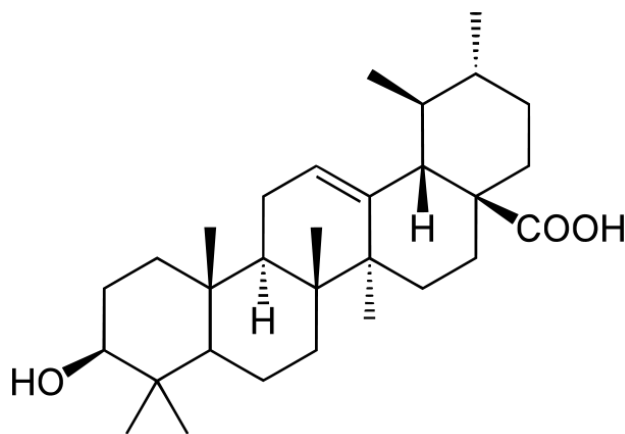


Figura 1.2 Estructura química del ácido ursólico.

Durante mucho tiempo se consideró que el ácido ursólico y sus sales de sodio y de potasio eran inactivas desde el punto de vista farmacológico y solamente se empleaba como agentes emulsionantes en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimenticios, sin embargo, varios estudios científicos han demostrado que esta sustancia presenta actividad anticarcinogénica (Shishodia S. 2003), antiinflamatoria (Reinborn T. 1998, Reico M. 1991), antimicrobiana (Fontanay S. 2008), hepatoprotectora y antiulcerativa (Liu J. 1995, Ferrer A. 2007).

Cabe destacar que varios triterpenos entre los cuales está el ácido ursólico, han demostrado ejercer efectos antihiperoglucémicos, hipoglucemiantes y/o antidiabéticos en modelos *in vivo* e *in vitro* (Takashima J. 2007, Ahmad V. 1980, Nayak S. 2011, Owen P. 2008).

1.2 Control de calidad de productos herbales

A pesar del amplio uso de la medicina herbolaria por millones de personas alrededor del mundo y del desarrollo de medicamentos botánicos o fitofármacos, la cantidad y la calidad de información científica de los productos herbales no es suficiente (Feng G. 2006), por lo que es indispensable desarrollar métodos de control de calidad estandarizados para asegurar que dicha mezcla de compuestos sea oficialmente reconocida y se permita su uso a nivel mundial (Yan L. 2004).

Entre los aspectos que más preocupan acerca de los productos derivados de la medicina tradicional está, la falta de seguridad en el consumo de sus productos, la cual debe ser garantizada por un completo control de calidad. La OMS, en su manual de métodos de control de calidad para plantas medicinales y la Farmacopea Herbolaria Mexicana presentan procedimientos para evaluar la identidad, pureza y contenido de los materiales de plantas medicinales y los recomiendan como herramientas de control de calidad para evaluar la calidad de los productos a base de plantas medicinales. (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2013, World Health Organization 1998).

Tabla 1.2 Parámetros para evaluar la calidad de productos herbales.

Pruebas de pureza	Pruebas de identidad	Valoraciones
Humedad	Macroscópicas	Principios activos Marcadores
Cenizas	Microscópicas	
Materia extraña	Organolépticas	
Disolventes residuales	Perfil cromatográfico	
Contaminantes microbianos		
Aflatoxinas		
Metales pesados		
Residuos de plaguicidas		

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2013, World Health Organization 1980.

Llevar a cabo el control de calidad de los medicamentos herbolarios no es fácil debido a la alta variabilidad de los componentes químicos de los extractos. Tradicionalmente la herramienta más utilizada para la evaluación de la calidad de estos productos herbales ha sido la selección y determinación de componentes activos o marcadores presentes en el extracto de la planta, sin embargo, no proporciona por sí una idea completa de un producto herbal, ya que son múltiples los constituyentes responsables de sus efectos terapéuticos. Estos constituyentes pueden trabajar sinérgicamente y pueden variar dependiendo no únicamente de la especie, sino también de las condiciones de cultivo, de la época de la cosecha, del

origen, de los métodos de proceso y secado de la planta, del tiempo de almacenaje, entre otros factores. Es por estas razones que es necesario determinar la mayoría de los constituyentes de las plantas medicinales con el propósito de asegurar la confiabilidad y la precisión de las investigaciones farmacológicas y clínicas, para conocer su bioactividad y los posibles efectos colaterales de los compuestos activos, así como mejorar el control de calidad de sus productos (Garza A. 2008, Liang Y. 2004).

A partir del 2005, en China, para llevar a cabo el control de calidad de estos medicamentos se empezó a utilizar las huellas dactilares; con esta modalidad es posible hacer frente a la complejidad química de los productos fitoterapéuticos y los problemas relacionados con el uso de pocos compuestos marcadores. La autenticidad y la identificación de productos herbales puede ser llevada a cabo de manera eficiente basándose en la integridad o semejanza de los perfiles cromatográficos o espectroscópicos aun si el número y/o la concentración de los constituyentes característicos no son idénticos en muestras distintas. (Gong F. 2005). La construcción de huellas dactilares ha llegado a ser una herramienta importante en el control de calidad de productos de uso farmacéutico hechos a base de plantas y es aplicable a la identificación de especies de plantas muy semejantes entre sí, para detectar adulteraciones, para el control de procesos de extracción o el estudio de la calidad de un producto terminado (Cieśła L. 2011). Normativas actualizadas sobre plantas medicinales publicadas por la OMS, la Agencia de Medicinas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia

Europea del Medicamento (EMA) se pronuncian por el uso de huellas dactilares; indican que la identificación de la planta medicinal debe ser una de las primeras pruebas aplicadas para garantizar la calidad y discriminar entre especies relacionadas o muestras adulteradas.(OMS 2007, FDA 2004, EMA 2006).

Entre las técnicas experimentales empleadas para la determinación de los perfiles o huellas dactilares están las técnicas espectroscópicas (Espectroscopía Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear), la electroforesis y las cromatográficas (cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución), la gran ventaja que presentan las técnicas cromatográficas radica en su gran capacidad de separación de compuestos presentes en una matriz compleja como lo son las plantas. (Pauli G. 2005, Lucio-Gutiérrez J. 2012, Liang Y. 2004, Gong F. 2005, C. Tistaert 2012).

1.2.1 Perfil cromatográfico

El perfil cromatográfico de la planta medicinal contiene varios datos que representan las características de los múltiples componentes de los productos herbales analizados. Un perfil cromatográfico debe mostrar tanto las semejanzas entre sus componentes como la diferencia que hay entre varios productos herbales. Es deseable obtener perfiles cromatográficos relativamente completos que incluyan a la mayoría de los componentes de la planta con el fin de tener un patrón de reconocimiento específico.

La Cromatografía en Capa Fina es una técnica sencilla, rápida, versátil y ha sido muy usada en el análisis de productos herbales (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2001, Ramírez Durón 2007), básicamente es usada como un método de rastreo que provee perfiles cromatográficos característicos y permite identificar adulteraciones en los productos. Entre las ventajas de esta técnica se encuentra la flexibilidad en la optimización de sus parámetros operacionales, su amplia disponibilidad, facilidad de uso y lo económica que resulta; su limitación es que se trata de una técnica de análisis cualitativo o semicuantitativo poco sensible y de baja resolución; sin embargo recientemente se ha modificado esta técnica aumentando considerablemente su reproducibilidad, resolución y sensibilidad, lo que se conoce hoy como cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) (Tistaert C. 2011).

La Cromatografía de Gases es una técnica bien establecida para analizar compuestos volátiles. La gran eficiencia de separación, aunada con la sensibilidad del detector hacen de esta técnica una gran herramienta para el análisis de muestras biológicas complejas, como lo son los aceites esenciales de los productos herbales. La composición y la concentración relativa de los aceites esenciales son características de algunas plantas por lo que cambios en la concentración o en la composición relativa de los aceites volátiles (aceites esenciales), pueden indicar adulteraciones o cambios enzimáticos, de oxidación o

fermentación. La desventaja de esta técnica radica en que no puede ser usada para el análisis de compuestos no volátiles o polares, a menos que se realice un tratamiento a la muestra con lo cual se pueden incrementar errores en el análisis (Garza A. 2008, Tistaert C. 2011).

1.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La CLAR es una técnica ampliamente usada para el análisis de plantas medicinales y en especial para la determinación de los perfiles o huellas dactilares debido a su versatilidad ya que puede ser empleada para analizar la mayoría de los componentes de los extractos de las plantas, sin importar si estos son volátiles, o no volátiles, polares, no polares y hasta iónicos. Reportes de Liang Y. y colaboradores (2004) refieren que el construir huellas dactilares empleando la información cromatográfica que aporta el cromatograma completo, presenta la ventaja de considerar la mayoría de los componentes del extracto lo cual representa la fitoequivalencia de la planta. Las columnas más utilizadas para la determinación de los perfiles son de fase inversa. Los detectores más empleados para la obtención de los perfiles son: el detector de arreglo de diodos (DAD) que proporciona información adicional a los perfiles cromatográficos obtenidos a longitudes de onda simples, ya que se pueden obtener los espectros relacionados con cada uno de los picos, lo que puede ser empleado como criterio de identificación y de pureza de la señal. También se han empleado acoplamientos con EM y RMN para la obtención de perfiles y con estos acoplamientos también se genera información espectral adicional útil para el análisis cualitativo (Tistaert C.

2012, Gómez A. 2006, Steinmann D. 2011). Debido a la gran cantidad de información que se genera al emplear estos acoplamientos, el análisis de los datos se vuelve un reto, por lo que es indispensable contar con herramientas quimiométricas para el manejo e interpretación de los mismos, tales como la estadística multivariable.

1.3 Quimiometría

La Química Analítica se ha desarrollado notoriamente con la introducción de los métodos quimiométricos. La quimiometría es la disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos. Entre los alcances de la quimiometría están: el diseño de experimentos, la optimización y la validación de métodos, el procesamiento de señales cromatográficas y espectroscópicas, técnicas de calibración (lineales, no lineales y multivariantes), reconocimiento de pautas y relaciones estructura-actividad, entre otros.

1.3.1. Pretratamientos de datos obtenidos con las técnicas instrumentales

Previo a la construcción un modelo matemático es recomendable realizar un pretratamiento o modificación de los datos con el propósito de eliminar las fuentes extrañas de variación que no son de interés en el análisis, ya que de no ser eliminadas, la varianza debida a los errores sistemáticos presentes en los experimentos aumentará y se requerirá un trabajo más complejo para obtener información de interés. (Hendriks M. 2005, Gutiérrez-Lucio R. 2012).

Para CLAR, las variaciones experimentales y el envejecimiento de la columna, entre otros factores, pueden generar distintos efectos como cambios en los tiempos de retención entre los perfiles cromatográficos, por lo que se han empleado distintos tratamientos de datos para solucionar este tipo de problemas (Tistaert C 2011).

Suavizado

Emplea algoritmos matemáticos que, aplicados a los datos de la matriz original, reducen el ruido, suavizan las señales o picos sin reducir en número de variables. Este tipo de transformaciones son relevantes para variables que están en el eje X, como el tiempo, en el caso de un cromatograma. En un suavizado, los valores del eje X son promediados por lo que los datos crudos son reemplazados por el promedio de los datos, creando así el efecto de suavizado. (The Unscrambler X).

Corrección de la línea base

Las variaciones en la línea base, como ruido y desviaciones, se deben a pequeños cambios en las condiciones experimentales como por ejemplo a cambios en la respuesta del detector debidas al gradiente de la fase móvil cuando se trabaja con cromatografía de líquidos, por contaminación del disolvente o simplemente debido al ruido electrónico. La corrección de la línea base es un tipo de pretratamiento que intenta corregir este tipo de tendencias en la línea base para evitar que se

afecten los resultados del análisis. La corrección de la línea base es muy empleada cuando se trabaja con datos espectroscópicos o cromatográficos. Existen varios tipos de corrección de línea base según el efecto que se desea corregir (The Unscrambler X).

Normalización

En muchas técnicas analíticas, las variables medidas para una muestra dada son incrementadas o disminuidas de su valor auténtico por un factor multiplicativo afectando la escala. Los métodos de normalización intentan eliminar este tipo de efectos mediante la identificación de algún aspecto que debería ser constante de una muestra a otra, el cual es utilizado para la corrección de la escala de todas las variables utilizando dicha característica (Rinnan A. 2009). La normalización se emplea para "escalar" las muestras con la finalidad de obtener en una misma escala todos los datos.

Alineación optimizada mediante correlación (COW)

COW es un método para alinear señales de datos de muestras que exhiben cambios en su posición a lo largo del eje x, como lo es el tiempo de retención en cromatografía. COW se aplica comúnmente a datos cromatográficos donde la posición de los picos puede cambiar entre análisis, debido a los pequeños cambios en las muestras o en las condiciones del cromatógrafo.

Para llevar a cabo la alineación se emplea un cromatograma representativo de las muestras que se quieren alinear, denominado vector de referencia, respecto al cual se alinean el resto de los cromatogramas. Los parámetros que hay que definir para la aplicación de este método de alineación son: la longitud del segmento y el grado de flexibilidad. El método funciona mediante la división de cada uno de los cromatogramas a ser alineados (vector de la muestra) en segmentos de tamaño definido y permitiendo el aumento o la disminución de la longitud de estos segmentos para buscar la correlación óptima con los segmentos del vector de referencia (Lucio-Gutiérrez J 2012, Tistaert C. 2012).

1.3.2 Técnicas de análisis multivariante

El análisis multivariante, se refiere a los métodos estadísticos y matemáticos que analizan simultáneamente medidas múltiples de cada objeto sometido a investigación. Cualquier análisis simultáneo de más de dos variables puede ser considerado como un análisis multivariante. El perfil cromatográfico de una planta medicinal es un sistema multivariable, tanto por la manera en cómo se registran las señales analíticas, como por el número de componentes que se pueden registrar (Cieśła L. 2012). Para el establecimiento de las huellas dactilares se han empleado diversos métodos quimiométricos, entre ellos el análisis de componentes principales (PCA), en el cual se buscan pautas o patrones presentados por las muestras (Tistaert C. 2011).

1.3.2.1 Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA es un método matemático que provee una interpretación general de la información principal contenida en una serie de datos multivariantes, mediante la extracción y visualización de la variación sistemática de los mismos. El PCA es un método no supervisado para el reconocimiento de pautas y es una de las herramientas más utilizadas para establecer la huella dactilar de productos herbales (Tistaert C. 2011). Los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí, llamadas componentes principales (PCs). No todos los componentes principales contienen la misma información; los primeros son los que describen la mayor variación en los datos, que se asocia a la información más relevante, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidas a ruido o error experimental, o ajuste del modelo y pueden ser descartados, ya que explican poca información de las variaciones presentadas en los datos, con lo que se consigue una importante reducción del número de variables. (Garza-Juárez A. 2008, Lucio-Gutiérrez J. 2012).

En los gráficos de los componentes principales es posible ver la correlación entre las diferentes variables y detectar e interpretar pautas de muestras, agrupamientos, similitudes o diferencias y muestras anómalas. Un gráfico de los valores de scores presentados por las muestras en dos componentes principales determinados, permite obtener información sobre la distribución y agrupamiento

natural de las muestras. Muestras más cercanas entre sí son similares y de manera contraria las muestras alejadas entre sí son diferentes.

El gráfico de loadings, en un análisis de PCA, refleja la contribución de las variables en un PC determinado. Analizando conjuntamente el gráfico de scores y loadings se pueden encontrar si existen correlaciones entre algunas variables y la distribución observada en las muestras; así se puede determinar cuáles son las variables importantes para la distinción de muestras (Garza-Juárez A. 2008).

1.3.2.2 Modelado independiente suave de analogía de clases (SIMCA)

Es un método de clasificación supervisado, donde cada clase se modela usando un PCA de forma independiente, de modo que cada clase tiene un modelo específico que lo describe con el número óptimo de PCs. De esta manera, se puede construir un "espacio de la clase", cuyo volumen marca el límite entre las muestras que son descritas por el modelo como pertenecientes a la clase estudiada y las muestras que no pueden ser consideradas como pertenecientes a ella, esto dentro de un nivel seleccionado de confianza. Para conocer si una muestra nueva se ajusta a la clase, la información que se calcula se divide en dos, una parte explicada por el modelo de la clase y otra parte que pertenece a los residuales. Si los residuales de la muestra son significativamente mayores que los de la clase, la muestra es rechazada (Lucio-Gutiérrez, 2012).

1.3.2.3 Técnicas de regresión múltiple

Cuando se desea conocer si existe correlación entre 2 variables ("x" y "y") o se desea predecir ciertas propiedades de una muestra con respecto a alguna variable, se emplean técnicas de regresión. La regresión sobre mínimos cuadrados parciales (PLS) es una técnica que se emplea para construir un modelo estadístico que relaciona variables independientes llamadas predictoras (x), para este caso, la huella dactilar o el perfil cromatográfico, con variables dependientes o de respuesta (y). En PLS el objetivo principal es predecir las variables respuesta. Las variables que muestren una alta correlación con las variables respuesta se les asigna un peso extra porque serán más efectivas en la predicción. Cuando la respuesta consta de una única variable, la técnica de regresión se conoce como PLS1. (Miller J. 2002, Brereton R. 2007).

1.4 Antecedentes

Hoy en día el empleo de la quimiometría es útil para realizar estudios con diferentes alcances, entre ellos la clasificación de especies de plantas muy parecidas, la determinación de huellas dactilares útiles en el control de calidad de fitoproductos, la predicción de propiedades de un extracto de planta, entre otros (Tistaert C. 2012, Araujo P. 2012, Lucio-Gutierrez R. 2012, Rajalahti T. 2011). Por ejemplo Cantarelli, M. y colaboradores (2010) emplearon análisis de PCA, cluster y análisis linear discriminante para clasificar dos especies del género *Achyrocline*: *A. satureioides* y *A. venosa*, basándose en el contenido de minerales de la planta. *A. satureioides* es una hierba de interés etnobotánico de uso cotidiano en América

del Sur, cuyas propiedades han sido estudiadas en profundidad. Por el contrario *A. venosa* es una especie que no ha generado interés debido a que no presenta propiedades medicinales, ni nutricionales. Ambas especies poseen características morfológicas muy similares que las hacen difícilmente distinguibles entre ellas, sin embargo a través del empleo de modelos multivariantes se logró la clasificación.

En el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se inició una investigación sistemática para el desarrollo de técnicas para el control de calidad de medicinas herbales. Entre estos trabajos se desarrollaron y validaron métodos por CLAR-DAD combinados con técnicas quimiométricas para establecer el perfil cromatográfico de *Turnera diffusa* como herramienta de control de calidad, Además Garza-Juárez y colaboradores, establecieron la correlación entre la actividad antioxidante y los perfiles cromatográficos de extractos de *T. diffusa* empleando PLS, los cromatogramas para el análisis fueron obtenidos usando CLAR-DAD (Garza-Juárez A. 2011). En el 2012, Lucio-Gutiérrez en su tesis de doctorado presenta la aplicación de diversos métodos quimiométricos para realizar la caracterización y control de calidad de cuatro plantas medicinales de amplio uso comercial, para las cuales existen informes de confusión, adulteraciones o presentación de reacciones adversas en los consumidores: *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, *Valeriana officinalis* y *Turnera diffusa* para ello empleó espectroscopia de infrarrojo y cromatografía de líquidos de alta resolución (Lucio-Gutiérrez J. 2012).

Dada la vasta cantidad de usos terapéuticos atribuibles a *Morinda citrifolia*, los científicos han investigado diversas actividades en esta planta y se han realizados estudios fitoquímicos enfocados a la identificación de metabolitos secundarios; en la actualidad se han aislado más de 160 compuestos a partir de *Morinda citrifolia*. Existen pocos reportes acerca del control de calidad de productos derivados del Noni y la mayoría se enfoca a los procesos de almacenaje del jugo del fruto (Yang J. 2007). En el 2006 Samoylenko y colaboradores aislaron 7 marcadores para emplearlos como estrategia en el control de calidad de productos elaborados a base de jugo de Noni (Samoylenko V. 2006). Deng y colaboradores, en el 2011 desarrollaron y validaron un método selectivo por CLAR para la determinación cualitativa y cuantitativa de iridoides en diferentes partes de la planta de Noni y de sus productos comerciales; sin embargo estos metabolitos se encuentran en mayor abundancia en el fruto, por lo que, aunque dicha metodología se puede aplicar a cualquier parte de la planta, el trabajo está más enfocado a los frutos (Deng S. 2011). También en el 2010, Nayak y colaboradores, generaron una metodología empleando HPTLC para la establecer la identidad de los frutos de *M. citrifolia*, lo cual puede emplearse como pruebas de rutina para el control de calidad de productos derivados de esta planta (Nayak S. 2010). En cuanto al empleo de técnicas de análisis multivariante en *M. citrifolia*, Katrin Lachenmeier desarrolló una metodología por HPTLC y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS) para el análisis de autenticidad de jugos comerciales de Noni, en donde se utilizó un análisis por PCA para diferenciar entre productos auténticos y adulterados; las muestras se distribuyeron en 3 grupos

pero no se pudo distinguir el factor de agrupación debido a que se desconocían las condiciones del procesamiento del jugo (Katrin L. 2006).

La población yucateca usa de manera indistinta *M. panamensis* y *M. citrifolia* debido a su amplia similitud morfológica y emplea las hojas y el fruto de *M. panamensis*, como un remedio para tratar la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Pérez I. 2008), sin embargo *M. panamensis* no cuenta con suficiente evidencia científica que avale este uso medicinal. En el 2011, se realizó un estudio para determinar el potencial hipoglucemiante y antihiperoglucémico de extractos hidroalcohólicos de hojas de *M. panamensis* mediante ensayos farmacológicos en roedores. Los ensayos demostraron la presencia de efectos antihiperoglucémicos, provocados por las dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/kg de los extractos; también se observaron efectos hipoglucemiantes (Vargas A. 2011). Dicho trabajo forma parte del proyecto "estudio y actividad biológica de *Morinda panamensis*" que se está realizando en los departamentos de Química Farmacéutica y Farmacología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán. Hasta la fecha no se han reportado metodologías para el análisis, el control de calidad o para la autenticación de extractos derivados de esta especie.

1.5 JUSTIFICACIÓN

Morinda panamensis se ha incorporado al uso cotidiano de la población yucateca en general, quien la utiliza como remedio herbal para el tratamiento de diversos padecimientos, entre ellos la DM2, esto es debido a la similitud morfológica en relación a *M. citrifolia* y las propiedades medicinales atribuidas a ésta; sin embargo hay una falta de información científica, médica y química con lo cual se podría garantizar el consumo seguro de esta especie.

No hay reportes de métodos para el control de calidad de productos derivados de ella, por lo que en este trabajo se pretendió desarrollar metodología analítica para la determinación del perfil cromatográfico y de un marcador con lo cual se pudiera contar con información que contribuya al consumo seguro de productos elaborados a base de hojas de *Morinda panamensis*

1.6 HIPÓTESIS

La huella dactilar generada por medio de herramientas quimiométricas permitirá diferenciar entre las especies de *Morinda panamensis* y *citrifolia*.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Establecer la huella dactilar cromatográfica de *Morinda panamensis* y correlacionarla con su actividad antidiabética empleando métodos quimiométricos.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar un método analítico por CLAR-DAD para la obtención de los perfiles cromatográficos en extractos de hojas de *Morinda panamensis*.
2. Establecer la huella dactilar cromatográfica característica de *Morinda panamensis*, aplicando técnicas quimiométricas.
3. Evaluar la capacidad del modelo quimiométrico para reconocer selectivamente productos o extractos derivados de la planta.
4. Desarrollar y validar un método para la cuantificación de un componente del extracto de hojas de *Morinda panamensis*.
5. Construir un modelo quimiométrico por PLS-1 para correlacionar la huella dactilar con la actividad antidiabética.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos y Materiales

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Agilent Technologies modelo 1200 series con detector de arreglo de diodos, equipado con automuestreador, desgasificador y controlador de temperatura para la columna.
- Espectrofotómetro Infrarrojo marca Perkin Elmer Frontier modelo IRL-1280102 con transformada de Fourier y celda de reflectancia totalmente atenuada (ATR).
- Columna cromatográfica Eclipse XDB-C18 (150 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula) marca Agilent Technologies.
- Vortex, VWR Scientific Products.
- Baño de agua con sonicador FS 20 Fisher Science.

- Rotavapor RII BUCHI Switzerland.
- Filtros de nylon (33 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro) (Millipore Millex-HN).

2.2 Programas Computacionales

El pre-tratamiento de los cromatogramas y el análisis Multivariable (PCA, PLS-1 y SIMCA) se realizó mediante el programa The Unscrambler X, CAMO, versión 10.2. El análisis de datos para la validación y para la elección del cromatograma de referencia para aplicar el COW se realizó con el programa Microsoft Office Excel 2007.

2.3 Solventes y Reactivos

Estándar de ácido ursólico (Pureza 98.7% p/p, Aldrich).

Ácido fosfórico, ácido fórmico grado analítico (JT Baker).

Etanol, Metanol grado analítico (JT Baker).

Agua, Metanol, Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker).

Nitrógeno gas (Infra 4.8).

2.4 Muestra vegetal

Para el desarrollo del proceso cromatográfico y de extracción se realizó la recolección de las hojas de *M. panamensis* en el mes de Septiembre de 2010 en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán. Se depositó una muestra del material vegetal en el herbario “Alfredo Barrera Marín” del mismo campus, con número de herbario JS Flores 12720.

Para la determinación de las huellas dactilares y la cuantificación del ácido ursólico presente en las hojas de *M. panamensis*, se realizaron recolectas en cinco zonas del estado de Yucatán (Tabla 2.1 y Figura 2.1) y para el análisis de selectividad del método quimiométrico, se recolectaron hojas de *M. citrifolia* en la Facultad de Veterinaria de la UADY (Tabla 2.1). Las recolectas se realizaron durante 9 meses (noviembre de 2010 a Julio de 2011).

Las hojas fueron secadas en un desecador de herbario durante tres días a una temperatura no mayor de 45 °C. Posteriormente, el material vegetal fue molido en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partícula correspondiente a un tamiz de malla 10 (tamaño de partículas de 2 mm). Las hojas de *M. panamensis* se guardaron en frascos etiquetados los cuales se almacenaron en ausencia de luz, de humedad y a temperatura ambiente. El mismo proceso se usó para las hojas de *M. citrifolia*.

Tabla 2.1 Recolectas de *Morinda panamensis* (MP) y *citrifolia* (MC).

Zona	Especie	Lugar	Etiqueta
A	MP	Facultad Química (UADY)	MPQUI
B	MP	Facultad de Veterinaria (UADY)	MPVET
C	MP	Preparatoria 2 (UADY)	MPPRE
D	MP	Col. Chuburna	MPCHU
E	MP	Dzidzantun	MPDZI
B	MC	Facultad de Veterinaria (UADY)	MCITR

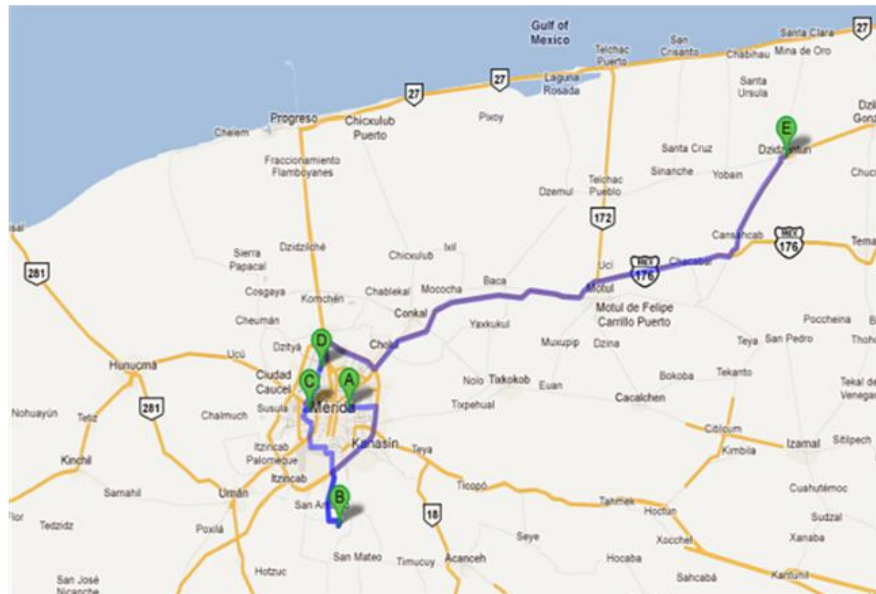


Figura 2.1 Mapa de las zonas de recolecta de muestras de *Morinda panamensis* y *citrifolia*.

2.5 Métodos

2.5.1 Obtención del extracto de *Morinda panamensis* empleado en el desarrollo del procedimiento cromatográfico.

Con el propósito de optimizar las condiciones cromatográficas se trabajó con un extracto de hojas de *M. panamensis* recolectadas en la Facultad de Veterinaria de la UADY, obtenido bajo las siguientes condiciones de extracción:

Se pesaron 3 g de planta molida y se sometió a extracción con 15 mL de una disolución hidroalcohólica de Etanol-Agua (9:1 v/v) la cual se agitó en un Vortex por 3 minutos y se filtró empleando papel Whatman No. 40. La extracción se repitió tres veces y se combinaron los extractos. El disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida a 37° C. Los extractos se etiquetaron y guardaron en atmósfera inerte empleando nitrógeno, en ausencia de luz y se almacenaron en un congelador a -18°C. (Garza-Juárez A. 2010).

Previo a la inyección cromatográfica, 2 mg de extracto seco, se disolvieron en 2 mL de metanol y se agitaron por un minuto en ultrasonido. La disolución se filtró a través de un filtro de membrana de Nylon de 0.45 µm.

2.5.2 Condiciones Cromatográficas

Con el extracto de *M. panamensis* obtenido (sección 2.5.1) se probaron diferentes condiciones cromatográficas para optimizar la separación de los componentes presentes en el extracto. Las variables que se optimizaron fueron las siguientes: composición de la fase móvil, modificador de fase móvil, temperatura de la columna, volumen de inyección, flujo y longitud de onda de registro de datos. Se partió de condiciones cromatográficas empleadas para *M. citrifolia* (Potterat y col. 2002), las cuales se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Variables empleadas para el desarrollo de las condiciones cromatográficas.

Variable	Condiciones Iniciales	Condiciones Evaluadas
Fase Móvil	ACN/H ₂ O	*ACN/H ₂ O *MeOH/ H ₂ O
Modificador de la fase móvil	Ac. Fórmico 0.1 %	Ac. Fórmico 0.1 % Ac. Acético 0.1 %
Temperatura de la columna (°C)	30	25, 30
Volumen de inyección (µL)	20	20, 10
Flujo (mL/min)	1	0.4, 0.6, 1
λ de onda del monitoreo	254	220, 240, 254, 280

*ACN: Acetonitrilo, MeOH: Metanol

Los parámetros de evaluación para seleccionar las mejores condiciones fueron: el número de señales y la separación de las mismas. La separación entre las señales se evaluó a través del factor de separación que se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Donde:

α : Factor de separación

t_{R2} : Tiempo de retención de la señal que se presenta a mayor tiempo de retención

t_{R1} : Tiempo de retención de la señal que se presenta a menor tiempo de retención

2.5.3 Desarrollo del proceso de extracción aplicado a hojas de *Morinda panamensis*.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se desarrolló el proceso de extracción empleando como variables el porcentaje de disolvente extractante y el tipo de energía empleado para la extracción. Los parámetros para seleccionar el mejor proceso fueron el porcentaje de extracción y el porcentaje de la desviación estándar relativa (%DER).

2.5.3.1 Proceso de Extracción 1

Se extrajeron 3 g de hojas de de *M. panamensis*, con 45 mL de una mezcla de Etanol-Agua en distintas proporciones (80, 90 y 100% de Etanol) a temperatura ambiente, empleando una agitación en vortex durante 9 minutos.

2.5.3.2 Proceso de Extracción 2

Se extrajeron 3 g de hojas de *M. panamensis*, con 45 mL de una mezcla de Etanol-Agua al 90 %, a temperatura ambiente y empleando agitación por ultrasonido durante 9 minutos.

El cálculo para el porcentaje de extracción es el siguiente:

$$\text{Porcentaje de extracción} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

En ambos casos el disolvente se eliminó empleando un rotavapor y los extractos se etiquetaron y guardaron en atmósfera inerte empleando nitrógeno, en ausencia de luz y se almacenaron en un congelador a -18°C.

2.5.4 Validación de los métodos cromatográficos

El proceso de validación se llevó a cabo en dos etapas, la primera para la determinación de los perfiles cromatográficos de hojas de *M. panamensis* y la segunda para la cuantificación de ácido ursólico en hojas de *M. panamensis*.

2.5.4.1 Validación del método analítico para la determinación de los perfiles cromatográficos de hojas de *Morinda panamensis*

La validación del método analítico se realizó, tomando como guía los lineamientos establecidos por la AOAC para suplementos alimenticios y botánicos (AOAC, 2002).

2.5.4.1.1 Precisión del sistema cromatográfico

La precisión del sistema cromatográfico se evaluó en el mismo día (precisión intradía) y en días diferentes (precisión interdía). Para evaluar la precisión intradía se realizaron cinco inyecciones del extracto de *M. panamensis* y se determinó el %DER de las alturas de las seis señales más intensas del perfil cromatográfico. Para la determinación de la precisión interdía se realizaron cinco inyecciones del extracto de *M. panamensis* por día, y este procedimiento se repitió durante tres días alternados. El cálculo para %DER es el siguiente:

$$\%DER = \frac{DE}{\bar{X}} * 100$$

Donde:

DE: Desviación estándar.

\bar{X} : Altura promedio.

2.5.4.1.2 Precisión del método de extracción

La precisión del proceso del método de extracción se determinó preparando cuatro extractos a partir de la planta molida y seca, empleando el proceso de extracción previamente establecido. Cada extracto se preparó en distintas fechas. Se calculó el % de DER de las alturas y los tiempos de retención de las seis señales más intensas.

2.5.4.1.3 Robustez del método cromatográfico

Se probó el efecto de pequeñas modificaciones en variables cromatográficas y de la técnica de extracción (Tabla 2.3), esto se realizó a través de un diseño de experimentos de Placket y Burman (Dejaegher B. 2009); para cada variable se escogió un nivel bajo y uno alto, representados por los signo - y + respectivamente (Tabla 2.4).

Cada prueba se realizó por triplicado y los parámetros a evaluar fueron el promedio de los tiempos de retención y las alturas de las seis señales más intensas.

Tabla 2.3 Variables modificadas para la determinación de la robustez.

Factores	Nivel de trabajo	Nivel Bajo	Nivel Alto
X1: Longitud de onda (nm)	220	218	222
X2: Temp. horno (°C)	25	23	27
X3: Vol. de inyección (µL)	10	8	12
X4: Flujo (mL/min)	1	0.8	1.2
X5: Tiempo de extracción (min)	3	1	5
X6: Vol. de extractante (mL)	15	13	17
X7: Etanol (%)	90	88	92

Tabla 2.4 Diseño Plackett-Burman para la determinación de la robustez.

Experimentos	Factores							Respuestas	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	tR	Altura
1	-	-	-	+	+	+	-	s	S
2	+	-	-	-	-	+	+	t	T
3	-	+	-	-	+	-	+	u	U
4	+	+	-	+	-	-	-	v	V
5	-	-	+	+	-1	-1	+	w	W
6	+	-	+	-	+	-	-	x	X
7	-	+	+	-	-	+	-	y	Y
8	+	+	+	+	+	+	+	z	Z

Para evaluar el efecto de cada condición modificada se aplicó la siguiente ecuación:

$$|V| = \bar{V}+ - \bar{V}-$$

en donde:

$\bar{V}+$ = Promedio de las respuestas en donde el factor X es alto (+)

$\bar{V}-$ = Promedio de las respuestas en donde el factor X es bajo (-)

$|V|$ = Es el valor absoluto de la diferencia entre los promedios de las respuestas

Si $|V| > DE \cdot 2^{1/2}$ la diferencia es significativa

DE = Desviación estándar obtenida del estudio de precisión del método

2 = constante referente al nivel estadístico de confiabilidad del 95%

2.5.4.1.4 Estabilidad del extracto

Para determinar la estabilidad, se empleó un extracto de hojas de *Morinda panamensis*, el cual se almacenó a -18 °C y se analizó cada mes, durante cinco meses. Como parámetro de evaluación se tomó en cuenta el número de señales y las alturas de los seis picos más intensos de los perfiles cromatográficos. Se construyeron gráficas control teniendo como valores límites, los datos de la desviación estándar obtenidos del análisis de precisión ($\bar{X} \pm 2 DE$).

2.5.4.2 Validación del método analítico para la cuantificación de ácido ursólico en hojas de *Morinda panamensis*

Además de los parámetros anteriores, para la cuantificación de ácido ursólico también se evaluaron los siguientes parámetros:

2.5.4.2.1 Linealidad

Para la determinación de la linealidad se prepararon tres curvas de calibración a cinco niveles de concentración: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Una vez obtenida la altura de los picos para cada uno de los estándares a las diferentes concentraciones, se capturaron los datos en el programa Microsoft Excel para obtener la regresión lineal y la ecuación de la línea recta.

2.5.4.2.2 Límite de Detección

El límite de detección se determinó a partir de curvas de calibración preparadas por triplicado a cinco niveles de concentración en el intervalo de 0.05 a 0.7 $\mu\text{g/mL}$.

La ecuación empleada para el cálculo es la siguiente:

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{m} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde

m: pendiente de la curva.

Ybl: Es la respuesta del blanco, para lo cual se obtiene otra curva de calibración y se determina la ecuación de la nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco (Ybl). del blanco.

Sbl: Desviación estándar del blanco, se calcula determinando la desviación estándar correspondiente a cada concentración de la curva de calibración que se utilizó para estimar la respuesta del blanco, se calcula la recta correspondiente a concentración vs S y se extrapola a cero, obteniéndose un estimado correspondiente a la desviación estándar del blanco. (Quattrocchi O. 1992).

n: Número de mediciones individuales.

2.5.4.2.3 Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación se determinó a partir de curvas de calibración preparadas por triplicado a cinco niveles de concentración en el intervalo de 0.05 a 0.7 µg/mL. La ecuación empleada para el cálculo es la siguiente:

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{m} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

2.5.4.2.4 Exactitud

La exactitud se determinó evaluando el porcentaje de recuperación al agregar 0.245 mg de ácido ursólico en 3 gramos de muestra de hojas de *M. panamensis*.

$$\text{Recuperación} = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} * 100$$

Donde \bar{X} : es la concentración obtenida y \hat{X} es la concentración adicionada de ácido ursólico.

2.5.4.2.5 Precisión

La determinación de la precisión se realizó utilizando como parámetro el área de la señal que corresponde al ácido ursólico ($t_R = 20.7$ min). Para la determinación de la repetibilidad se realizaron el mismo día, seis inyecciones, de disoluciones estándar de ácido ursólico en concentraciones baja, media y alta; para la determinación de la precisión intermedia, se inyectaron durante tres días consecutivos seis disoluciones estándar de ácido ursólico en concentraciones baja, media y alta, preparadas cada día. Para la determinación de la precisión del método analítico se prepararon cinco extractos de hojas de *M. panamensis* en distintas fechas y se evaluó el %DER del área de la señal correspondiente al ácido ursólico. Con los datos de las lecturas, se obtuvo el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (DE) y el % de la desviación estándar relativa (%DER).

2.5.5 Análisis de las muestras de *Morinda panamensis* y *citrifolia*

Se colectaron 45 muestras de hojas de *M. panamensis* y 9 muestras de hojas de *M. citrifolia*; las muestras se extrajeron por triplicado, teniendo un total de 135 extractos de *M. panamensis* y 27 extractos de *M. citrifolia*; los cuales se analizaron con el método cromatográfico desarrollado para la obtención de los perfiles cromatográficos y la cuantificación de ácido ursólico. Posterior a cada análisis cromatográfico, se realizó la estabilización del sistema durante cinco minutos empleando como fase móvil una mezcla de MeOH:H₂O en proporción 30:70.

Para el manejo de las matrices de los datos cromatográficos, los cromatogramas fueron importados al programa Unscrambler X en formato de valores separados por coma (CSV).

El método validado fue empleado para cuantificar el ácido ursólico en las muestras de *M. panamensis* y de *M. citrifolia* colectadas como se mencionó previamente en este apartado. Los resultados obtenidos se compararon empleando una prueba de hipótesis que consistió en una prueba t para dos muestras suponiendo varianzas distintas.

2.5.6 Análisis Quimiométrico

Se partió de una matriz de datos constituida por 135 cromatogramas de los extractos de *M. panamensis* y 27 cromatogramas de los extractos de *M. citrifolia* y 3936 variables correspondientes a la respuesta del detector a los diferentes tiempos de retención. Con esta matriz se realizó la optimización de parámetros (pre-tratamientos de datos, selección de las regiones de trabajo) para la construcción del modelo óptimo de PCA. Posteriormente se realizó el análisis SIMCA con el propósito de evaluar la selectividad del método quimiométrico para distinguir entre *M. panamensis* y *M. citrifolia*, y por último se utilizó el PLS-1 para correlacionar la huella dactilar cromatográfica y la actividad antidiabética de *M. panamensis*.

2.5.6.1 Construcción del modelo de PCA

Antes de llevar a cabo el análisis de componentes principales, se realizó el pretratamiento de los datos cromatográficos, empleando: corrección de la línea base, normalización unidad-vector y corrección de los desplazamientos de los tiempos de retención usando el método de alineación optimizada mediante correlación (COW, correlation Optimized Warping).

Para la aplicación del algoritmo se seleccionó un cromatograma que sirvió como referencia, y el resto de los cromatogramas se alinearon con respecto a este. Para la selección del cromatograma se calcularon con el programa Excel, los

coeficientes de correlación entre los cromatogramas y se seleccionó aquel vector que presentó mayor número de coeficientes de correlación con valores iguales o mayores a 0.97. En cuanto a los valores de la longitud de segmento (N) y el grado de flexibilidad (t) fueron determinados de manera empírica hasta obtener la combinación en la cual se observe que la mayoría de las señales se encuentren lo mejor alineadas.

Para la construcción del modelo por PCA, se probaron varias regiones del cromatograma para formar la matriz de trabajo. En cada caso se determinó el número de componentes principales óptimos a aplicar en el análisis de PCA, empleando una corrección de fondo. El modelo quimiométrico de PCA se construyó empleando una validación cruzada.

2.5.6.2 Capacidad predictiva del modelo: análisis SIMCA

Para la construcción del modelo SIMCA se consideraron tres regiones de los cromatogramas también utilizadas para el análisis del PCA. El número de componentes seleccionado fue de 12 y los resultados fueron evaluados empleando el gráfico de Si/So vs Ho, que es un gráfico que se refiere a la relación o distancia que hay entre las muestras con respecto al modelo construido (The Unscrambler X).

Se seleccionaron como muestras de clasificación o conjunto de validación externo: nueve muestras de *M. panamensis* y veintisiete de *M. citrifolia*. Para la construcción del modelo SIMCA, se empleó el PCA diseñado para *M. panamensis* excluyendo las nueve muestras de la misma especie que se emplearon para la clasificación.

2.5.6.3 Correlación de las huellas dactilares con la actividad antidiabética

La correlación de las huellas dactilares con la actividad antidiabética se evaluó empleando el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS1). Para la construcción del Modelo PLS-1 se empleó como bloque X, los datos de los perfiles cromatográficos y como vector Y, los datos de las actividades antidiabéticas de los extractos de hojas de *M. panamensis*; Para el bloque X, se probaron las tres regiones de trabajo seleccionadas en el análisis de PCA. El modelo de PLS-1 fue validado mediante una validación completa (full validation). Para el Bloque Y o datos de la actividad biológica, se emplearon los datos de la actividad antidiabética de extractos de hojas de *M. panamensis*, estos datos fueron proporcionados por el laboratorio de Farmacología de la UADY. Se empleó un conjunto de calibración que constó de 45 muestras (o cromatogramas) de *M. panamensis*.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Desarrollo y Validación del Método Analítico

3.1.1 Condiciones Cromatográficas

De los diferentes sistemas cromatográficos que se probaron (Tabla 3.1), se seleccionó el que proporcionó el mayor número de señales y la mejor separación.

Tabla 3.1 Condiciones empleadas en el desarrollo del sistema cromatográfico para el análisis de hojas de *Morinda panamensis*.

Variable	Condiciones Evaluadas	Condiciones Finales
Fase Móvil	ACN/H ₂ O MeOH/H ₂ O	MeOH/ H ₂ O
Modificador de la fase móvil	Ac. Fórmico 0.1% Ac. Acético 0.1%	—
Temperatura de la columna (°C)	25, 30	30
Volumen de inyección (µL)	20, 10	10
Flujo (mL/Min)	0.4, 0.6, 1	1
λ de onda del monitoreo (nm)	220, 240, 254, 280	220
Tiempo de estabilización (min)		5

En la tabla 3.2 se muestra el sistema de gradiente que se empleó para la determinación de las huellas dactilares de *M. panamensis* en donde A corresponde al metanol y B al agua; posterior a cada análisis cromatográfico, se realizó la estabilización del sistema durante 5 minutos empleando como fase móvil una mezcla de MeOH:H₂O en proporción 30:70. El tiempo del análisis cromatográfico fue de 25 minutos.

Tabla 3.2 Programa de gradiente de elución empleado para el análisis de extractos de hojas de *Morida panamensis*.

Tiempo (min)	% A	% B
0	30	70
3	30	70
6	70	30
12	70	30
14	90	10
17	90	10
18	100	0
25	100	0

En la Figura 3.1 se muestra el cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico desarrollado, en el que se observan 23 señales cuyos tiempos de retención se presentan en la tabla 3.3. En la tabla 3.4 se presentan los factores de separación (α) calculados para las señales del cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico desarrollado.

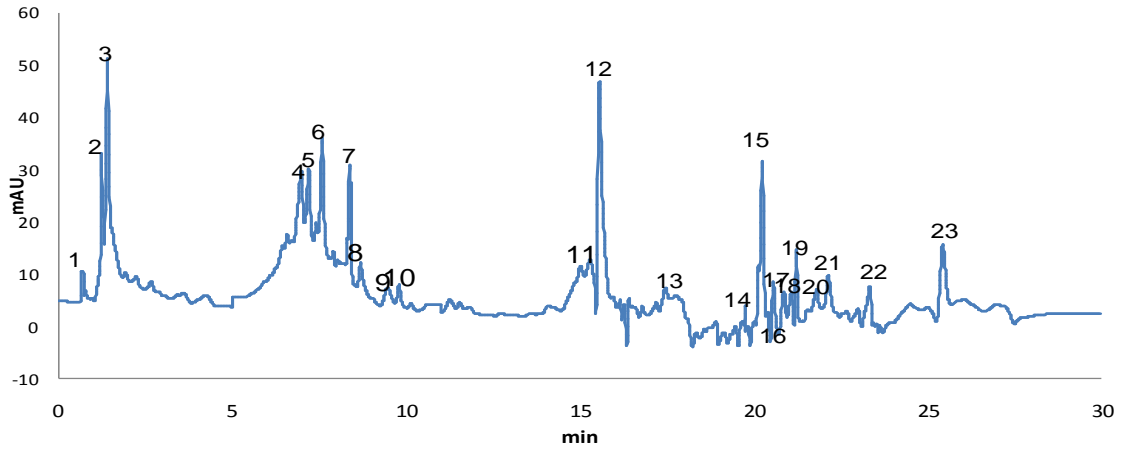


Figura 3.1 Cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico desarrollado.

Tabla 3.3 Valores de t_R correspondientes a las 23 señales obtenidas.

Señal	t_R (min)	Señal	t_R (min)	Señal	t_R (min)	Señal	t_R (min)
1	0.16	7	8.25	13	17.40	19	21.19
2	1.26	8	8.56	14	19.81	20	21.78
3	1.90	9	9.49	15	19.97	21	22.15
4	6.80	10	9.95	16	20.35	22	23.45
5	7.12	11	15.45	17	20.83	23	25.98
6	7.43	12	15.82	18	21.07		

Tabla 3.4. Valores de α calculados para las 23 señales obtenidas con el sistema cromatográfico desarrollado.

Señal	α	Señal	α	Señal	α
1 y 2	2.00	9 y 10	1.04	17 y 18	1.01
2 y 3	1.53	10 y 11	1.63	18 y 19	1.00
3 y 4	4.90	11 y 12	1.02	19 y 20	1.02
4 y 5	1.04	12 y 13	1.10	20 y 21	1.01
5 y 6	1.04	13 y 14	1.13	21 y 22	1.05
6 y 7	1.11	14 y 15	1.00	22 y 23	1.10
7 y 8	1.03	15 y 16	1.01		
8 y 9	1.11	16 y 17	1.02		

3.1.2 Proceso de Extracción

Los resultados de los porcentajes de extracción empleando agitación en vortex y con diferentes proporciones de la mezcla etano:agua, se muestran en la Tabla 3.5, en donde se observa que se obtienen mejores porcentajes empleando el etanol al 90%.

Tabla 3.5 Resultados de recuperación obtenidos empleando la agitación en vortex.

% de Etanol	% de Extracción	%DER
80	11.9 ± 0.66	5.6
90	15.3 ± 0.94	6.2
100	5.3 ± 0.71	13.5

Posteriormente, se tomaron las mejores condiciones obtenidas con la agitación en vortex y estas se compararon con la extracción empleando la agitación en ultrasonido y los resultados se muestran en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 Resultados de recuperación obtenidos empleando la agitación en ultrasonido.

% de Etanol	% de Extracción	% DER
90	9.3 ± 0.65	7.2

Comparando los porcentajes de extracción de ambos métodos cuando se emplea el etanol al 90%, se obtienen mejores resultados con la agitación en vortex, por lo que las condiciones elegidas para el proceso de extracción fueron: etanol al 90% y uso de agitación en vortex como fuente de energía para la extracción. El procedimiento de extracción desarrollado se muestra en la Figura 3.2.



Figura 3.2 Procedimiento de extracción para hojas de *Morinda panamensis*.

3.1.3 Validación del método cromatográfico para la determinación de las huellas dactilares de *Morinda panamensis*

El método analítico desarrollado fue validado, mediante la evaluación de los siguientes parámetros: precisión del sistema cromatográfico, precisión del método de extracción, estabilidad del extracto y robustez del sistema. La validación se realizó sobre seis señales que fueron elegidas por ser las más intensas y estar distribuidas a lo largo del cromatograma, marcadas con los números: 3, 6, 7, 12, 15 y 23 en el cromatograma de la Figura 3.1.

3.1.3.1 Precisión del sistema cromatográfico

Los resultados del análisis de precisión intra e interdía se muestran en las tablas 3.7 y 3.8.

Tabla 3.7 Precisión intradía del sistema cromatográfico empleando como parámetro de evaluación la altura y el tiempo de retención de los picos.

Pico	%DER (Altura)	%DER (t_R)
1	11.83	0.20
2	2.49	0.07
3	4.36	0.05
4	6.97	0.17
5	2.53	0.05
6	2.27	0.03

n= 8

Tabla. 3.8 Precisión intermedia del sistema cromatográfico empleando como parámetro de evaluación la altura de los picos.

Pico	%DER (Altura)	%DER (t_R)
1	14.90	0.39
2	8.13	0.33
3	5.91	0.35
4	5.38	0.62
5	4.00	0.76
6	4.57	1.64

n= 24

Las %DER de los tiempos de retención y alturas de los seis picos considerados para la determinación de la precisión intradía fueron menores o iguales a 0.20 y 11.83% respectivamente y para la precisión interdía fueron menores o iguales a 1.64 y 14.90% respectivamente.

3.1.3.2 Precisión del proceso de extracción

En la Tabla 3.9 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de la precisión del método analítico en donde se empleó la altura de la señal como parámetro de evaluación.

Tabla. 3.9 Precisión intermedia del método analítico empleando como parámetro de evaluación la altura de los picos.

Pico	%DER	Pico	%DER	Pico	%DER
1	12.01	3	6.87	5	6.14
2	6.83	4	16.44	6	7.08

El mayor % de DER se encontró para la señal número 4. Para todos los picos, los % de DER fueron inferiores al 20 % por lo que cumplen con los criterios de la AOAC.

3.1.3.3 Robustez del método cromatográfico

En la Tabla 3.10 y 3.11 se subrayan los valores que ejercen un efecto significativo de los factores evaluados para la determinación de la robustez. Cambios en el flujo afectaron significativamente los tiempos de retención de las seis señales evaluadas; los otros factores no causaron efectos significativos sobre los tiempos de retención del resto de las señales. En cuanto al efecto de estos factores sobre las áreas, el flujo causó un efecto significativo sobre el área de los picos 2 y 3, mientras que el tiempo de extracción afectó el área de la señal 4. Las otras señales no fueron modificadas significativamente por los cambios realizados para este análisis, determinado a un nivel de significancia del 95%.

Tabla 3.10 Resultados de robustez del método analítico empleando como parámetro de evaluación el tiempo de retención.

Señal	$DE \cdot 2^{1/2} t_R$	V Longitud de onda (nm)	V Temp. horno (°C)	V Vol. inyec. (μ L)	V Flujo (mL/min)	V Tiempo extrac. (min)	V Vol. de extrac. mL	V % de extractan te
1	0.1017	0.023	0.019	0.019	<u>0.125</u>	0.018	0.019	0.022
2	0.2046	0.016	0.013	0.044	<u>0.254</u>	0.047	0.052	0.034
3	0.1934	0.036	0.040	0.041	<u>0.237</u>	0.037	0.038	0.038
4	0.4195	0.193	0.003	0.014	<u>0.435</u>	0.211	0.190	0.011
5	0.5793	0.123	0.165	0.129	<u>0.708</u>	0.088	0.093	0.099
6	0.5694	0.038	0.074	0.204	<u>0.668</u>	0.202	0.032	0.194

n= 3

Tabla 3.11 Resultados de robustez del método analítico empleando como parámetro de evaluación las áreas.

Señal	DE*2 ^{1/2} A.	V Lon. de onda (nm)	V Temp. horno (°C)	V Vol. inyec. (µL)	V Flujo (mL/min)	V Tiempo extrac. (min)	V Vol de extrac. mL	V % de Extractante
1	266.12	100.25	138.7	109	200.65	97.95	6.65	181.30
2	116.41	39.35	10.5	29.6	<u>138.05</u>	35.25	14.75	25.80
3	53.05	39.12	6.72	11.12	<u>53.67</u>	13.27	12.87	1.82
4	74.90	7.67	40.07	10.87	10.17	<u>86.92</u>	11.17	15.87
5	98.91	6.25	2.95	79.35	25.50	71.75	19.90	67.75
6	354.91	229.22	33.22	24.17	29.57	295.67	32.92	277.17

n= 3

3.1.3.4 Estabilidad del extracto de hojas de *Morinda panamensis*

Se evaluó la estabilidad del extracto de *M. panamensis* en función del número total de señales y de la altura de las seis señales consideradas en la validación. La Figura 3.3 corresponde al gráfico de control obtenido en función del número total de señales. Los valores límites se establecieron a partir del estudio de precisión ($\bar{x} \pm 2$ DE); el extracto fue estable hasta el día 150 posterior a su preparación.

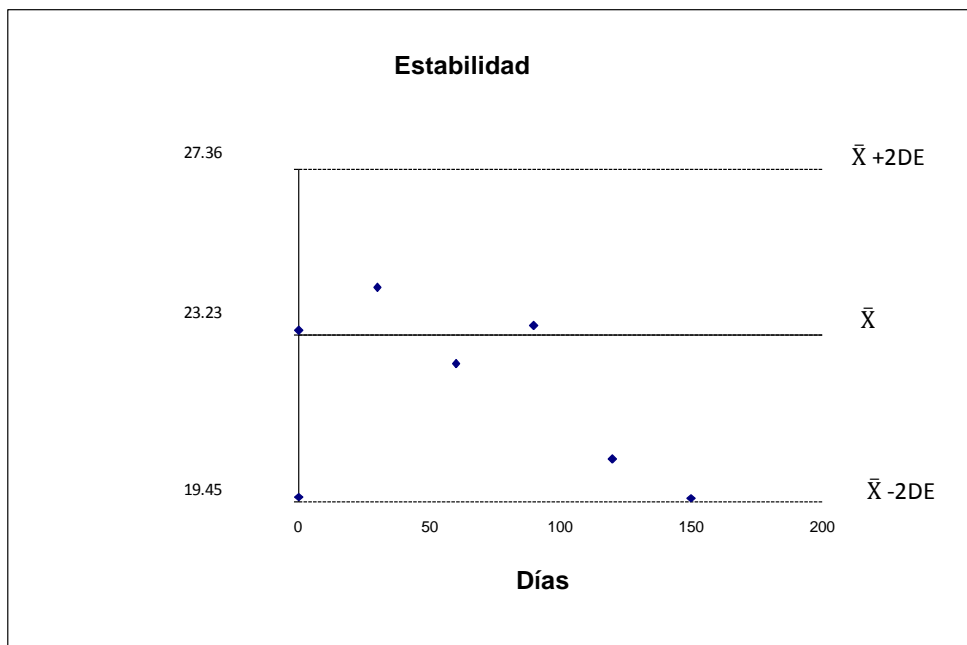


Figura 3.3 Gráfico de estabilidad del extracto de *Morinda panamensis*, en donde \bar{X} es el promedio del número total de señales, y DE es la desviación estándar.

Los resultados de la estabilidad del extracto de hojas de *Morinda panamensis* registrados en función de las alturas de las seis señales escogidas para la validación mostraron que el extracto fue estable hasta el día 150 posterior a su preparación cuando se almacenó a -18°C . En el día 180, cuatro de los componentes de este extracto perdieron su estabilidad, los resultados se presentan en la tabla 3.12.

Tabla 3.12 Resultados de la estabilidad del extracto de *Morinda panamensis*.

Señal	Altura promedio (± DE)	Día					
		30	60	90	120	150	180
1	43.93 (40.68-47.18)	47.01	46.41	46.02	45.74	43.35	<u>*39.92</u>
2	26.93 (25.77-28.09)	27.79	27.52	27.63	26.42	26.33	<u>*25.25</u>
3	27.95 (26.66-29.14)	28.39	28.01	27.83	27.84	27.21	<u>*26.74</u>
4	54.68 (50.94-58.42)	57.86	55.60	53.75	52.29	52.12	<u>*50.02</u>
5	35.41 (33.05-37.77)	37.23	37.11	36.98	36.55	35.18	<u>*34.96</u>
6	10.66 (9.79-11.53)	11.21	11.13	10.94	10.05	9.88	<u>*9.06</u>

* Compuestos no estables

3.2 Modelo quimiométrico de *Morinda panamensis*

3.2.1 Pretratamiento de los datos

El pretratamiento de los datos consistió en realizar la corrección de la línea base, la normalización de los cromatogramas crudos y la optimización de los parámetros para COW (correlation optimized warping) como se explica a continuación.

Corrección de la línea base y normalización de datos

Todos los cromatogramas obtenidos fueron pretratados de la misma manera antes del análisis quimiométrico. El tratamiento de los cromatogramas se realizó en el siguiente orden: Corrección de la línea base, normalización y alineación de las señales. En la Figura 3.4 se muestran los cromatogramas de los extractos de *M. panamensis* originales y en cada una de las etapas del tratamiento.

El cromatograma elegido para emplear como referencia fue el que corresponde a la recolecta del mes de marzo en el sitio de la Prepa 2, este presentó un valor de correlación igual o superior a 0.97 con 35 muestras de un total de 135. Los valores seleccionados de longitud de segmento fue de 60 y el grado de flexibilidad fue de 15, ya que fueron los que mostraron mejor alineación de las señales.

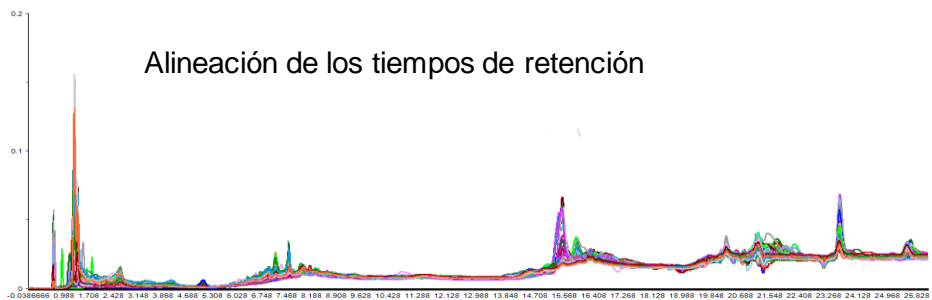
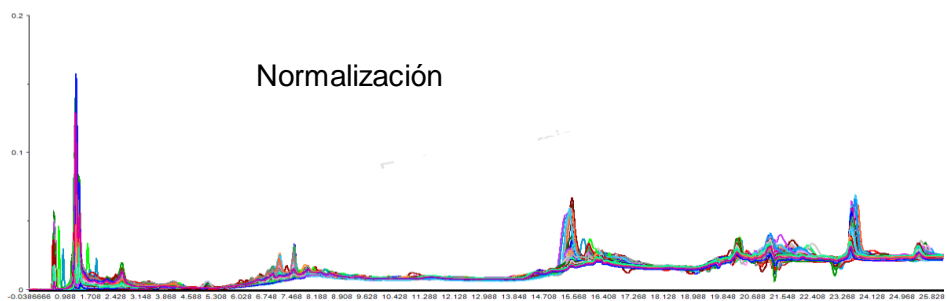
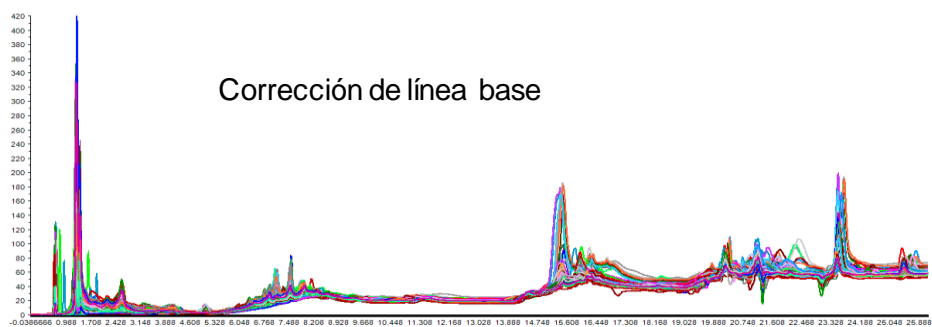
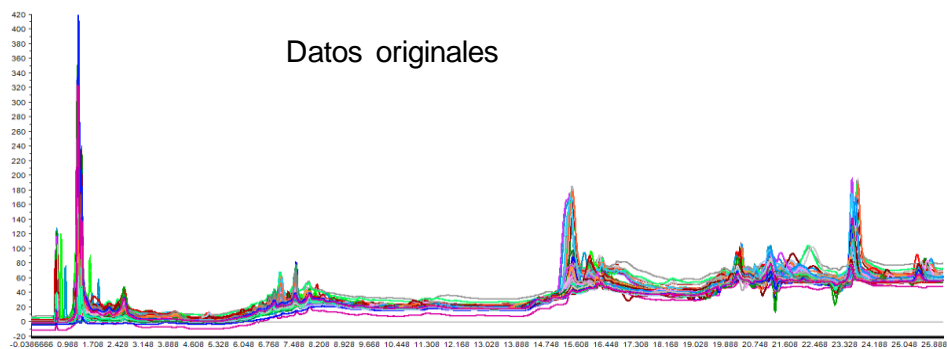


Figura 3.4 Pretratamientos realizados a los datos de los cromatogramas crudos de los 135 extractos de hojas de *Morinda panamensis*.

3.2.2 Análisis de PCA

Se construyeron tres matrices de trabajo a partir de los datos cromatográficos de los extractos de hojas de *M. panamensis* que posteriormente fueron evaluadas. Las regiones de trabajo fueron: a) el cromatograma completo o Modelo 1 (M1), b) el cromatograma excluyendo 2 señales (M2) y c) elección de cuatro zonas del cromatograma (M3). En la Tabla 3.13 se presentan las regiones de trabajo así como el intervalo de tiempos de retención y el número de variables que comprenden. Estas matrices se emplearon para el análisis quimiométrico por PCA, SIMCA y PLS-1.

Tabla 3.13 Regiones de trabajo utilizadas para el análisis por PCA.

Modelos	Tiempo de retención (minutos)	Número de variables
M1	0-26.00	3934
M2	0-15.06, 16.05-23.18, 24.23-26.00	2436
M3	1.17-3.00, 6.18-7.70, 21.70-22.00, 25.20-25.90	673

En la Figura 3.5 se muestran las zonas de trabajo para la construcción del modelo quimiométrico por PCA.

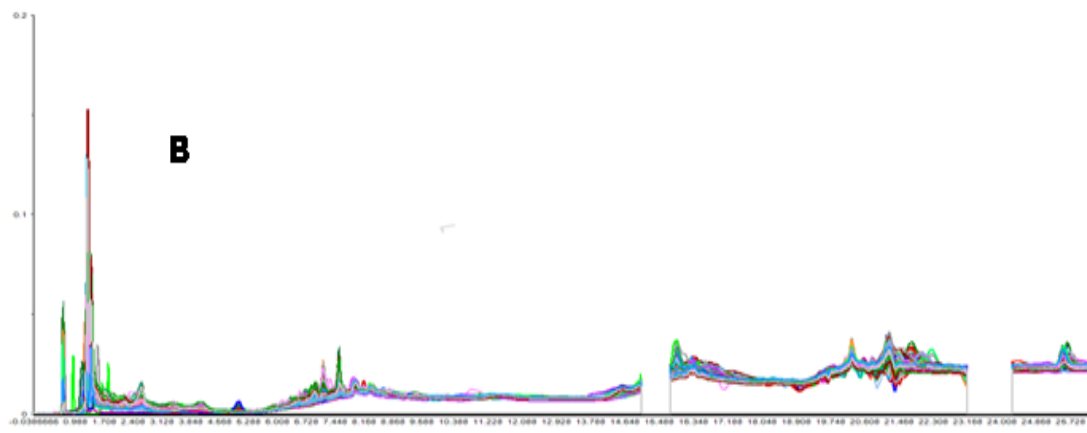
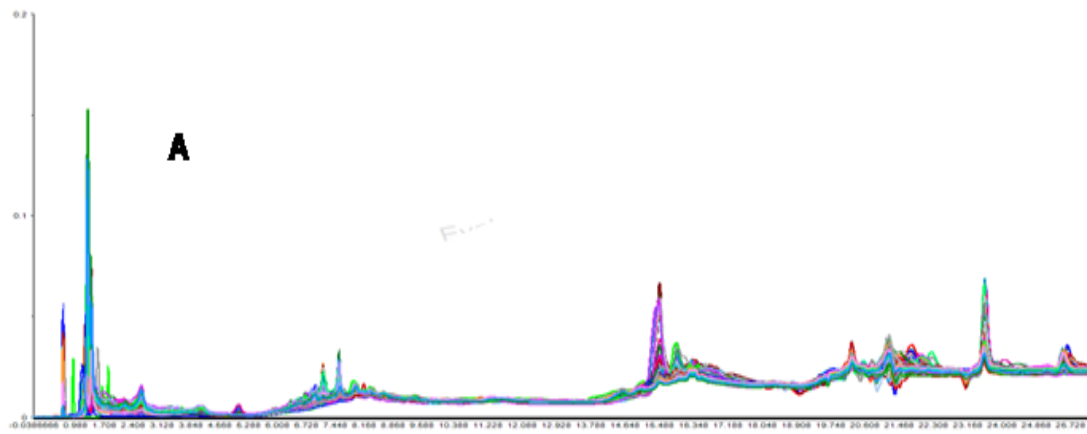


Figura 3.5 Zonas de trabajo empleadas para la construcción del modelo quimiométrico por PCA. A) M1, B) M2, C) M3.

Las Figuras 3.6, 3.8 y 3.10 representan los datos de los PCAs construidos con las regiones de trabajo usadas en los modelos 1, 2 y 3 (Tabla 3.13), en donde se muestran las gráficas de scores (muestras) y loadings (variables) para los componentes 1 y 2 (PC1 y PC2).

Para el modelo 1: en la gráfica de scores (Figura 3.6 A) se observa que las muestras o cromatogramas se distribuyen en dos grupos. El gráfico de los loadings o variables (Figura 3.6 B) indica que las regiones entre 1.27 a 1.47 y 15.27 a 15.92 minutos, son las responsables de ese comportamiento entre las muestras. Para identificar o asignar estas regiones de variables que más influyen en la distribución de las muestras se presenta en la Figura 3.7 un gráfico de loadings en modalidad lineal, en donde se observa que estas regiones corresponden a las zonas marcadas como A y B, los cuales son los que mayor influencia tienen en el modelo de PCA para la primera componente principal.

Para el modelo 2: en la gráfica de scores (Figura 3.8 A) se observa que las muestras se distribuyen en un grupo, y el gráfico de los loadings (Figura 3.8 B) indica que la región entre 1.27 a 1.47 minutos es la responsable del comportamiento observado entre las muestras. Para identificar la región de variables que está influyendo en la distribución de las muestras, se presenta en la Figura 3.9 la gráfica de loadings en modalidad lineal, en donde se observa que esta región corresponde a la zona señalada como A.

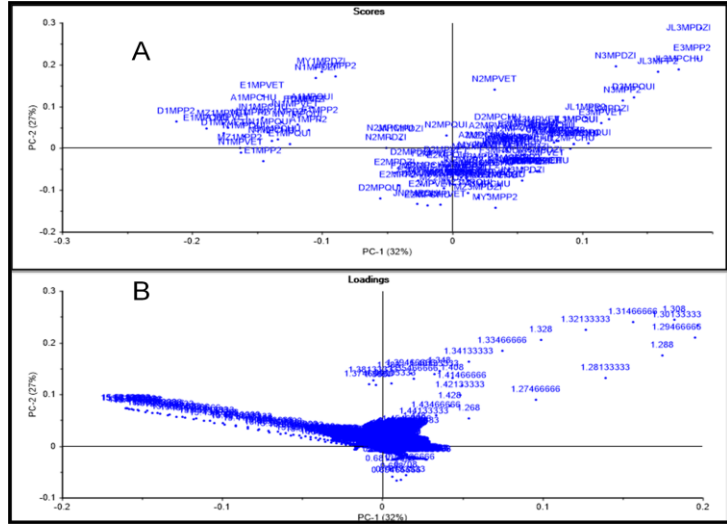


Figura 3.6 Gráficos de doble dimensión del PCA de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*. A) Gráfico de scores o muestras. B) Gráfico de loadings o variables.

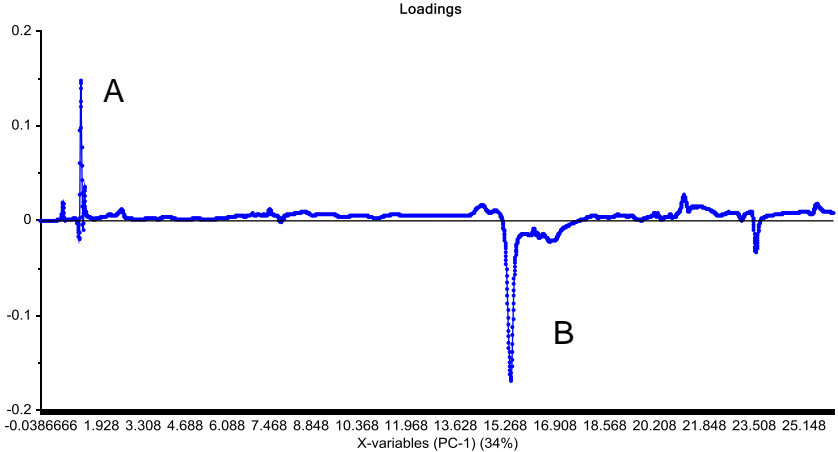


Figura 3.7 Gráficos lineal de loadings o variables del PCA de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*.

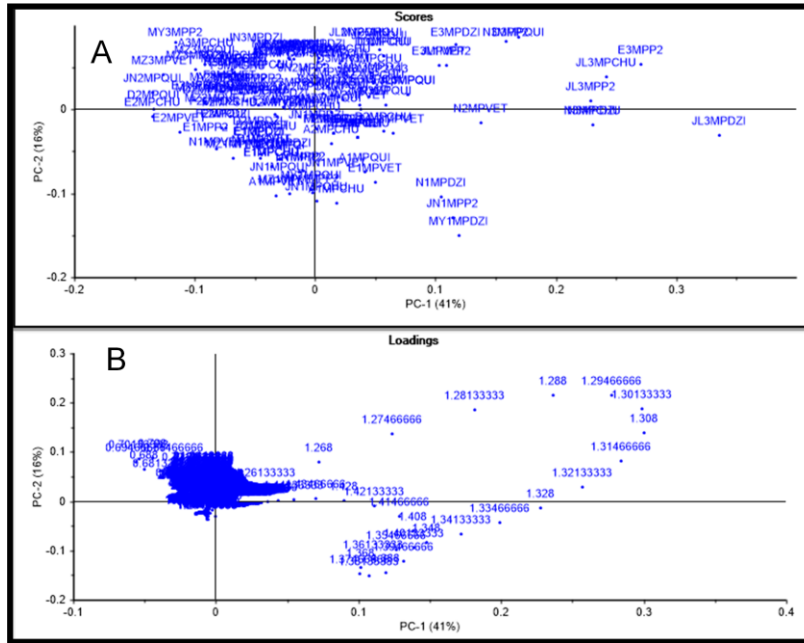


Figura 3.8 Gráficos de doble dimensión del PCA de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*. A) Gráfico de scores. B) Gráfico de loadings.

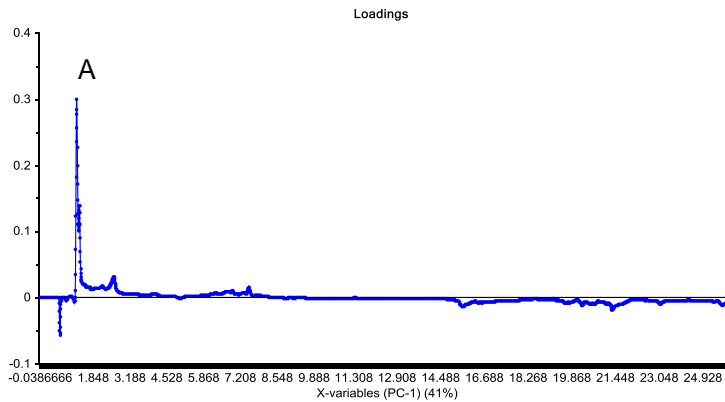


Figura 3.9 Gráficos lineal de loadings o variables del PCA de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*.

Para el modelo 3, la gráfica de scores (Figura 3.10 A) indica que la mayoría de las muestras distribuyen en un grupo y diez muestras se separan de la agrupación. En la gráfica de los loadings (Figura 3.10 B) se pueden identificar cuáles son las variables que tienen más influencia sobre las muestras que se observan separadas y estas son las que se encuentran en el intervalo de 1.26 a 1.46 minutos. Para asignar la región de variables que están influyendo en la distribución de las muestras, se muestra en la Figura 3.11 la gráfica de loadings en modalidad lineal, en donde se observa que estas regiones corresponden a la zona señalada como A.

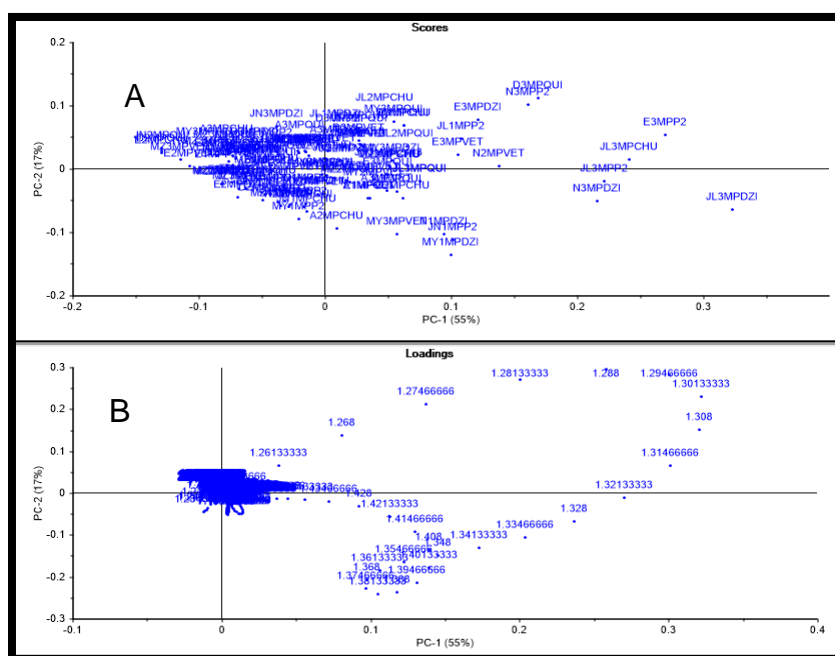


Figura 3.10 Gráficos de doble dimensión del PCA de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*. A) Gráfico de scores o muestras. B) Gráfico de loadings o variables.

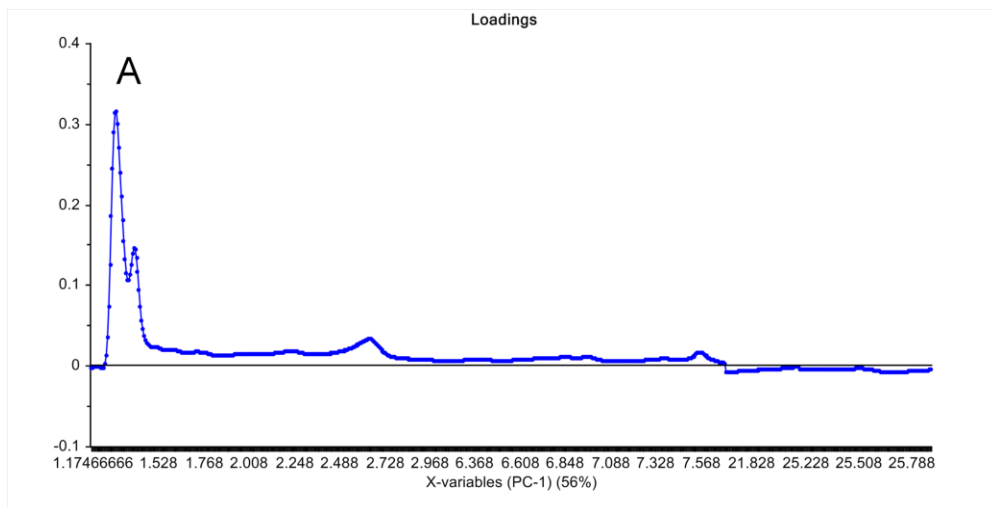


Figura 3.11 Gráficos lineal de las variables (t_R) del PCA de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*.

La comparación entre estos tres modelos se muestra en la tabla 3.14. El modelo 3 considerado como el mejor debido a que presentó el mayor porcentaje de varianza explicada con el menor número de componentes principales.

Tabla 3.14 Comparación de Modelos de PCA.

Modelos de PCA	Número de Componentes	porcentaje de varianza explicada
M1: 130 x 3934	12	90.89
M2: 130 x 3657	13	90.30
M3: 130 x 671	6	90.62

3.3 Determinación de la selectividad del método quimiométrico. (Análisis SIMCA)

Para la construcción del modelo SIMCA se emplearon como grupo de clasificación las muestras que se presentan en la Tabla 3.15. En cuanto a el modelo de PCA empleado para la clasificación se utilizó el modelo tres (M3), correspondientes a las matrices mostradas en la tabla 3.14. Los límites para el espacio definido por el modelo de *M. panamensis* (T^2) y su espacio residual (Q) fueron establecidos a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 3.15 Muestras empleadas como parte del grupo de clasificación para la construcción del modelo SIMCA.

<i>M. panamensis</i>	<i>M. citrifolia</i>
NMPVET-1	NMC-1
DMPDZI-2	DMC-2
EMPCHU-3	EMC-3
FMPP2-1	FMC-1
MZMPQUI-2	MZMC-2
AMPVET-2	AMC-3
MYMPDZI-3	MYMC-4
JNMPCHU-1	JNMC-5
DMPP2-2	DMC-6

Los resultados del análisis por SIMCA fueron evaluados empleando el gráfico de la figura 3.12; en esta gráfica se muestra la pertenencia de una muestra a la clase estudiada, en este caso *M. panamensis*; todas las muestras empleadas se clasificaron como *M. panamensis*, a excepción de una muestra recolectada en el mes de abril, perteneciente a la especie *M. citrifolia*, sin embargo las otras muestras de *M. citrifolia* no se pudieron diferenciar empleando este modelo.

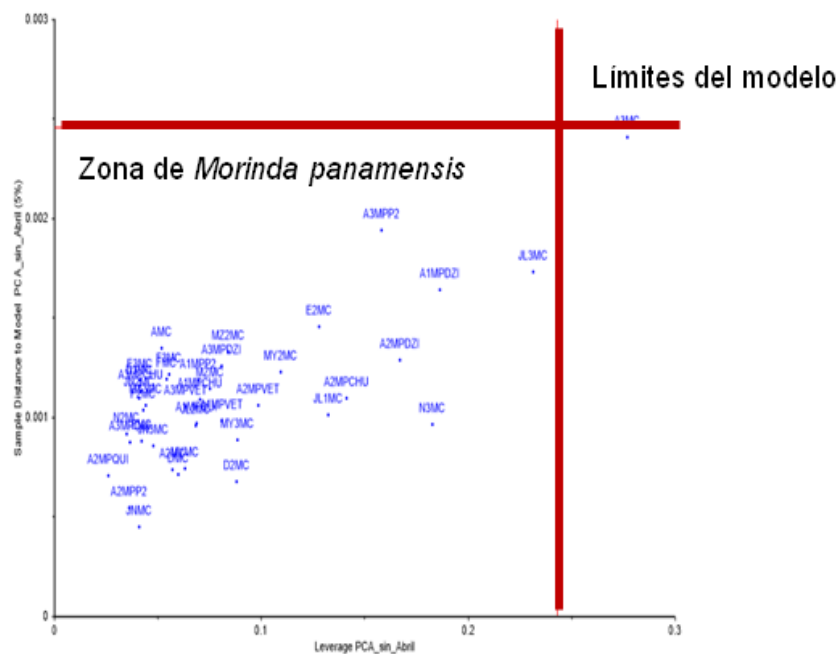


Figura 3.12 Gráfico de clasificación de muestras de *Morinda panamensis*.

3.4 Determinación de ácido ursólico

El método desarrollado para la obtención de los perfiles cromatográficos de hojas de *Morinda panamensis* fue validado para emplearlo para la cuantificación de ácido ursólico presente en hojas de esta especie.

En la Figura 3.13 se observa el cromatograma en donde se indica el pico correspondiente al ácido ursólico en el extracto de hojas de *Morinda panamensis*, el cual presenta un tiempo de retención de 20.5 minutos.

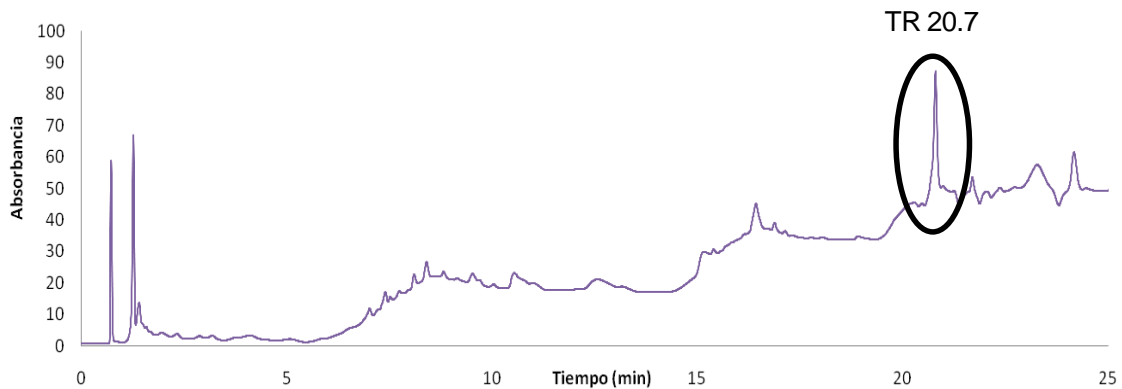


Figura 3.13 Cromatograma del ácido ursólico registrado por CLAR.

3.4.1 Validación del método analítico para la determinación de ácido ursólico.

3.4.1.1 Línealidad, límites de detección y cuantificación.

En la Figura 3.4 se presenta la curva de calibración resultante de la cuantificación del ácido ursólico. El coeficiente de regresión lineal de 0.999, con límites de detección y cuantificación de 0.008 y 0.021 mg/mL respectivamente. Una curva de calibración y la ecuación de la recta se muestran en la Figura 3.14.

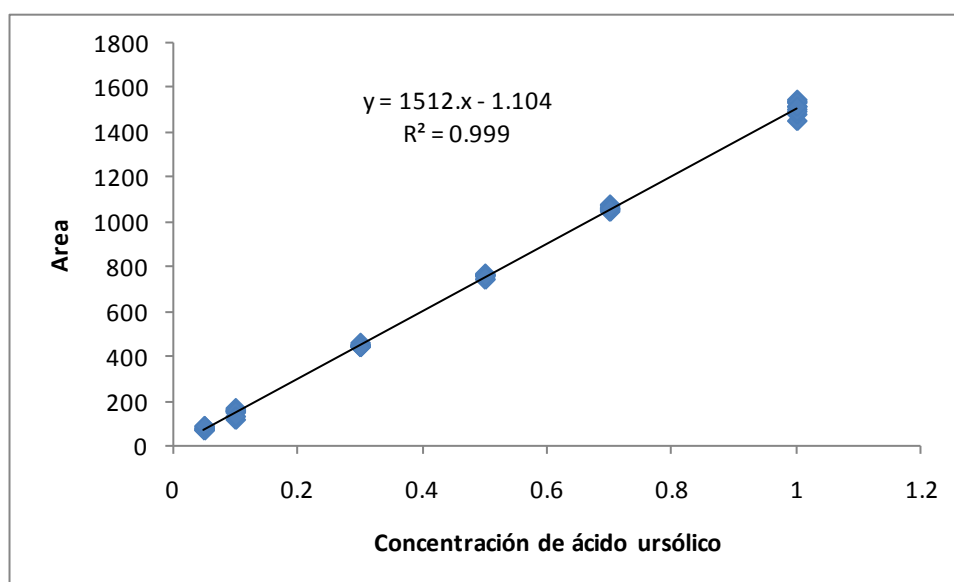


Figura 3.14 Curva de calibración de ácido ursólico.

3.4.1.2. Precisión y exactitud

En la tabla 3.16 se muestra un cuadro con los resultados de la validación.

Tabla 3.16 Resultados de la validación del método por CLAR-DAD para la cuantificación del ácido ursólico en extractos de hojas de *Morinda panamensis*.

Parámetros evaluados		Valores
Linealidad	Ecuación de regresión	$y=1512x+1.104$
	Coefficiente de correlación	0.999
Límite de detección	LD mg/mL	0.008
Límite de cuantificación	LC mg/mL	0.021
Precisión	Precisión intradía: %DER,	3.7
	Precisión interdía:%DER	5.8
Exactitud	%Recuperación	95.60
	%DER	2.57

La precisión intra e interdía del método analítico, expresado como %DER de las áreas de ácido ursólico fue de 3.7 y 5.8 %. El porcentaje de recuperación fue del 95.60 % con un %DER de 2.57; lo cual se encuentra dentro de los criterios establecidos por la AOAC.

3.4.4.2 Cuantificación de ácido ursólico en hojas de *Morinda panamensis* y *citrifolia*.

Los resultados de la cuantificación del ácido ursólico en los extractos de *Morinda panamensis* y *Morinda citrifolia* se presentan en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17 Datos de la cuantificación de ácido ursólico en muestras de *Morinda panamensis* y *Morinda citrifolia*.

	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.
	Concentración (mg/g)								
MPVET	0.072	0.047	0.049	0.060	0.072	0.083	0.080	0.078	0.054
MPDZI	0.070	0.038	0.051	0.078	0.077	0.048	0.069	0.067	0.060
MPP2	0.069	0.047	0.058	0.061	0.048	0.066	0.049	0.046	0.066
MPQUI	0.070	0.053	0.065	0.081	0.081	0.082	0.080	0.082	0.083
MPCHU	0.074	0.083	0.049	0.048	0.079	0.083	0.062	0.062	0.061
MCITR	0.066	0.062	0.058	0.070	0.061	0.061	0.067	0.069	0.079

El valor de $t_{\text{calculado}}$ (0.16) fue menor que el valor de $t_{\text{crítico}}$ (2.08) a un nivel de confianza del 95 %, por lo que no existe diferencia significativa en la concentración de ácido ursólico en ambas especies. Tampoco se observó diferencias entre regiones ni periodos de colecta.

3.5 Correlación de las huellas dactilares con la actividad antidiabética

Para la construcción de un modelo predictivo que pudiera correlacionar los perfiles cromatográficos con la actividad antidiabética de los extractos de hojas de *Morinda panamensis*, se utilizó en análisis de PLS-1. Los resultados mostrados a continuación son los que se obtuvieron con la matriz de datos tres (M3). En la Figura 3.15, se observa una línea azul que representa el ajuste del modelo con los datos proporcionados de las huellas dactilares (bloque X) y la línea roja se refiere a la capacidad del modelo para predecir nuevos datos.

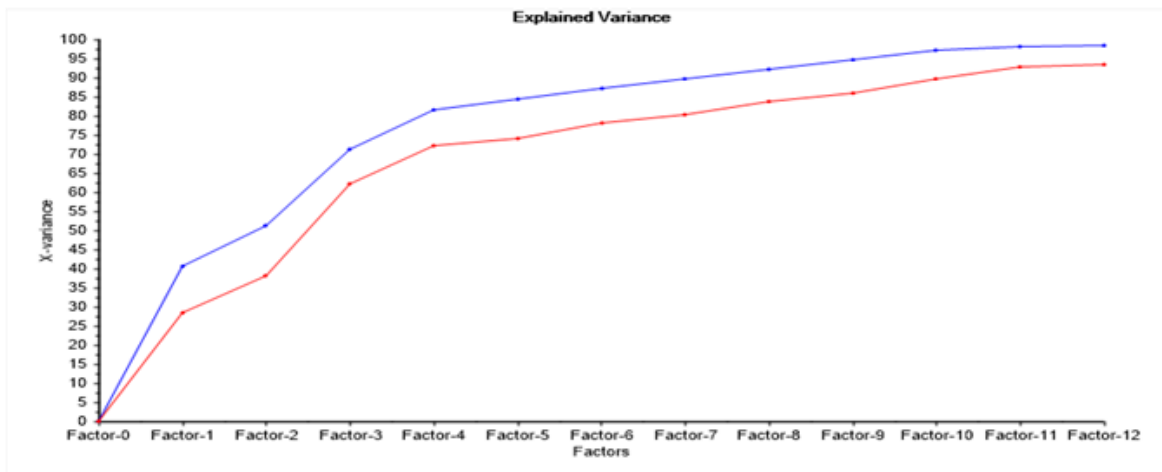


Figura 3.15 Gráfica de ajuste del bloque X al modelo de PLS.

Por otra parte, la Figura 3.16, muestra que el ajuste del modelo para los datos de la actividad antidiabética (valores Y) requiere de hasta 12 variables latentes, línea azul, presentando poca varianza explicada. La línea roja indica la capacidad del modelo para predecir los valores de Y, obtenida por validación cruzada, observándose nula capacidad predictiva para Y del modelo construido.

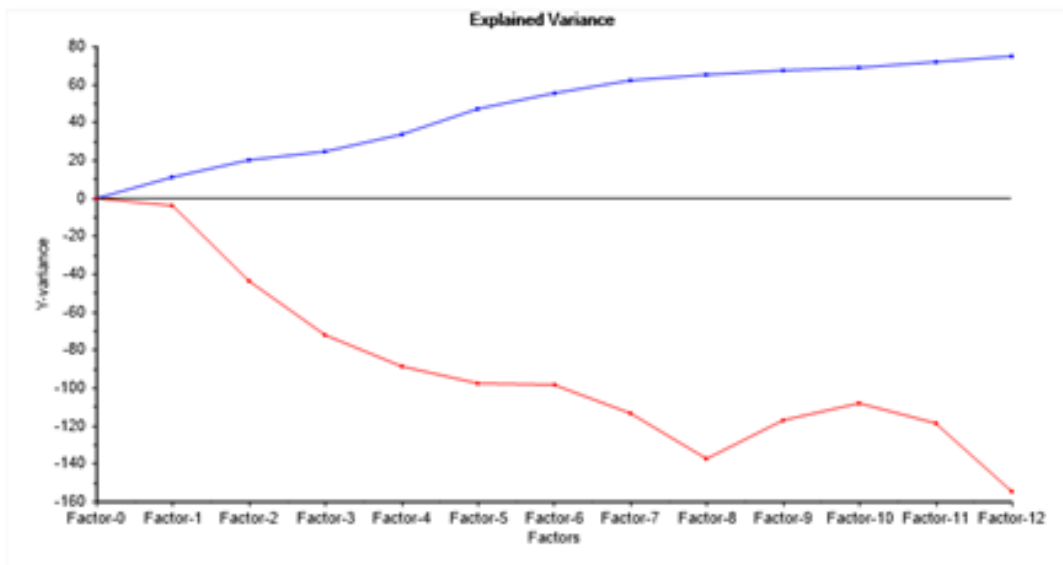


Figura 3.16 Gráfica de ajuste del vector Y al modelo de PLS.

Para este análisis presentó un valor de pendiente de -0.0106 con un RMSE (raíz del error cuadrático medio de predicción) de 4.5999. La distancia del valor de la pendiente a la unidad y el alto valor del RMSE, en conjunto con los datos de la gráfica 3.16, indican que el modelo quimiométrico no es capaz de correlacionar ambas variables. Resultados semejantes se obtuvieron para los otros modelos (M1 y M2).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método por CLAR-DAD para establecer la huella dactilar cromatográfica de hojas de *Morinda panamensis*, bajo las mismas condiciones cromatográficas se validó el método para la cuantificación de ácido ursólico en la misma matriz. CLAR se eligió por ser la técnica cromatográfica más empleada para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de las plantas medicinales. Se analizaron 45 muestras de plantas provenientes de distintas regiones del estado de Yucatán y recolectadas en diferentes épocas del año. Con los cromatogramas obtenidos y aplicando el análisis de componentes principales, se estableció un modelo quimiométrico, que posteriormente fue empleado para clasificar muestras de extractos de hojas de *M. panamensis* y *M. citrifolia*. Empleando la técnica quimiométrica PLS-1, se

determinó también si existe correlación entre el perfil cromatográfico de *M. panamensis* y su actividad antidiabética. Por último, se cuantificó la cantidad de ácido ursólico presente en los extractos de hojas de *M. panamensis* y *M. citrifolia* y se compararon los resultados.

4.1 Condiciones cromatográficas

Para el desarrollo del procedimiento cromatográfico, se partió de las condiciones establecidas por Potterat y colaboradores (2007) para *Morinda citrifolia*, quienes realizaron la cuantificación de varios constituyentes en productos comerciales de noni. Se trabajó con una columna de fase inversa y los sistemas de elución probados fueron los comúnmente usados con este tipo de columnas, como MeOH:H₂O y ACN:H₂O, en diferentes proporciones, obteniéndose mejores resultados con la mezcla MeOH:H₂O; también se probó añadir un modificador de la fase móvil (ácido fosfórico y ácido fórmico al 0.1% en agua) para mejorar las formas de los picos y la selectividad de la columna; sin embargo no se mejoró la resolución de las señales cromatográficas. Se trabajó en el intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm y los cromatogramas fueron analizados a cuatro longitudes de onda representativas de todo este intervalo. Se seleccionó aquella longitud de onda en donde se observaron mayor cantidad de señales y en las que la respuesta del detector fue más intensa.

4.2 Proceso de extracción

Comúnmente para obtener extractos de plantas se emplean mezclas hidroalcohólicas como solventes de extracción, siendo los más utilizados el etanol y metanol (Ong E. 2004, Huie C. 2002), en este trabajo se probaron mezclas tanto con etanol como con metanol.

4.3 Validación del proceso para la obtención de huellas dactilares

La determinación de perfiles cromatográficos o huellas dactilares es un proceso cualitativo por lo que los parámetros empleados para llevar a cabo la validación fueron: precisión del sistema cromatográfico, precisión del procedimiento de extracción, robustez del método analítico y estabilidad del extracto de hojas de *M. panamensis*, cabe mencionar que la determinación de la estabilidad se realizó para el extracto seco.

La validación se llevó a cabo empleando un extracto de las hojas de *M. panamensis* obtenido a partir del proceso de extracción previamente desarrollado. Para la evaluación de los parámetros de validación se seleccionaron los 6 picos más intensos, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo de todo el cromatograma. Estas 6 señales fueron identificadas utilizando el espectro de absorción UV-Vis de cada una de ellas.

Para el estudio de la robustez del método analítico desarrollado se empleó un diseño experimental de Placket-Burman. Se evaluó el efecto de 7 factores, 4

relacionados con el sistema cromatográfico y 3 con el sistema de extracción. Como era de esperarse, la variación en el flujo presentó un efecto significativo en los tiempos de retención de las 6 señales evaluadas, sin embargo solo afectó el área de los picos 2 y 3, esto quizá se atribuya a que son señales poco resueltas, a comparación de las otras restantes.

4.5 Modelo Quimiométrico

El propósito principal al establecer el perfil cromatográfico o huella dactilar de *Morinda panamensis* empleando PCA, fue construir un modelo que incluya las similitudes que existen entre las diferentes muestras de *Morinda panamensis* recolectadas en distintas regiones y épocas del año.

Uno de los problemas cuando se trabaja con matrices complejas como las plantas en cromatografía es el desplazamiento de los tiempos de retención y la dispersión de la línea base (Gong F 2005, Tistaert C. 2011). Para corregir el efecto de estos problemas se probaron varios pre-tratamientos como el suavizado, las derivadas de primer y segundo orden, sin embargo los mejores resultados se obtuvieron con la corrección de la línea base, la normalización y el COW:

La corrección de los desplazamientos del tiempo de retención fue el último pretratamiento de datos realizado y se utilizó el PCA para evaluar la forma de aplicar la alineación de los cromatogramas empleados que conformaron la matriz

de trabajo. En el análisis de PCA; el gráfico de scores sirvió para observar pautas o patrones de comportamiento, las agrupaciones y las similitudes de las muestras después de efectuar cada pretratamiento. (Tistaert C. 2011).

El problema de dispersión en la línea base entre los cromatogramas fue corregido empleando un algoritmo llamado corrección de línea base. Los problemas de las diferencias en las intensidades de las señales se corrigieron empleando la normalización, en donde se realizó un ajuste de todas las señales a una escala fija. (Brereton R. 2007).

Para corregir el desplazamiento de los tiempos de retención de los picos entre los cromatogramas se empleó el COW. Se calcularon los coeficientes de correlación entre todas las muestras y la parte que representa el cuello de botella de este tipo de pretratamiento fue la elección del cromatograma de referencia para lo cual se utilizó un filtro con el propósito de identificar los coeficientes de correlación más altos (≥ 0.97) y se seleccionó aquella muestra que presentó un mayor número de coeficientes de correlación más altos; esto se hizo porque es deseable que el cromatograma de referencia presente una mayor similitud con todos los cromatogramas que se desean alinear, ya que si se realiza una mala elección del cromatograma de referencia, la alineación sería inadecuada. Existen otros métodos para realizar la corrección de los tiempos de retención, entre ellos el alineación de pico blanco, alineación de tiempo dinámico, alineación de tiempo paramétrico, alineación de tiempo semi-paramétrico sin embargo, entre todas ellas la alineación optimizada mediante correlación o COW, es la más popular y efectiva, a pesar de tener la desventaja de que es una técnica que consume

tiempo comparando con las alineaciones que se hacen de manera manual. (Tistaert C. 2012).

Después de haber realizado el pretratamiento se procedió a seleccionar las regiones de trabajo para la construcción del modelo de PCA en base a los siguientes criterios: para el modelo 1 se decidió emplear toda la información aportada por el cromatograma, de tal manera que se trabajó en el intervalo de tiempo de retención correspondiente entre 0 y 25 minutos. Para el modelo 2 se eliminaron 2 señales (t_R : 15.5 y 23.76 minutos) que aparecieron en algunos de los blancos cromatográficos y el efecto de este cambio fue que las muestras se distribuyeron en un solo grupo (Figura 3.8 A) por lo que fue posible identificar las variables que originaban la separación de las muestras (Figura. 3.6). En el modelo 3 se seleccionaron 4 regiones en donde se presentó el mayor número de señales; cabe mencionar que ninguna de estas señales se encontró en los blancos cromatográficos; al analizar estas regiones en el gráfico de scores, se observó que las muestras se distribuyeron en un grupo, igual que en el modelo 2; sin embargo el modelo 2 requirió de 13 componentes para explicar el 90.30 % de varianza, mientras que el modelo 3 utilizó 6 componentes para explicar el 90.62 % de la varianza por lo que el modelo más eficiente fue el 3.

Información adicional se obtuvo en los gráficos de los loadings, donde se identificaron las variables que explican la tendencia o forma de agrupación que las muestras. Las variables que presentaron mayor influencia para los tres modelos seleccionados corresponden a zonas en donde hay señales cromatográficas, lo cual se atribuye a componentes presentes en los extractos de las hojas de

Morinda panamensis; esto es lo deseable en la construcción de un modelo por PCA. Caso contrario sería que las variables con mayor influencia en el modelo correspondieran a zonas donde no hay señales, lo que correspondería al ruido instrumental. (Harynuk J. 2012).

Para la determinación del número de componentes óptimos al aplicar el análisis de PCA, se realizó una corrección de fondo (leverage correction) el cual permite estimar con cuántos componentes es recomendable establecer el modelo al aplicar el PCA.

El propósito principal en este trabajo al construir un modelo quimiométrico por PCA para establecer la huella dactilar de *Morinda panamensis*, es que este sea incluyente y no excluyente, por ello se emplearon muestras de hojas recolectadas en 5 zonas distintas, con condiciones climáticas variadas y durante distintos períodos del año. Considerando el mismo propósito, en la construcción de este modelo únicamente se incluyeron las regiones que fueron comunes a todos los cromatogramas.

4.6 Selectividad del método quimiométrico

El SIMCA es un método de clasificación supervisado en donde cada clase se modela usando un PCA de forma independiente, de modo que cada clase tiene un modelo específico que la describe (Lucio-Gutiérrez J. 2012). Entre las ventajas del SIMCA está que es una técnica que puede emplear desde uno hasta varios modelos para la clasificación de muestras. (Tistaert C. 2011). Las muestras a

discriminar son comparadas con los modelos de las clases y asignadas a alguna de ellas. Esta técnica se ha utilizado exitosamente para clasificar muestras herbales (Gong F 2005). La regla para decidir la clasificación de las muestras estudiadas dice que "si una muestra pertenece a una clase, deberá presentar una pequeña distancia al modelo de la clase" (The Unscrambler 2006) y este modelo presenta unos límites, de tal manera que cualquier muestra que se ubique fuera de estos límites se considera como no perteneciente a la clase.

En este trabajo, el modelo SIMCA se construyó a partir de un solo PCA, el cual corresponde al Modelo 3 establecido para *Morinda panamensis* en la sección 3.2.2. Los resultados obtenidos mostraron que las muestras de las 2 especies estudiadas (Tabla 3.15) se ubicaron dentro de los límites establecidos para la clase de *Morinda panamensis* (Figura 3.12) por lo que el modelo SIMCA construido no fue capaz de discriminar las muestras empleadas; cabe mencionar que los cromatogramas de ambas especies son muy parecidas entre sí.

Una muestra correspondiente al mes de abril de *Morinda citrifolia* se ubicó fuera de los límites de la zona de clasificación (Figura 3.12), sin embargo sus muestras de repetición (triplicados) se ubican en la zona de clasificación por lo que debió haber habido algún problema instrumental (elución cromatográfica) al cual se le pueda atribuir algún cambio en las señales de los cromatogramas y por lo tanto se haya clasificado de manera diferente a sus triplicados.

Debido a que no se encontró selectividad empleando la técnica cromatográfica, se realizó una prueba preliminar empleando espectrofotometría IR, y se determinaron los espectros IR de muestras de hojas de *M. panamensis* y *M. citrifolia*; estos espectros fueron exportados al Unscrambler X, se realizó el tratamiento de los datos y la construcción de un modelo por PCA, sin embargo todas se distribuyeron en la zona de clasificación para muestras de *M. panamensis*.

4.7 Validación del proceso para la cuantificación de ácido ursólico

La misma metodología analítica desarrollada para la obtención de los perfiles cromatográficos se utilizó para cuantificar ácido ursólico, un componente de las hojas de la misma planta y con el propósito de emplearlo como un marcador de las hojas y utilizarlo como una estrategia más para diferenciar entre ambas especies. Se determinó la linealidad, los límites de detección y cuantificación, la precisión y la exactitud de la metodología empleando un estándar de ácido ursólico. Los valores obtenidos estuvieron dentro del criterio de aceptación establecido por la guía de la AOAC empleada para suplementos alimenticios. Los valores encontrados de ácido ursólico estuvieron entre 0.038 – 0.083 y 0.058 - 0.079 mg/g para *Morinda panamensis* y *Morinda citrifolia* respectivamente y no presentaron diferencias significativas entre ambas especies. Las hojas recolectadas en la Facultad de Química fueron las que mostraron una mayor cantidad de ácido ursólico, esto quizá se deba a que el riego en este sitio de muestreo está

garantizado, a comparación de los otros sitios donde el crecimiento de la planta ocurrió de manera silvestre.

4.8 Análisis de predicción de la actividad antidiabética

Entre las técnicas quimiométricas empleadas para la predicción de variables de respuesta o dependientes están la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), la regresión de componentes parciales (PCR) o las técnicas de regresión lineal multivariantes (Garza-Juarez, 2010), la ventaja del algoritmo PLS es que trata de encontrar factores (llamados variables latentes) que maximizan la cantidad de variación explicada en X que es relevante para la predicción de Y, es decir, captura varianza y consigue correlación.

Los resultados mostrados en las gráficas de la Figura 3.15 y 3.16 muestran que los datos de las huellas dactilares de *Morinda panamensis* (Bloque X) se ajustan al modelo de regresión, lo cual indica que el algoritmo de PLS empleado es capaz de describir o predecir las muestras de las huellas dactilares, sin embargo no se observó el mismo comportamiento para los datos de la actividad antidiabética, en donde de acuerdo a la Figura 3.16 no es posible describir el comportamiento de esos datos con respecto al modelo de regresión empleado, por lo que era de esperarse que al graficar la relación entre ambas variables, no se encuentre alguna correlación. Los datos de la actividad antidiabética fueron proporcionados por el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Química de la UADY a partir de una metodología *in vitro* conocida como evaluación del efecto inhibitorio de α -

glucosidasas intestinales. Los efectos observados en los extractos de *Morinda panamensis* indican que las hojas no poseen efectos inhibitorios sobre el complejo enzimático de α -glucosidasas intestinales; sin embargo, es importante destacar que existen reportes (Chen B. 2012, Kang W. 2009) donde se describen importantes efectos de los ácidos triterpénicos, ursólico y oleanólico como inhibidores del mencionado complejo enzimático por lo que resulta necesario encontrar las condiciones optimas para evaluar la actividad antidiabética de hojas de *Morinda panamensis*.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

- Se desarrolló y validó una metodología analítica para la obtención de la huella dactilar cromatográfica de *Morinda panamensis*; el cual también fue utilizado para la cuantificación de ácido ursólico presente en hojas de la misma planta.
- Las muestras analizadas de *Morinda panamensis* y *Morinda citrifolia* no presentaron diferencia significativa en el contenido de ácido ursólico.
- Para la construcción del modelo quimiométrico por PCA de *Morinda panamensis* se requirió aplicar pretratamientos a los datos obtenidos; siendo los más útiles la corrección de la línea base, la normalización y la alineación de las señales cromatográficas. Así mismo, la selección

adecuada de muestras y variables para la construcción del modelo fue especialmente importante, seleccionando una matriz con 130 muestras y 668 variables las cuales correspondieron a cuatro regiones de la huella dactilar que presentaron mayor abundancia de señales.

- Las huellas dactilares cromatográficas y espectroscópicas (FT-IR) de las hojas, no permitieron la diferenciación entre muestras de *Morinda panamensis* y *Morinda citrifolia*.
- El análisis por PLS sugirió que no existe correlación entre la huella dactilar cromatográfica y la actividad antidiabética de los extractos de *Morinda panamensis*.

5.2 Perspectivas

- Obtener huellas dactilares cromatográficas de otras partes de la planta de *Morinda panamensis* para evaluar su posible uso en la diferenciación de las especies: *Morinda panamensis* y *citrifolia*.
- Buscar metodologías alternativas de procesamiento de muestra y adquisición de espectros por FT-IR para la obtención de las huellas dactilares de *Morinda panamensis* a partir de hojas y de otras partes de la planta.
- Estudiar si existe correlación entre la huella dactilar de *Morinda panamensis* y otras actividades biológicas.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad V., Bano S. Isolation of Beta-Sitosterol and Ursolic Acid from *Morinda citrifolia* Linn. J. Chem. Soc. Pak. 2, 71. (1980).

Araujo P. Chemometrics in Chromatography. Preface. J. of Chrom. B. 910,1.(2012).

Arellano J., Flores, S., Tun J., Cruz M. Etnoflora Yucatanense. Nomenclatura, forma de vida, usos, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. UADY. Yucatán. (2003).

AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. (2002).

Ávila-Martínez D., Olivera-Calderón E. Estudio Florístico y Etnobotánico de los Huertos Familiares en la Parte Norte y Oriente de Mérida, Yucatán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México, Marzo. (2007).

Brereton R., In Calibration: Applied Chemometrics for scientist; John Wiley Sons, Ltd. 193-220. (2007).

Cantarelli M., Pellerano R., Del Vitto L., Marchevsky E., Camina J. Characterisation of Two South American Food and Medicinal Plants by Chemometric Methods Based on their Multielemental Composition. Phytochem. Anal. 21, 550-555. (2010).

Ceballos J. Estudio Fitoquímico del Fruto de *Morinda panamensis* Seem. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. (2012).

Chen B, Zhang Q, Wang W, Huang H, Kang W. α -Glucosidase Inhibitory Active Constituents Contained in Nutshell of *Trapaacornis*. 37:1408-11. (2012).

Chízar Fernández C. Plantas Comestibles de Centroamérica; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio): Santo Domingo Heredia. (2009).

Cieśła L. Biological Fingerprinting of Herbal Samples by Means of Liquid Chromatography. 1-9. (2012).

Da Silva V., Silvab G., Bolzani V., Lopes M. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia Sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. *Ecl. Quim. Sao Paulo*. 31, 4, 55-58. (2006).

Dejaegher B.; Vander Heyden Y. The Use of Experimental Design in Separation Science. Tutorial. *Acta Chromatogr*. 21, 2. (2009).

Delgado G., Jiménez M., Saad I., Sánchez A., Reyes R., Céspedes C., Rodrigo J., Fontana B., Collera O., García F., Romo A., Pérez A., Arciniegas A. *Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química UNAM. Primera edición. S. y G. Editores S.A. de C.V. México, (2006).*

Deng S., West B., Palu A., Jensen C. Determination and Comparative Analysis of Mayor Iridoids in Different Parts and Cultivation Sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochem. Anal.* 22, 26-30. (2011).

Deng Y., Chin Y., Chai H., Keller W., Kinghorn A. Anthraquinone with Quinone Reductase-Inducing Activity and Benzophenones from *Morinda citrifolia* (Noni) roots. *J. nat. Prod.* 70, 2049-2052. (2007).

EMA Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products. CPMP/QWP/2819/00. Rev.1.(2006).

EMA Guideline on specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Medicinal Products. CPMP/QWP/2820/00. Rev.1.(2006).

Espitia L. Estudio Fitoquímico de las Hojas de *Morinda panamensis* Seem. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. (2011).

European Food Safety Authority. Safety of Leaves from *Morinda citrifolia* L., Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *The EFSA Journal*. 769, 1-17. (2008).

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, SSA. México 2da. Edición. (2013).

FDA. Guidance for Industry, Botanical Drug Products. Rockville, MD. CDER/FDA 2004.

Feng G., Ye R. New Approach on Similarity Analysis of Chromatographic Fingerprint of Herbal medicine. *Journal of Chromatography A*. 1104, 100-105. (2006).

Ferrer A., Hernández M., Serafín C., Basterrechea M., Fuentes V., Torres M. Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L`Herit. *Revista CENIC ciencias Químicas*. 38. 1, 243-247. (2007).

Fontanay S., Grare M., Mayer J., Finance C., Duval R. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial Spectra and Selectivity Indexes. *J. of Ethnopharma*. 120, 2. (2008).

Garza-Juárez A. Desarrollo y Validación de un Método por CLAR-DAD para Establecer el Perfil Cromatográfico de *Turnera diffusa* como Herramienta de Control de Calidad. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. (2008).

Garza-Juárez A., Salazar-Cavazos M., Salazar-Aranda R., Pérez-Meseguer J., Wasman de Torres N. Correlation between Chromatographic Fingerprints and Antioxidant Activity of *Turnera diffusa*. *Planta Med*. 77, 958-963. (2011).

Gomez A., García-Barrera T., Lorenzo F. Anthocyanins Profile as Fingerprint of Wines Using Atmospheric Pressure Photoionisation Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 570, 101-108. (2006).

Gong F., Wang B., Chau F., Data Preprocessing for Chromatographic Fingerprint of Herbal Medicine with Chemometric Approaches. *Analytical Letters*. 38, 2475-2492. (2005).

Gubler R. El papel del curandero y la medicina tradicional en Yucatán. *Alteridades*. 6, 11-18.(1996)

Hendriks M., Cruz-Juarez L., Bont D., Hall R. Preprocessing and Exploratory Analysis of Chromatographic Profiles of Plant Extracts. *Anal. Chim. Acta*. 545, 53-64. (2005).

Hirazumi A., Furusawa E., Chou S. Immunomodulation Contributes to the Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit Juice. *Proc. West Pharmacol*. 39, 25-27. (1996).

Kang W, Zhang L, Song Y. α -Glucosidase Inhibitors from *Luculia pinciana*. 3:406-9. (2009).

Katrin L., Muoff F., Madeo B., Reush H. Authentication of Noni (*Morinda citrifolia*) Juice. *J. of Agric. and Food Sci*. 102,58-61. (2006).

Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. of Ethnoph*. 49 (1995).

Liang Y., Peishan X., Chan K. Quality Control of Herbal Medicines. *Journal of Chromatography B*. 812, 53-70. (2004).

Loonjang K. Chemical Constituents from the stem of *Morinda elliptica* Ridl. Tesis de Maestría. Prince of Songkla University. Tailandia. (2004).

Lucio-Gutiérrez J. Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. (2012).

Mata R., Rivero-Cruz J., Chávez D. Bioactive Secondary Metabolites From Selected Mexican Medicinal Plants: Recent Progress. En Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, characterization and biological properties. Tringali C. Ed. Taylor & Francis: Gran Bretaña. (2001).

Mathivanan N., Surendiran G., Srinivasan K., Sagadevan E., Malarvizhi K. Review on the Current Scenario of Noni Research: Taxonomy, Distribution, Chemistry, Medicinal and Therapeutic Values of *Morinda citrifolia*. Int. J. Noni Res. 1,1. (2005).

McClatchey W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). Integr Cancer Ther. 1, 110-120. (2002).

Meite S., N`guessan J., Bahi C., Yapi H., Djaman A., Guina F. Antidiarrheal Activity of the Ethyl Acetate Extract of *Morinda morindoides* in rats.. Eur. J. Sci. Res. 28, 4, 621-626. (2009).

Mendoza H., Ramírez B., Jiménez L. *Rubiaceae* de Colombia. Guía ilustrada de Géneros. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá. (2004).

Miller J., Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ta. Edición. Editorial Pearson. Madrid. (2002).

Nayak S., Mengi S. Preliminary Physicochemical and Phytochemical Evaluation of *Morinda citrifolia* Fruit Extractives. Int. J. Pharm. Sci. 12, 150-154. (2010).

Nelson S., Elevitch C. Noni: The Complete Guide for Consumers and Growers. Permanent Agriculture Resources (PAR): China. (2006).

Nordin J., Lajis H., Mooi L., Abdullah M., SUkari M., Ali A. Antitumor Promoting and Antioxidant Activities of anthraquinones isolated from the cell suspension culture of *Morinda elliptica*. Asia-pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 11, 1, 3-7. (2003).

Owen P., Martineau L., Caves D., Haddad P., Matainaho T., Johns T. Consumption of Guava (*Psidium guajava* L) and Noni (*Morinda citrifolia* L) May Protect Betel Quid-Chewing Papua New Guineans Against Diabetes. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17, 635-643. (2008).

Pauli G., Jaki B., Lankin D. Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *Journal of Natural Products*. 68, 133-149. (2005).

Pawlus A., Su B., Keller W., Kinghorn A. An Anthraquinone with Potent Quinone Reductase-Inducing Activity and Other Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J. Nat. Prod.* 68, 1720-1722. (2005).

Pérez-Novelo K., Rodríguez-Dzul L. Estudio Florístico de los Huertos Familiares de Abalá Yucatán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UADY. (2008).

Potterat O., Hamburger M. *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit-Phytochemistry Pharmacology, Safety. *Plant Med.* 73, 191-199. (2007).

Quattrochi O., Abelaira S., Laba R. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. 108-114. (1992).

Rajalahti T., Kvalheim O. Multivariate Data Analysis in Pharmaceutics: A Tutorial Review. *Int. Journ. of Pharm.* 417, 280-290. (2011).

Ramírez D., Ceniceros A., Salazar A., Waksman de Torres. Evaluation of Thin-Layer Chromatography Methods for Quality Control of Commercial Products Containing *Aesculus hippocasium*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Pasiflora incamate* and *Tila occidentalis*. *J. of AOAC International*. 90, 920-924. (2007).

Razmovski-Naumovski V., Tongkao-on W., Kimble B., Qiao V., Beilun L., Li K., Roufogalis B., Depo Y., Meicun Y., Li G. Multiple Chromatographic and

Chemometric Methods for Quality Standardisation of Chinese Herbal Medicines. 12, 99-106. (2010).

Reico M., Giner R., Terencio M. Sanz M., Ríos J. Anti-inflammatory Activity of *Helichrysum stoechas*. *Planta Medica*. 57, A56. (1991).

Reingbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L. Ursolic Acid From *Plantago major*, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Catalyzed prostaglandin Biosynthesis. *J. Nat. Prod.* 61, 1212. (1998).

Rinnan Å., Norgaard L., Berg F., Thygesen J., Bro R., Engelsen S. In Chapter 2 Data Pre-processing; Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control; Academic Press: San Diego, 29-50. (2009).

Robinson M., Zhang X. The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges, 3a ed. WHO Press: Ginebra, (2011).

Samoylenko V., Zhao J., Dunbar C., Khan I., Rushing J., Muhammad I. New Constituents From Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6398-6402. (2006).

Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark R., Badmaev V., Ghai G., Rosen R. Ho C. Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 9, 4478-4481. (2001).

Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B. Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor κ B Activation Induced by Carcinogenic Agents Through Suppression of κ B α Kinase and p65 Phosphorylation. *Cancer Research*. 63, 4375-4383 (2003).

Siddiqui B., Sattar F., Gulzar T., Begum S. Isolation and Structural Determination of a Benzofuran and a Bis-nor-isoprenoid from *Aspergillus* Grown on the Water Soluble Fraction Of *Morinda citrifolia* Linn. Leaves. *Natural Product Research*. 17, 355-360. (2003).

Standley P., Williams L. *Flora of Guatemala, Part XI*, Field Museum of Natural History: Estados Unidos de América, Vol 24, p 126. (1975).

Steinmann D., Ganzera M. Recent Advances on HPLC/MS in Medicinal Plant Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 744-757. (2011).

Takashima J., Ikeda Y., Komiyama K., Kishida A., Ohsaki A. New Constituents from the Leaves of *Morinda citrifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 343-345. (2007).

The Unscrambler User manual. CAMO Software AS. Available at: <http://www.camo.com>. Accessed July 10, 2013.

Tistaert C., Dejaegher B. Chataigné G., Rivière C., Nguyen N., Chau M., Quetin-Leclercq., Vander Heyden Y. Potential Antioxidant Compounds in Mallotus Species Fingerprints. Part II: Fingerprints Alignment, Data Analysis and peak Identification. *Anal. Chim. Acta.* 721, 35-43. (2012).

Tistaert C., Dejaegher B. Vander Heyden Y. Chromatographic Separation Techniques and Data Handling Methods for Herbal Fingerprints: a Review. *Anal. Chim. Acta.* 690, 148-161 (2011).

Vargas-Castillo A. Determinación del Efecto Hipoglucemiante y Antihiper glucémico del Extracto Hidroalcohólico Obtenido a Partir de las Hojas de *Morinda panamensis* Seem. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. (2011).

Wang M., West B., Jensen C., Nowicki D., Su C., Palu A., Anderson G. *Morinda citrifolia* (Noni): A Literature Review and Recent Advances in Noni Research. *Acta Pharmacol. Sin.* 23, 12, 1127-1141. (2002).

West B., Tani H., Palu A., Tolson C., Jensen C. Safety Test and Antinutrient Analyses of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Leaf. *J. of Sci. Food Agric.* 87, 2583-2588. (2007).

WHO. WHO Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP) for Herbal medicines. 2007. Geneva. ISBN: 9789241547161.

WHO. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva. (1998).

Yang L., Wu D., Tang X., Peng W., Wang X. Ma Y., Su W. Fingerprint Quality Control of Tianjihuang by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection. J. of Chromatog. A. 1070,35-42.(2005).

Yang J., Paulino R., Janke-Stedronsky S., Abawi F. Free-Radical-Scavenging Activity and Total Phenols of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Juice and Powder in Processing and Storage. 102, 302-308. (2007).

Zhu Y., Woerdenbag H. Traditional Chinese Herbal Medicine. Pharm. World Sci. 17. 103-112. (1995).