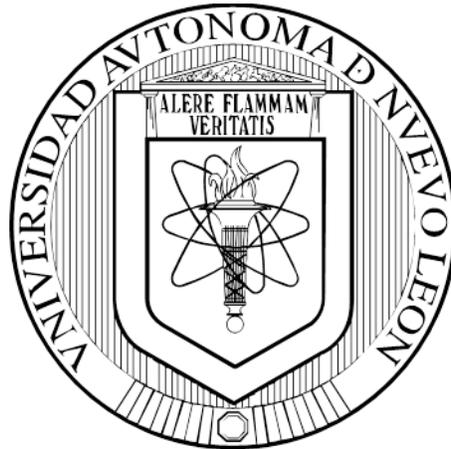


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO HERBOLARIO CON
ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

POR

MC. CECILIA DELGADO MONTEMAYOR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
QUÍMICA BIOMÉDICA**

SEPTIEMBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

POR

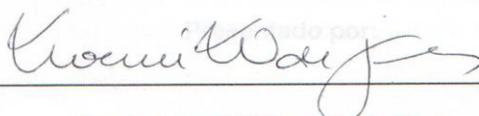
MC. CECILIA DELGADO MONTEMAYOR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
QUÍMICA BIOMÉDICA**

SEPTIEMBRE, 2017

**DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

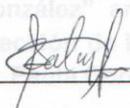
Aprobación de la Tesis:



**Dr. C. Noemí Waksman de Torres
Director de Tesis**



**Dr. C. Paula Cordero Pérez
Co-Director de Tesis**



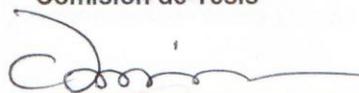
**Dr. C. Ricardo Salazar Aranda
Comisión de Tesis**



**Dr. C. Ma. de la Luz Salazar Cavazos
Comisión de Tesis**



**Dr. C. Rocío Álvarez Román
Comisión de Tesis**



**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

Dr. C. Paula Cordero Pérez

**DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

MC. Cecilia Delgado Montemayor Fecha de graduación: Septiembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título de estudio: Desarrollo de un medicamento herbolario con actividad
hepatoprotectora Presentado por: *Turnera diffusa*

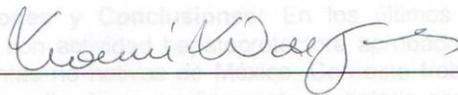
Número de registro: 168 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con Orientación en Química Biomédica

MC. Cecilia Delgado Montemayor

Área de estudio: Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina y
Unidad de Hígado, Hospital Universitario "Dr. José E. González" UANL

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Noemí Waksman de Torres y la co-dirección de la Dr. C. Paula Cordero Pérez.

Director



Dr. C. Noemí Waksman de Torres

Co-Director



Dr. C. Paula Cordero Pérez

RESUMEN

MC. Cecilia Delgado Montemayor Fecha de graduación: Septiembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título de estudio: Desarrollo de un medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*.

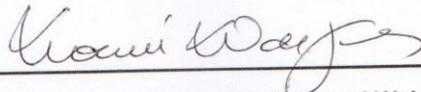
Número de páginas: 166 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Química Biomédica.

Área de estudio: Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina y Unidad de Hígado, Hospital Universitario "Dr. José E. González" UANL.

Propósito y Método del Estudio: El propósito del presente trabajo fue desarrollar un medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa* estandarizado y con criterios de control de calidad. Se realizaron 10 colectas de *T. diffusa*, se estableció y estandarizó el proceso de obtención/purificación del medicamento. Se cuantificó el hepatodamianol, los flavonoides totales, los solventes residuales así como las actividades antioxidantes y hepatoprotectora *in vitro*. Se identificaron los principales componentes por HPLC/MS con el fin de obtener las condiciones mínimas que debe de cumplir el medicamento. Por medio de análisis quimiométrico, se seleccionó la colecta que tuviera mayor similitud con el resto y se realizó la actividad hepatoprotectora *in vivo*. Como parte del desarrollo del medicamento también se determinó su estabilidad en condiciones aceleradas.

Contribuciones y Conclusiones: En los últimos años los medicamentos herbolarios con actividad hepatoprotectora aprobados por COFEPRIS son en base a plantas no nativas de México. Con este trabajo se aportan las bases para el desarrollo de un medicamento herbolario con los suficientes controles de calidad para poder ser empleado como hepatoprotector; en nuestro conocimiento sería el primer medicamento herbolario realizado a partir de *T. diffusa*. Se desarrollaron métodos cromatográficos y espectroscópicos para la identificación del hepatodamianol en muestras de *T. diffusa* y se pudo comprobar que presenta actividad hepatoprotectora *in vivo*.

Director



Dr. C. Noemí Waksman de Torres

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 El Hígado	1
	1.2 Etiología de las enfermedades hepáticas	2
	1.3 Perspectiva actual de las enfermedades hepáticas	3
	1.4 Medicina herbal	5
	1.5 Productos herbolarios en México	5
	1.6 Desarrollo de nuevos productos herbolarios	7
	1.7 Control de calidad en los productos naturales	8
	1.8 Productos naturales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas	11
	1.9 Plantas mexicanas con actividad hepatoprotectora	14
	1.10 <i>Turnera diffusa</i>	19
	1.11 Antecedentes	22
	1.12 Justificación	24
	1.13 Objetivo general	25
	1.14 Objetivos específicos	25
2	MATERIAL Y MÉTODOS	26
	2.1 Material, Equipos y Reactivos	26
	2.1.1 Material	26
	2.1.2 Equipo	28
	2.1.3 Reactivos	30
	2.1.4 Material Biológico	32
	2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)	32
	2.2.1 Sistema de elución	32
	2.3 Condiciones de elución para los cromatógrafos líquidos de alta resolución	32

2.3.1 Sistema para el cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	32
2.3.2 Sistema para la cuantificación de hepatodamianol en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	34
2.3.3 Sistema para el cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución con detectores UV y masas (UHPLC-UV/MS)	35
2.3.4 Sistema para el cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de masas (HPLC-MS/TOF)	37
2.4 Colecta del material herbal	39
2.5 Obtención de extractos primarios	39
2.6 Diseño de experimentos	40
2.7 Fraccionamiento	41
2.7.1 Eliminación de clorofilas	41
2.7.2 Cromatografía de líquidos a vacío	42
2.7.3 Fraccionamiento en columna a baja presión	43
2.8 Cultivo celular	43
2.8.1 Mantenimiento de las líneas celulares	43
2.8.2 Conteo celular	44
2.8.3 Congelamiento de las líneas celulares	45
2.9 Determinación de la citotoxicidad del extracto y fracciones	45
2.10 Determinación de la actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones	47
2.10.1 Modelo de hepatoprotección	47
2.10.2 Determinación de la aspartato	48

	aminotransferasa (AST)	
	2.11 Control de calidad	48
	2.11.1 Determinación de la actividad antioxidante por la técnica de DPPH	48
	2.11.2 Determinación del contenido de flavonoides totales	50
	2.11.3 Determinación de estabilidad acelrada	51
	2.11.4 Determinación de solventes residuales	51
	2.11.5 Cuantificación de hepatodamianol	52
	2.12 Identificación por RMN	52
	2.12.1 Análisis quimiométrico	53
	2.12.2 1D-TOCSY selectivo para la identificación de hepatodamianol	53
	2.12.3 Alineación optimizada mediante correlación COW	54
	2.13 Ensayo <i>in vivo</i>	55
3	RESULTADOS	57
	3.1 Colecta del material herbal	57
	3.2 Fraccionamiento	58
	3.2.1 Obtención del extracto y fracciones	58
	3.2.2 Análisis por HPLC-DAD del extracto y fracciones	59
	3.2.3 Actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones	62
	3.2.4 Actividad citotóxica del extracto y fracciones	63
	3.3 Diseño de experimentos	64
	3.3.1 Identificación de variables que afectan en el proceso de obtención del medicamento herbolario	64
	3.4 Control de calidad del medicamento herbolario	68
	3.4.1 Identidad, análisis por HPLC-DAD	68

3.4.2 Pureza, determinación de solventes residuales	71
3.4.3 Contenido, determinación de flavonoides totales, actividad antioxidante e identificación de principales componentes	72
3.4.3.1 Cuantificación de flavonoides totales	72
3.4.3.2 Determinación de la actividad antioxidante	74
3.4.3.3 Caracterización preliminar de los principales componentes de la fracción Mezcla de flavonoides	75
3.4.4 Actividad hepatoprotectora <i>in vitro</i>	93
3.4.5 Determinación de estabilidad acelerada	95
3.5 Identificación por RMN	98
3.5.1 Análisis quimiométrico, identificación de componentes principales	98
PCA	
3.5.2 1D-TOCSY selectivo para la identificación de hepatodamianol	98
3.5.3 Alineación optimizada mediante correlación COW	101
3.6 Ensayo <i>in vivo</i>	104
4 DISCUSIÓN	107
5 CONCLUSIONES	138
6 PERSPECTIVAS	140
7 ANEXO	141
BILIOGRAFÍA	147

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Plantas mexicanas utilizadas para el tratamiento de las afecciones hepáticas	15
II	Publicaciones científicas de <i>T. diffusa</i> en los últimos años	20
III	Sistema de elución para el HPLC-DAD, gradiente lineal	33
IV	Sistema de elución para la cuantificación de hepatodamianol en el HPLC-DAD, gradiente lineal	35
V	Sistema de elución para el UHPLC-UV/MS, gradiente lineal	37
VI	Sistema de elución para el HPLC-MS/TOF, gradiente lineal	38
VII	Identificación de las variables que afectan el proceso de obtención del medicamento herbolario	40
VIII	Lugar y fecha de las colectas de <i>Turnera diffusa</i>	58
IX	Porcentaje de recuperación del extracto y fracciones	59
X	Actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones obtenidas en el daño con CCl ₄ sobre la línea celular HepG2	62
XI	Citotoxicidad del extracto y fracciones sobre la línea celular HepG2	64
XII	Diseño factorial completo para la obtención del extracto	66
XIII	Optimización del volumen de solvente basado en N12	68
XIV	Optimización del número de extracciones basado en N12	68
XV	Cuantificación de hepatodamianol en los medicamentos herbolarios	70
XVI	Cuantificación de los flavonoides totales de las muestras de medicamento herbolario	73
XVII	Actividad antioxidante de las muestras del medicamento herbolario	74
XVIII	Resultados del análisis por UHPLC-UV/Vis-MS/MS de la fracción Mezcla de flavonoides	77
XIX	Datos espectrales de masas del compuesto g	78
XX	Datos espectrales de masas del compuesto a	81
XXI	Datos espectrales de masas del compuesto c	84
XXII	Datos espectrales de masas del compuesto d	86

XXIII	Datos espectrales de masas del compuesto i	88
XXIV	Datos espectrales de masas del compuesto h	90
XXV	Datos espectrales de masas del compuesto b	92
XXVI	Cuantificación de hepatodamianol en MH4 expuesto a condiciones de estabilidad acelerada	95
XXVII	Características promedio del medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora de <i>T. diffusa</i>	133

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Silybum marianum</i>	11
2	Compuestos principales de la silimarina	13
3	<i>Turnera diffusa</i>	19
4	Estructura del hepatodamianol	23
5	Cámara de Neubauer	44
6	Reacción de reducción del MTT a formazán	46
7	Reacción de cuantificación de la AST	48
	Secuencia de pulsos del experimento 1D-TOCSY.	
8	Durante el bloque MLEV-17 ocurre la propagación de la magnetización a través del sistema de espín	54
9	Cromatograma del extracto metanólico, λ 254nm	60
10	Cromatograma de la fracción extracto s/clorofilas, λ 254nm	60
11	Cromatograma de la fracción Fr. VLC, λ 254nm	61
12	Cromatograma de la fracción Mezcla Flavonoides, λ 254nm	61
13	Actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones obtenidas	63
14	Gráficos de los coeficientes de las variables analizadas en el diseño factorial	67
15	Cromatograma de la mezcla de solventes y muestras para la determinación de solventes residuales	71
16	Cromatograma de la fracción Mezcla de flavonoides, UHPLC-UV-Vis-MS/MS, λ 280 y 350nm	76
17	Estructura propuesta para el compuesto a. 8-C-ramnosil-7-O-ramnosido de luteolina	81
18	Estructura propuesta para el compuesto c. 8-C-ramnosil-	83

	7-O-glucosido de luteolina	
19	Estructura propuesta para el compuesto d. 8-C-ramnosil-7-O-hexapiranos-.2,3-ulosido de luteolina	85
20	Estructura propuesta para el compuesto i. 8-C-ramnosil-7-O-hexapiranos-2,3-ulosido de apigenina	87
21	Actividad hepatoprotectora in vitro de los medicamentos herbolarios	94
22	Actividad hepatoprotectora de MH4 bajo condiciones de estabilidad acelerada	96
23	Comparación de los cromatogramas de MH4 a 0, 3 y 6 meses en condiciones aceleradas de estabilidad (λ 254nm)	97
24	PCA de los medicamentos herbolarios (PC1 vs. PC2)	98
25	1D-TOCSY selectivo para los sistemas de spines de los metilos 6''' y 6'' del hepatodamianol	100
26	Comparación del 1D-TOCSY selectivo del hepatodamianol y MH4	101
27	Alineación mediante COW de los espectros de hidrógeno de los medicamentos herbolarios	102
28	Ponderaje logarítmico del producto acumulativo máximo de los coeficientes de correlación de los medicamentos herbolarios.	103
29	Actividad hepatoprotectora, niveles de AST detectados en suero	104
30	Actividad hepatoprotectora, niveles de ALT detectados en suero	105
31	Cromatograma del experimento S2, λ 254nm	111
32	Cromatograma del experimento S3, λ 254nm	112
33	Cromatograma de la fracción Mezcla de flavonoides a 254 y 350nm	115

34	Estructura base de los flavonoides	116
35	Sistema de nomenclatura para flavonoides glicosilados por Domon y Costello	118
36	Nomenclatura utilizada para los fragmentos de los flavonoides C-glicósidos	119
37	Mecanismo propuesto de ciclación para la pérdida de una molécula neutra de MeOH a partir del ion pseudomolecular $[M+H]^+$ 609	125
38	Sobreposición de los espectros $^1\text{HRMN}$ de los medicamentos herbolarios	128
39	Gráfico de cargas para PC1, contribución de MH9 al primer componente principal	129
40	Gráfico de cargas para PC2, contribución de MH9 al segundo componente principal	129
41	Cromatograma de la muestra MH1, λ 254nm	140
42	Cromatograma de la muestra MH2, λ 254nm	141
43	Cromatograma de la muestra MH3, λ 254nm	141
44	Cromatograma de la muestra MH4, λ 254nm	142
45	Cromatograma de la muestra MH5, λ 254nm	142
46	Cromatograma de la muestra MH6, λ 254nm	143
47	Cromatograma de la muestra MH7, λ 254nm	143
48	Cromatograma de la muestra MH8, λ 254nm	144
49	Cromatograma de la muestra MH9, λ 254nm	144
50	Cromatograma de la muestra MH10, λ 254nm	145

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
[M+H]⁺	Ion pseudomolecular + protón
°C	Grado Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
1D-TOCSY	Espectroscopía de correlación total en una dimensión
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
AcOEt	Acetato de etilo
AlCl₃	Tricloruro de aluminio
ALT	Alanino aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butil hidroxitolueno
C-18	Octadecilsilano
CC₅₀	Concentración citotóxica 50
CCF	Cromatografía en capa fina
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CE₅₀	Concentración efectiva 50
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
cm	Centímetro
cm³	Centímetro cubico
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
COW	Alineación optimizada mediante correlación

DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
DPPH	2.2-difenil-1-picril-hidrazilo
EM	Espectrometría de masas
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EtOH	Etanol
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
h	Horas
H₂O	Agua
HPLC/UV	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de ultravioleta
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos
HR	Humedad relativa
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio
kg	Kilogramo
m/z	Relación masa/carga
MDA	Malondialdehido
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	MegaHertz
min	Minuto

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milisegundo
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NaCl	Cloruro de Sodio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina
PC	Componente Principal
PCA	Análisis de componentes principales
ppm	Partes por millón
R²	Coefficiente de correlación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
u	Unidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UHPLC-UV/Vis-MS/MS	Cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia con detector ultravioleta/visible acoplado a espectrómetro de masas/masas
UI/L	Unidades Internacionales por litro
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
v/v	Relación volumen/volumen
VLC	Columna de líquidos a vacío

α	Alfa
β	Beta
λ	Longitud de onda

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El Hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, pesa aproximadamente 1.3 kg, está situado en el hipocondrio derecho dentro de la cavidad abdominal. La función principal de este órgano es sintetizar una gran variedad de proteínas y actuar como centro de desintoxicación para los múltiples subproductos metabólicos tóxicos endógenos y toxinas ingeridas accidentalmente. Cuenta con un importante suministro de oxígeno a través de la arteria hepática, además la vena porta proporciona nutrientes, compuestos endógenos y otras sustancias que son absorbidas desde el intestino[1].

Está constituido principalmente por cuatro tipos de células: los hepatocitos que son la máquina biosintética, las células endoteliales que sirven como barrera entre la sangre y los hepatocitos, las células de Kupffer las cuales

funcionan como macrófagos y las células estelares que almacenan grasa y vitamina A. El hígado lleva a cabo múltiples funciones, como la formación y excreción de bilis, síntesis de proteínas, detoxificación de xenobióticos y compuestos endógenos, así como regulación de la glucosa sanguínea. A menudo el daño hepático se relaciona con la desregulación de alguna de las funciones del órgano [2], [3].

1.2 Etiología de las enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas son causadas principalmente por medicamentos o fármacos, ingesta de alcohol, infecciones virales (principalmente por los virus de hepatitis B y C), infecciones parásitas, acumulación excesiva de grasa y desórdenes de tipo autoinmune [4], [5]. Estos agentes pueden inducir hepatitis que es un estado de inflamación del hígado. Si este estado es persistente, se produce un proceso crónico reversible denominado fibrosis, que es una acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular (incluyendo colágeno tipo I y III); este proceso tiene el propósito de limitar el daño tisular producido por lesiones hepáticas crónicas independientemente de la etiología. La fibrosis ocurre en los sitios de mayor lesión y usualmente requiere que el estímulo dañino persista durante muchos meses o años [6]. Si bien este proceso clásicamente se había considerado irreversible, la evidencia clínica y experimental sugiere todo lo contrario [5], [7]. La cirrosis es el estado siguiente al que puede evolucionar el hígado si no es

resuelta la fibrosis; sin embargo el estadio exacto en que la fibrosis/cirrosis se hace irreversible es desconocido.

Todos estos procesos pueden culminar en carcinoma hepatocelular, en el cual existe un crecimiento no controlado así como pérdida de la función normal de las células que constituyen el órgano. El cáncer hepático es la tercera causa más común de muerte por cáncer en el mundo; entre un 70-90% de los casos de carcinoma hepatocelular está relacionado con cirrosis y es raramente detectado en etapas tempranas. Sólo el 6-11% de los pacientes con este diagnóstico sobreviven más de 5 años posteriores al diagnóstico [8]. En algunos casos la única alternativa de tratamiento es el trasplante hepático [6], [7].

1.3 Perspectiva actual de las enfermedades hepáticas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que alrededor de 2.4 millones de muertes anuales están relacionadas con alguna enfermedad hepática y que cerca de 800 mil de estas defunciones son atribuidas a cirrosis [9]. Por otro lado, estudios epidemiológicos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía indican que en 2013 en México se registraron poco más de 600 mil defunciones, las principales causas fueron la diabetes mellitus (14.25%), seguida por enfermedades isquémicas de corazón (12.63%), enfermedades cerebrovasculares (5.29%) y enfermedades hepáticas (4.79%). A pesar de los avances en la medicina moderna no se han desarrollado fármacos eficaces que

puedan estimular la función hepática, que regeneren células hepáticas o que ofrezcan protección frente a un determinado daño [10], [11].

Estudios recientes han correlacionado la obesidad y el aumento en el índice de masa corporal con esteatosis, esteatohepatitis no alcohólica y con hepatocarcinoma [8], [12]. La obesidad central, la diabetes mellitus, la resistencia a insulina son factores que predisponen a desarrollar un daño hepático.

En el mundo hay más de 1400 millones de personas con sobrepeso y México ocupa el primer lugar en sobrepeso tanto adulto como infantil [13]. Debido a estos datos, se cree que en México la cirrosis y el cáncer hepático serán un importante problema de salud y se prevé que las enfermedades hepáticas serán importantes causas de morbi-mortalidad en un futuro cercano [1], [14].

Los esfuerzos hasta ahora empleados para controlar las principales etiologías que afectan al hígado han sido enfocados hacia la concientización del uso de bebidas alcohólicas para prevenir la cirrosis alcohólica, la aplicación de vacunas para prevenir las hepatitis virales para aquellos casos en que ya se cuenta con vacuna, así como la investigación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. El aumento en la expectativa de vida con algunos los tratamientos hasta ahora evaluados no ha arrojado resultados satisfactorios; sin embargo por ejemplo para el virus de la hepatitis C hay ya en el mercado nuevos antivirales altamente efectivos con una tasa de curación del 95-100% pero tienen un muy

alto costo [15]; por lo que el descubrimiento de nuevos fármacos efectivos en el tratamiento de las enfermedades hepáticas contribuirá considerablemente en la resolución de este problema en nuestro país en especial y a nivel mundial en general.

1.4 Medicina herbal

Una alternativa a los tratamientos convencionales son los productos naturales; la medicina herbal sin duda alguna han sido de gran importancia para el cuidado de la salud, desde tiempos ancestrales y hasta la actualidad [16]. Evidencia de esto es que más del 70% de los fármacos que ha aprobado la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) en los últimos 30 años tienen una relación directa o indirecta con algún producto natural [17].

1.5 Productos herbolarios en México

En México la Ley General de Salud reconoce tres tipos de productos herbolarios [18]:

1. Medicamento Herbolario: Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de este, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya

eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional. Los medicamentos herbolarios, además de contener material vegetal, podrán adicionar en su formulación excipientes y aditivos. No se consideran medicamentos herbolarios aquéllos que estén asociados a principios activos aislados y químicamente definidos.

2. Remedios Herbolarios: Preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional, el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad.

3. Suplementos alimenticios: Productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes.

Así, la principal diferencia del medicamento herbolario con los remedios herbolarios y suplementos alimenticios radica en que poseen evidencia científica de su utilidad para el alivio, curación, prevención o recuperación de

padecimientos; mientras que los remedios herbolarios solamente se apoyan en el conocimiento popular o tradicional y se emplean como auxiliares sintomáticos. Ambos, se diferencian de los suplementos alimenticios en que estos últimos sólo completan o incrementan vitaminas y minerales.

1.6 Desarrollo de nuevos productos herbolarios

Para recomendar el uso de productos herbolarios es necesario desarrollar una fitoterapia científica o racional; es decir tomar de la fitoterapia tradicional el uso empírico de las plantas, como guía para realizar sobre esas especies profundos estudios que lleven a determinar cuál es el, o cuáles son los principios activos de la misma. El objetivo es hacer un uso adecuado de los preparados a base de plantas con finalidad terapéutica. Para ello, es preciso disponer de medicinas herbales o extractos que cumplan criterios de calidad, seguridad y eficacia que exige cualquier medicamento [19].

Cuando se conoce la o las moléculas responsables de la actividad farmacológica en un producto herbolario es necesario estandarizar su contenido para poder predecir una determinada actividad. La estandarización se puede definir como el establecimiento de la calidad farmacéutica reproducible por medio de la comparación de un producto de referencia establecida y definiendo la cantidad mínima de uno o varios componentes o grupos de componentes que deberían estar presentes. Dado que la naturaleza no provee los productos con composición consistente y estandarizada, la estandarización de un producto

herbal es un proceso complicado, que comienza desde el proceso de cultivo, pasando por el de extracción, almacenaje, transportación, etc.

La estandarización involucra ajustar la preparación vegetal a un contenido definido de uno o varios constituyentes con actividad terapéutica conocida, mezclando diversos lotes, agregando material inerte o adicionando el constituyente activo [20], [21].

Dado el amplio uso que tienen los productos herbolarios en todo el mundo, no es aconsejable confiar solamente en la tradición y creencias milenarias. Al no encontrarse estandarizados este tipo de productos, se desconoce o no se tiene claro la dosis que se está administrando, la cantidad y parte de la planta utilizada, la época y lugar de colecta; afectando todo esto la cantidad de metabolitos terapéuticos que se administran.

1.7 Control de calidad en los productos naturales

Dependiendo del tipo de producto herbal y el propósito para el cual es vendido, se pueden aplicar distintas regulaciones, pero uno de los elementos centrales es siempre la necesidad de definir apropiadamente la identidad del material inicial, así como ciertas consistencias respecto a sus especificaciones.

La gran mayoría de las plantas utilizadas en los países europeos se describen en farmacopeas en forma de monografías; sin embargo, no sucede lo mismo con las plantas consumidas en Latinoamérica. En 2001 surgió en México

la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) la cual se define como un documento expedido por la Secretaría de Salud que consigna los métodos generales para el análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de la calidad de este tipo de productos y su uso adecuado. En 2013 se publicó la segunda edición de la FHEUM donde se agregaron 52 nuevas monografías de drogas vegetales (de las cuales 12 son plantas mexicanas y cuyo desarrollo monográfico es resultado de investigación realizada en nuestro país), 12 nuevas monografías de aceites esenciales y 5 nuevos métodos generales de análisis.

El control de calidad es un proceso múltiple que debe de cubrir todas las etapas, desde el cultivo del material vegetal, hasta el control del producto terminal, y la evaluación de sus estabilidad y calidad a largo tiempo [19]. En general, el control de calidad se basa en tres importantes definiciones farmacopeicas:

- Identidad: ¿Es la planta la que debe ser?
- Pureza: ¿Hay contaminantes que no deberían de estar?
- Contenido: ¿Está el contenido de constituyentes activos dentro de los criterios límites definidos?

Para responder a estas interrogantes, cada medicina herbal debería ser estandarizada, siguiendo, al menos, los lineamientos de la OMS [19].

La identidad se puede verificar por observaciones macro y microscópicas. Fuentes confiables son los ejemplares de herbario. Sin embargo, en los últimos años se ha considerado importante también agregar el perfil cromatográfico y/o espectroscópico del material.

La pureza está íntimamente ligada con la seguridad de los fármacos, y se refiere a la ausencia de contaminantes como material extraño o metales pesados, contaminación microbiana, aflatoxinas, radioactividad y residuos de pesticidas que deben estar ausentes o por debajo de ciertos umbrales previamente establecidos.

El contenido es el parámetro que representa mayor dificultad para su cumplimiento, debido, en principio a la falta de información acerca de la composición de los remedios herbales. La composición química de los productos naturales varía, dependiendo de diversos factores, como especie, quimiotipo, parte de la planta usada, condiciones de almacenamiento, tiempo de cosecha, zona geográfica, lo cual puede dar lugar a variabilidad en cuanto a su acción farmacológica.

Debido a lo anterior el desarrollo de métodos analíticos para evaluar la calidad de estos productos es complicado. Algunos problemas para el desarrollo de métodos analíticos, que presentan las medicinas herbales que no tienen los compuestos de síntesis, son los siguientes: son mezclas complejas, en muchos casos se desconocen los componentes activos, por lo general no están disponibles métodos analíticos o materiales de referencia, el material

herbal es químicamente variable y los distintos métodos de cosecha, secado, almacenamiento, transportación y procesado afectan su composición.

1.8 Productos naturales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas

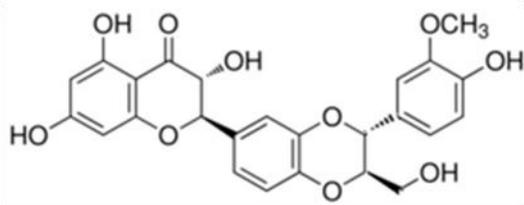
Un ejemplo de un producto natural mundialmente utilizado para el tratamiento de diferentes afecciones hepáticas es *Silybum marianum* (Cardo mariano), planta que pertenece a la familia Asteraceae (Figura 1), es nativa del área del Mediterráneo y crece en el sureste de Europa. A partir de las semillas se extrae la silimarina que es un extracto estandarizado al que se le ha demostrado diversas actividades farmacológicas como: hepatoprotectora, anti-inflamatoria, anti-cancerígena y cardioprotectora [22].



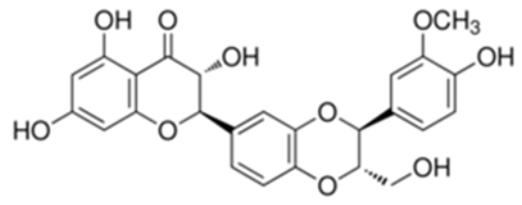
Figura 1. *Silybum marianum*.

La silimarina está conformado por aproximadamente un 70-80% de “flavonoliganos de silimarina” (mezcla de silibinina A y B, isosilibinina A y B,

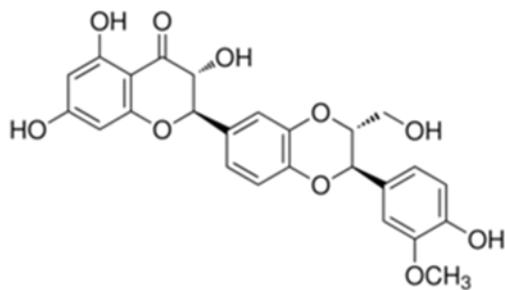
silidianina y silicristina) y flavonoides (taxifolina y quercetina), y el resto de un 20-30% consiste en compuestos indefinidos que son polifenoles polimerizados u oxidados (Figura 2) [22].



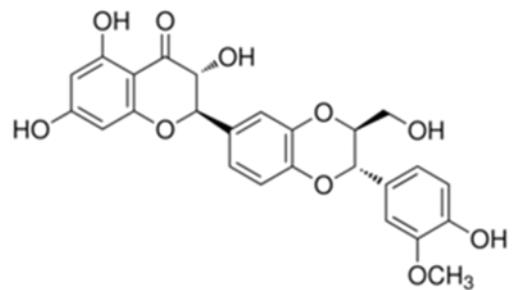
Silibinina A



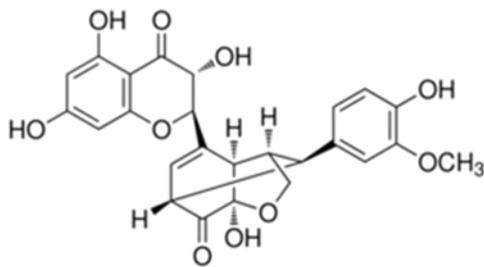
Silibinina B



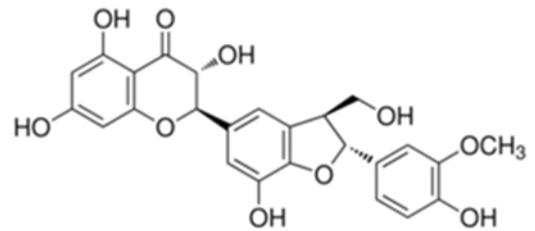
Isosilibinina A



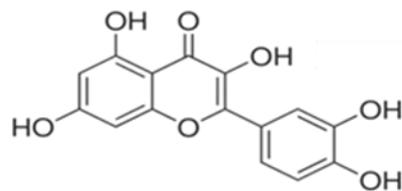
Isosilibinina B



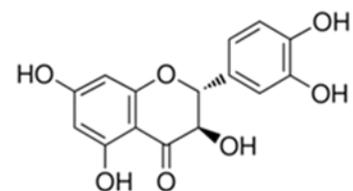
Silidianina



Silicristina



Quercetina



Taxifolina

Figura 2. Compuestos principales de la silimarina.

La silimarina tiene varias propiedades benéficas con atractivo potencial terapéutico para las enfermedades hepáticas producidas por alcohol, así como efectos en la regeneración hepática y en la fibrogénesis hepática, también actúa previniendo la peroxidación lipídica e inflamación [22].

1.9 Plantas mexicanas con actividad hepatoprotectora

En México se han inventariado cerca de 4500 plantas medicinales, se conoce que cerca del 80% de la población mexicana utiliza estas plantas para el alivio de sus enfermedades. De la gran mayoría de las plantas medicinales mexicanas no existen estudios científicos que sustenten su acción, se estima que solo el 10% de estas se han estudiado.

Existen diferentes reportes de plantas mexicanas que se utilizan tradicionalmente para el tratamiento de afecciones hepáticas, ejemplo de estas se muestran en la tabla I [14], [16], [23]–[25].

Tabla I. Plantas mexicanas utilizadas para el tratamiento de las afecciones hepáticas.

Planta	Familia	Nombre común	Parte usada
<i>Arachis hypogaea</i>	Papiloneáceas	Cacahuate Maní	Aceite de cacahuate
<i>Brickellia cavanillesii</i>	Compuestas	Hámula Monterrey Ámula Prodigiosa	Hojas
<i>Cacalia decomposita</i>	Compuestas	Matarique Maturín	Rizomas y raíz
<i>Capriola dactylon</i>	Gramináceas	Gramma Pata de gallo	Toda la planta
<i>Cecropia obtusifolia</i>	Moráceas	Chancarro Guarumo	Hojas
<i>Centaurea americana</i>	Asteráceas	Chancero alegre Flor de canasta Cardo	Semillas y hojas
<i>Chicorium intybus</i>	Asteráceas	Achicoria Ahuirón	Hojas y raíz
<i>Cnicus benedictus</i>	Papavaráceas	Cardo Santo	Toda la planta

<i>Cochlospermum vitifolium</i>	Bixaceas	Árbol del algodón de seda	Corteza
<i>Coleosanthus squarrosus</i>	Asteráceas	Prodigiosa Gobernadora de Puebla	Hojas
<i>Condalia obtusifolia</i>	Ramnáceas	Abrojo Chaparro prieto	Hojas
<i>Conyza filaginoides</i>	Compuestas	Simonillo Hierba amarga	Parte aérea
<i>Cynara scolymus</i>	Compuestas	Alcachofa	Hojas y corazón
<i>Equisetum spp.</i>	Equisatáceas	Cola de caballo Bejuquillo	Tallo
<i>Eupatorium collinum</i>	Compuestas	Hierba del ángel	Hojas
<i>Foeniculum vulgare</i>	Umbelíferas	Hinojo	Raíz, ramas, hojas y semillas
<i>Heterotheca inuloides</i>	Asteraceas	Acáhuatl Árnica	Flores

<i>Juglans mollis</i>	Jyglandaceas	Nogal Nogal encarcelado Nogal blanco	Hojas y corteza
<i>Krameria ramosissima</i>	Krameriaceas	Zarzaparilla	Raíz
<i>Leucophyllum frutescens</i>	Scrophulariaceae	Cenizo Hierba ceniza Palo cenizo	Hojas
<i>Marrubium vulgare</i>	Labiadas	Marrubio	Ramas
<i>Medicago sativa</i>	Pailonáceas	Alfalfa	El jugo
<i>Mespilus germanica</i>	Rosáceas	Níspero	Hojas
<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitáceas	Melón amargo	Frutos
<i>Opuntia imbricata</i>	Cactaceas	Coyonoistle	Frutos
<i>Parthenium incanum</i>	Compuestas	Mariola	Hojas
<i>Prosthechea michuacana</i>	Orquidaceas	Papa de agua dulce Agua Lily	Flores

<i>Psidium guajava</i>	Psidiumnaceas	Guayabo	Raíz, corteza, hojas y frutos inmaduros
<i>Quassia amara</i>	Simarubáceas	Cuasia	Madera
<i>Rhamnus purshiana</i>	Ramnáceas	Cáscara Sagrada	Corteza
<i>Saccharum officinarum</i>	Poáceas	Caña de azúcar	El jugo
<i>Salvia officinalis</i>	Labiadas	Salvia	Hojas y ramas
<i>Smilax medica</i>	Liláceas	Zarzaparrilla Cerveza de raíz	Raíz
<i>Taraxacum officinale</i>	Compuesta	Diente de león Amargón	Hojas y raíz
<i>Thymus vulgaris</i>	Labiadas	Tomillo	Toda la planta
<i>Turnera diffusa</i>	Turneráceas	Damiana Hierba del venado Hierba de la loma	Parte aérea
<i>Verbena carolina</i>	Verbenaceas	Hieba de San José Verbena Poleo negro	Flores y hojas

1.10 *Turnera diffusa*

Es la planta más importante de las especies de la familia de las Turneráceas por su aplicación en la medicina tradicional [26]; conocida popularmente como “Damiana”, es un arbusto que mide de 70-90 cm de altura, tallo ramoso, hojas alternadas, ovaladas y aromáticas, con flores pequeñas de color amarillo (Figura 3) [23].



Figura 3. *Turnera diffusa*.

La importancia actual de damiana en los países industrializados, tanto como una planta medicinal, como planta vendida en el mercado se refleja

indirectamente por un número cada vez mayor de publicaciones científicas recientes que se ocupan de la identificación de la misma en productos en el mercado así como también del control de calidad (Tabla II) [26]–[32].

Tabla II. Publicaciones científicas de *T. diffusa* en los últimos años.

Autor	Año	Trabajo
Kumar [29]	2006	Monografía de la caracterización farmacognósica
Ramírez-Durón [27]	2006	Método por TLC para el control de calidad de productos que contienen damiana
Camargo [28]	2010	Método por HPLC y TLC para el control de calidad de extracto acuoso de las hojas de damiana
Godoi [30]	2004	Método por gases/masas con trampa de iones para el control de calidad rápido y fiable del aceite esencial
Schäffer [31]	2013	Método por gases bidimensional para detectar damiana en mezclas de hierbas de interés forense
Lucio-Gutiérrez [32]	2012	Método de huella dactilar por HPLC de longitud de onda variable para predecir la actividad antioxidante de extractos de damiana, también para control de calidad de productos herbales farmacéuticos.

Es usada a nivel popular para tratar el resfriado común, dispepsia, desbalance hormonal, depresión, desórdenes nerviosos y como aperitivo. La infusión de las hojas es utilizada como antianémica, conceptiva y para contrarrestar la frigidez e impotencia [23], [33], [34].

En la literatura se refieren estudios donde se han evaluado la actividad adaptogénica, antiansiedad, antiaromatasa, antibacteriana, antihiperlipidémica, antioxidante, antiobesidad, antiespasmódica, afrodisiaca, antiulcerativa, gastroprotectora y hepatoprotectora [14], [26], [29], [35]–[54].

De esta planta se han aislado e identificado compuestos de tipo flavonoides, compuestos fenólicos, derivados de ácidos fenólicos y del maltol, glucósidos cianogénicos, sesquiterpenos, triterpenos, politerpenos, derivados de xantina, entre otros [26].

1.11 Antecedentes

Un estudio realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y la Unidad de Hígado del Hospital “Dr. José Eleuterio González” ambos de la UANL, demostró la actividad hepatoprotectora de cuatro plantas de la región noreste de México; las plantas evaluadas fueron *T. diffusa*, *Krameria ramosissima*, *Juglans mollis* y *Centaurea americana*. En este trabajo se demostró que los extractos de *Centaurea americana* (flor y hoja-tallo), *T. diffusa* (parte aérea) y *Juglans mollis* (corteza y hoja) reducían significativamente ($P < 0.001$) los niveles de daño en las células hepáticas en un modelo *in vitro* utilizando células HUH7, por lo que se consideraron excelentes candidatos para aislar posibles compuestos hepatoprotectores [14].

Posteriormente nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de obtener por medio de aislamiento biodirigido un compuesto con actividad hepatoprotectora a partir de *T. diffusa*; el compuesto aislado fue un flavonoide C-glicosilado (Figura 4) que ya había sido reportado anteriormente [33]. Este compuesto denominado hepatodamianol demostró tener una capacidad antioxidante similar a la quercetina y no se le había adjudicado ninguna otra acción farmacológica [55]. Los resultados mostraron que el hepatodamianol fue cuatro veces más efectivo que la silibinina (compuesto utilizado para el tratamiento de enfermedades hepáticas) en el modelo *in vitro* de hepatoprotección desarrollado utilizando células HepG2 [56]. Se presentó la solicitud de patente para el uso de este

compuesto como agente hepatoprotector ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

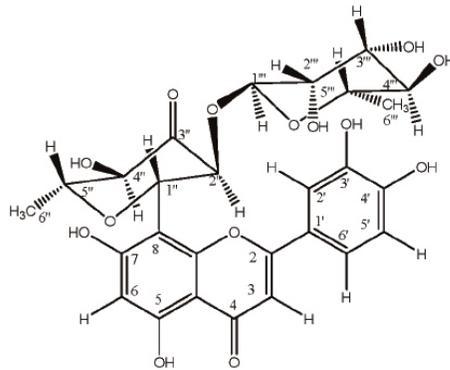


Figura 4. Estructura del heptodamianol.

Si bien los resultados obtenidos son promisorios, el porcentaje de recuperación del compuesto es menor al 8%; las múltiples etapas del proceso de obtención, los costos elevados de material, reactivos y el extenso tiempo de trabajo hacen que la propuesta del uso del flavonoide como un agente hepatoprotector sea poco factible [57].

1.12 Justificación

Debido a la prevalencia que tienen las enfermedades hepáticas y a que las tendencias indican que en años próximos aumentará su incidencia; es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

En México existe una gran biodiversidad y contamos con numerosas plantas a las cuales se les han atribuido diferentes actividades farmacológicas. Tal es el caso de *T. diffusa* que ha demostrado tener actividad hepatoprotectora, recientemente se ha aislado e identificado el componente principal de dicha actividad; sin embargo la obtención de este compuesto es un proceso muy largo y laborioso.

Por lo anterior, se propone la obtención de un medicamento herbolario a partir de *T. diffusa* el cual esté estandarizado y cumpla con criterios de calidad que permitan en un futuro realizar ensayos preclínicos con el mismo.

1.13 Objetivo general

Obtener un medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*

1.14 Objetivos específicos

1. Seleccionar la mejor opción (extracto/fracción) para elaborar un medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*.
2. Optimizar el proceso de obtención del medicamento herbolario.
3. Establecer parámetros para el control de calidad del medicamento herbolario.
4. Evaluar *in vivo* el medicamento herbolario.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Equipos y Reactivos

2.1.1 Material

- Acrodiscos de poro de 0.2 μm membrana de nylon marca Pall Life Sciences
- Cajas de cultivo celular T-25, T-75 y T-175 marca Corning con filtro en la tapa
- Cajas para criotubos con capacidad de 25 marca VWR
- Cámara de Neubauer
- Capilares de 10 μL marca Drummon Wiretrol

- Cartucho de SPE C₁₈ 1000 mg/8 mL marca Alltech
- Columna HPLC fase inversa de octadecilsilano C-18 Hipersyl-Gold 4.6x150 mm, tamaño de partícula de 5µm marca Thermo
- Columna UHPLC fase inversa de octadecilsilano C-18 Hipersyl-Gold 2.1x 50 mm, tamaño de partícula de 1.9µm marca Thermo
- Criotubos de 2 mL de capacidad marca Nalgene
- Cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄ 20x20 marca Merck
- Cubas cromatográficas de 121x108x80 mm
- Embudo Hirsch Pyrex tamaño de poro M (10-15) de 160 mL
- Espátulas para polvos
- Frascos de vidrio ámbar de boca ancha con tapa
- Gradillas
- Jeringas estériles desechables de 1 mL y 5 mL de capacidad
- Licuadora de 7 velocidades, vaso de vidrio marca Licuaturbo man
- Matraces bola de 50 mL, 100 mL y 500 mL con boca esmerilada 24/40 marca Pyrex
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL y 500 mL marca Pyrex
- Matraces Kitazato de 250 mL
- Papel filtro Whatman # 40
- Pipetas automáticas de 100-1000 µL, 20-200 µL y 1-20 µL marca Eppendorf y Accumax Pro
- Pipetas Pasteur

- Pipetas serológicas de 5 mL, 10 mL y 25 mL estériles marca VWR
- Pipetor automático marca VWR
- Placas de 6 pozos de fondo plano, estériles y con tapa marca Corning
- Placas de 96 pozos de fondo plano, estériles y con tapa marca Corning
- Placas de porcelana de 12 pozos
- Probetas de 25 mL, 50 mL y 250 mL marca Pyrex
- Puntillas de 100-1000 μ L, 20-200 μ L y de 1- 20 μ L marca Eppendorf
- Tubos cónicos de 15 mL y 50 mL estériles con tapa marca Corning
- Tubos de ensayo 13 x 100 marca Pyrex y Kimax
- Tubos de poliestireno de 5 mL estériles y con tapa marca VWR
- Tubos eppendorf ambar de 1.5 mL de capacidad marca Eppendorf
- Tubos eppendorf claros de 1.5 mL de capacidad marca Eppendorf
- Vasos de precipitado de 10 mL, 50 mL, 250 mL, 600 mL y 1000mL marca Pyrex

2.1.2 Equipo

- Autoclave marca Market Forge Sterilmatic
- Balanza analítica marca AND modelo GR-120
- Bomba de vacío Gast de 1 caballo de fuerza
- Campana de extracción Lumistell CEE-120
- Campana de flujo laminar marca Prendo modelos CSB 120

- Centrífuga ECMicro-MB
- Centrífuga refrigerada marca Thermo modelo Centra CI3R
- Colector de fracciones BioRad Modelo 2128
- Enfriador y Recirculador Hdake k20
- Espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 7500
- Espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo TOF QSTAR XL, marca Applied biosystems, interfase de ionización por electrospray (ESI)
- Espectrómetro de Masas con analizador de trampa de iones LCQFleet, marca Thermo Scientific, interfase de ionización ESI
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker de 400 MHz Avance III
- Horno de convección marca ShellLab a 40°C
- Horno de calentamiento a 37°C Bluem
- HPLC Waters 600 con automuestreador Waters 717 plus y detector de arreglo de diodos Waters 2996
- HPLC Agilent 1100, bomba cuaternaria y automuestreador
- Incubadora marca Thermo modelo MIDI 40
- Invertoscopio Southern Precisión Instrument
- Lámpara ultravioleta
- Lector de placas marca
- Microscopio con objetivos 4X, 10X, 40X y 100X marca Eagle modelo CM 240

- Placa de calentamiento Cimarec 2
- Refrigerador Daewoo
- Rotavapor Heidolph Laborota 4000-efficient
- Sheaker marca Heidolph modelo Unimax 1010
- Sonicador Branson 2510
- UHPLC Ultimate 3000, (Dionex, Thermo Scientific), bomba cuaternaria, automuestreador y compartimento de columna termostados, detector de longitud de onda variable.
- Vortex VWR Scientific Products

2.1.3 Reactivos

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) marca Sigma
- Acetato de etilo (grado analítico) Marca Fermont
- Ácido acético Marca Fermont
- Ácido fórmico Marca Fermont
- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Antibiótico Penicilina – Estreptomina (10 000 unidades/mL – 10 000 µg/mL) 10 X marca Gibco
- Aspartato AminoTransferasa marca Instrumentation laboratory
- Azul tripano 0.4% probado para cultivo celular marca Sigma
- Bromuro metil tiazol tetrazolio (MTT) marca Sigma

- Buffer de fosfatos en solución salina (PBS) marca Sigma
- Cloruro de metileno (Grado analítico) Marca Fermont
- Dimetil sulfóxido probado para cultivo celular marca Sigma
- Doxorrubicina hidroclicorada marca Sigma
- Etanol (Grado analítico) Marca Fermont
- Hexano (Grado analítico) Marca Fermont
- Hidroxido de sodio
- L-Glutamina 200mM 100X marca Gibco
- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) Marca Gibbco
- Metanol (grado analítico) Marca Fermont
- Metanol (HPLC) Marca Tedia
- Nitrógeno gas de alta pureza grado 5.0 marca AGA
- Nitrógeno líquido
- Quercetina marca TCI América
- Silibinina Marca Sigma
- Sílica gel 60G para cromatográfica en capa fina Marca Merck
- Suero fetal bovino marca Gibco
- Tetracloruro de carbono (Grado reactivo) Marca Sigma
- Tripsina 0.25% 1x marca Gibco

2.1.4 Material Biológico

Se utilizaron las líneas HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y Vero (células de epitelio renal del mono verde) ambas ATCC.

2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron cromatoplasmas base aluminio de sílica gel 60F₂₅₄ las que se cortaron del ancho necesario por 7 cm de altura. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta a 254 nm.

2.2.1 Sistema de elución

El sistema de elución estaba formado por una mezcla de acetato de etilo (AcoEt): ácido fórmico: ácido acético: agua en proporción 25:1:1:3.

2.3 Condiciones de elución para los cromatógrafos líquidos de alta resolución

2.3.1 Sistema para el cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

El equipo empleado fue un HPLC-DAD Waters 1525, equipado con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos.

La separación cromatográfica se realizó con una columna Hypersil-Gold de 4.6x150 mm de fase inversa octadecilsilado (C-18) y tamaño de partícula de 4 μm . Se inyectaron 10 μL de la muestra disuelta en metanol (MeOH). El sistema de elución se muestra en la tabla III. La fase móvil se formó por mezcla de ácido fórmico al 0.1% y MeOH, se desgasificó y filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.45 μm , el caudal de la fase fue de 0.4 mL/min. Antes de la primera inyección, la columna se acondicionó por una hora con la fase móvil en las condiciones iniciales, los últimos cinco minutos del sistema de elución fueron para volver a equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Tabla III. Sistema de elución del HPLC-DAD, gradiente lineal.

Tiempo	%A 0.1% Ácido fórmico	%B MeOH
0	70	30
20	40	60
25	30	70
30	30	70
40	70	30
45	70	30

2.3.2 Sistema para la cuantificación de hepatodamianol en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

El equipo empleado fue un HPLC-DAD Waters 1525, equipado con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos.

La cuantificación se realizó siguiendo las especificaciones del método validado, La separación cromatográfica se realizó con una columna phenomenex Luna de 150x4.6 mm de fase inversa octadecilsilado (C-18), tamaño de partícula de 5 μm con una precolumna phenomenex (C18 4x3.0 mm). El sistema de elución se muestra en la tabla VII. La fase móvil se formó por la mezcla de A) MeOH y de B) ácido fórmico al 0.1%, se filtró con una membrana con tamaño de poro de 0.45 μm y se desgasificó, el caudal de la fase móvil fue un gradiente (tabla IV) utilizando un periodo de equilibrio de 15 min previo a cada inyección.

Tabla IV. Sistema de elución para la cuantificación de hepatodamianol en el HPLC-DAD, gradiente lineal.

Tiempo	Flujo (mL/min)	%A MeOH	%B 0.1% Ácido fórmico
0	0.4	30	70
20	0.4	60	40
25	0.2	70	30
45	0.2	70	30

2.3.2 Sistema para el cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución con detectores UV y masas (UHPLC-UV/MS).

El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia, UHPLC Ultimate 3000, (Dionex, Thermo Scientific) equipado con bomba cuaternaria, automuestreador y compartimento de columna con termostato, detector de longitud de onda variable y espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones (LCQFleet, Thermo Scientific) con software Xcalibur (versión 2.1; Thermo Scientific) y equipado con una interfase de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Se empleó nitrógeno como gas cortina y gas auxiliar a 30 y 20 unidades (AU) respectivamente. El capilar se mantuvo a

275°C y 14 V, y la fuente a 5 kV. Para los experimentos MS se realizó full scan entre m/z 200 y 2000 y en los experimentos MS^n se seleccionó el ion de interés y se volvió a fragmentar empleando una energía de colisión de 35% usando Helio como gas de colisión.

La separación cromatográfica se realizó con una columna Hypersil-Gold de fase inversa (C-18) (50 mm X 2.1 mm, 1.9 μ m, Thermo Scientific). Se inyectó 0.7 μ L de la muestra disuelta en MeOH. El sistema de elución se muestra en la tabla V. La fase móvil se formó por mezcla de ácido fórmico al 1% y MeOH, se desgasificó y filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 μ m, el caudal de la fase fue de 0.2 mL/min. La detección por UV se hizo a 280 y 350 nm. Antes de la primera inyección, la columna se acondicionó por una hora con la fase móvil en las condiciones iniciales, los últimos 1.2 minutos del sistema de elución fueron para volver a equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Tabla V. Sistema de elución del UHPLC-UV/MS, gradiente lineal.

Tiempo (min)	%A 0.1% Ácido fórmico	%B MeOH
0	70	30
4	40	60
5	30	70
6	30	70
7	70	30
8.2	70	30

2.3.3 Sistema para el cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de masas (HPLC-MS/TOF)

El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC Agilent 1100, equipado con bomba cuaternaria, automuestreador y espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF QSTAR XL, Applied biosystems). Equipado con una interfase de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo.

La separación cromatográfica se realizó con una columna Ascentis Express de fase inversa (C-18, 100 mm X 2.1mm, 2.7 μ m, Supelco), se inyectaron 2 μ L de la muestra disuelta en MeOH. El sistema de elución se muestra en la tabla VI. La fase móvil se formó por mezcla de ácido fórmico al 1% y MeOH, se desgasificó y filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 μ m, el caudal de la fase fue de 0.2 mL/min.

Tabla VI. Sistema de elución del HPLC-MS/TOF, gradiente lineal.

Tiempo (min)	%A 0.1% Ácido fórmico	%B MeOH
0	70	30
10	55	45
20	0	100
25	0	100
26	70	30

2.4 Colecta de material herbal

Las colectas de *T. diffusa* se llevaron a cabo en los meses de noviembre 2014, enero, julio, octubre, noviembre y diciembre 2015, febrero y abril 2016 en el municipio de Montemorelos, y junio de 2015 en Linares; ambos municipios de Nuevo León. Se obtuvo únicamente la parte aérea de la planta.

Los especímenes colectados se secaron a temperatura ambiente hasta que mantuvieron peso constante y posteriormente se molieron.

2.5 Obtención de extractos primarios

Para cumplir con el objetivo uno se realizó un extracto metanólico de la parte aérea. Para la extracción se pesaron 500 g de material seco y molido de la planta y se extrajeron con 800 mL de MeOH agitando durante una hora a 200 rpm; el proceso se realizó por triplicado a temperatura ambiente.

Para cumplir el objetivo dos, el proceso de optimización se realizó con las mismas condiciones anteriormente mencionadas solo que ajustadas a 3 g de planta.

Una vez optimizadas las condiciones de extracción, todas las extracciones subsecuentes se realizaron con los resultados obtenidos del objetivo dos.

Los extractos obtenidos se juntaron, filtraron, se evaporaron a presión reducida a 37°C y se almacenaron en refrigeración (4°C) en frascos color ámbar con atmósfera de nitrógeno hasta su posterior uso.

2.6 Diseño de experimentos

Se determinaron cuales eran las variables que afectaban el proceso de extracción, es decir que variables modificaban el porcentaje de recuperación y cantidad de hepatodamianol. Las variables analizadas se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Identificación de las variables que afectan el proceso de obtención del medicamento herbolario.

Pasos del proceso de obtención	Variables	Valor original	Valor alto	Valor bajo
Obtención del extracto	Volumen de solvente	40 mL	80mL	20mL
	Velocidad de agitación	200 rpm	300 rpm	100 rpm
	Tiempo de agitación	1 h	3 h	0.5 h
	Número de extracciones	3	6	1

Para identificar que variables afectaban la obtención del extracto se realizó un diseño de experimentos factorial completo de dos niveles, cuatro factores y dos respuestas en el software Modde versión 8.0 de la compañía Umetrics. La cantidad de planta a extraer no se varió, se partieron de las condiciones de extracción masiva ajustadas a 3 g de planta.

Una vez obtenidos los resultados del diseño factorial se generaron en el software los gráficos de coeficientes que muestran la regresión lineal múltiple (MLR, método utilizado para modelar la relación lineal entre una variable dependiente y una o más variables independientes). El tamaño del coeficiente representa el cambio en la respuesta cuando un factor varía su valor de 0 a 1 en unidades codificadas. El coeficiente fue significativo cuando el intervalo de confianza no cruza de cero.

2.7 Fraccionamiento

2.7.1 Eliminación de clorofilas

La eliminación de clorofilas se realizó por medio de extracción en fase sólida; 10 mL de solución metanólica saturada del extracto metanólico se hizo pasar por un cartucho de octadecilsilano C-18 y éste se eluyó con 70 mL de solución acuosa de metanol al 50%, posteriormente una solución acuosa de metanol al 70% y finalmente metanol 100%. Todas las fracciones se evaporaron a presión reducida a 37°C hasta sequedad.

Se evaluaron las actividades hepatoprotectora y citotóxica de la fracción obtenida con metanol al 50% y se realizó el análisis cromatográfico de la misma; esta fracción evaluada se llamó Extracto s/clorofilas y se continuó con esta el fraccionamiento.

2.7.2 Cromatografía de líquidos a vacío (VLC)

La fracción extracto s/clorofilas se hizo pasar por una columna de líquidos a vacío; 40 g de sílica se empacaron en un embudo Hirsh tamaño de poro M. La muestra (3 g) se mezcló con 5 g de sílica, ya adsorbida la muestra se colocó sobre la columna previamente formada y esta se eluyó con solventes de menor a mayor polaridad cloruro de metileno (CH_2Cl_2), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH. Se eluyó la columna con 200 mL de cada una de los solventes. Todas las fracciones generadas se evaporaron a presión reducida a 37°C.

Se evaluaron las actividades hepatoprotectora y citotóxica de la fracción obtenida con AcOEt:MeOH y se realizó el análisis cromatográfico de la misma; esta fracción evaluada se identificó como Fr. VLC y con ella se continuó el proceso de fraccionamiento.

2.7.3 Fraccionamiento en columna a baja presión

La fracción VLC se separó en una columna de baja presión marca Lichroprep de fase inversa C-18 (40-63 μm), las fracciones se eluyeron con metanol 40%, 50%, 60% y 100%. Se inyectaron 400 mg de la muestra, y se utilizaron 300 mL de cada fase a una velocidad de flujo de 3 mL/min. Todas las fracciones generadas se evaporaron a presión reducida a 37°C.

De las cuatro fracciones generadas la obtenida con MeOH 60% se analizó cromatográficamente, además se determinaron las actividades hepatoprotectora y citotóxica. Esta fracción se identificó como Mezcla Flavonoides.

2.8 Cultivo celular

2.8.1 Mantenimiento de las líneas celulares

Se descongeló una alícuota de cada línea celular, y se propagó en varios frascos de cultivo; una vez que el cultivo llegó a una confluencia del 70-80% se retiró el medio utilizando una bomba de aspiración. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS; ya lavadas las células se agregó 1 mL de tripsina y se incubó por 5 min a 37°C con 5% de CO₂.

Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 6 mL de medio de cultivo DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 10% para neutralizar la tripsina; esta solución se

colectó en un tubo cónico Falcon de 15 mL y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm y 25 °C.

Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo.

2.8.2 Conteo celular

Para contar la células se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular; en un tubo eppendorf se agregaron 20 μL de la suspensión celular a una mezcla de 170 μL de medio y 10 μL de azul tripano.

Se tomaron 10 μL de la dilución con azul tripano y se colocaron en la cámara de Neubauer por capilaridad. En el conteo solo se tomaron en cuenta las células que se encontraban en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara (Figura 5) que no estuvieran teñidas con el colorante.

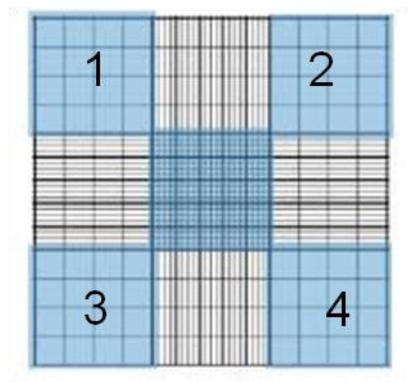


Figura 5. Cámara de Neubauer

El cálculo del número de células por mililitro se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\# \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \left(\frac{\text{total de células}}{4} \right) * (\text{Factor de dilución}) * (10^4)$$

2.8.3 Congelamiento de las líneas celulares

Una vez que se conoció la cantidad de células por mililitro que había en la suspensión celular, se tomó la cantidad necesaria para tener 1 millón de células.

En un criovial se agregaron 75 μL de DMSO (con el fin de preservar la membrana celular al almacenar en el nitrógeno líquido) y la cantidad necesaria de SFB para que al agregar las células se obtuviera 1 mL de solución. Al adicionar se tomó la precaución de homogenizar correctamente la solución.

Inmediatamente se pasó el vial a un baño con hielo y una vez terminado el procedimiento las células se almacenaron en nitrógeno líquido.

2.9 Determinación de la citotoxicidad del extracto y fracciones

La evaluación de la citotoxicidad se realizó por medio de la prueba de reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium (MTT) según lo descrito por Mossman en 1983 [58]. En este ensayo se midió

espectrofotométricamente a una λ de 517 nm la conversión del MTT a cristales de formazán (un producto violeta); la reacción de reducción celular implica la acción de los cofactores de nucleótidos de piridina $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ y la enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo funcionan en la células vivas (Figura 6). El producto de formazán es impermeable a la membrana celular, acumulándose dentro de la célula. Al adicionar un agente lisante las membranas celulares se rompen liberando los cristales acumulados permitiendo la cuantificación del producto formado. La intensidad del producto es proporcional a la cantidad de células vivas.

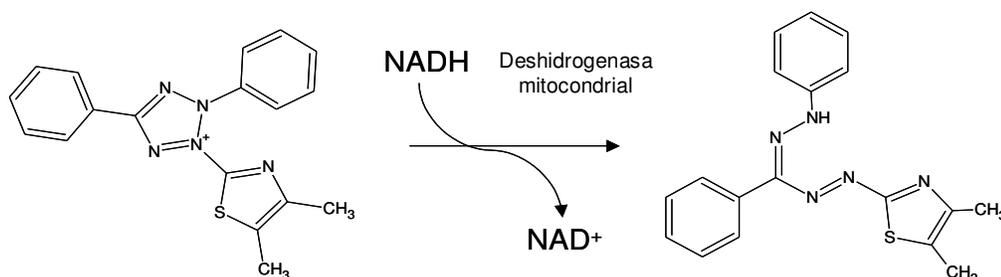


Figura 6. Reacción de reducción del MTT a formazán

Para realizar el ensayo se agregaron 5000 células Vero por pocillo en plazas de 96 pozos; transcurridas 24 h se retiró el medio y se agregó 100 μL del extracto o fracción disuelto en medio de cultivo a concentraciones de 50-3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se dejó en incubación a 37°C y 5% de CO₂ por 48 h y posteriormente se lavó la placa en dos ocasiones con PBS. Después del lavado se agregaron 200 µL de MTT 0.5 mg/mL y se incubó por 3 h.

Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante y se adicionó 200 µL de DMSO; se agitó por 8 min a 25 rpm y se leyó espectrofotométricamente a 570 nm en el lector de placas.

2.10 Determinación de la actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones

2.10.1 Modelo de hepatoprotección

La evaluación de la actividad hepatoprotectora se realizó según lo reportado por Delgado-Montemayor tesis Maestría [57]: En placas de 6 pozos se sembraron 1 millón de células HepG2, a las 12 h se retiró el medio y se lavaron con PBS. Posterior a esto, se agregaron las soluciones de los extractos o fracciones a evaluar disueltos en PBS a 100 µg/mL, se mantuvieron en condiciones de incubación durante una hora. Transcurrido este tiempo se retiraron las soluciones para adicionar 1.5 mL de CCl₄ 0.4%; se dejó actuar por 2 h en condiciones de incubación, se retiró el sobrenadante y fue llevado inmediatamente para cuantificar la enzima aspartato aminotransferasa (AST). Los sobrenadantes se mantuvieron en baño de hielo hasta la determinación enzimática.

2.10.2 Determinación de la aspartato aminotransferasa (AST)

Se cuantificó la AST en el equipo llab Aries con el kit de marca Instrumentation laboratory; la cuantificación se realizó conforme la recomendación de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) siguiendo la reacción mostrada en la figura 7.

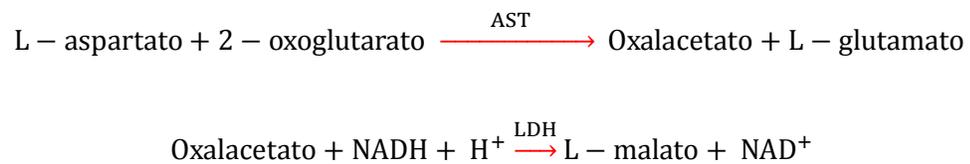


Figura 7. Reacción de cuantificación de la AST.

La disminución de la absorbancia debido a la oxidación de NADH a NAD⁺ es proporcional a la actividad de la AST en la muestra. La absorbancia se midió a 340 nm.

2.11 Control de calidad

2.11.1 Determinación de la actividad antioxidante por la técnica de DPPH

Se realizó según lo descrito por Granados-Guzmán; se determinó la concentración efectiva 50 (CE₅₀) para reducir el radical 2.2-difenil-1-picril-

hidrazilo (DPPH) por medio de espectrofotometría UV-Vis a una λ de 517 nm utilizando una técnica a microescala en placas de 96 pozos [59].

Se prepararon soluciones de los extractos y fracciones a una concentración de 1 mg/mL en etanol (EtOH). De esta solución se tomó 0.1 mL y se adicionó en un pozo con 0.1 mL de EtOH; a partir de esta solución se realizó una serie de diluciones seriadas (factor 1:2) por 11 pozos más. A cada uno de los pozos se le agregó 0.1 mL de DPPH (280 μ M) y se dejó reposar por 15 min en obscuridad. Transcurrido el tiempo se leyó la placa en el lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific).

Se utilizó una solución de quercetina 1 mg/mL como control positivo y EtOH como control negativo.

Para determinar la CE_{50} fue necesario calcular la capacidad reductora de los extractos. La capacidad reductora se determinó por medio del porcentaje de reducción mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción} = \frac{(\text{Absorbancia del control negativo}) - (\text{Absorbancia de la muestra})}{\text{Absorbancia del control negativo}} \times 100$$

Los porcentajes de reducción se graficaron versus la concentración del extracto en cada pozo; del gráfico generado se calculó la ecuación de la recta y

se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción.

2.11.2 Determinación de la cantidad de flavonoides totales

Se determinó la cantidad de flavonoides totales por medio de espectrofotometría UV-Vis a una λ de 510 nm [60], [61].

Se prepararon soluciones de las muestras del medicamento herbolario a una concentración de 1 mg/mL en EtOH. De esta solución se tomó 0.1 mL y se adicionó en un pozo con 0.1 mL de EtOH; a partir de esta solución se realizó una serie de diluciones seriadas (factor 1:2) por 11 pozos más. A cada uno de los pozos se le agregó 0.1 mL de $AlCl_3$ (10%). La solución final se dejó reposar por 60 min. Transcurrido el tiempo se leyó la placa en el lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific).

La quercetina y rutina fueron los estándares de referencia, se realizó una curva con diferentes concentraciones del estándar y se trataron de la misma forma que las muestra. Se utilizó EtOH blanco y el contenido de flavonoides totales se expresó como mg de flavonoides equivalentes a quercetina o rutina por g de muestra (mg/g). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.11.3 Determinación de estabilidad acelerada

Para determinar la estabilidad del producto se realizó mediante el ensayo de estabilidad acelerada descrito en la NOM-073-SSA1-2015 que describe los procedimientos para la estabilidad de fármacos y medicamentos.

El ensayo consiste en exponer la muestra a condiciones de 40 ± 2 °C, con $75\pm 5\%$ de humedad relativa durante seis meses. Se tomaron muestras cada mes hasta completar 6 meses; el parámetro de seguimiento fue la actividad hepatoprotectora y el perfil cromatográfico, en los cuales se buscaron diferencias significativas entre las muestras obtenidas en los distintos tiempos.

La atmósfera con humedad relativa controlada se generó con una combinación de agua y diferentes sales en un sistema que se encontraba herméticamente cerrado [62].

Para generar la humedad en aproximadamente un 75% se utilizaron 100 mL de agua desionizada por cada 230 g de NaCl en un recipiente de 2500 cm³ a una temperatura de 40°C [63]

2.11.4 Determinación de solventes residuales

Se determinó la presencia de solventes residuales por medio de cromatografía de gases - espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas

5973 INERT. La separación se realizó en una columna capilar DB-WAX de 30m * 0.25 mm * 0.25 μ m; y helio como gas acarreador a flujo de 1 mL/min. La rampa de temperatura comenzó a 40°C y se mantuvo así por 5 min, posteriormente se llevó a 230°C a una velocidad de 10°C por min y se mantuvo por 5 min más. El detector se mantuvo a 140°C.

Se buscó la presencia de metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y cloruro de metileno. Para realizar el análisis, 10 mg de medicamento herbolario liofilizado por 24 y 48 hrs se pusieron en viales ámbar de 2mL, se llevó a baño de calentamiento a 80°C por 30 min y del head space se tomaron 2 μ L para la inyección directa en el equipo.

2.11.5 Cuantificación de hepatodamianol

Se realizó la cuantificación de hepatodamianol en los medicamentos herbolarios por medio de HPLC/UV siguiendo el método validado descrito en el punto 2.3.2.

2.12 Identificación por RMN

Se realizó el espectro de 1 HRMN de los medicamentos herbolarios en un espectrómetro Bruker de 400 MHz Avance III. Se disolvieron 50 mg del los

medicamentos herbolarios liofilizados en DMSO-d6. El espectro del hepatodamianol se obtuvo con 5 mg del compuesto puro en DMSO-d6.

2.12.1 Análisis quimiométrico

Con los espectros de hidrógeno de los medicamentos herbolario se realizó estadística multivariable mediante el software AMIX. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó utilizando todas las señales obtenidas entre desplazamientos de 0 a 14 ppm, se realizó bucketing de las señales y se obtuvieron 350 buckets de 0.04ppm. Para el gráfico se tomaron en cuenta la primera y segunda componente principal con un 95% de nivel de confianza.

2.12.2 1D-TOCSY selectivo para la identificación de hepatodamianol

Tanto el hepatodamianol como los medicamentos herbolarios fueron disueltos en DMSO-d6. Los experimentos de ¹HRMN fueron obtenidos usando la secuencia selmlgp en el modo DQD con 65536 puntos y 16 incrementos (Figura 8). El tiempo de mezclado fue evaluado en el intervalo de 20 a 200 ms y el valor de O1 fue definido en función de la frecuencia de observación de la señal de interés. El procesamiento y análisis de los espectros se realizó con el programa TopSpin 3.2.

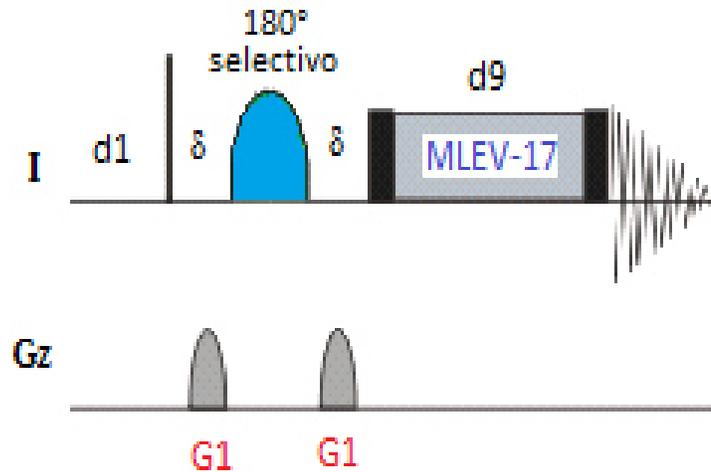


Figura 8. Secuencia de pulsos del experimento 1D-TOCSY. Durante el bloque MLEV-17 ocurre la propagación de la magnetización a través del sistema de espín [64].

2.12.3 Alineación optimizada mediante correlación COW

Los espectros de hidrógeno de los medicamentos herbolarios se alinearon mediante COW, se utilizó el producto acumulativo máximo de los coeficientes de correlación para buscar cual de las muestras representa mejor a todas, es decir cuál es la muestra que mayor similitud tiene entre todas, a mayor sea su ponderaje mayor similitud.

2.13 Ensayo *in vivo*

Todos los procedimientos con animales fueron llevados a cabo de acuerdo con las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la cual fue publicada en el Diario Oficial de la Nación el 22 de Agosto de 2001. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestra institución con el registro QA17-00004.

El ensayo se realizó de acuerdo a Cordero y col.[65] con ligeras modificaciones. Se trabajó con ratas Wistar, hembras, de aproximadamente 200-300 g de peso corporal. Las ratas fueron mantenidas en condiciones estándar de laboratorio, temperatura de 24 ± 3 °C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, alimentadas con croquetas comerciales estándar y con acceso a agua *ad libitum*.

Las ratas se dividieron al azar en los 4 grupos de experimentación (n=4 cada grupo) y recibieron diferentes tratamientos. Un grupo control de daño negativo, un grupo control de daño positivo, grupo de hepatoprotección utilizando silibinina como tratamiento y un grupo experimental al que se le administró el medicamento herbolario.

Se realizaron tomas de sangre basal a todos los animales en el día 0, como datos clínicos de referencia. Se administró solución salina (1000 μ L) vía oral por tres días consecutivos cada 12 horas, a los controles de daño tanto positivo

como negativo. Al grupo de hepatoprotección se les administró silibinina 70 mg/Kg (en máximo 1000 µL) por el mismo lapso de tiempo. El grupo experimental recibió el medicamento herbolario a dosis de 70 mg/Kg de peso bajo el mismo esquema de administración que los controles.

Al finalizar la segunda dosis del tercer día de experimentación se hicieron tomas de sangre previo a la inducción de daño. El grupo control de daño negativo recibió vía intraperitoneal 1 mL/Kg de peso de aceite mineral. El resto de los grupos se les administró i.p. CCl₄ 1 mL/Kg de peso al 50% en aceite mineral.

Posterior a 24 horas de la administración i.p. del CCl₄ o aceite mineral se realizó el sacrificio de los animales. Para esto se anestesiaron las ratas con xilacina (8 mg/Kg) y ketamina (90 mg/Kg) i.p. Una vez en anestesia el animal se realizó la cirugía para obtener primeramente sangre de vena cava y posteriormente la resección del hígado.

De la muestra de sangre se obtuvo el suero y se determinaron las enzimas AST y ALT en el equipo llab Aries con el kit de marca Instrumentation laboratory; la cuantificación se realizó conforme la recomendación de la IFCC.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Colecta del material herbal

Se realizaron diversas colectas durante el desarrollo del trabajo, los lugares y fechas se muestran en la tabla VIII. Se colectó únicamente la parte aérea de la planta.

Tabla VIII. Lugar y fecha de las colectas de *Turnera diffusa*.

Lugar de colecta	Fecha de colecta	Clave
Montemorelos, Nuevo León	Enero 2015	MH1
Montemorelos Nuevo León	Noviembre 2015	MH2
Montemorelos, Nuevo León	Noviembre 2014	MH3
Montemorelos, Nuevo León	Diciembre 2015	MH4
Montemorelos, Nuevo León	Abril 2016	MH5
Montemorelos, Nuevo León	Julio 2015	MH6
Montemorelos, Nuevo León	Octubre 2015	MH7
Montemorelos, Nuevo León	Febrero 2016	MH8
Linares, Nuevo León	09 Junio 2015	MH9
Linares, Nuevo León	26 Junio 2015	MH10

3.2 Fraccionamiento

3.2.1 Obtención de extracto y fracciones

Se realizó el proceso de fraccionamiento descrito en el punto 2.7 utilizando la colecta de Montemorelos, Noviembre 2014. Los porcentajes de recuperación obtenidos del extracto y las fracciones se muestran en la tabla IX.

Tabla IX. Porcentaje de recuperación del extracto y fracciones de *T. diffusa*.

Nombre	% de Recuperación
Extracto	12.08%
Extracto s/clorofilas	50.28%
Fr. VLC	32.9%
Mezcla Flavonoides	24%

3.2.2 Análisis por HPLC-DAD de extracto y fracciones

El extracto y fracciones obtenidas se analizaron por HPLC-DAD siguiendo las condiciones instrumentales descritas en el punto 2.3.1. Todos los cromatogramas se obtuvieron con 1 mg de cada una de las muestras disueltas en 1 mL de MeOH. Los cromatogramas se muestran en las figuras 9 a 12.

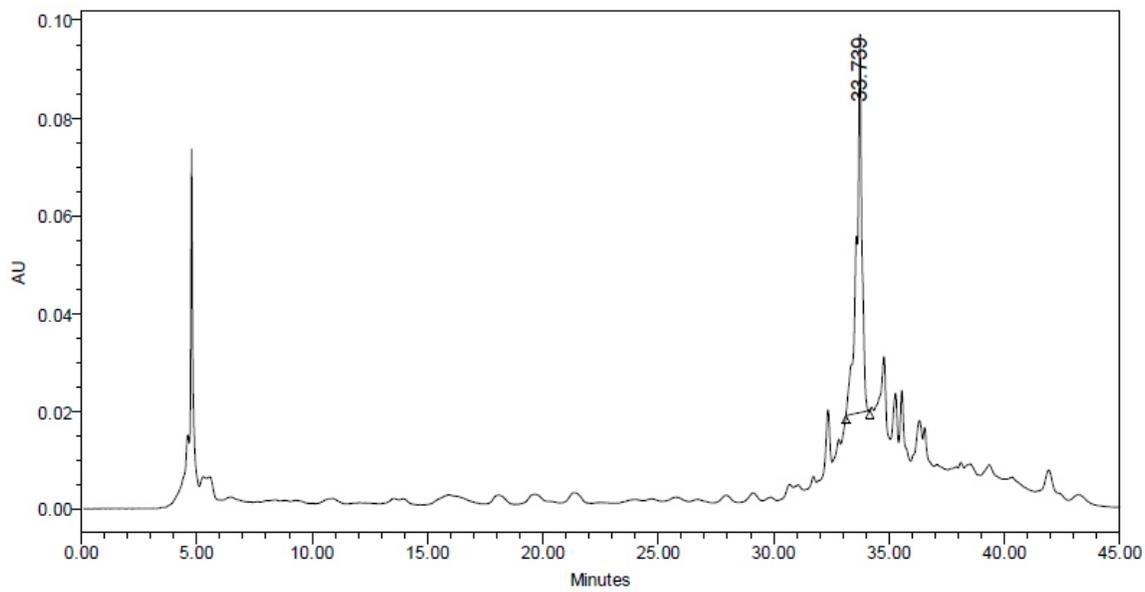


Figura 9. Cromatograma del extracto metanólico, λ 254nm.

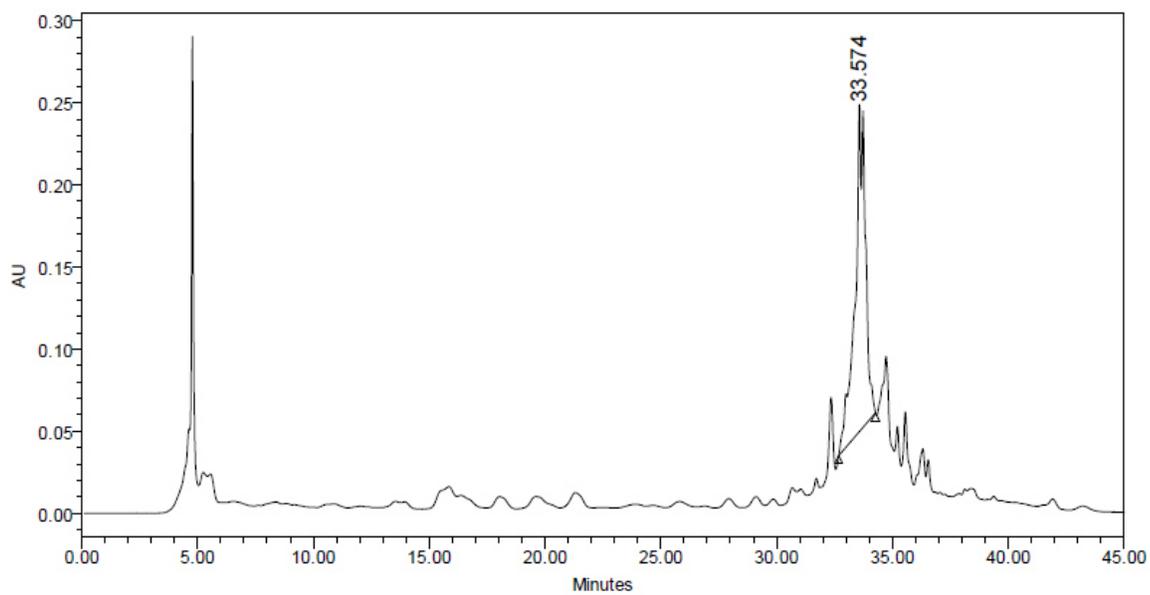


Figura 10. Cromatograma de la fracción extracto s/clorofilas, λ 254nm.

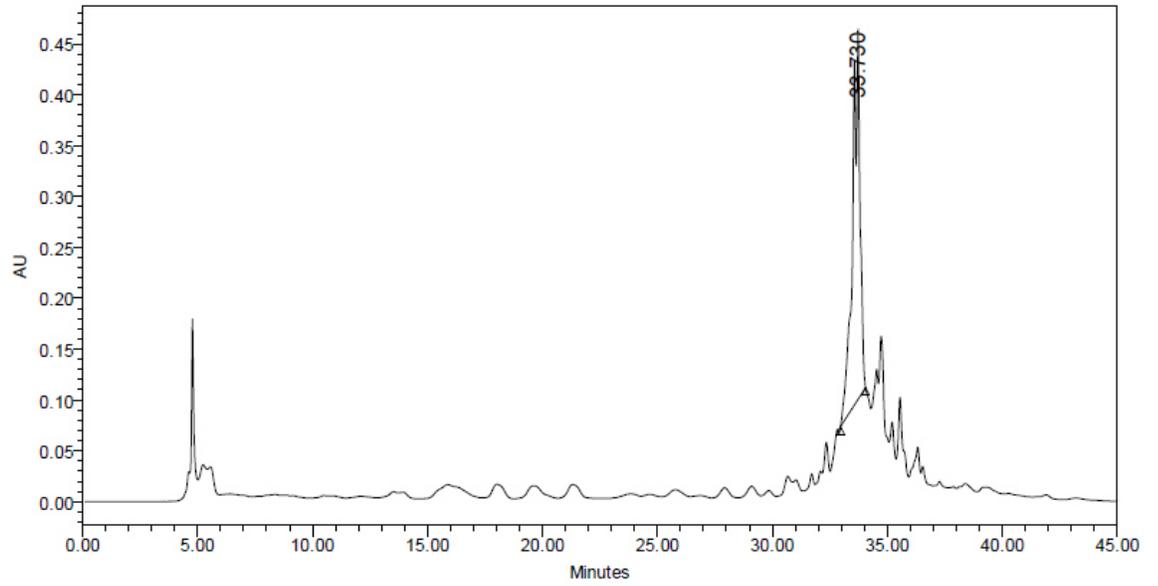


Figura 11. Cromatograma de la Fr. VLC, λ 254nm.

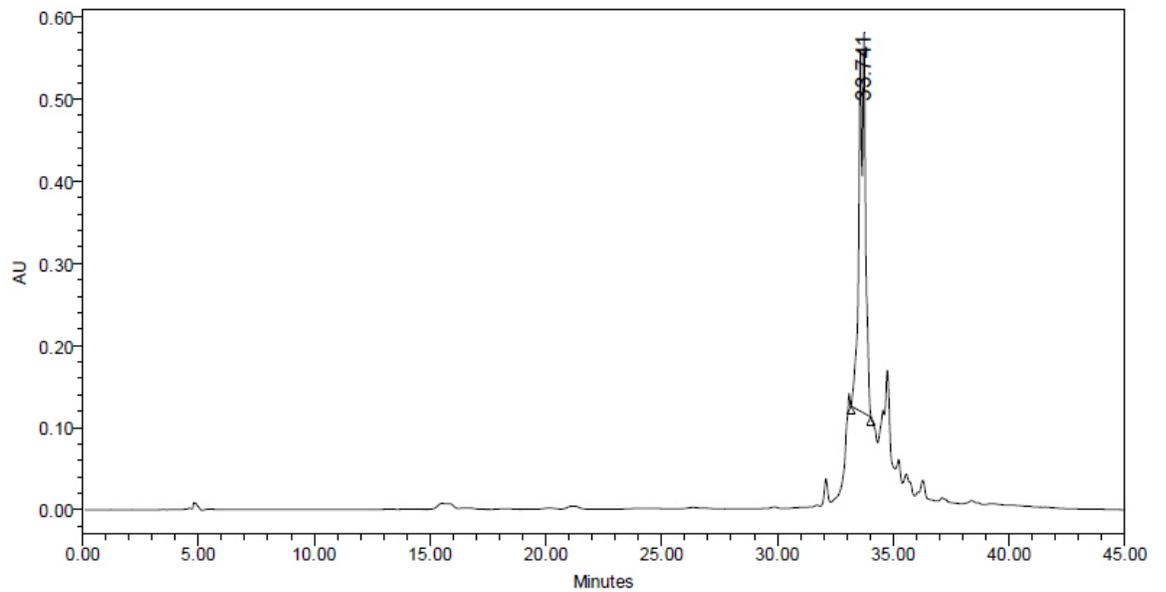


Figura 12. Cromatograma de la fracción Mezcla Flavonoides, λ 254nm.

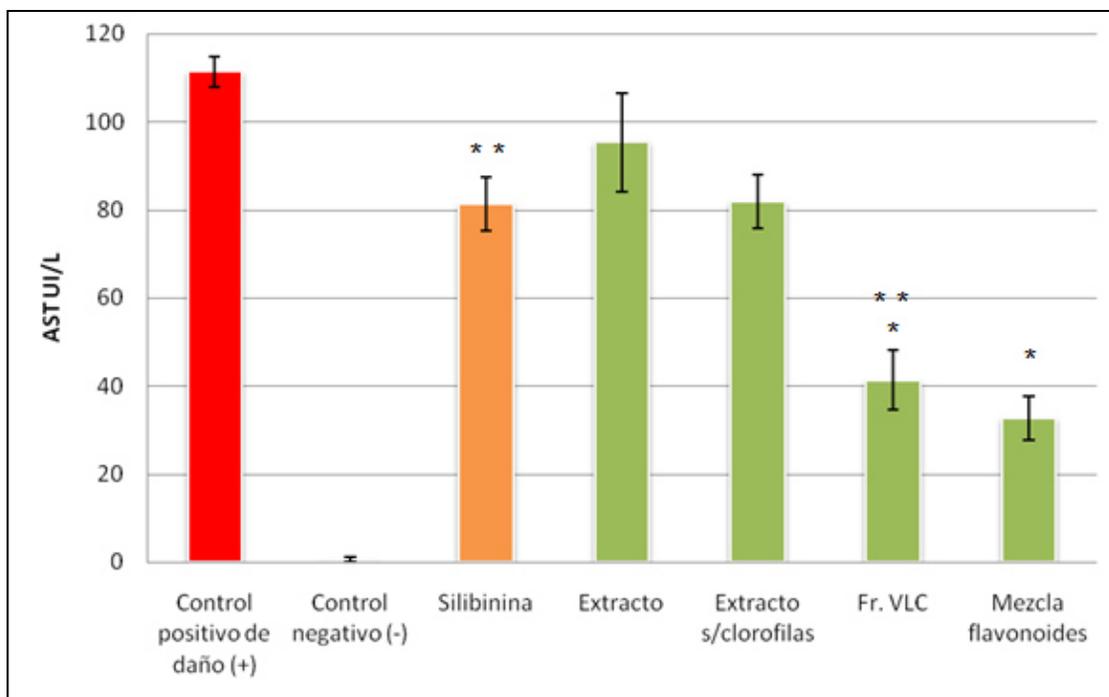
3.2.3 Actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones

La actividad hepatoprotectora se determinó siguiendo los pasos descritos en el punto 2.10. Los resultados se muestran en la figura 13 y tabla X.

Tabla X. Actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones obtenidas en el daño con CCl₄ sobre la línea celular HepG2.

Nombre de la muestra	AST (UI/L)
Extracto	95.33 ± 11.1
Extracto s/clorofilas	82.00 ± 6.08
Fr. VLC	41.33 ± 6.50
Mezcla Flavonoides	32.33 ± 5.13
Silibinina	81.33 ± 6.02
Control positivo de daño(+)	111.33 ± 3.51
Control negativo (-)	0.66 ± 0.57

Control positivo de daño (+): CCl₄ 0.4%, Control negativo (-): PBS, n=3. Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar.



Prueba t student, *= $p < 0.05$, ** = $p > 0.05$

Figura13. Actividad hepatoprotectora del extracto y fracciones obtenidas.

3.2.4 Actividad citotóxica del extracto y fracciones

La actividad citotóxica se determinó siguiendo los pasos descritos en el punto 2.9. Los resultados se muestran en la tabla XI.

Tabla XI. Citotoxicidad del extracto y fracciones sobre la línea celular Vero.

Nombre de la muestra	CC ₅₀
Extracto	49.73 ± 5.03 µg/mL
Extracto s/clorofilas	>500 µg/mL
Fr. VLC	>500 µg/mL
Mezcla Flavonoides	>500 µg/mL
Doxorrubicina	3.13 ± 0.23 µg/mL

3.3 Diseño de experimentos

3.3.1 Identificación de variables que afectan el proceso de obtención del medicamento herbolario

Para la identificación de las variables que afectan la obtención del extracto se trabajó con un diseño factorial completo de 19 experimentos (16 diseños y 3 valores centrales). Los resultados se muestran en la tabla XII.

Una vez identificadas las variables que afectan significativamente el proceso de extracción, se seleccionó el experimento N12 para seguir con el proceso de optimización de las variables volumen de solvente y número de extracciones.

Se realizaron experimentos independientes para cada una de las variables; para optimizar el volumen de solvente a utilizar se mantuvo la cantidad MeOH

constante (150mL) y este se fraccionó en el número de extracciones a realizar (Tabla XIII). Por otro lado; para optimizar el número de extracciones se utilizaron tres diferentes volúmenes de MeOH (15, 20 y 25 mL) y se extrajo la planta en 3 ,4 y 5 ocasiones (Tabla XIV).

Se seleccionó el experimento S2 (3 extracciones con 50 mL de solvente cada una) como condiciones de extracción.

Tabla XII. Diseño factorial completo para la obtención del extracto.

Damiana Montemorelos Noviembre 2014					3 g planta			
Experimento	Vol. Solvente	Tiempo agitación	Vel. Extracción	# extracciones	Peso inicial	Peso final	% Recuperación	Área hepatodamianol
N1	10	0.5	100	1	13.3815	13.4604	2.63	5.2
N2	25	0.5	100	1	13.6516	13.7800	4.28	5.33
N3	10	2	100	1	9.584.1	9.6861	3.40	9.26
N4	25	2	100	1	13.0478	13.2210	5.77	10.06
N5	10	0.5	300	1	9.4789	9.5600	2.70	7.38
N6	25	0.5	300	1	14.0633	14.2038	4.68	8.44
N7	10	2	300	1	11.5560	11.6461	3.00	4.61
N8	25	2	300	1	13.4136	13.5892	5.85	8.85
N9	10	0.5	100	6	11.6841	11.8961	7.07	7.84
N10	25	0.5	100	6	9.5066	9.8128	10.21	8.53
N11	10	2	100	6	14.2919	14.5382	8.21	7.93
N12	25	2	100	6	13.3410	13.7923	15.04	8.1
N13	10	0.5	300	6	14.0833	14.3331	8.33	6.82
N14	25	0.5	300	6	13.5301	13.8500	10.66	4.56
N15	10	2	300	6	11.6144	11.8228	6.95	6.15
N16	25	2	300	6	9.5967	9.9499	11.77	4.55
N17	15	1	200	3	14.1362	14.3571	7.36	6.43
N18	15	1	200	3	12.0216	12.2452	7.45	5.03
N19	15	1	200	3	9.5739	9.8078	7.80	7.22

Vol. solvente: mL, Tiempo agitación: h, Vel. extracción: rpm, Peso inicial y final: g, Área D1: % de área en el cromatograma.

Investigation: optimizacion (MLR)

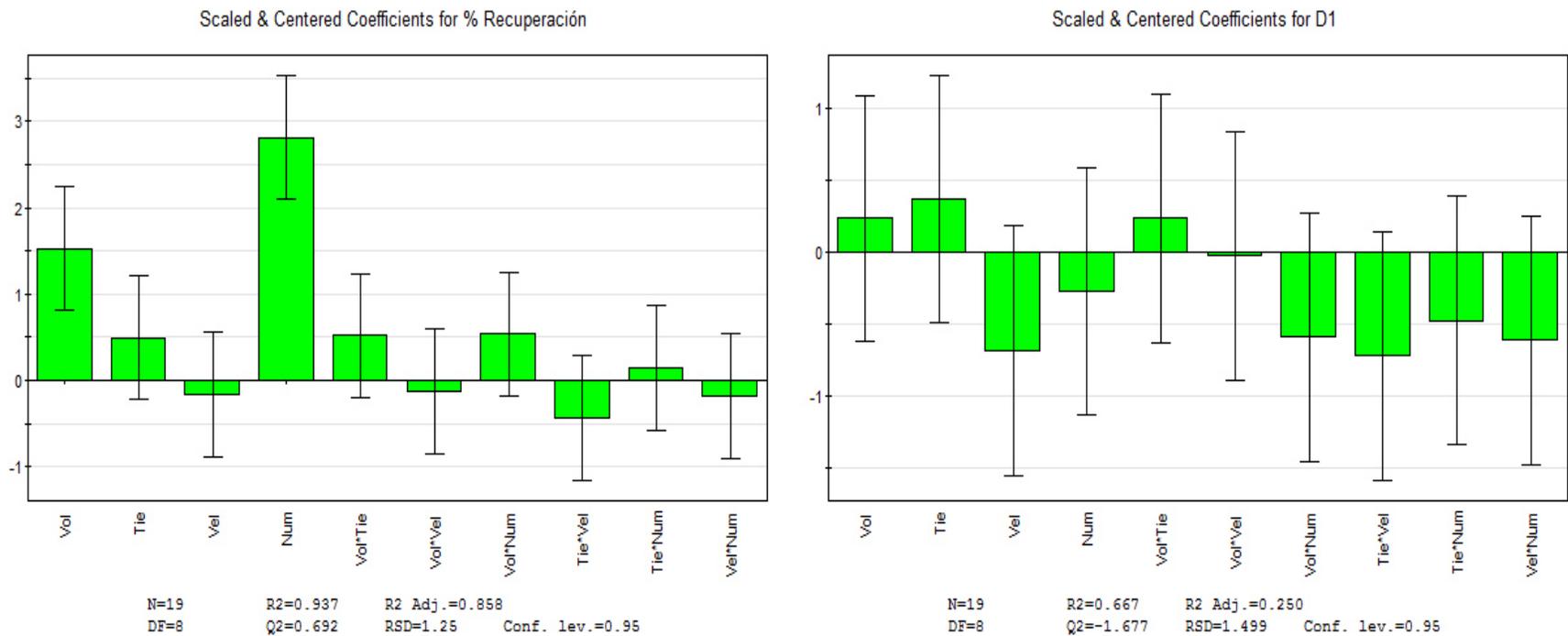


Figura 14. Gráficos de los coeficientes de las variables analizadas en el diseño factorial. (a) Efecto de las variables en función al % de Recuperación, (b) Efecto de las variables en función del % de área de hepatodamianol.

Tabla XIII. Optimización del volumen de solvente basado en N12.

Experimento	Vol. solvente	Tiempo agitación	Vel. extracción	# extracciones	Peso Inicial	Peso final	% Recuperación	% Área hepatodamianol	Área	Altura
S1	150	2	300	1	107127.5	107338.4	7.03	25.13	-	-
S2	50	2	300	3	104537.3	104849.3	10.40	19.24	1193261	53794
S3	35	2	300	4	104521.5	104831.7	10.34	35.7	1051359	52333
S4	30	2	300	5	112785.3	113089.8	10.15	15.83	-	-
N12	25	2	300	6	-	-	15.04	12.43	-	-

Vol. solvente: mL, Tiempo agitación: h, Vel. extracción: rpm, Peso inicial y final: g, % Área hepatodamianol: % de área relativa en el cromatograma.

Tabla XIV. Optimización del número de extracciones basado en N12.

Experimento	Vol. Solvente	Tiempo agitación	Vel. Extracción	# extracciones	Peso Inicial	Peso final	% Recuperación	% Área hepatodamianol
E1	15	2	300	3	110463.1	110675.5	7.08	24.68
E2	15	2	300	4	98515.9	98737.6	7.39	22.89
E3	15	2	300	5	110450.6	110699.9	8.31	19.6
E4	20	2	300	3	112782.2	113007.2	7.50	23.09
E5	20	2	300	4	107143.3	107393.2	8.33	21.49
E6	20	2	300	5	107133.6	107392.5	8.63	22.44
E7	25	2	300	3	107185.7	107461.4	9.19	22.38
E8	25	2	300	4	100115.7	100410	9.81	22.8
E9	25	2	300	5	164992.7	165291.2	9.95	20.8
N12	25	2	300	6	-	-	15.04	12.43

Vol. solvente: mL, Tiempo agitación: h, Vel. extracción: rpm, Peso inicial y final: g, % Área hepatodamianol: % de área relativa en el cromatograma.

3.4 Control de calidad del medicamento herbolario

Como parámetros de control de calidad del producto elaborado se determinaron diferentes características, como parámetro de identidad se hizo un análisis por HPLC-DAD para las diferentes muestras, como parámetro de pureza se determinó la cantidad de solventes residuales en las muestras liofilizadas y por último como parámetro de contenido se determinó la cantidad de flavonoides totales, la actividad antioxidante y la identificación de los principales componentes. Además como parte del control de calidad se determinó la estabilidad del producto y la actividad hepatoprotectora de cada una de las muestras.

3.4.1 Identidad, análisis por HPLC-DAD

Se analizaron las diferentes muestras por HPLC-DAD siguiendo el método validado como está descrito en el punto 2.11.5. Se inyectaron 20 μ L de la muestra disuelta en metanol al 80% (v/v) todas las muestras se inyectaron por duplicado a 0.1 y 0.2 mg/mL. Los resultados de cuantificación se presentan en la tabla XV y los cromatogramas en el anexo (capítulo 7) figuras 39-48.

Tabla XV. Cuantificación de hepatodaminol en los medicamentos herbolarios

Clave	mg de hepatodaminol/ g de MH
MH1	224.2
MH2	189.2
MH3	151.8
MH4	205.2
MH5	148.4
MH6	199.3
MH7	178.9
MH8	109.3
MH9	256.9
MH10	48.3

3.4.2 Pureza, determinación de solventes residuales

Se liofilizaron lotes de medicamento herbolario por 24 y 48 horas a condiciones de -30°C y 2.5×10^{-4} bares de presión. Las muestras se procesaron como se indica en el punto 2.11.4 y no se detectó presencia de solventes en las muestras. El cromatograma de la mezcla de solventes y muestras se observan en la figura 15.

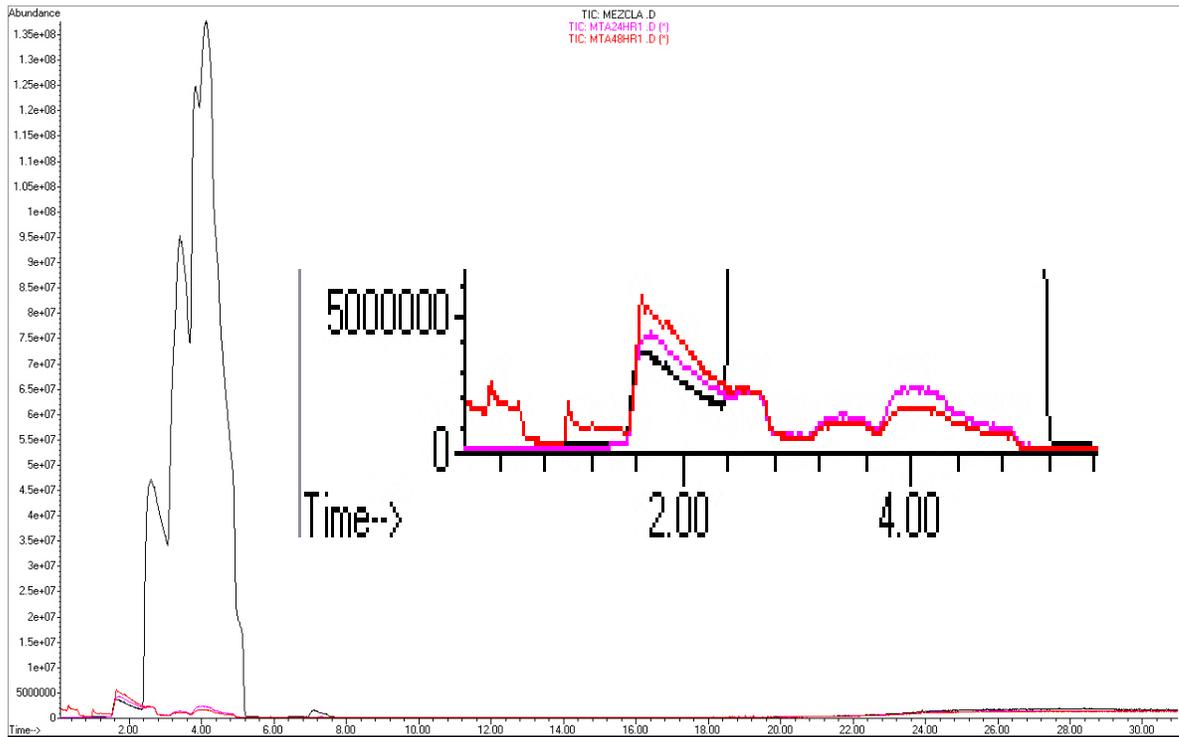


Figura 15. Cromatograma de la mezcla de solventes y muestras para la determinación de solventes residuales

3.4.3 Contenido, determinación de flavonoides totales, actividad antioxidante e identificación de principales componentes.

3.4.3.1 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de los flavonoides totales se realizó utilizando las muestras previamente liofilizadas siguiendo la metodología descrita en el punto 2.11.2, los resultados de las diferentes muestras se resumen en la tabla XVI.

Para la curva de calibración de quercetina se realizaron 6 puntos entre concentraciones de 31.25 a 0.12 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$), la ecuación de la recta fue $y=0.0301x + 0.0076$ con un coeficiente de correlación $R^2= 0.9922$; para la curva de calibración de rutina se realizaron 6 puntos entre concentraciones de 125 a 0.49 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$), la ecuación de la recta fue $y=0.0124x + 0.0308$ con un coeficiente de correlación $R^2=0.9909$.

Tabla XVI. Cuantificación de los flavonoides totales de las muestras del medicamento herbolario

Clave	mg de flavonoides equivalentes a quercetina por g de muestra (mg/g)	mg de flavonoides equivalentes a rutina por g de muestra (mg/g)
MH1	80.11 ± 1.65 mg/g	186.97 ± 4.01 mg/g
MH2	68.62 ± 0.88 mg/g	159.09 ± 2.15 mg/g
MH3	52.54 ± 0.66 mg/g	120.06 ± 1.61 mg/g
MH4	66.18 ± 0.45 mg/g	153.18 ± 1.10 mg/g
MH5	57.81 ± 0.29 mg/g	32.86 ± 0.72 mg/g
MH6	88.42 ± 0.52 mg/g	207.16 ± 1.26 mg/g
MH7	64.68 ± 0.63 mg/g	149.52 ± 1.53 mg/g
MH8	47.76 ± 0.15 mg/g	108.45 ± 0.36 mg/g
MH9	162.58 ± 0.36 mg/g	379.69 ± 0.89 mg/g
MH10	49.35 ± 0.70 mg/g	112.32 ± 1.69 mg/g

n=10

3.4.3.2 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se realizó utilizando las muestras previamente liofilizadas siguiendo la metodología descrita en el punto 2.11.1, los resultados de las diferentes muestras se resumen en la tabla XVII.

Tabla XVII. Actividad antioxidante de las muestras del medicamento herbolario

Clave	CC ₅₀	Ecuación de la recta y coeficiente de correlación (R ²)
MH1	55.45 µg/mL	y=1.0045x + 15.132 R ² = 0.9824
MH2	62.34 µg/mL	y=0.8104x + 13.119 R ² = 0.9862
MH3	58.88 µg/mL	y=0.5827x + 16.93 R ² = 0.9698
MH4	53.54 µg/mL	y=0.9096x + 13.668 R ² = 0.9948
MH5	78.26 µg/mL	y=0.5043x + 14.124 R ² = 0.9806

MH6	52.25 µg/mL	$y=0.9587x + 13.39$ $R^2= 0.9448$
MH7	60.42 µg/mL	$y=0.596x + 13.782$ $R^2= 0.9779$
MH8	66.68 µg/mL	$y=0.505x + 9.7016$ $R^2= 0.9938$
MH9	26.92 µg/mL	$y=2.2381 x + 15.218$ $R^2= 0.9907$
MH10	53.01 µg/mL	$y=0.9096x + 13.668$ $R^2= 0.9948$
Quercetina	3.99 µg/mL	$y=10.464x + 8.1527$ $R^2= 0.9728$

n=3

3.4.3.3 Caracterización preliminar de los principales componentes de la fracción Mezcla de flavonoides

Se analizó la fracción Mezcla de flavonoides y se encontraron 10 compuestos de tipo flavonoide (tabla XVIII, figura 16) de los cuales 5 se caracterizaron estructuralmente basados en sus espectros de masas. El compuesto g de masa $[M+H]^+$ 577 ya estaba reportado y se conocía su estructura [33]; los dos pares

isoméricos 623 y 609 permanecen pendientes de caracterizar debido a la poca información derivada de los espectros.

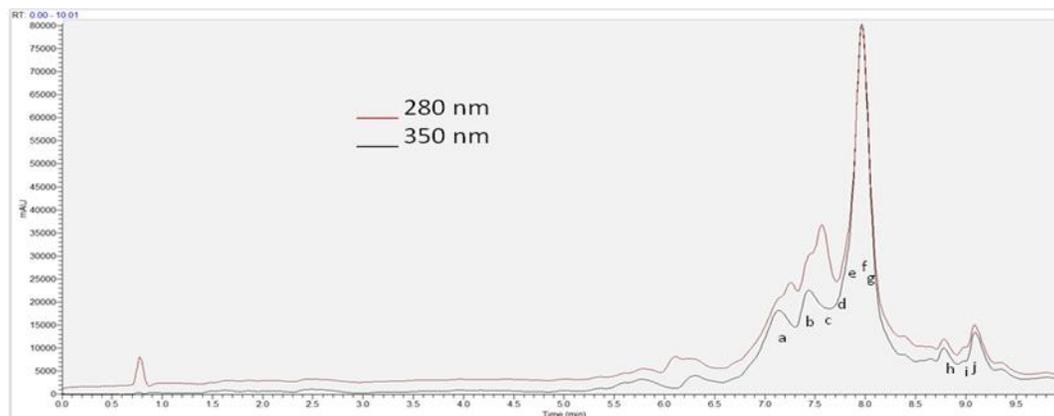


Figura 16. Cromatograma de la fracción Mezcla de flavonoides, UHPLC-UV-Vis-MS/MS, λ 280 y 350nm.

Tabla XVIII. Resultados de análisis por UHPLC-UV/Vis-MS/MS de la fracción Mezcla de flavonoides.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ion pseudomolecular [M+H] ⁺	Masa exacta [M+H] ⁺	Identidad
a	7.17	579	579.1716	8-C-ramnosil-7-O-ramnosido de luteolina
b	7.45	609	609.1455	
c	7.65	595	595.1671	8-C-ramnosil-7-O-glucosido de luteolina
d	7.85	575	575.1392	8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-2,3-ulosido de luteolina
e	7.90	623	623.1603	
f	7.92	609		
g	7.94	577	577.1557	8-C-β-[6-deoxi-2-O-(α-L-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulosido] de luteolina
h	8.75	623	623.1628	
l	9.09	561	561.1628	8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-2,3-ulosido de apigenina

El compuesto g (hepatodamianol) identificado inequívocamente mediante RMN en estudios previos, como 8-C-β-[6-deoxi-2-O-(α-L-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulosido] de luteolina (Figura 4) [33] fue analizado por LC-MS/MS y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla XIX.

Tabla XIX. Datos espectrales de masas del compuesto g.

Compuesto g [M+H] ⁺ =577			
Masa exacta: 577.1557, fórmula molecular: C ₂₇ H ₂₈ O ₁₄ + H ⁺			
MS ²			
m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
431*	100.0	146	-ramnosa
413	10.9	164 (146+18)	-ramnosa-H ₂ O
329	2.9	248 (146+102)	-ramnosa- ^{0,2} X
387	1.8	190 (146+44)	-ramnosa- ^{0,4} X
369	1.7	208 (146+62)	-ramnosa- ^{0,4} X-H ₂ O
311	1.2	266 (146+120)	-ramnosa- ^{0,2} X-H ₂ O
385	1.1	192 (146+46)	-ramnosa-H ₂ O-CO

403	0.5	174 (146+28)	-ramnosa-CO
299	0.5	278 (146+132)	-ramnosa ^{-0,1} X
367	0.4	210 (146+64)	-ramnosa-2H ₂ O-CO
327	0.4	250 (146+104)	A+41
395	0.4	182 (146+36)	-3H ₂ O
287	0.4	290 (146+144)	-ramnosa-3ulosido
359	0.3	218 (146+72)	-4 H ₂ O
357	0.2	220 (146+74)	-ramnosa ^{-0,3} X
339	0.1	238 (146+92)	-ramnosa ^{-0,3} X-18
MS³ (431)			
413	100	18	-H ₂ O
387	54.2	44	^{-0,4} X
369	34.5	62	^{-0,4} X-H ₂ O
329	28.7	102	^{-0,2} X
385	20.2	46	-H ₂ O-CO
299	16.1	132	^{-0,1} X

327	15.5	104	A+41
359	13.2	72	-4 H ₂ O
403	7.9	28	-CO
367	6.6	64	-2H ₂ O-CO
339	4.3	92	- ^{0,3} X-18
311	3.5	120	- ^{0,2} X-H ₂ O
395	3.0	36	-2 H ₂ O
357	2.1	74	- ^{0,3} X ⁺

El compuesto a tiene un ion pseudomolecular de [M+H]⁺ 579 y fue analizado por LC-MS/MS y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla XX. La fórmula molecular y estructura propuesta es 8-C-ramnosil-7-O-ramnósido de luteolina (figura 17).

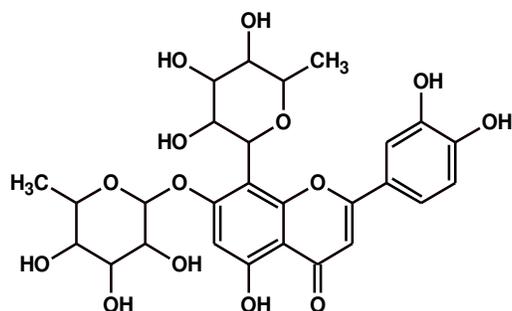


Figura 17. Estructura propuesta para compuesto a. 8-C-ramnosil-7-O-ramnosido de luteolina.

Tabla XX. Datos espectrales de masas del compuesto a.

Compuesto a $[M+H]^+=579$			
Masa exacta: 579.1716, fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{14} + H^+$			
MS ²			
m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
433*	100	146	-ramnosa
415	21.6	164 (146+18)	-ramnosa -H ₂ O
397	20.4	182 (146+36)	-ramnosa -2*H ₂ O
329	6.3	250 (146+104)	-ramnosa- ^{0,2} X ⁺
287	3.0	292 (146+146)	- 2*ramnosa

353	1.7	226 (146+80)	-ramnosa- ^{0,4} X ⁺ -2H ₂ O
299	1.3	280 (146+134)	-ramnosa- ^{0,1} X ⁺
311	1.0	268 (146+122)	-ramnosa- ^{0,2} X ⁺ -2H ₂ O
525	0.8	54	-3H ₂ O
475	0.7	104	^{0,2} X ⁺
379	0.6	200 (146+54)	-ramnosa-3H ₂ O
561	0.4	18	-H ₂ O
MS³ (433)			
397	100.0	36	-2*H ₂ O
415	50.3	18	-H ₂ O
353	19.0	80	^{0,4} X ⁺ -2H ₂ O
329	15.9	104	- ^{0,2} X ⁺
389	6.3	44	- ^{0,4} X ⁺
371	6.2	62	- ^{0,4} X ⁺ -H ₂ O
359	4.1	74	- ^{0,3} X ⁺
387	3.5	46	-H ₂ O-CO

299	3.0	134	$^{-0,1}X^{+}$
-----	-----	-----	----------------

El compuesto c tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^{+}$ 595 y fue analizado por LC-MS/MS y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla XXI. La fórmula molecular y estructura propuesta es 8-C-ramnosil-7-O-ramnósido de luteolina (figura 18).

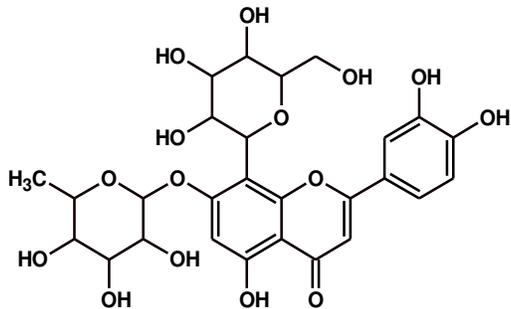


Figura 18. Estructura propuesta para compuesto c. 8-C-ramnosil-7-O-glucosido de luteolina.

Tabla XXI. Datos espectrales de masas del compuesto c.

Compuesto c [M+H] ⁺ =595			
Masa exacta: 595.1671, fórmula molecular: C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ + H ⁺			
MS ²			
m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
449	100	146	-ramnosa
431	92.2	164 (146+18)	-ramnosa -H ₂ O
329	33.0	266 (146+120)	-ramnosa- ^{0,2} X ⁺
413	22.8	182 (146+36)	-ramnosa -2H ₂ O
577	14.8	18	-H ₂ O
287	4.4	308 (146+162)	-ramnosa-hexosa
395	3.2	200 (146+54)	-3H ₂ O
311	2.4	284 (146+120+18)	- ^{0,2} X ⁺ - H ₂ O
299	1.7	296 (146+150)	- ^{0,1} X ⁺
475	1.2	120	- ^{0,2} X ⁺

MS ³ (449)			
329	100.0	120	^{-0,2} X ⁺
431	46.7	18	-H ₂ O
413	26.1	36	-2H ₂ O
359	15.9	90	^{-0,3} X ⁺

El compuesto d tiene un ion pseudomolecular de [M+H]⁺ 575 y fue analizado por LC-MS/MS y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla XXII. Después de analizar las fragmentaciones se la estructura propuesta es una 8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-2,3-ulosido de luteolina (figura 19).

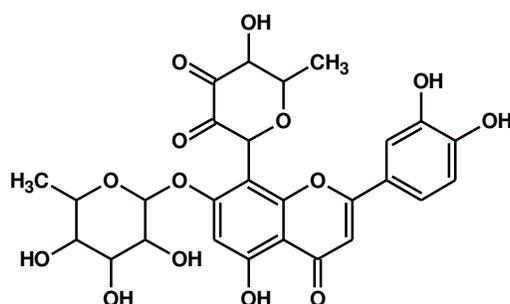


Figura 19. Estructura propuesta para compuesto d. 8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-2,3-ulosido de luteolina.

Tabla XXII. Datos espectrales de masas del compuesto d.

Compuesto d $[M+H]^+=575$

Masa exacta: 575.1392, fórmula molecular: $C_{27}H_{26}O_{14}+ H^+$

MS²

m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
429	100.0	146	-ramnosa
411	2.4	164 (146+18)	-ramnosa-H ₂ O
287	1.1	288 (146+142)	-ramnosa -2,3 ulósido
557	0.3	18	-H ₂ O
327	0.3	248 (146+102)	- ^{0,2} X ⁺
401	0.3	174 (146+28)	-ramnosa-CO
521	0.1	54	-3H ₂ O
433	0.1	142	-2,3-ulosido

MS³ (429)

411	100	18	-H ₂ O
327	50.14	102	- ^{0,2} X ⁺

355	36.5	74	$^{-0.3}X$
299	28.33	130	$^{-0.1}X$
251	16.36	178 (142+36)	-2,3 ulosido-2H ₂ O
401	7.14	28	-CO
287	5.4	142	-2,3 ulósido
373	1.08	56	-3 H ₂ O

El compuesto i tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 561 (tabla XXIII), la fragmentación es similar a la encontrada para el compuesto g. La estructura propuesta es la 8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-3-ulosido de apigenina (figura 20).

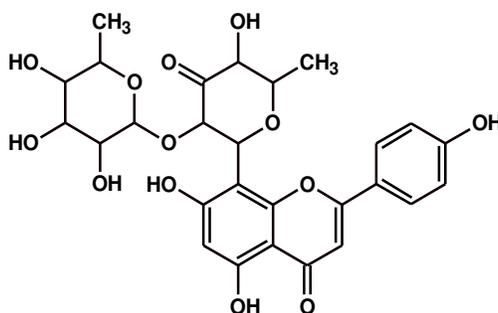


Figura 20. Estructura propuesta para compuesto i. 8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-2,3-ulosido de apigenina.

Tabla XXIII. Datos espectrales de masas del compuesto i.

Compuesto i $[M+H]^+=561$

Masa exacta: 561.1628, fórmula molecular: $C_{27}H_{28}O_{13} + H^+$

MS²

m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
415	100.0	146	-ramnosa
397	10.2	164 (146+18)	-ramnosa-H ₂ O
371	2.4	190 (146+44)	-ramnosa- ^{0,4} X
295	2.4	266 (146+120)	-ramnosa- ^{0,2} X-H ₂ O
353	2.3	208 (146+62)	-ramnosa- ^{0,4} X-H ₂ O
313	1.9	248 (146+102)	-ramnosa- ^{0,2} X
369	1.3	192 (146+46)	-ramnosa-H ₂ O-CO
283	0.5	278 (146+132)	-ramnosa - ^{0,1} X
271	0.4	290 (146+144)	-ramnosa-3-ulósido
311	0.4	250	A+41
351	0.3	210 (146+64)	-ramnosa-2H ₂ O-CO

379	0.3	182 (146+136)	-ramnosa-2 H ₂ O
507	0.3	54	-3 H ₂ O
MS³ (415)			
397	100	18	-H ₂ O
371	61.51	44	- ^{0,4} X
353	46.9	62	- ^{0,4} X-H ₂ O
313	32.46	102	- ^{0,2} X
369	23.76	46	-H ₂ O-CO
311	21.31	104	A+41
283	11.13	132	- ^{0,1} X
343	9.72	72	-4 H ₂ O
323	7.7	92	- ^{0,3} X- H ₂ O
351	7.37	64	-2H ₂ O-CO
387	6.34	28	-CO
379	3.13	36	-3 H ₂ O
295	1.87	120	- ^{0,2} X-H ₂ O

341	1.81	74	$^{-0,3}X^+$
-----	------	----	--------------

El compuesto h tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 623 (tabla XXIV); debido a la pobre información encontrada para este compuesto no es posible proponer una estructura para el mismo.

Tabla XXIV. Datos espectrales de masas del compuesto h.

Compuesto h $[M+H]^+=623$			
Masa exacta: 623.1603, fórmula molecular: $C_{28}H_{30}O_{16} + H^+$			
MS^2			
m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
477	100	146	-ramnosa
387	24.75	236 (146+90)	-ramnosa $^{-0,3}X$
533	16.19	90	$^{-0,3}X$
413	1.82	210 (146+64)	-ramnosa-2H ₂ O-CO
327	1.07	296 (146+150)	-ramnosa $^{-0,1}X^+$

605	0.61	18	-H ₂ O
MS³ (477)			
387	100	90	- ^{0,3} X
327	2.72	150	- ^{0,1} X ⁺
371	1.48	106	- ^{0,2} X ⁺
459	1.44	18	-H ₂ O

El compuesto b tiene un ion pseudomolecular de [M+H]⁺ 609 (tabla XXV) con los datos obtenidos no se puede proponer una estructura que justificara todas las fragmentaciones para este compuesto.

Tabla XXV. Datos espectrales de masas del compuesto b.

Compuesto b [M+H] ⁺ =609			
Masa exacta: 609.1455, fórmula molecular: C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆ + H ⁺			
MS ²			
m/z	% A. Relativa	Pérdida	Asignación
431	100	178 (146+32)	-ramnosa- MeOH
577	77.63	32	-MeOH
463	56.32	146	-ramnosa
329	18.6	280 (146+134)	-ramnosa - ^{0,1} X
445	16.21	164 (146+18)	-H ₂ O
413	13.61	196 (146+50)	-ramnosa- ^{2,3} X-2H ₂ O
591	8.91	18	-H ₂ O
409	4.35	200 (146+54)	-3H ₂ O
559	1.97	50	- ^{2,3} X-2H ₂ O
MS ³ (477)			
431	100	32	-MeOH

413	45.01	50	$^{-2,3}X-2H_2O$
329	41.97	134	$^{-0,1}X$
445	7	18	$-H_2O$
341	4.37	122	$^{-0,2}X- H_2O$

3.4.4 Actividad hepatoprotectora *in vitro*.

Se determinó la actividad hepatoprotectora de los medicamentos herbolarios siguiendo lo descrito en el punto 2.10, los resultados se muestran en la figura 21.

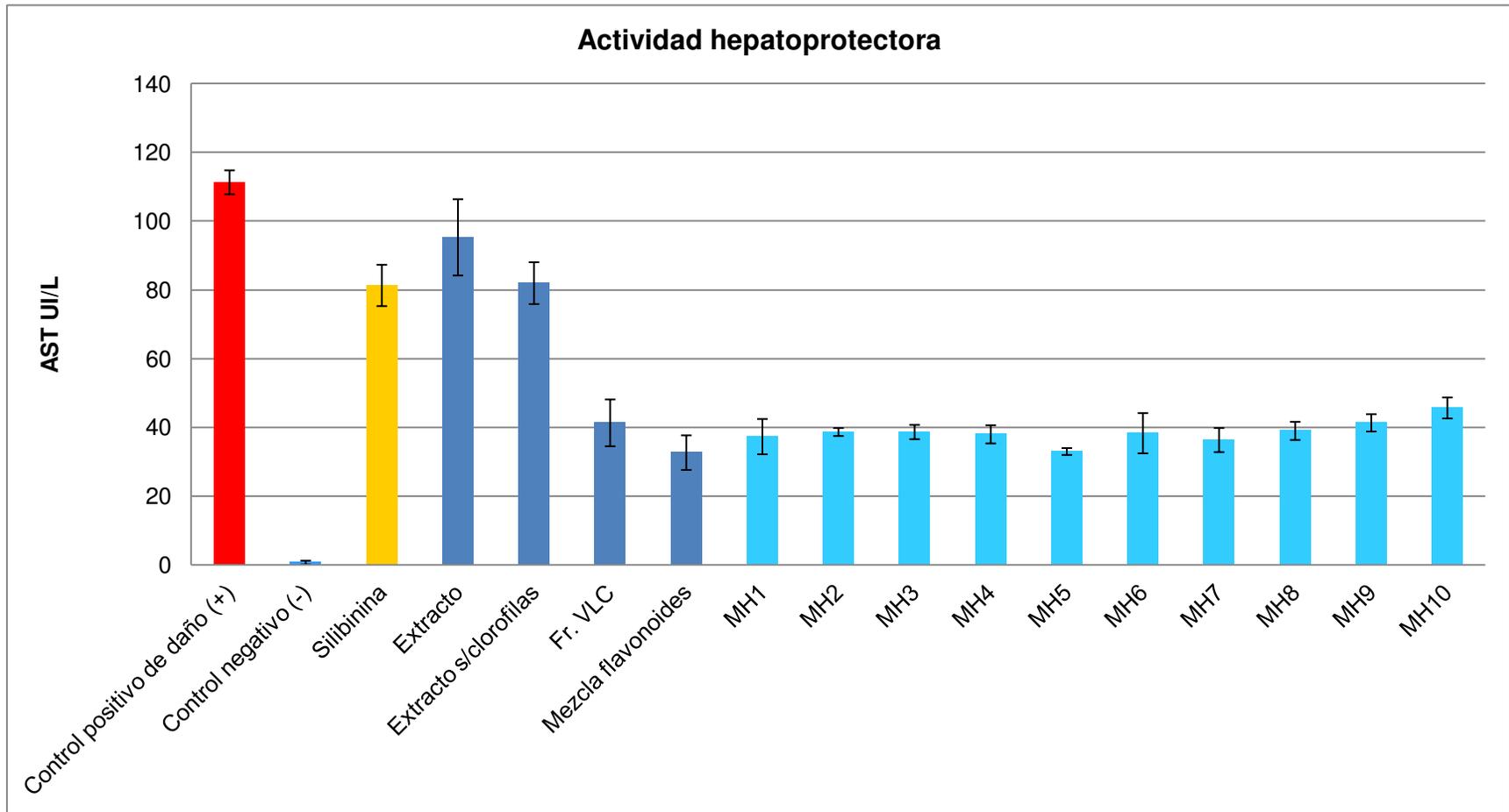


Figura 21. Actividad hepatoprotectora in vitro de los medicamentos herbolarios.

3.4.5 Determinación de estabilidad acelerada

Se cuantificó el hepatodamianol y se determinó la actividad hepatoprotectora *in vitro* del MH4 expuesto a las condiciones descritas por la NOM-073-SSA1-2015 para fármacos nuevos. Los resultados de la cuantificación y actividad hepatoprotectora se muestran en la tabla XXVI y figura 22 respectivamente. Se realizó una comparación de los cromatogramas (a λ 254nm) del análisis por HPLC de MH4 a 0, 3 y 6 meses en condiciones de estabilidad acelerada, la comparación se muestra en la figura 23.

Tabla XXVI. Cuantificación de hepatodamianol en MH4 expuesto a condiciones de estabilidad acelerada.

Tiempo (meses)	% de hepatodamianol en MH4
0	100
1	88.88 \pm 0.80
2	77.06 \pm 0.76
3	74.12 \pm 0.82
4	75.63 \pm 0.83
5	21.25 \pm 0.42
6	16.85 \pm 0.22

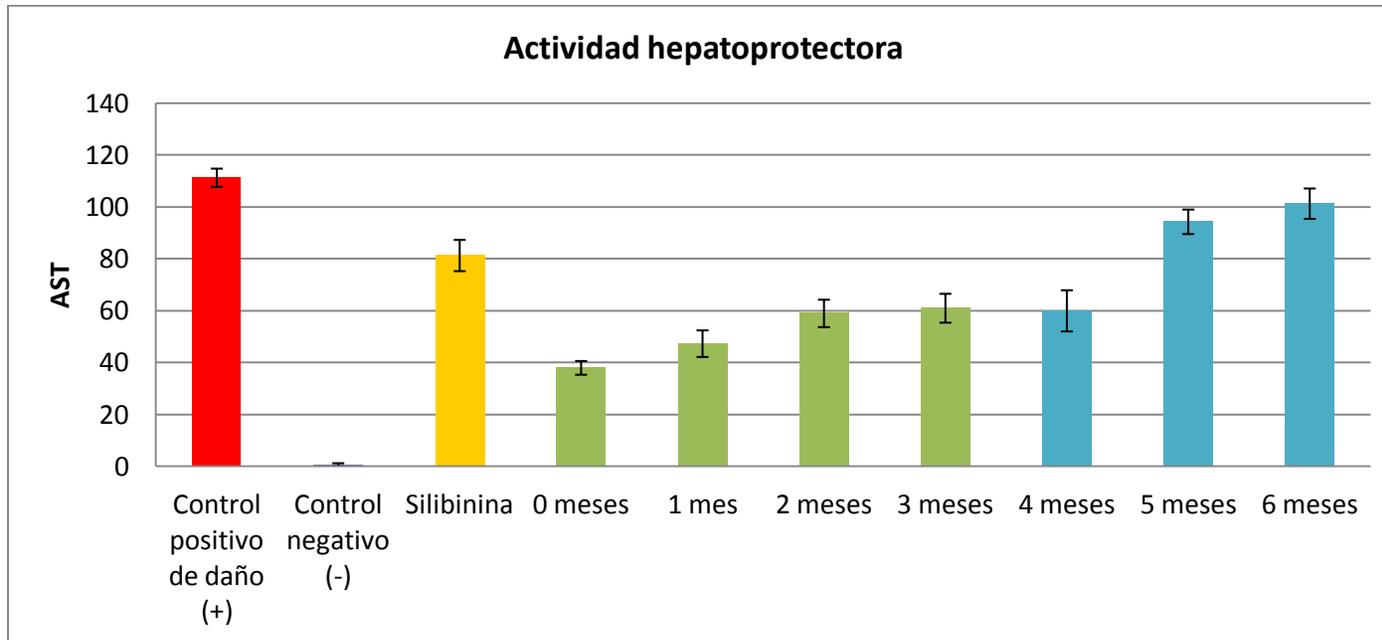


Figura 22. Actividad hepatoprotectora de MH4 bajo condiciones de estabilidad acelerada.

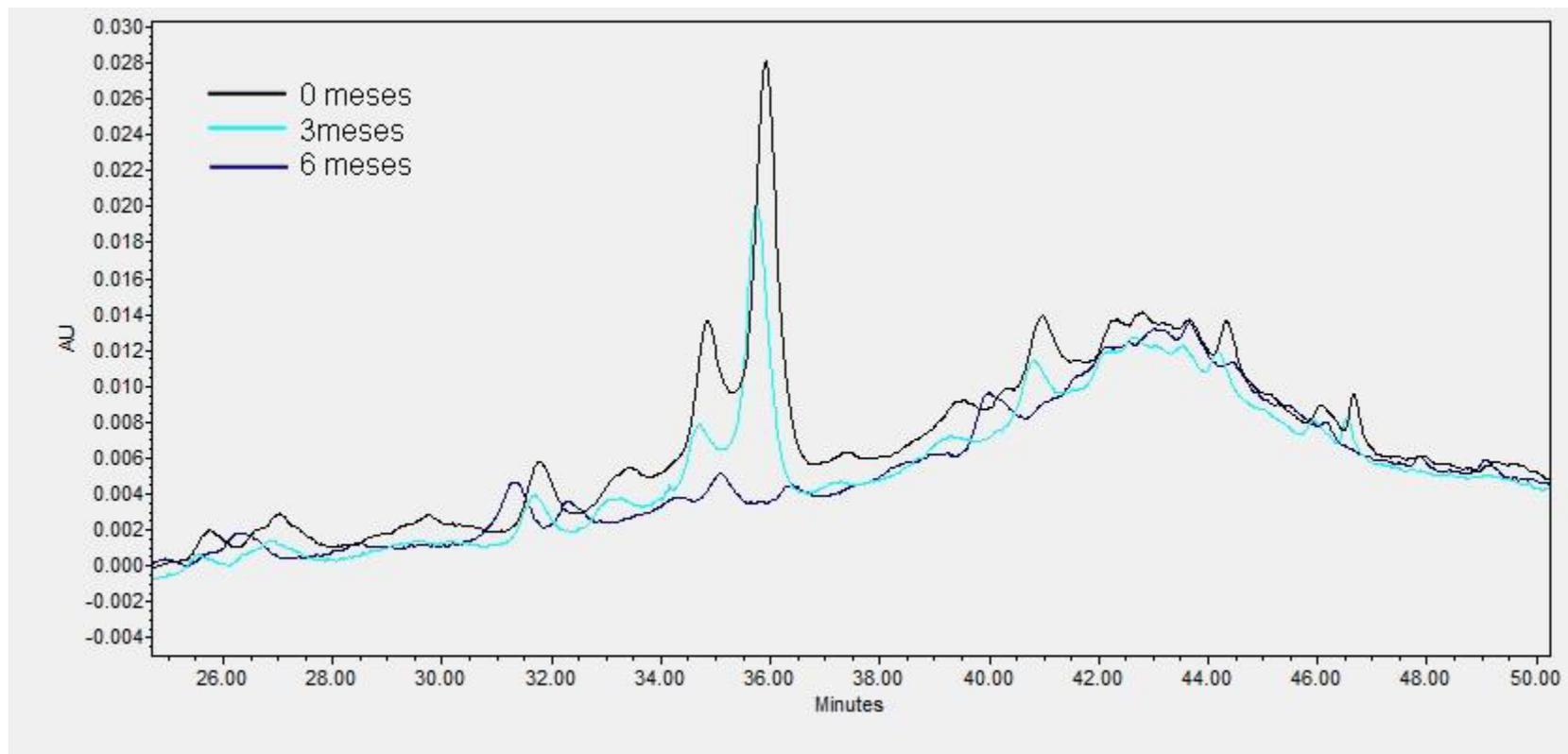


Figura 23. Comparación de los cromatogramas de MH4 a 0, 3 y 6 meses en condiciones aceleradas de estabilidad (λ 254nm).

3.5 Identificación por RMN

3.5.1 Análisis quimiométrico, identificación de componentes principales

PCA

Se obtuvieron 8 componentes principales que explicaban un 95.78% de la varianza total, se obtuvo el gráfico del componente 1 y 2 (figura 24). Se utilizaron 347 buckets para el análisis. El MH9 no se agrupó con los demás medicamentos herbolarios.

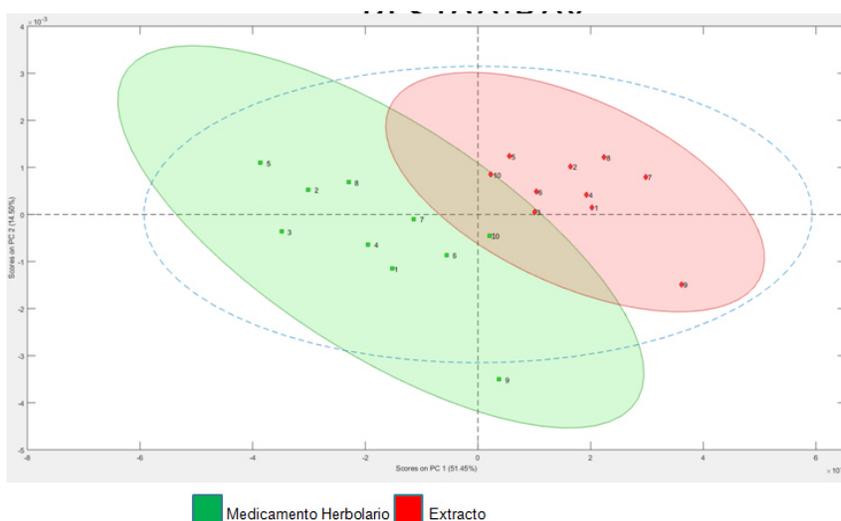


Figura 24. PCA de los medicamentos herbolarios (PC1 vs. PC2)

3.5.2 1D-TOCSY selectivo para la identificación de hepatodamianol

Se utilizaron los sistemas de spines de los metilos 6'' y 6''' (dobletes) del hepatodamianol para su identificación en los medicamentos herbolarios.

Para la señal del metilo 6''' a 0.515 ppm se dio el pulso selectivo a 219 Hz (zona media de la señal), el tiempo de mezclado óptimo para transferir la magnetización y observar las señales 5''', 4''', 3''', 2'''' y 1'''' fue de 200 ms. En el metilo 6'' a 1.40 ppm el pulso selectivo fue a 564 Hz y el tiempo de mezclado óptimo para transferir la magnetización y observar las señales 5'' y 4'' fue de 50 ms. En la figura 25 se muestra el espectro 1D-TOCSY selectivo de los metilos 6'' y 6''' y en la figura 26 se muestra la comparación del 1D-TOCSY selectivo de la muestra MH4 y el hepatodamianol.

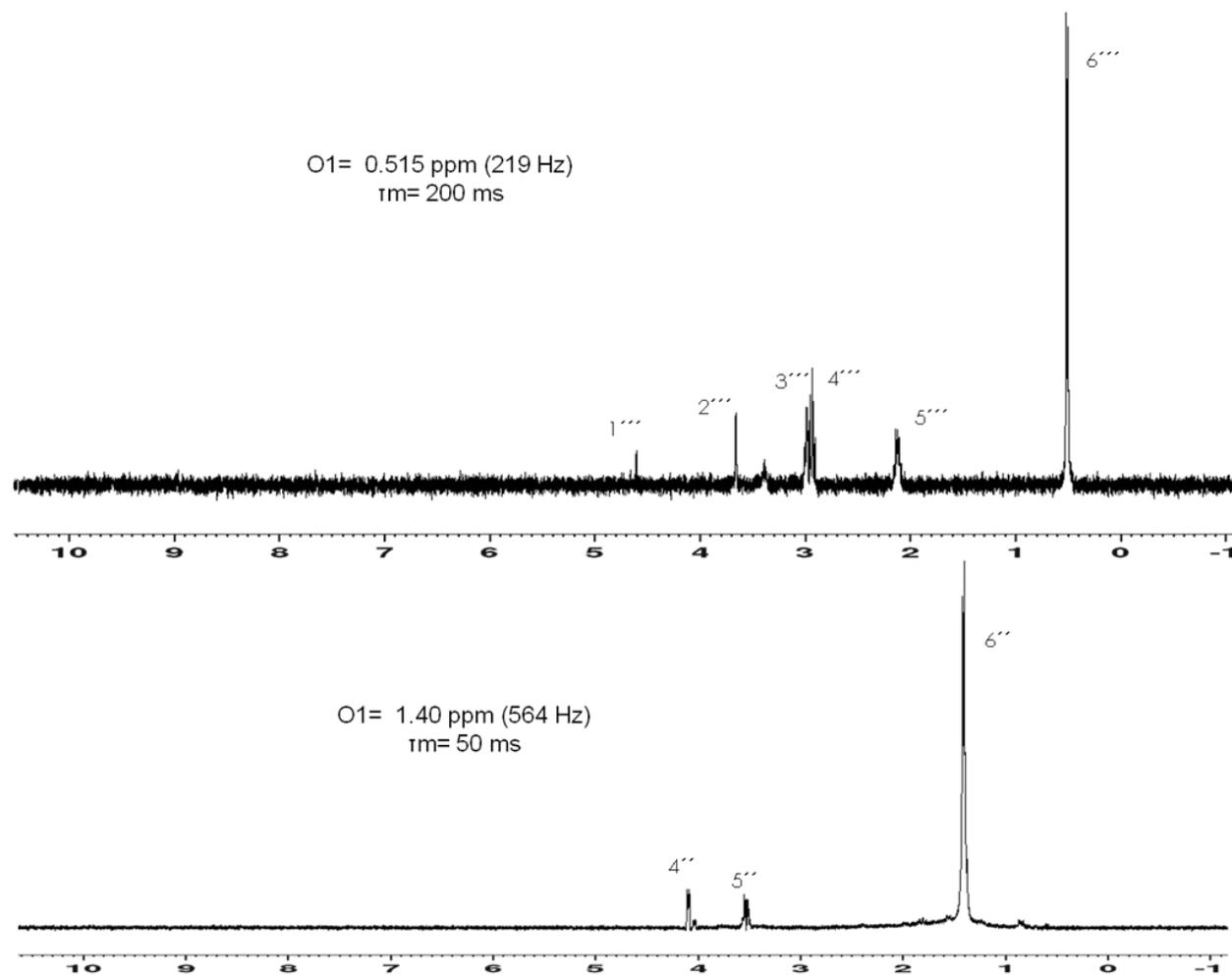


Figura 25. 1D-TOCSY selectivo para los sistemas de spines de los metilos 6''' y 6'' del heptadecanol.

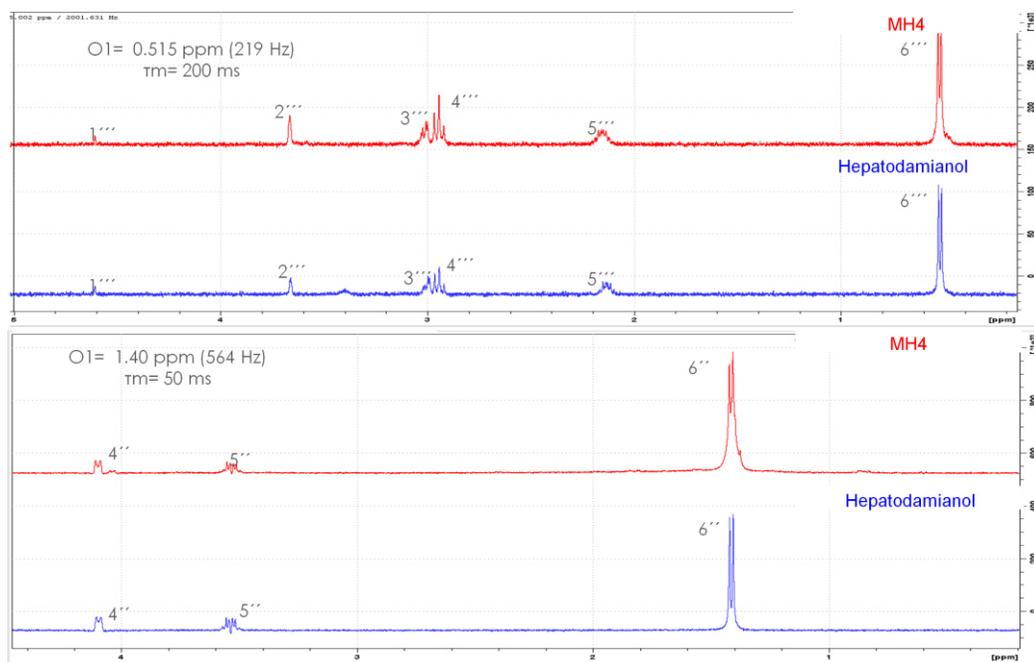


Figura 26. Comparación del 1D-TOCSY selectivo del hepatodamianol y MH4

3.5.3 Alineación optimizada mediante correlación COW

Se alinearon los espectros de hidrógeno de los medicamentos herbolarios mediante COW (figura 27) y se utilizó el producto acumulativo máximo de los coeficientes de correlación para identificar la muestra con mayor similitud (figura 28).

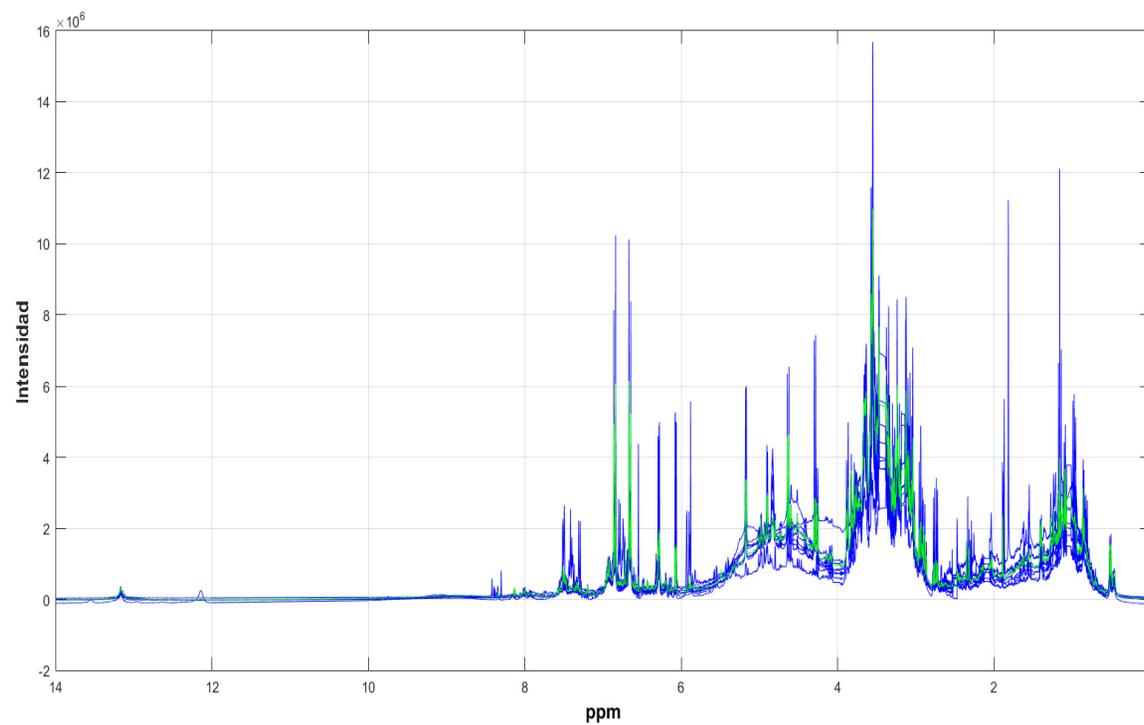


Figura 27. Alineación mediante COW de los espectros de hidrógeno de los medicamentos herbolarios.

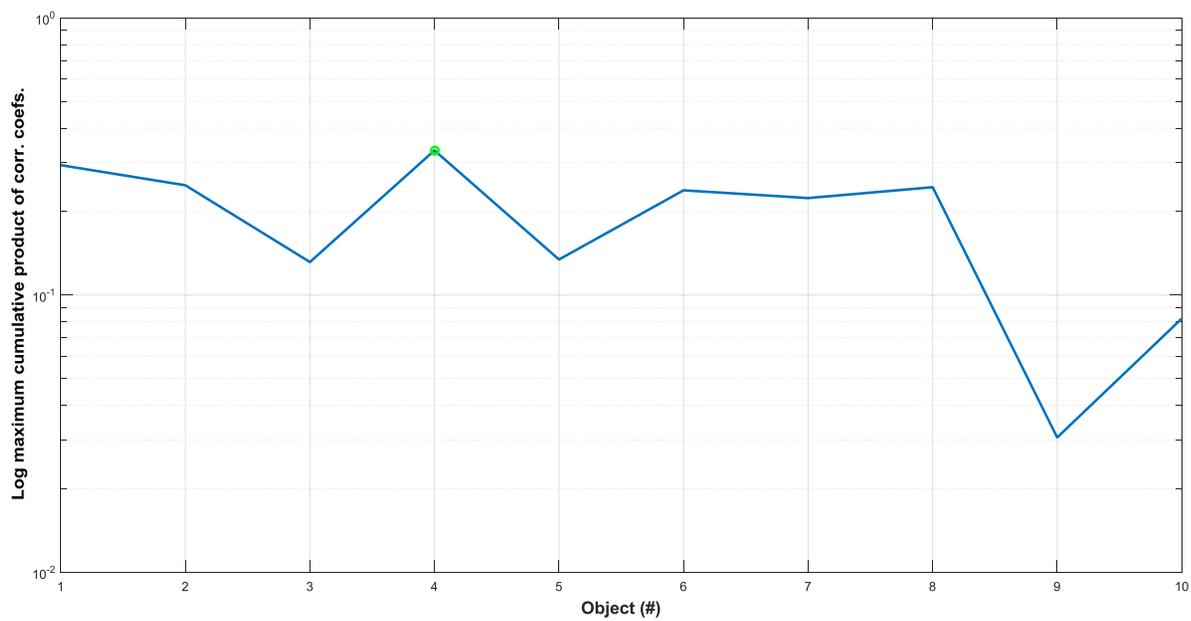
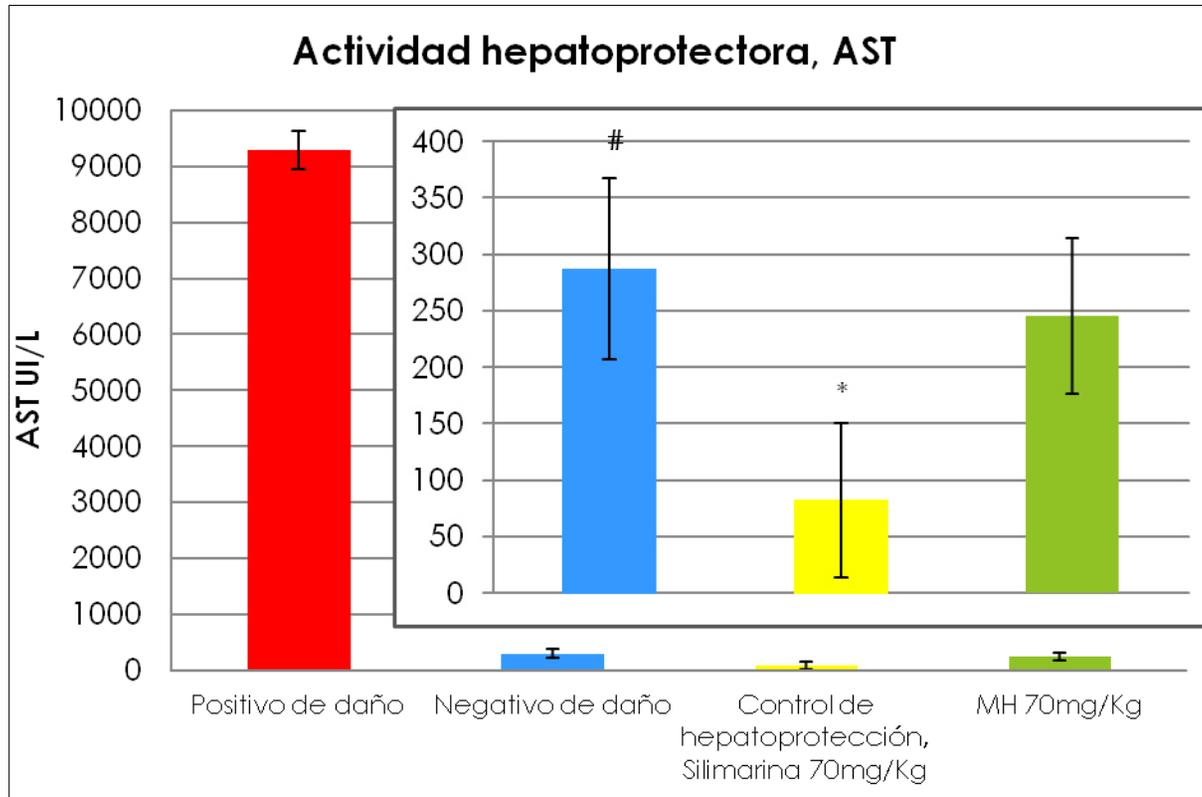


Figura 28. Ponderaje logarítmico del producto acumulativo máximo de los coeficientes de correlación de los medicamentos herbolarios.

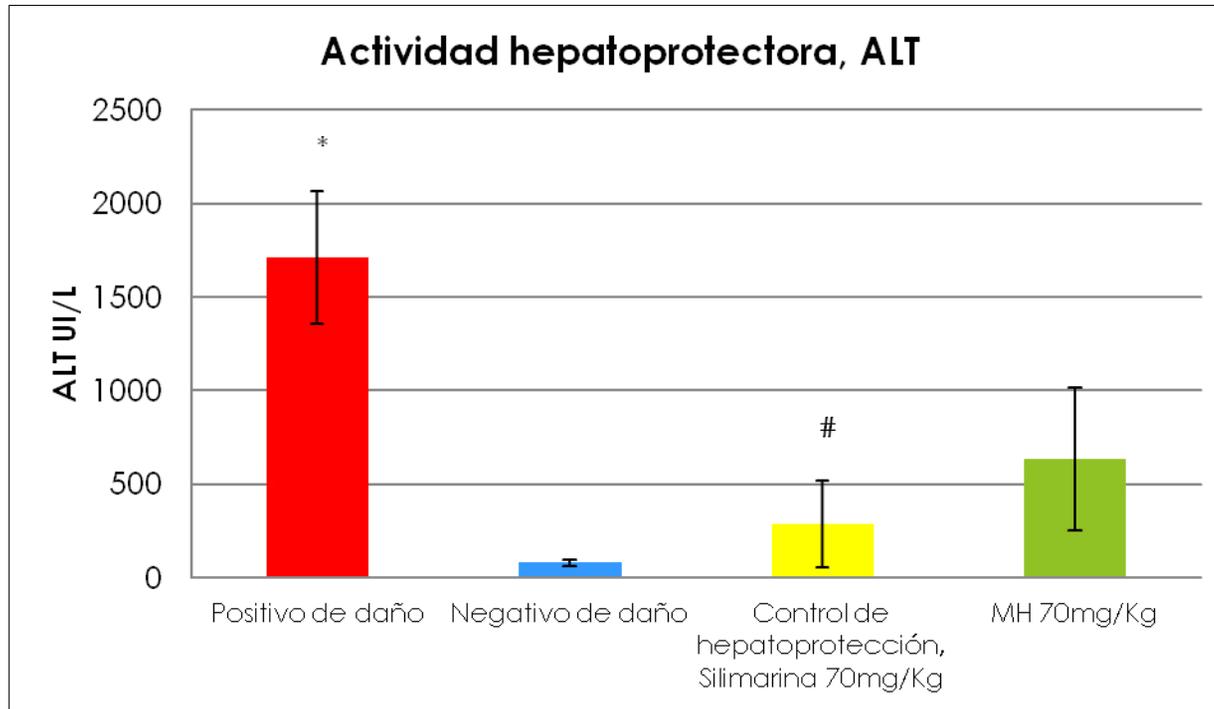
3.6 Ensayo *in vivo*

Se determinó la actividad hepatoprotectora *in vivo* utilizando ratas de la cepa Wistar como modelo experimental. Los resultados de los niveles enzimáticos de AST y ALT se muestran en las figuras 29 y 30 respectivamente.



n=4, #: Estadísticamente similares, $p > 0.05$, *: Diferencia significativa, $p < 0.05$ con respecto al medicamento herbolario

Figura 29. Actividad hepatoprotectora, niveles de AST detectados en suero.



n=4, #: Estadísticamente similares, $p > 0.05$, *: Diferencia significativa, $p < 0.02$ con respecto al medicamento herbolario

Figura 30. Actividad hepatoprotectora, niveles de ALT detectados en suero.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Las enfermedades hepáticas tienen una alta prevalencia en México y en general a nivel mundial [66], se pronostica que estas enfermedades tendrán un considerable aumento en un corto tiempo; por lo que representan un serio problema de salud pública [67]. La necesidad de tener y desarrollar nuevos esquemas de tratamiento es un factor importante para detener el avance y/o prevenir el desarrollo de este tipo de afecciones.

Los productos naturales han demostrado ser una excelente fuente de moléculas novedosas, algunas de las cuales han funcionado como fármacos o han sido inspiración o base para la síntesis de algunos otros. México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, por lo que resulta interesante la búsqueda de nuevas moléculas activas aisladas o en su defecto extractos estandarizados con un eficiente control de calidad a partir de plantas que crecen en el país para el tratamiento de las principales afecciones hepáticas.

Se seleccionó trabajar con *T. diffusa* debido a que es una planta con amplio uso etnofarmacológico y ha sido estudiada anteriormente por el grupo de trabajo. Se ha demostrado que el extracto metanólico de la parte aérea de la planta presenta actividad hepatoprotectora *in vitro* en un modelo celular [14]; además ya se identificó y aisló el compuesto, denominado hepatodamianol, el cual es el principalmente responsable de esta actividad; también se demostró que el hepatodamianol (el cual es un flavonoide C-glicosilado reportado previamente en la literatura, al cual no se le había adjudicado ninguna acción farmacológica) resultó ser poco más de 4 veces más activo que la silibinina en el modelo *in vitro* de células HepG2 dañadas con CCl₄ [56]. Sin embargo, el porcentaje de recuperación del hepatodamianol es menor al 8% a partir del extracto metanólico, por lo que proponerlo como una opción para el desarrollo de un fármaco es poco factible.

Una alternativa para este tipo de casos es el desarrollo de extractos o fracciones estandarizadas a partir de plantas con demostrada actividad biológica. En México para el tratamiento de problemas de salud se reconocen tres tipos de productos naturales; los suplementos alimenticios, los remedios herbolarios y los medicamentos herbolarios, siendo estos últimos los únicos que exigen que se confirme su eficacia y seguridad terapéutica para lograr su registro sanitario frente a COFEPRIS.

En nuestro país el desarrollo de medicamentos herbolarios es aún poco frecuente; la COFEPRIS aprobó el registro sanitario de 18 medicamentos

herbolarios en 2014, 30 registros en 2015 y 10 registros en lo que va del 2016 [68]. Los medicamentos desarrollados se componen principalmente de una sola especie de plantas, pero existen algunos que son mezclas de dos o más; las plantas mayormente utilizadas son *Valeriana officinalis* (ansiolítico) [69]–[72], *Garcinia cambogia* (control de apetito y pérdida de peso) [73]–[75], *Passiflora incarnata* (ansiolítico) [76]–[79], *Panax ginseng* (adaptógeno) [80], [81], *Cordia verbenacea* (antiinflamatorio) [82], [83], *Coffea canephora* (estimulante) [84], *Silybum marianum* (hepatoprotector) [85]–[91], *Hedra helix* (espasmódica, expectorante) [75], [92]–[94], *Ginkgo biloba* (mejorar la memoria, ansiolítico) [95]–[98], *Hypericum perforatum* (antidepresivo) [99]–[102], *Echinacea purpurea* (enfermedades respiratorias) [75], [103]–[106], *Vitis vinifera* (antihiperlipidémico) [107], [108]. Es importante recalcar que aunque se han desarrollado medicamentos herbolarios hepatoprotectores en nuestro país, todos estos están formulados a base de *Silybum marianum*, la cual no es una planta mexicana.

Para el desarrollo del medicamento herbolario a partir de la parte aérea de *T. diffusa* se llevó a cabo el proceso de fraccionamiento descrito previamente para la obtención del hepatodamianol [57], esto se realizó con la finalidad de obtener fracciones con diferente grado de pureza o concentración de hepatodamianol. Cada una de las muestras obtenidas (Extracto, Extracto s/clorofilas, Fr. VLC y Mezcla de Flavonoides) se analizaron por HPLC, y se determinó su actividad hepatoprotectora y citotóxica; todos los datos se obtuvieron simultáneamente.

Con la información obtenida y haciendo un análisis de costos/proceso de purificación se seleccionó la Fr. VLC para el desarrollo del medicamento herbolario debido a:

- En el análisis por HPLC se pudo observar como la fracción está enriquecida en hepatodamianol.

- En cuanto a la actividad hepatoprotectora no hay diferencia significativa entre la Fr. VLC y Mezcla de flavonoides con una $P < 0.05$; al comparar la Fr. VLC con la silibinina (control de hepatoprotección) si se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$), siendo más activa la Fr. VLC.

- Si bien la fracción Mezcla de flavonoides es una fracción más limpia y enriquecida en hepatodamianol, requiere de un paso extra en el proceso de purificación, lo cual aumenta costos y hace más largo el proceso de obtención del medicamento herbolario.

- Tanto la fracción seleccionada como las otras fracciones no fueron citotóxicas (valores de $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$). Por el contrario el extracto metanólico (muestra anteriormente llamada "Extracto") mostró ser moderadamente tóxico con una CC_{50} de $49.73 \pm 5.03 \mu\text{g/mL}$; esto concuerda con lo reportado por Avelino y colaboradores [109] los cuales determinaron la CC_{50} del extracto metanólico de *T. diffusa* en valores de 30.67 a 63.24 $\mu\text{g/mL}$ en diferentes líneas celulares, incluyendo líneas cancerosas y normales.

Una vez que se seleccionó la fracción para el desarrollo del medicamento herbolario, se prosiguió con la identificación de las variables que afectaban la obtención del extracto metanólico; se trabajó con un diseño factorial completo de 19 experimentos (16 diseños y 3 valores centrales).

En los gráficos de coeficientes para las variables analizadas se pudo observar que los factores volumen de solvente y número de extracciones eran los que afectaban significativamente ($P < 0.05$) la respuesta "% de Recuperación", ninguna de las interacciones entre variables tuvieron efecto significativo ($P > 0.05$). Por el contrario, para la respuesta "Área hepatodamianol" ninguna variable o interacción entre ellas tuvo significancia ($P > 0.05$) (Figura 14).

Una vez identificadas las variables que afectaban significativamente el proceso de extracción, se seleccionó el experimento N12 para seguir con el proceso de optimización ya que presentó los mejores valores de % de recuperación y área de hepatodamianol.

Utilizando las condiciones experimentales de N12 se optimizaron las variables volumen de solvente y número de extracciones. Para esto se hicieron experimentos independientes en los cuales para optimizar la variable "volumen de solvente" la cantidad MeOH se mantuvo constante (150mL como volumen total en las extracciones) y el solvente se fraccionó en el número de extracciones a realizar (Tabla XII). Por otro lado; para optimizar el número de extracciones se utilizaron tres diferentes volúmenes de MeOH (15, 20 y 25 mL) y se extrajo la planta en 3, 4 y 5 ocasiones (Tabla XIII).

Al analizar los resultados de estos experimentos, se observó que las condiciones de los experimentos S2 y S3 generaban los rendimientos más altos. Aunque el experimento S3 mostraba casi el doble de % área de hepatodamianol (área relativa) en comparación con S2, mediante un análisis de los cromatogramas se observó que la diferencia se debía a la forma en que se realizó la integración de los picos en el cromatograma (había muy poca cantidad de picos integrados en la muestra del experimento S3), (figuras 31 y 32) por lo que se decidió hacer la comparación en base a la altura y área de hepatodamianol.

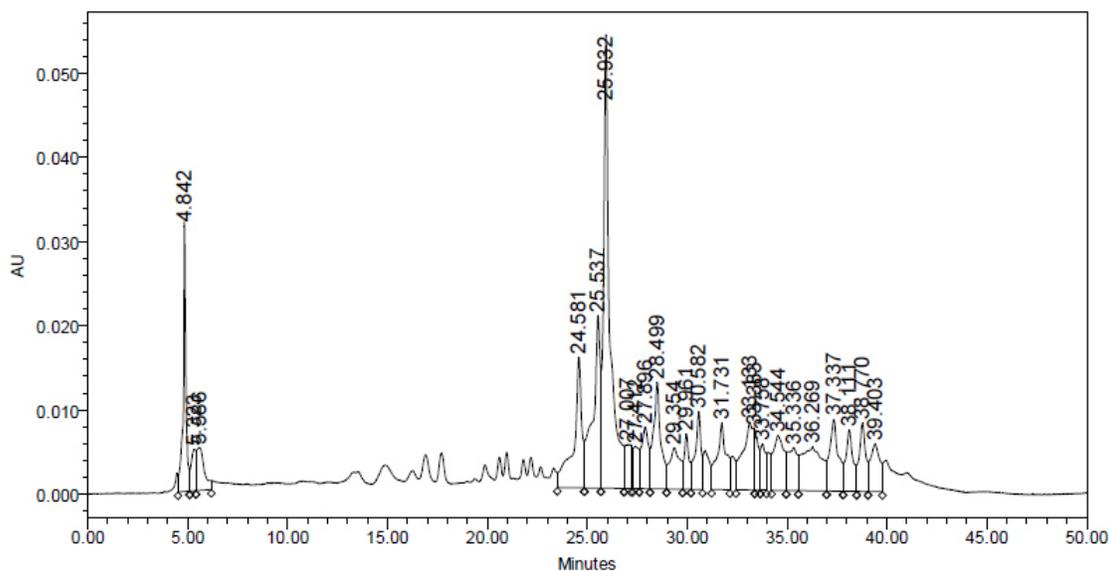


Figura 31. Cromatograma del experimento S2, λ 254 nm.

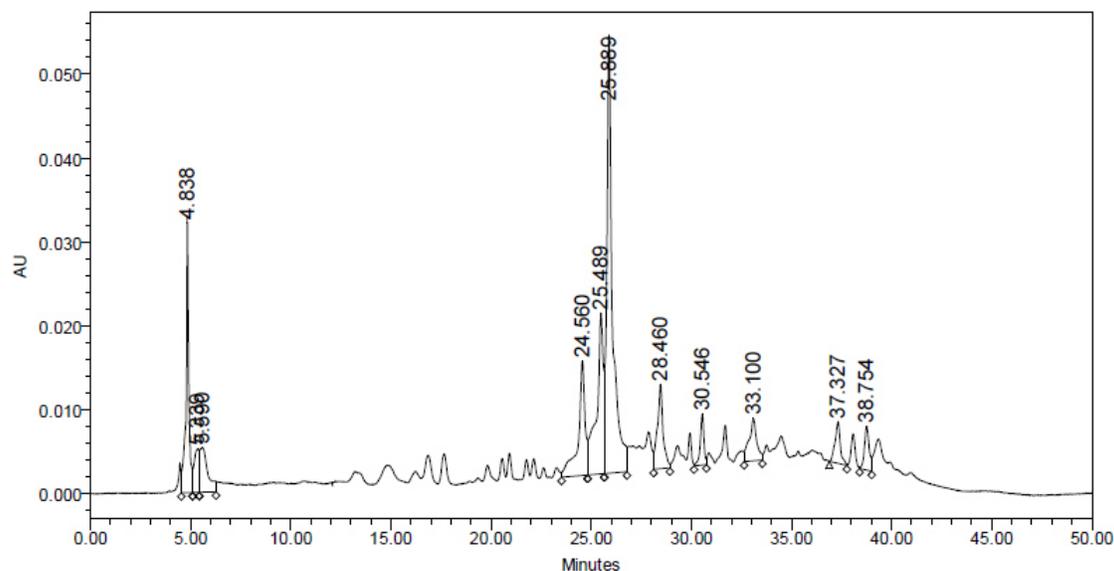


Figura 32. Cromatograma del experimento S3, λ 254 nm.

Los resultados de altura y área de hepatodamianol en ambos experimentos son muy similares, siendo ligeramente mayores en el experimento S2.

Debido a todo lo anterior, se seleccionaron las condiciones del experimento S2 (3 extracciones con 50 mL de solvente cada una), además estas condiciones experimentales implican dos horas menos en el proceso de extracción en comparación con S3.

Una vez obtenido los extractos con las condiciones optimizadas, se procedió a establecer parámetros que permitieran su control de calidad. Para ello, se determinaron diferentes parámetros químicos, esto con el fin de establecer el perfil que debería de presentar una colecta (procesada por el método anteriormente optimizado) para ser considerada como el medicamento herbolario. Si el lote

cumple con todas estas características se podría, por lo tanto, predecir presentará actividad hepatoprotectora en un sistema biológico.

Mediante un análisis de contenido de las muestras se pudo observar que todas tienen un perfil cromatográfico similar; el contenido de hepatodamianol se cuantificó con un método validado. En la tabla XV se puede observar que la muestra MH9 seguida de MH1 mostraron el mayor contenido de hepatodamianol, mientras que las muestras con menor cantidad fueron MH10, MH8 y MH5. Las concentraciones encontradas están entre 48.3 y 256.9mg de hepatodamianol por gramo de medicamento herbolario.

En cuanto al contenido de flavonoides totales la muestra que mayor cantidad mostró fue MH9 seguida de MH6 y MH1. El ensayo de DPPH dio como resultado que la actividad antioxidante fue mayor en la muestra MH9, la cual presentó una CE_{50} de casi la mitad respecto a las otras muestras.

Estos resultados se resumen en lo siguiente: la muestra con el mayor contenido de hepatodamianol y mayor cantidad de flavonoides totales presentes (MH9) fue también la muestra que presentó la mejor actividad antioxidante. Sin embargo, las muestras MH8 y MH10 que mostraron el menor contenido de flavonoides totales no fueron las de menor actividad antioxidante.

Es de conocimiento en nuestro grupo de trabajo que los meses de otoño-invierno, específicamente el mes de Noviembre-Enero, es cuando la planta expresa el mayor contenido de hepatodamianol en el año. En los resultados podemos observar que para estas muestras no sucedió lo esperado, esto se

puede deber al cambio climático que se ha presentado en la región en los últimos años, las lluvias en meses de verano y la llegada tardía del invierno pudieron afectar la planta y por lo tanto la producción de sus metabolitos secundarios.

Aunque se demostró que en los medicamentos herbolarios hay diferencia en el contenido de hepatodamianol, flavonoides totales y actividad antioxidante, los resultados de la actividad hepatoprotectora *in vitro* no demostraron diferencia significativa entre ellos. Todos los medicamentos herbolarios resultaron ser hepatoprotectores, y esta actividad resultó ser mejor que la obtenida con la silibinina. Estos resultados nos indican que si bien el hepatodamianol es uno de los responsables de la actividad hepatoprotectora, en realidad la mezcla de todos los compuestos presentes parece tener un papel importante para el efecto protector.

Cuando se está desarrollando un medicamento herbolario no es solo necesario conocer la o las moléculas responsables de la actividad farmacológica, sino, conocer los principales componentes presentes en la mezcla, esto con el fin de tener un mayor conocimiento del contenido del medicamento y tener un mejor control de calidad. Es por esto que se planteó realizar la identificación de los componentes principales.

El análisis se realizó por medio de UHPLC-UV/Vis-MS/MS; el análisis cromatográfico se centró en conocer la mezcla de flavonoides, por ser los componentes mayoritarios de esta fracción. Está descrito que los flavonoles y flavonas tienen espectros con λ máximas de absorción a 255/370 y 268/340 nm

respectivamente. Después de sobreponer los cromatogramas a 254 y 350 nm se pudo observar que la mayoría de los picos cromatográficos absorbían a ambas longitudes de onda, por lo tanto, debido a lo anterior y a que estudios fitoquímicos desarrollados en *T. diffusa* han reportado la presencia de compuestos polifenólicos y flavonoides, se podía suponer que se trataba de este tipo de metabolito secundario [26], [35]. (Figura 33); esto se corroboró posteriormente al analizar la fracción por espectrometría de masas, ya que cada uno de los picos identificados correspondía a un flavonoide glicosilado con base lueolina o apigenina.

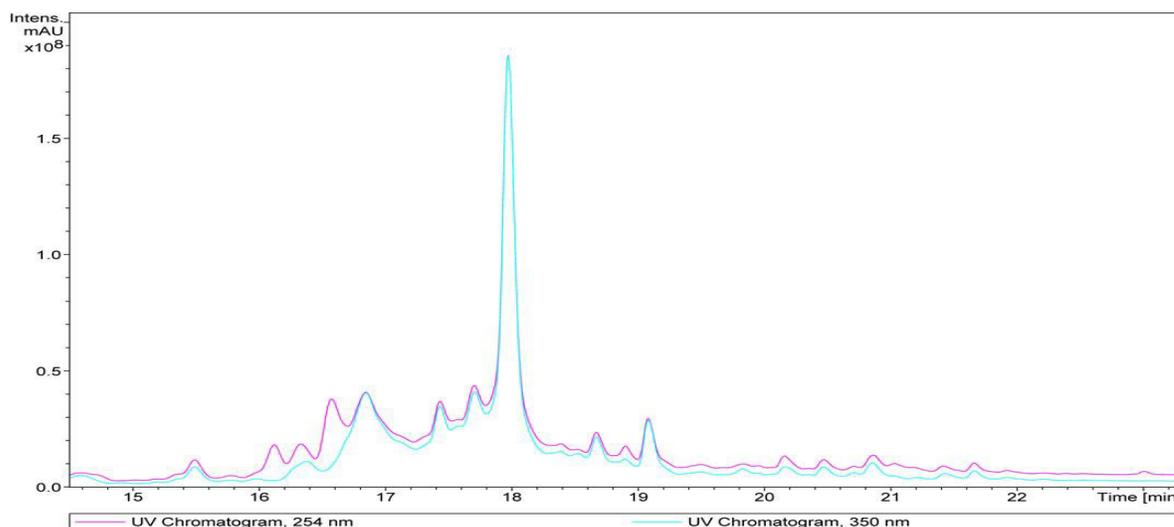


Figura 33. Cromatograma de la fracción Mezcla de Flavonoides a 254 y 350nm

En la actualidad la RMN sigue siendo la herramienta por excelencia para la elucidación estructural en productos naturales; es una técnica no destructiva, pero tiene la desventaja de requerir de varios miligramos de muestra y que se

encuentre en un alto grado de pureza. Para el estudio de los flavonoides glicosilados presentes en *T. diffusa*, se dificulta el aislamiento de cada uno de ellos debido a que se presentan como una matriz compleja que no se puede resolver con las condiciones cromatográficas desarrolladas. La idea de purificar la cantidad necesaria de cada uno de estos compuestos para su elucidación por RMN no es tan factible.

En los últimos años la espectrometría de masas acoplada en tandem a cromatografía de líquidos se ha convertido en una alternativa para identificar compuestos presentes en mezclas que son difíciles de separar, tiene la ventaja de requerir de menor cantidad de muestra (comparada con RMN) y brinda valiosa información para la caracterización estructural de los compuestos [110]. [110].

Los flavonoides poseen un núcleo de tres anillos de difenilpropano ($C_6C_3C_6$) figura 34, las modificaciones usuales en el núcleo base son hidroxilaciones y/o metilaciones en las posiciones C-3, C-5, C-7, C-3', C-4' y/o C-5'. Ocasionalmente ácidos alifáticos o aromáticos, grupos sulfato, prenilo o isoprenilos están unidos al esqueleto del flavonoide [110].

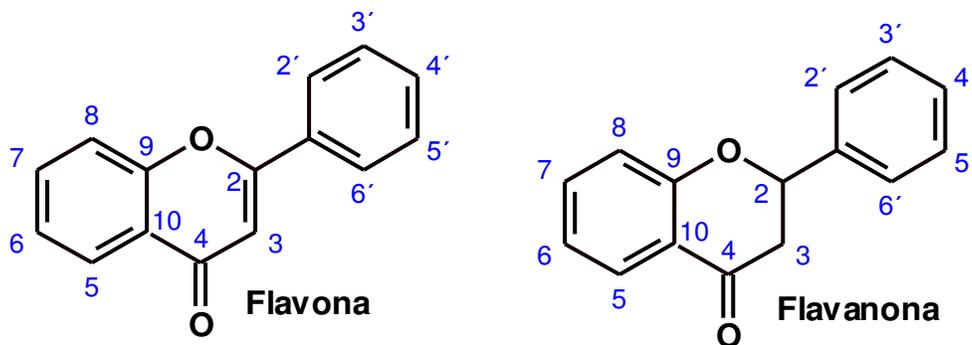


Figura 34. Estructura base de los flavonoides.

En plantas, los flavonoides se presentan generalmente como glicósidos. Los O-glicósidos tiene un azúcar como sustituyente unido mediante un grupo hidroxilo de la aglicona; mientras que en el caso de los C-glicósidos, el azúcar está unido a la aglicona a través de un enlace carbono-carbono. Los monosacáridos más frecuentemente encontrados en este tipo de estructuras son la glucosa y ramnosa y en menor frecuencia la arabinosa, xilosa y ácido glucurónico [110].

Los iones fragmento producidos en el análisis de flavonoides glicosilados por espectrometría de masas se designan generalmente por el sistema de nomenclatura diseñado por Domon y Costello (figura 35) [111].

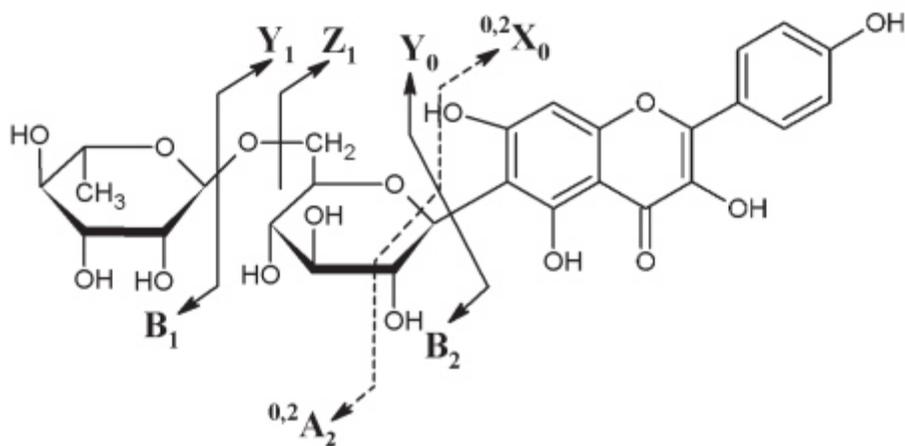
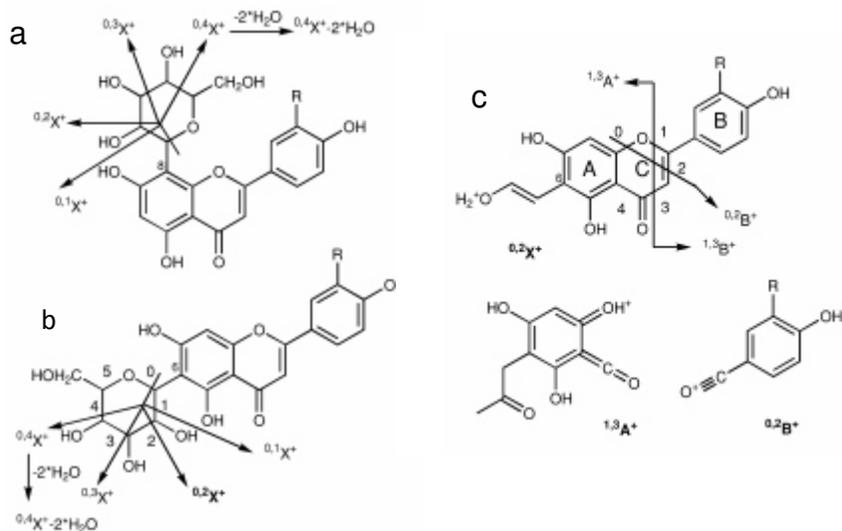


Figura 35. Sistema de nomenclatura para flavonoides glicosilados por Domon y Costello [111].

Teóricamente un azúcar puede estar unido a cualquiera de los grupos hidroxilo de la aglicona, pero hay ciertas posiciones que son favorecidas tales como el grupo 7-hidroxilo para flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas y la posición 3-OH para flavonoles.

La nomenclatura utilizada para describir las fragmentaciones en los azúcares C-unidos se muestran en la figura 36.



a: 6-C-glicosido, b: 8-C-glicosido, c: fragmentación de $^{0,2}X^+$ en el caso de isómero 6-C

Figura 36. Nomenclatura utilizada para los fragmentos de los flavonoides C-glicósidos.

Para las C-glicosilaciones solo se han encontrado hasta la fecha en las posiciones C-6 y C-8. Se ha descrito que espectros MS/MS de iones positivos para los isómeros mono C-glicósidos apigenina 8/6-C-glicosido (vitexina/isovitexina) y luteolina 8/6-C-glicosido (orientina/isorientina) difieren únicamente en las intensidades relativas de las pérdidas. Para el isómero 8-C-glicosilado la pérdida de agua ($[M+H]^+ - 18$) se observa como el pico base, mientras que el isómero 6-C-glicosilado el fragmento correspondiente a la pérdida $^{2,3}X^+ - 2H_2O$ muestra la mayor intensidad. Sin embargo para los pares vitexina/isovitexina no se encontraron estas diferencias [110]. Waridel *et.al.* reportaron que en los

espectros MS/MS de modo negativo la pérdida ($[M-H]^+-18$) se observa solo en el isómero 6-C-glicosido [112].

Con esto se evidencia que los parámetros instrumentales afectan el patrón de fragmentación por lo que no se puede aún determinar por MS/MS la posición inequívoca de las glicosilaciones; sin embargo si se cuenta con estándares de los isómeros C-glicosilados y/o O-glicosilados se pueden comparar los patrones de fragmentación de los estándares con los compuestos de interés y así poder determinar cuál sería la posición de la unión azúcar-flavonoide.

En la fracción en estudio el compuesto g (hepatodamianol) identificado inequívocamente mediante RMN en estudios previos, como 8-C- β -[6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-*xilo*-hexopiranos-3-ulosido] de luteolina [33] fue analizada por LC-MS/MS y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla XIX. Puede observarse el ion pseudomolecular $[M+H]^+$ 577 y la pérdida de 146 u, correspondientes a la pérdida de la ramnosa O-enlazada que produce el ion m/z 431(ion base). En el espectro de MS^2 el ion m/z 431 pierde agua para dar el segundo ion más abundante, m/z 413. Posteriormente, se observan los iones m/z : 329, 387, 357 y 299, correspondientes a la pérdida de 102, 44, 74 y 132u respectivamente, esto concuerda con las fragmentaciones esperadas para el azúcar enlazado a la aglicona mediante unión C-C. Este azúcar C-enlazado posee la particularidad de tener un grupo cetónico en la posición 3, por lo que las pérdidas que involucran esta posición, la $^{0,1}X$ y $^{0,2}X$ poseen 2u menos que las que se presentan en los azúcares de tipo deoxyhexosas, 134 y 104 respectivamente.

Las fragmentaciones del azúcar C-enlazado solo se observan posteriores a la pérdida de ramnosa, esto indica que la ramnosa está enlazada a un hidroxilo de este azúcar y no a uno de la aglicona.

En cuanto al enlace interglicosídico se evidencia el ión m/z 102 ($-^{0,2}X^+$); esto implica que el azúcar O-enlazado no puede estar sobre las posiciones 6", 4" y 3", debido a que esta pérdida involucra las posiciones mencionadas. Por lo tanto, las fragmentaciones obtenidas están de acuerdo con la estructura ya reportada por Zhao *et. al.*[33] para el hepatodamianol.

El compuesto a tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 579 (tabla XX) y el ion base en la MS^2 es la pérdida de 146 u a partir del ion pseudomolecular; pérdida atribuible a una deoxihexosa, probablemente ramnosa, enlazada por una unión tipo O-glicosídico. Posteriormente, se observan las pérdidas de agua y los fragmentos provenientes de las pérdidas 104, 134, 80, 122, características de una deoxihexosa unida por un enlace C-glicosídico a la aglicona; esto se corroboró en el experimento MS^3 . El ion m/z 287 indica la presencia de luteolina como aglicona.

La posición de los azúcares O-enlazados puede ser sobre un hidroxilo aromático del flavonoide o sobre un hidroxilo del azúcar C-enlazado a la aglicona. En el primer caso, se observarían fragmentos abundantes correspondientes a la pérdida del azúcar O-enlazado (ej. -146u, deoxihexosas), mientras que en el segundo caso, el ion más abundante serían el generado por la pérdida de agua [113], [114].

Sin embargo esta información no está de acuerdo con los resultados obtenidos en las fragmentaciones del hepatodamianol donde la pérdida de 146 u es el ion base; por lo que no podemos tomar esta información como base para poder hacer la asignación de la unión de los azúcares O-enlazados.

No obstante en el espectro de masas observamos que a partir del ion pseudomolecular puede darse la pérdida de 104 u, lo que implicaría que no es necesario que se pierda previamente la unidad de ramnosa; con esta información se puede concluir que el O-azúcar no estaría enlazado a la ramnosa. El compuesto a es una flavona di-O-C-glicosilada.

La posición más común de unión O-glicosídica es en el hidroxilo 7, sin embargo no es posible definir este sitio de unión mediante la EM. Con respecto a la posición de la C-glicosilación (8C ó 6C) se asume arbitrariamente para los compuestos que se identificaron la posición 8; esto de acuerdo con el compuesto g, sin embargo es importante aclarar que con la información encontrada no se puede asignar una posición inequívocamente. No existe hasta el momento un criterio aceptado en la literatura para hacer esta distinción en compuestos diglicosilados utilizando solamente EM, más aun cuando no se tienen los dos isómeros que permitan establecer en las condiciones de análisis las diferencias en los patrones de fragmentación.

Teniendo en cuenta lo anterior y de acuerdo con la fórmula molecular la estructura propuesta es la 8-C-ramnosil-7-O-ramnósido de luteolina (figura 17).

El compuesto c, tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 595 (tabla XXI) y, al igual que en los dos compuestos anteriores, el ion base en la MS^2 es la pérdida de 146 u, atribuible probablemente a la pérdida de ramnosa, enlazada por una unión tipo O-glicosídico. En el MS^3 se observa como ion base el fragmento m/z 329, el ión m/z 475 (pérdida de 120 u, $^{-0,2}X^+$) y el ión m/z 359 (pérdida de 146 + 90 u, $^{-0,3}X^+$); en el MS^2 se observa el fragmento m/z 299 (pérdida de 146 + 150, $^{-0,1}X^+$) todos concordantes con la ruptura de una hexosa C-enlazada. Teniendo en cuenta que se observa la pérdida de 120 u directamente del ion pseudomolecular puede proponerse que la ramnosa esta enlazada a un hidroxilo de la aglicona. La estructura propuesta asumiendo los azúcares ramnosa y glucosa es la 8-C-ramnosil-7-O-glucosido de luteolina (figura 18).

El compuesto d tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 575 (tabla XXII). En el MS^2 el ion base es pérdida de 146 u (ramnosa). La diferencia de masa hace pensar en dos H menos que el compuesto g (hepatodamianol) y 4 unidades menos que el compuesto a. Esta diferencia de masa no está en el O-azúcar puesto que la pérdida es de 146 u y tampoco parece estar en la aglicona puesto que se observa el ion m/z 287, lo que lleva a pensar que la diferencia está en el azúcar C-enlazado. Se propone que exista un carbonilo extra en relación al compuesto g.

Al analizar las fragmentaciones se observan los iones correspondientes a las pérdidas de 130, 102, 74 u correspondientes a las pérdidas $^{-0,1}X^+$, $^{-0,2}X^+$ y $^{-0,3}X^+$, donde se evidencian las 2 unidades menos que en la rupturas presentes en el

compuesto g; además la diferencia entre los dos primeros fragmentos (rupturas $^{0,1}X^+$ y $^{0,2}X^+$) es de 28 u, lo que implica que la posición 2 al igual que la posición 3 es un carbonilo.

La estructura propuesta es una 8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-2,3-ulosido de luteolina (figura 19).

El compuesto i tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 561 (tabla XXIII), en el Ms^2 el ion base es pérdida de 146 u (ramnosa O-enlazada). Se observan las pérdidas de 132, 102, 74 y 44 u, posteriores a la pérdida de la unidad de ramnosa; esta fragmentación es similar a la encontrada para el compuesto g.

Los datos obtenidos indican que la diferencia entre el compuesto i y g se encuentra en la aglicona; en el compuesto i se observa el ión m/z 271 el cual corresponde a la apigenina. La estructura propuesta es la 8-C-ramnosil-7-O-hexopiranos-3-ulosido de apigenina (Figura 20).

El compuesto h tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 623 (tabla XXIV); se observa como ion base del Ms^2 la pérdida de 146 unidades, probablemente por la pérdida de una unidad de O-ramnosa. Adicionalmente se observa la pérdida de 90 u ($^{-0,2}X$) tanto del ion pseudomolecular como del ion resultante de la pérdida de ramnosa; debido a esto se asume que existe una unidad de azúcar C-enlazado.

El C-azúcar unido muestra una ruptura donde se pierden 150 u por lo que podría ser una glucosa o arabinosa, sin embargo no se observa un fragmento atribuible a una ruptura $^{0,2}X$ que ayudara a distinguir entre estos azúcares. Debido

a la pobre información encontrada para este compuesto no es posible proponer una estructura para el mismo.

El compuesto b tiene un ion pseudomolecular de $[M+H]^+$ 609 (tabla XXV), a diferencia de todos los compuestos analizados se caracteriza por la pérdida de 178 u, 32 unidades de masa más que la ramnosa, para dar el ion base m/z 431.

Adicionalmente se observa la pérdida de 32 u a partir el ion pseudomolecular lo que hace pensar que estas 32 u no pertenecen necesariamente al azúcar. La justificación de esta pérdida es una reacción intramolecular en la que se produce MeOH, beneficiada por la formación de un pentaciclo según se muestra en la figura 37.

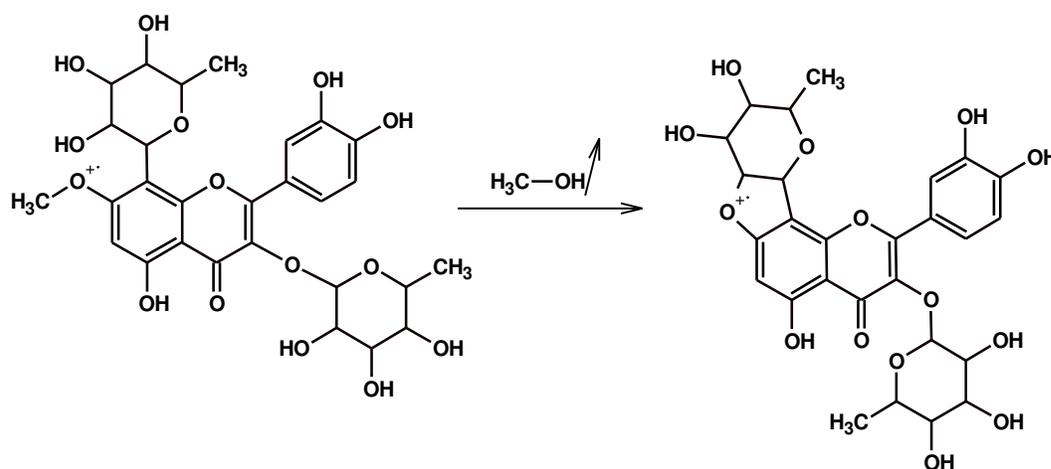


Figura 37. Mecanismo propuesto de ciclación para la pérdida de una molécula neutra de MeOH a partir de ion pseudomolecular $[M+H]^+$ 609.

El ión m/z 463 que implica la pérdida de 146 u también es abundante en el espectro por lo que se deduce que este compuesto tiene una O-ramnosa en su estructura. Dentro de las pérdidas que se observan están algunas características de una deoxihexosa C-enlazada como 134, 50 y 122 u, sin embargo las pérdidas correspondientes a las fragmentaciones $^{0,2}X$ y $^{0,3}X$ no se observan por lo que se considera que se requieren más estudios para caracterizar este compuesto.

Con la información disponible, la estructura propuesta es la que se observa en la figura 35 con fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{15}$. Sin embargo según los datos obtenidos de masa exacta la fórmula molecular sería $C_{27}H_{28}O_{16}$, por lo que la fórmula molecular del compuesto propuesto (estructura propuesta basada en el patrón de fragmentación) no concuerda. Una posible explicación sería que los compuestos son isómeros con el mismo ion molecular pero diferente masa exacta; esto se tendría que comprobar con futuros experimentos.

Hoffmann-Bohm *et. al.* aislaron e identificaron 9 flavonas C-glicosiladas de las hojas de *Allophyllus edulis* variedades *Edulis* y *Gracilis* y probaron su actividad hepatoprotectora *in vitro* en cultivo de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y galactosamina. Encontraron que las flavonas 8 C-glicosiladas tenían efectos hepatotóxicos y las 6-glicosiladas tenían un efecto protector, no obstante, encontraron también que cuando la ramnosa está presente en la estructura modifica la actividad hepatotóxica y la convierte en hepatoprotectora. Adicionalmente, una sustitución en el hidroxilo 7 de la aglicona, ya sea por un metoxilo o por un O-glicósido incrementa el efecto hepatoprotector [115]. Esta

correlación estructura-actividad está de acuerdo con otros trabajos publicados donde, por ejemplo, la isoornetina (flavona 6-C-glicosilada), tiene efecto hepatoprotector en una dosis de 15mg/Kg en ratas [116].

En base a lo anterior aunque el hepatodamianol (que es el mayoritario en la mezcla) es un C-8-glicósido, la presencia de la ramnosa ayuda a que su efecto sea hepatoprotector. El hecho de que moléculas tan similares tengan efectos opuestos puede implicar que el mecanismo de esta actividad no solo sería vía radicales libres [117].

Para poder hacer un análisis integral de todos los resultados obtenidos como parámetros de control de calidad, se decidió hacer una comparación de los espectros por medio de estadística multivariable para determinar si todos los medicamentos herbolarios obtenidos: M1-M10 pueden considerarse semejantes. Para esto se utilizaron los espectros de $^1\text{HRMN}$ ya que esta técnica nos permite observar todos los hidrógenos de los compuestos presentes en la mezcla, el análisis de todos ellos es simultáneo; logrando así una caracterización global. La quimiometría hace factible el procesamiento de la gran cantidad de datos obtenidos para reconocer patrones y eventualmente clasificar entre grupos. Uno de los procedimientos más utilizados en el análisis no supervisado es el PCA [118].

El resultado del PCA de los espectros $^1\text{HRMN}$ (figura 24) nos indica que la muestra MH9 no se agrupa con el resto de los medicamentos herbolarios, y al quedar fuera del intervalo de confianza esta diferencia es estadísticamente

relevante. Los espectros de hidrógeno se muestran en la figura 38. En las zonas de 4 ppm, 5.9 ppm y 7.5 ppm se observan señales intensas en la muestra MH9 que no se observan en el resto de los medicamentos herbolarios. Por el contrario, en 5.2 ppm la señal presente en MH9 es de baja intensidad, contrario a lo observado para el resto de las muestras.

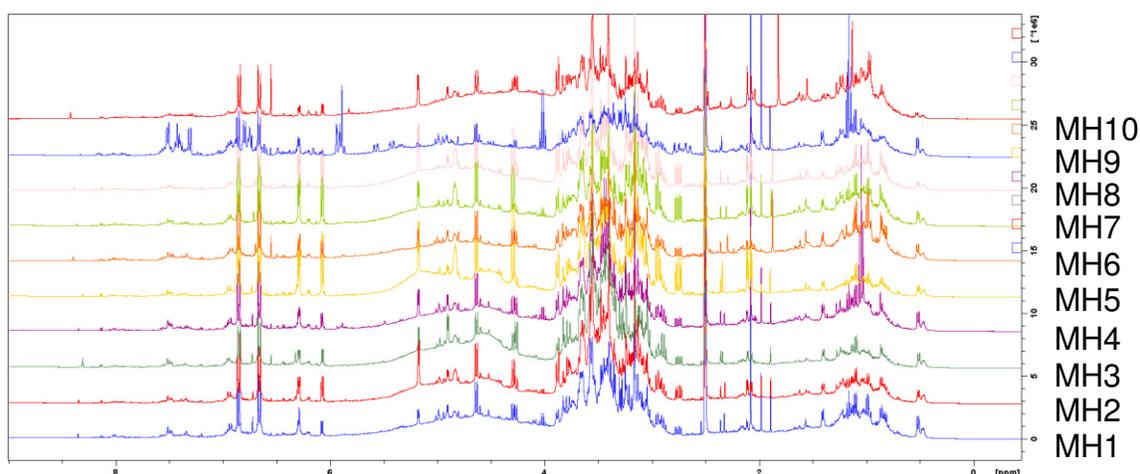


Figura 38. Sobreposición de los espectros $^1\text{HRMN}$ de los medicamentos herbolarios.

Al analizar los gráficos de cargas tanto para PC1 (figura 39) como para PC2 (figura 40) se puede observar que las señales de hidrógeno que se presentan en la zona aromática son las responsables de que MH9 no se agrupe con el resto de los medicamentos herbolarios, por lo que se supone que en esta muestra exista otro flavonoide base distintito del resto.

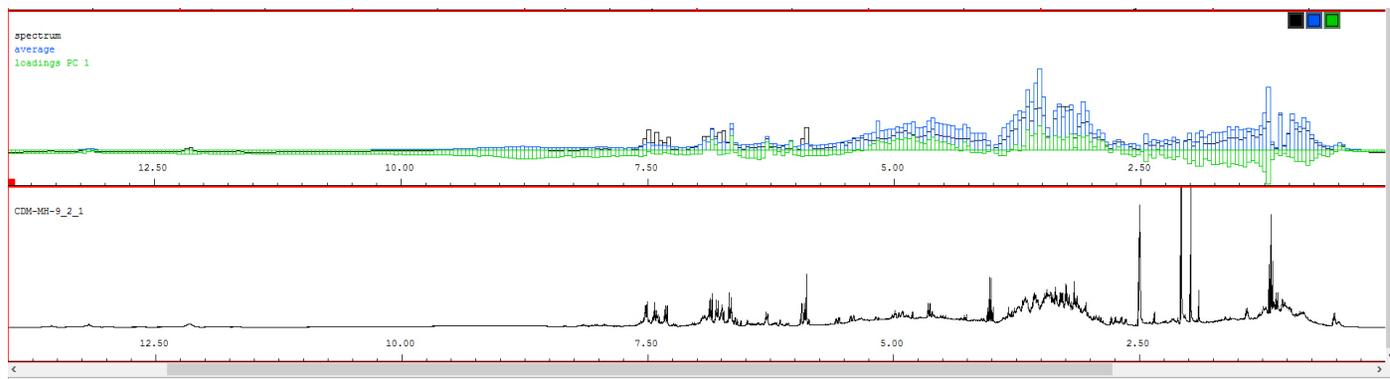


Figura 39. Gráfico de cargas para PC1, contribución de MH9 al primer componente principal.

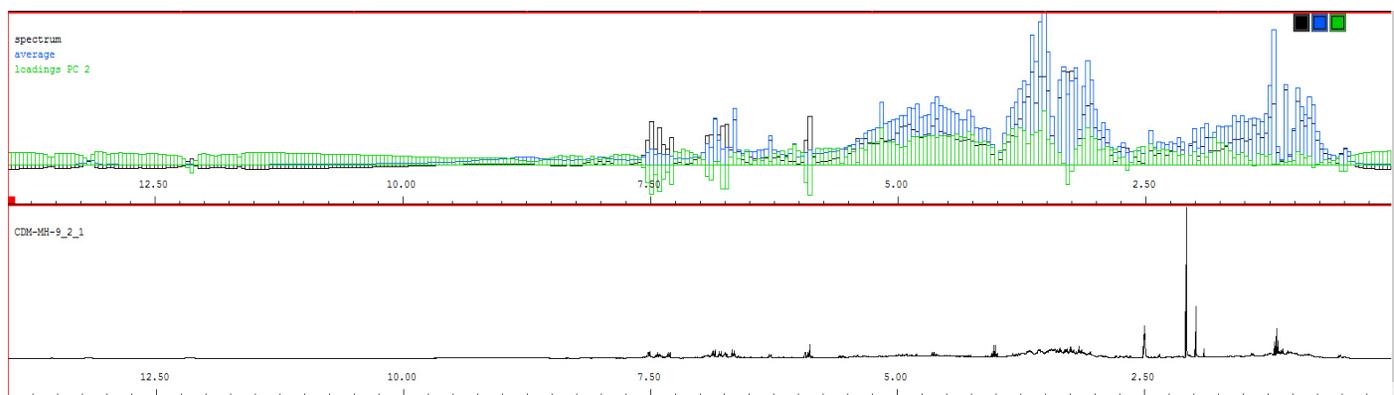


Figura 40. Gráfico de cargas para PC2, contribución de MH9 al segundo componente principal.

Si bien ya se contaba con un método de identificación y cuantificación de heptodamianol por HPLC/UV validado, se requería de un método más rápido y confiable que indicara la presencia de heptodamianol tanto en colectas, en los medicamentos herbolarios desarrollados y muestras comerciales. Una de las desventajas de trabajar con detectores como el UV-Vis es que solo se observa la presencia de grupos cromóforos; a una misma longitud de onda todos los compuestos con estructuras cromóforas semejantes darán respuestas similares, lo que complica la identificación de una molécula en específico cuando ésta se encuentra en una matriz compleja. Por lo que es necesario, en algunas ocasiones, recurrir a otro tipo de técnicas para la detección de un analito en específico.

La RMN es una de las técnicas analíticas más utilizadas para realizar estudios en productos naturales, debido al amplio número de moléculas que pueden ser analizadas de forma simultánea. En el área de productos naturales, es de particular interés utilizar métodos por RMN para asegurar el control de calidad. De esta manera es posible realizar la caracterización global del extracto y autenticar que los componentes presentes corresponden con los metabolitos bioactivos.

Por otra parte, la RMN ha demostrado ser una herramienta analítica muy versátil para la caracterización, elucidación y cuantificación de metabolitos de interés biológico. En particular, la identificación de biomarcadores puede realizarse mediante experimentos selectivos que permiten aislar específicamente las señales del compuesto de interés a través del acoplamiento escalar o dipolar, por lo que

estos métodos se han convertido en una estrategia para el análisis de mezclas complejas, como es el caso de los extractos herbales [119].

El experimento 1D-TOCSY selectivo (Figura 8), permite establecer conectividades ^1H - ^1H vía el acoplamiento escalar entre los núcleos que forman parte del mismo sistema de espín. Este experimento se basa en irradiar selectivamente una señal de hidrógeno, dar un tiempo de relajación y esperar a que transmita esa magnetización al sistema de espines donde se encuentre localizado el núcleo de hidrógeno irradiado [64]. En la estructura del hepatodamianol hay varios sistemas de espines, debido al resultado previo de la presencia de otros flavonoides base luteolina en el medicamento herbolario se seleccionaron los sistemas de espines de los azúcares; las señales de hidrógeno de los metilos 6'' y 6''' no se encontraban sobrepuestas con otras señales y la línea base no se encontraba elevada por lo que se consideraron adecuadas para el experimento.

Esta técnica de identificación tiene la ventaja de ser rápida y se logró la identificación del biomarcador sin la necesidad de hacer algún proceso de purificación. Este experimento es considerado una especie de cromatografía espectroscópica o cromatografía de espín ya que a partir de espectros de hidrógeno de mezclas en donde se observan todas las señales de todos los compuestos presentes, al dar este tipo de secuencia de pulso se logra eliminar todas las señales y solo permanece la señal del hidrógeno irradiado y su correspondiente sistema de espines.

Con el experimento 1D-TOCSY selectivo desarrollado se logró identificar inequívocamente la presencia del hepatodamianol en todas las muestras de los medicamentos herbolarios desarrollados.

Una vez que se demostró que MH9 era diferente al resto de las muestras se tomó la decisión de excluir los resultados de esta muestra para realizar el promedio de las características que debe de cumplir el medicamento herbolario y a su vez lograr la caracterización del mismo. En la tabla XXVII se muestran las características a cumplir del producto final.

Tabla XXVII. Características promedio del medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora de *T. diffusa*.

Característica	Valor
Cuantificación de Hepatodamianol por HPLC	161.47 ± 52.23 mg de hepatodamianol/ g de MH
Identificación de Hepatodamaianol por RMN	Presentar las señales para el 1D-TOCSY selectivo para los sistemas de espines de 6''' (219Hz) y 6'' (564Hz)
Solventes residuales	Con 24hrs de liofilizado, señales de solventes menores a la señal de N ₂
Flavonoides totales	63.94 ± 13.83 mg de flavonoides equivalentes a quercetina/ g de MH 147.73 ± 33.57 mg de flavonoides equivalentes a rutina/g de MH
Actividad antioxidante (DPPH)	CE ₅₀ 60.09 ± 8.33 µg/mL
Identificación de flavonoides	Mostrar los iones [M+H] ⁺ 579, 595, 575, 577, 561 y corresponder con los patrones de fragmentación
Actividad hepatoprotectora	En el modelo <i>in vitro</i> liberar 38.63 ± 3.26 UI/L de AST

Para realizar el modelo de hepatoprotección *in vivo* fue necesario seleccionar una muestra entre los medicamentos herbolarios obtenidos; para hacer esta selección se trabajó con los espectros de hidrógeno de RMN. Para ellos, se realizó

una alineación optimizada mediante correlación COW de los espectros, COW es un método para alinear señales de datos de muestras que exhiben cambios en su posición a lo largo del eje x. El método funciona mediante la división de cada uno de los espectros a ser alineados en segmentos de tamaño definido y permitiendo el aumento o la disminución de la longitud de estos segmentos para buscar la correlación óptima. [120], [121]. Se utilizó el acumulativo máximo de los coeficientes de correlación para buscar que muestra tenía la máxima similitud entre todas. MH4 resulto ser la muestra con mayor similitud como se muestra en la figura 37, también se corroboró que MH9 es la que difiere mayoritariamente.

Una vez seleccionada MH4 se realizó el estudio de hepatoprotección *in vivo* y la determinación de estabilidad del medicamento bajo condiciones aceleradas.

La NOM-073-SSA1-2015 que trata sobre la estabilidad de medicamentos y fármacos; establece que para un medicamento nuevo se tiene que determinar la estabilidad del mismo bajo condiciones aceleradas, esto involucran exponer la muestra por seis meses a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75 \pm 5\%$ de HR. MH4 fue el medicamento seleccionado para este estudio, se sometió a las condiciones indicadas en la NOM-072-SSA1-2015 y se tomó una alícuota cada 30 días. Se observó que la cantidad de hepatodamianol disminuyó con el tiempo (como se muestra en la tabla XXVI), al mes 1 se degradó el 12%, la cuantificación en los meses 2, 3 y 4 fue muy similar degradándose aproximadamente el 25% del hepatodaminanol; para el quinto mes se degradó el 79% y para el sexto mes un 84% del hepatodamianol. Estos resultados de cuantificación de hepatodamianol en las muestras tratadas en

condiciones de estabilidad acelerada concuerdan con los resultados de actividad hepatoprotectora *in vitro* obtenidos para estas mismas muestras (figura 22). La NOM-073-SSA1-2015 considera como cambio significativo durante la estabilidad acelerada a una variación del 5% de la potencial inicial; por lo tanto, desde el mes 1 se debe de considerar a MH4 como no estable ya que la actividad hepatoprotectora disminuye en un 8% en comparación con el medicamento que no fue expuesto a dichas condiciones; hay que tomar en cuenta que el medicamento herbolario se expuso como un polvo liofilizado, habrá que probar algún tipo de formulación farmacéutica para su protección y así evitar la degradación del hepatodamianol.

Para el modelo *in vivo* de hepatoprotección se siguió el modelo diseñado por Cordero Pérez et. al.[65], se midieron las enzimas AST y ALT que son indicadoras de daño hepático. Los niveles encontrados en suero para ambas enzimas fueron significativamente menores ($P < 0.02$) en comparación con el control de daño. Analizando detalladamente la liberación de ALT se determinó que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$) con relación a la silimarina (control de hepatoprotección), por el contrario en la liberación de AST existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre estos dos grupos mostrando mejor grado de hepatoprotección la silimarina; sin embargo, los niveles enzimáticos encontrados entre el control negativo de daño y el medicamento herbolario no mostraron diferencia significativa ($P > 0.05$). Por lo tanto puede considerarse el medicamento herbolario desarrollado a partir de *T. diffusa* como un agente hepatoprotector con una potencia similar a la silimarina en este modelo *in vivo*.

Brito *et. al.* determinaron la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico de *T. ulmifolia* en un modelo *in vivo* con ratas Wistar utilizando CCl₄ como agente inductor de daño; los resultados que obtuvieron fueron similares a los nuestros; los niveles de AST y ALT detectados en suero para el grupo de hepatoprotección (Legalon®) y grupo de extracto metanólico de *T. ulmifolia* fueron estadísticamente similares o menores ($p>0.05$) con respecto al control negativo de daño, tanto con 7 o 21 días de tratamiento previo a la inducción del daño. Sin embargo las dosis utilizadas son diferentes a lo realizado en este trabajo, en el ensayo realizado por Brito *et. al.* el CCl₄ fue administrado a dosis de 2.5 mL/Kg diluido al 50% en aceite de maíz, es decir el agente hepatotóxico fue 2.5 veces más que en nuestro modelo. Estos mismos autores administraron Legalon® a dosis de 50 mg/Kg, mientras que el extracto a 500 mg/Kg, en el presente trabajo se utilizó tanto la silimarina como el medicamento herbolario a dosis de 70mg/Kg.

Si bien los resultados de hepatoprotección fueron similares entre este grupo de investigadores y los reportados en este trabajo, la gran diferencia entre las dosis hace que no pueda realizarse una correcta comparación de los resultados [122].

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se hizo un análisis del costo/proceso de purificación, perfil cromatográfico y actividades hepatoprotectora y citotóxica seleccionando la Fr. VLC para el desarrollo del MH.
- Se determinó que las variables volumen de solvente y número de extracciones son las que afectan significativamente el proceso de extracción, se optimizaron cada una de las variables por experimentos independientes.
- Se realizó la cuantificación de hepatodamianol en los medicamentos herbolarios utilizando un método cromatográfico validado.

- Se realizó la identificación inequívoca de hepatodamianol en los medicamentos herbolarios mediante un método de pulsos selectivos por ¹HRMN.
- Se estandarizó el MH y se obtuvieron las características promedio de cantidad de flavonoides totales y actividad antioxidante.
- Se identificó hepatodamianol en las muestras por HPLC/MS y se identificaron cuatro compuestos más de los cuales se realizó la identificación tentativa.
- Se determinó la actividad hepatoprotectora *in vivo* del MH, no hay diferencia significativa con el grupo de silimarina a la misma dosis.
- Se comprobó que el medicamento herbolario no es estable bajo condiciones aceleradas a partir del primer mes.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- -Desarrollar una forma farmacéutica para la administración oral del MH.
- Validar y desarrollar un método de cuantificación alternativo del hepatodamianol por HPLC/MS y por RMN.
- Determinar marcadores de estrés oxidativo (MDA, glutatión, TBARS) en los hígados obtenidos en el modelo *in vivo*, en función de conocer más del mecanismo de acción.
- Usar el método de pulsos selectivos para la identificación del hepatodamianol en muestras comerciales.
- Desarrollar MH de otras plantas con actividad farmacológica del norte del país.

CAPÍTULO 7

ANEXO

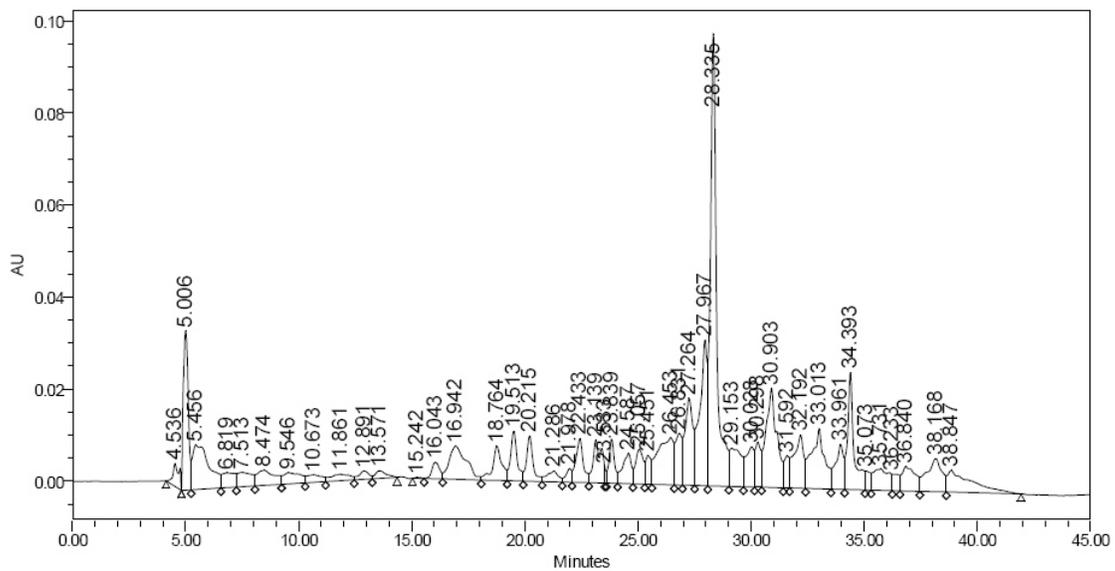


Figura 41. Cromatograma de la muestra MH1, λ 254nm

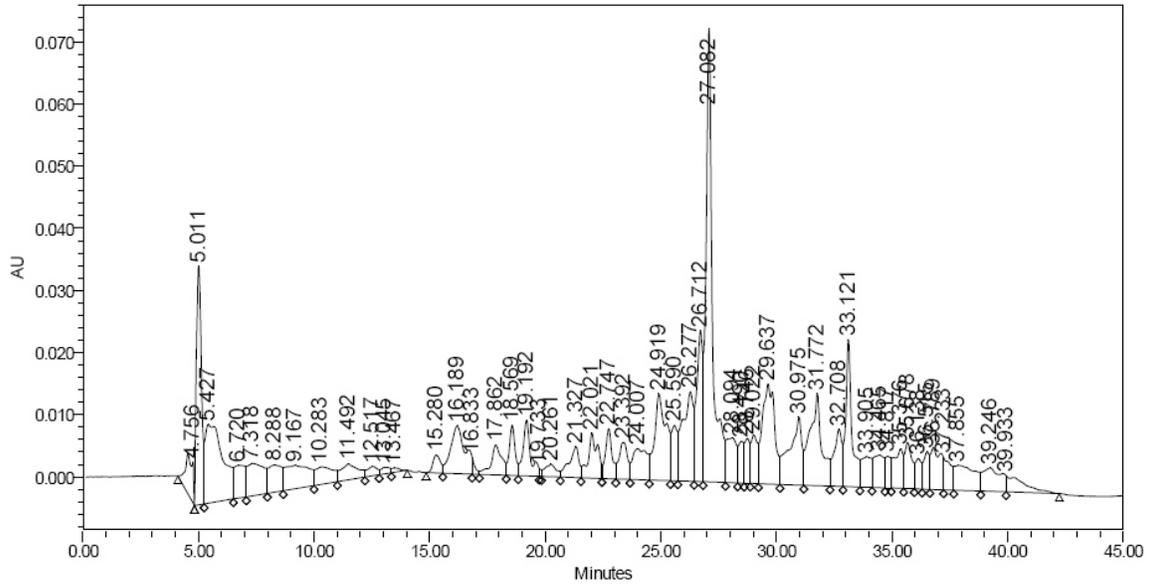


Figura 42. Cromatograma de la muestra MH2, λ 254nm

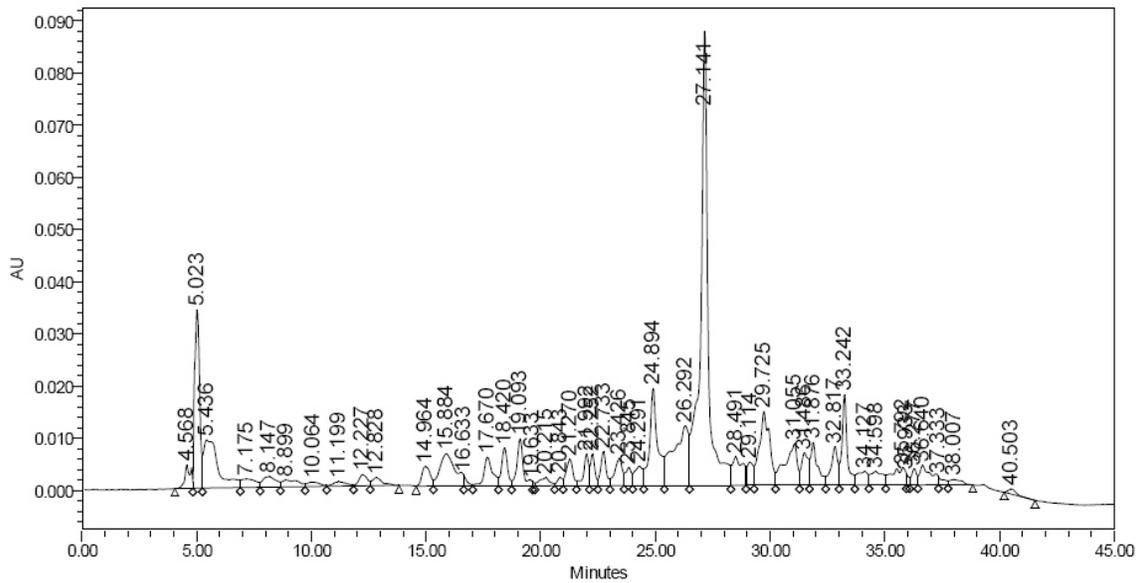


Figura 43. Cromatograma de la muestra MH3, λ 254nm

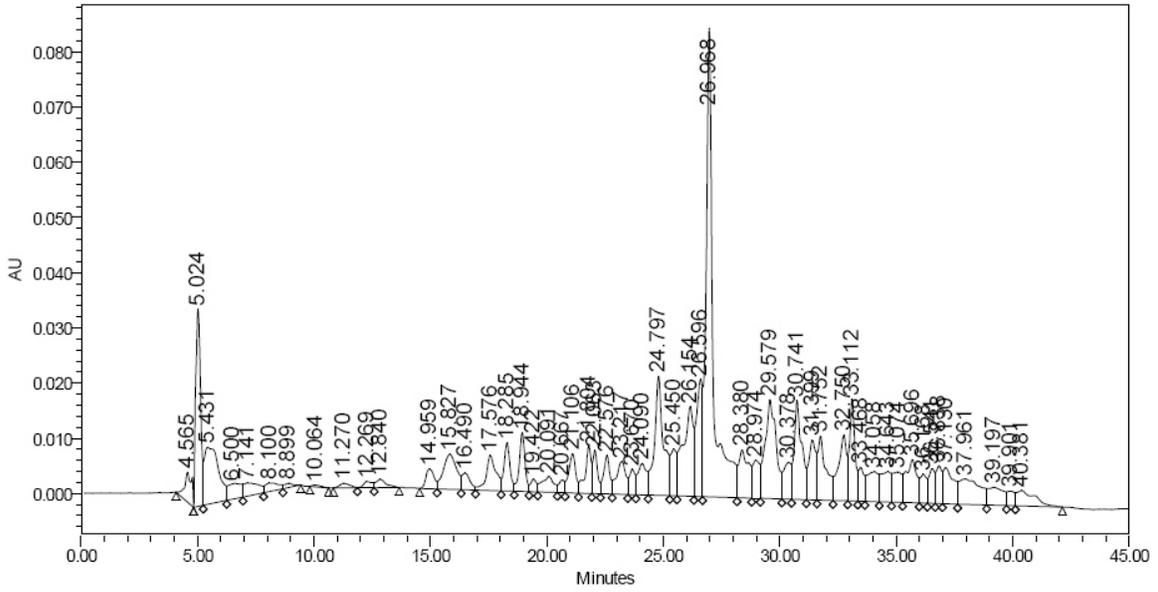


Figura 44. Cromatograma de la muestra MH4, λ 254nm

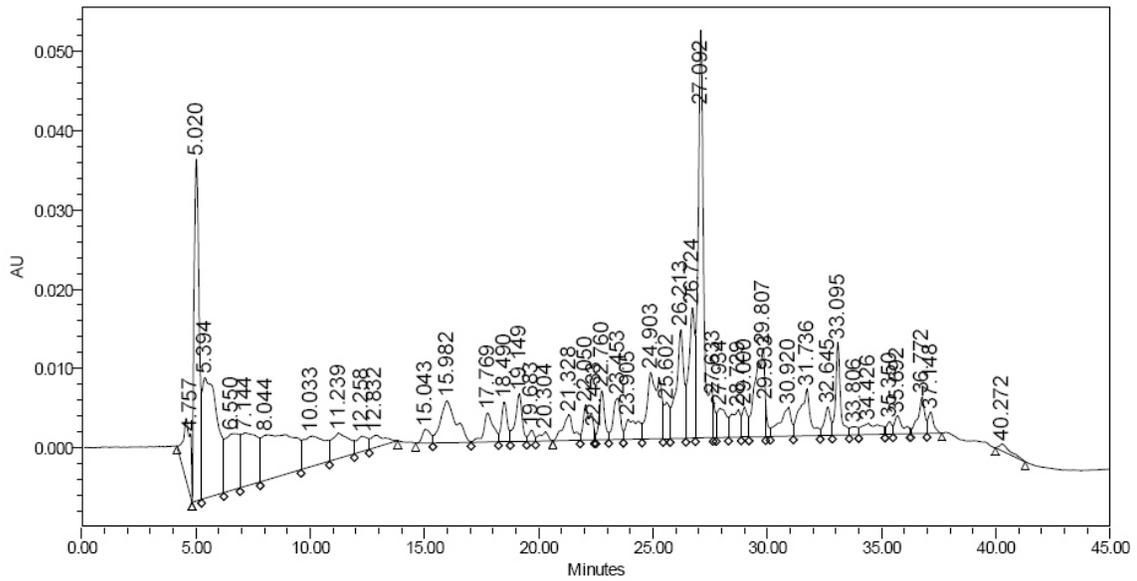


Figura 45. Cromatograma de la muestra MH5, λ 254nm

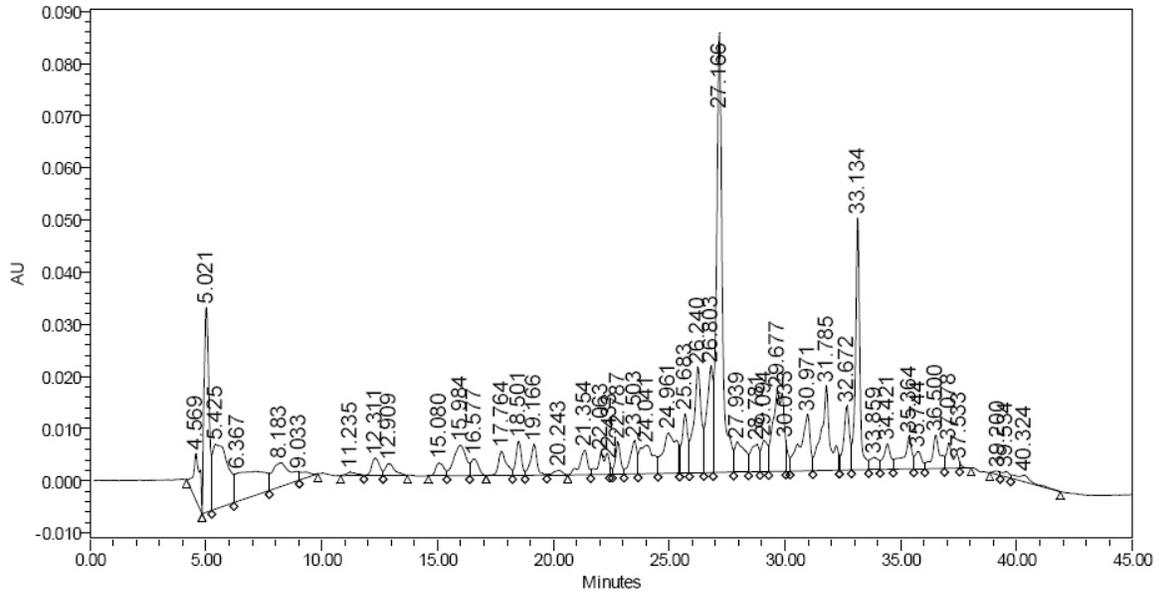


Figura 46. Cromatograma de la muestra MH6, λ 254nm

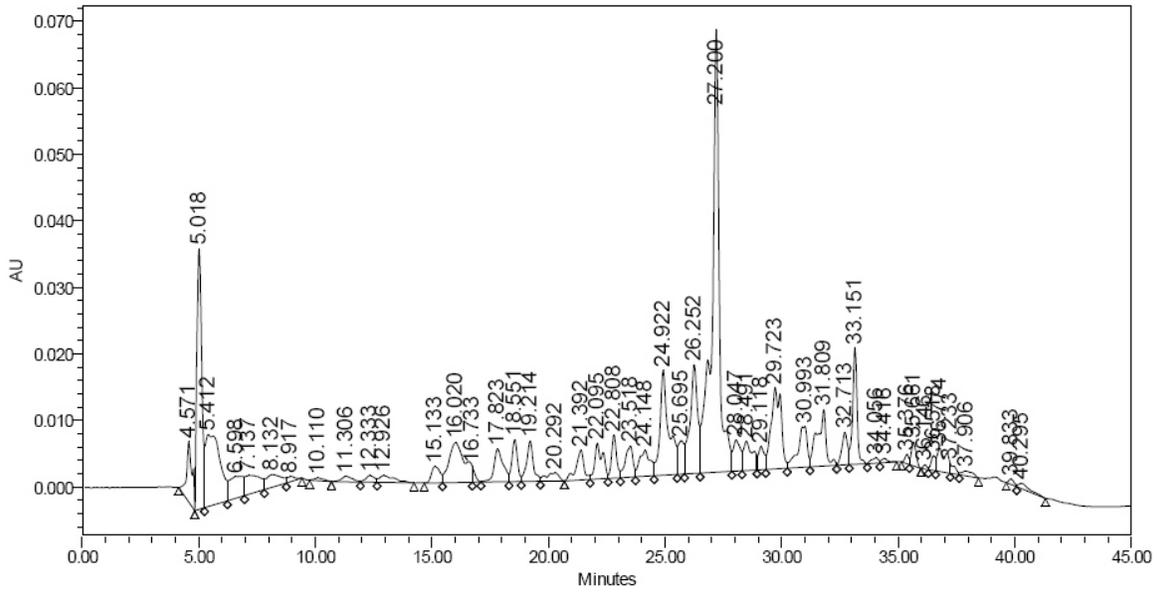


Figura 47. Cromatograma de la muestra MH7, λ 254nm

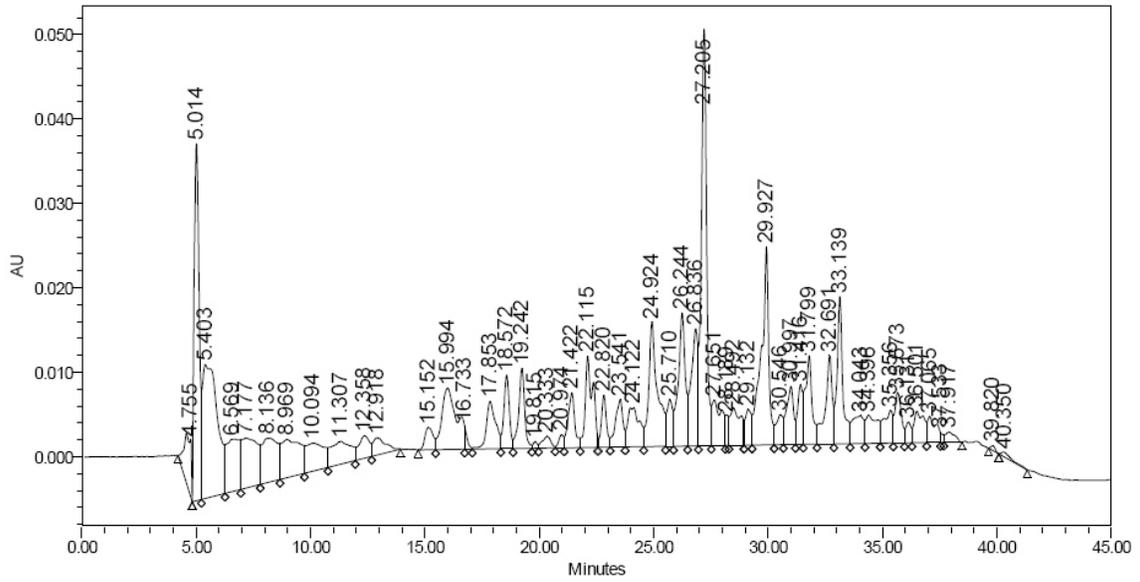


Figura 48. Cromatograma de la muestra MH8, λ 254nm

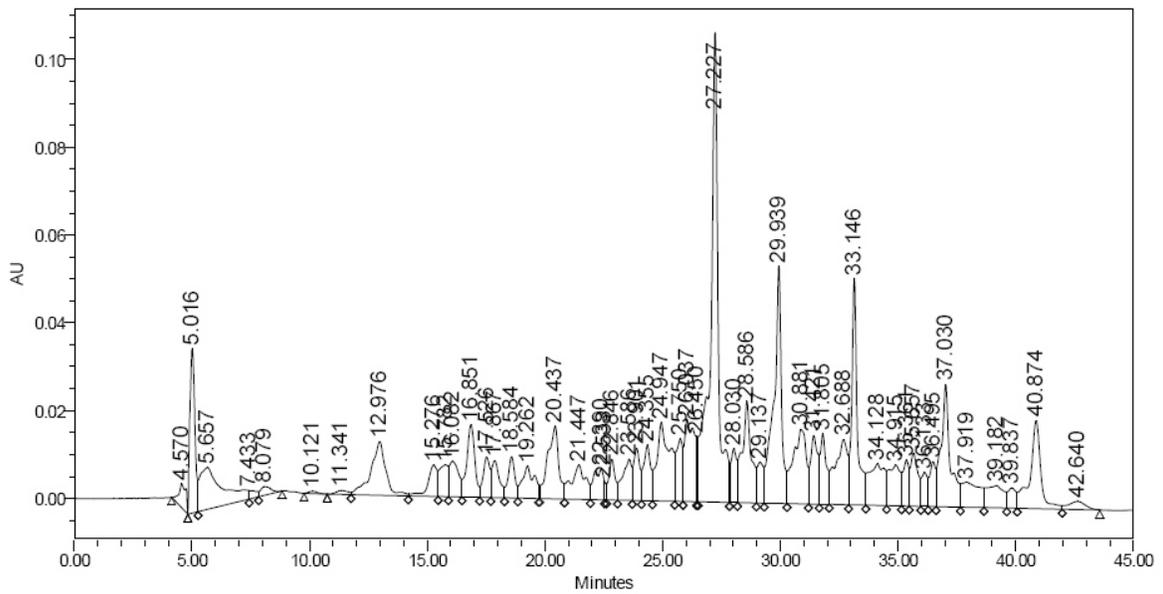


Figura 49. Cromatograma de la muestra MH9, λ 254nm

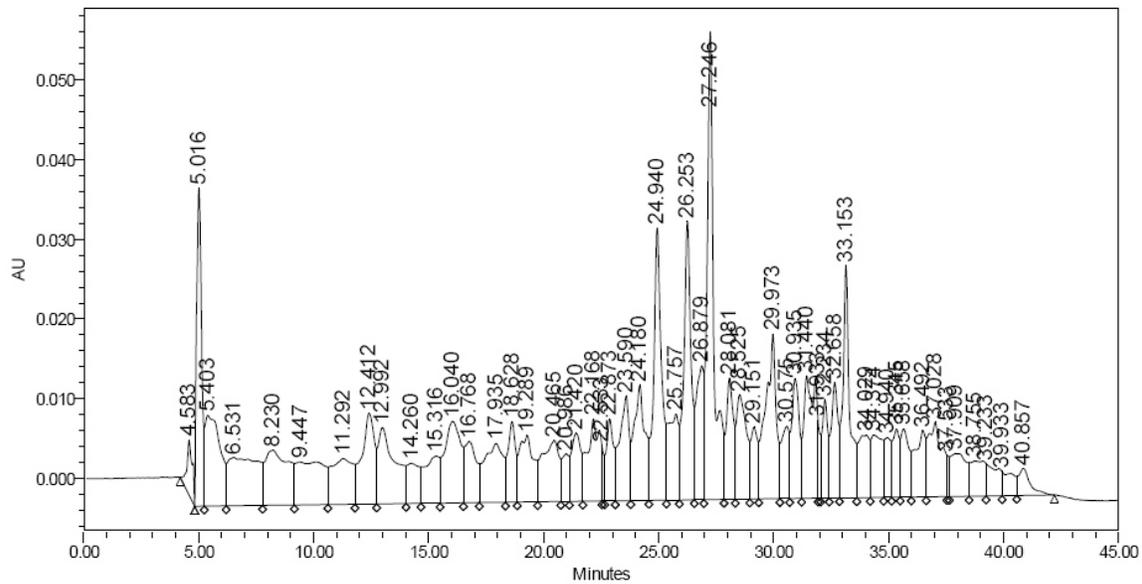


Figura 50. Cromatograma de la muestra MH10, λ 254nm

Bibliografía

- [1] N. Méndez Sanchez and M. Uribe, *Conceptos actuales en hepatología*. Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana, primera Edición.2003.
- [2] V. M. Piñeiro-Carrero and E. O. Piñeiro, "Liver," *Pediatrics*, vol. 113, no. 4, p. 1097, 2004.
- [3] B. D. Hiraganahalli, V. C. Chinampudur, S. Dethe, D. Mundkinajeddu, M. K. Pandre, J. Balachandran, and A. Agarwal, "Hepatoprotective and antioxidant activity of standardized herbal extracts," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 8, no. 30, pp. 116–123, 2012.
- [4] C. Bustíos, M. Dávalos, R. Román, and E. Zumaeta, "Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud," *Rev. Gastroenterol. del Perú*, vol. 27, no. 3, pp. 238–245, 2004.
- [5] P. Ramachandran and J. P. Iredale, "Reversibility of liver fibrosis," *Ann. Hepatol.*, vol. 8, no. 4, pp. 283–291, 2009.
- [6] D. Kershenobich Stalnikowitz and A. Bonder Weissbrod, "Liver fibrosis and inflammation. A review," *Ann. Hepatol.*, vol. 2, no. 4, pp. 159–163, 2003.
- [7] R. Bataller and D. A. Brenner, "Liver fibrosis," *Sci. Med.*, vol. 115, no. 2, pp. 209–218, 2005.
- [8] S. C. Larsson and a Wolk, "Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies.," *Br. J. Cancer*, vol. 97, no. 7, pp. 1005–8,

Oct. 2007.

- [9] Organización Mundial de la Salud, "OMS-cirrosis," 2014. [Online]. Available: www.who.int/en.
- [10] H. M. Abdallah, S. M. Ezzat, R. S. El Dine, E. Abdel-Sattar, and A. B. Abdel-Naim, "Corrigendum to 'Protective effect of *Echinops galalensis* against CCl₄-induced injury on the human hepatoma cell line (Huh7)' [Phytochem. Lett. 6 (2013) 73–78]," *Phytochem. Lett.*, vol. 6, no. 3, p. 471, Aug. 2013.
- [11] INEGI, "Estadísticas Mortalidad," *Estadística población, hogares y vivienda*, 2015. [Online]. Available: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>.
- [12] C. L. Hart, G. D. Batty, D. S. Morrison, R. J. Mitchell, and G. D. Smith, "Obesity , overweight and liver disease in the Midspan prospective cohort studies," *Int J Obes*, vol. 34, no. 6, pp. 1051–1059, 2010.
- [13] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Nutrición, "Sistemas alimentarios para una mejor nutrición," 2013.
- [14] L. Torres-González, L. E. Muñoz-Espinosa, A. M. Rivas-Estilla, K. Trujillo-Murillo, R. Salazar-Aranda, N. W. De Torres, and P. Cordero-Pérez, "Protective effect of four Mexican plants against CCl₄ -induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line," *Ann. Hepatol.*, vol. 10, no. 1, pp. 73–79, 2011.
- [15] E. R. Feeney and R. T. Chung, "Antiviral treatment of hepatitis C," *Br. Med. J.*, vol. 349, p. 3308, 2014.

- [16] A. Covarrubias-Gómez and U. Guevara-López, "Evaluación del consumo de medicina herbal en el enfermo con dolor: Un estudio piloto," *Rev. Mex. Anesthesiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 156–162, 2009.
- [17] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural Products as a Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010," *J. Nat. Prod.*, vol. 75, no. 3, pp. 311–335, 2012.
- [18] "Ley General de Salud." [Online]. Available: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf.
- [19] N. Waksman de Torres, "Control de calidad de fitofármacos," *Revista Conocimiento*, pp. 17–24, 2009.
- [20] M. Mosihuzzaman and M. I. Choudhary, "Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 80, no. 10, pp. 2195–2230, Jan. 2008.
- [21] E. S. Ong, "Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 812, no. 1–2, pp. 23–33, Dec. 2004.
- [22] J. Shamama, K. Kanchan, and A. Mushir, "Reassessing Bioavailability of Silymarin," *Altern. Med. Rev.*, vol. 16, no. 3, pp. 239–249, 2011.
- [23] J. Adame and H. Adame, *Plantas curativas del Noreste Mexicano*. Editorial Castillo, primera Edición. 2000.
- [24] L. Favari, C. Arce-Díaz, J. Ortiz-Martínez, S. Pablo-Pérez, C. Soto, and M.

- E. Meléndez-Camargo, "Hepatoprotective and antioxidant effects of *Taraxacum officinale* against carbon tetrachloride induced acute hepatic damage in the rat," *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 44, no. 4, pp. 53–61, 2013.
- [25] L. Torres-González, W. Waksman-de Torres, J. Pérez-Meseguer, L. E. Muñoz-Espinosa, R. Salazar-Aranda, and P. Cordero-Pérez, "Review of plants with hepatoprotective activity evaluated in México," vol. 16, no. 63, pp. 78–86, 2014.
- [26] K. Szewczyk and C. Zidorn, "Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana--*Turnera diffusa*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 152, no. 3, pp. 424–43, Mar. 2014.
- [27] R. Ramírez-Durón, L. Cenicerós-Almaguer, R. Salazar-Aranda, M. de L. Salazar-Cavazos, and N. Waksman de Torres, "Evaluation of thin-layer chromatography methods for quality control of commercial products containing *Aesculus hippocastanum*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Passiflora incarnata*, and *Tilia occidentalis*," *J. AOAC Int.*, vol. 90, no. 4, pp. 920–924, 2007.
- [28] E. Camargo and W. Vilegas, "Controle de qualidade dos extratos polares de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 20, no. 2, pp. 228–232, 2010.
- [29] S. Kumar and A. Sharma, "Apigenin: The Anxiolytic Constituent of *Turnera aphrodisiaca*," *Pharm. Biol.*, vol. 44, no. 2, pp. 84–90, Jan. 2006.

- [30] A. F. . Godoi, W. Vilegas, R. H. . Godoi, L. Van Vaeck, and R. Van Grieken, "Application of low-pressure gas chromatography–ion-trap mass spectrometry to the analysis of the essential oil of *Turnera diffusa* (Ward.) Urb.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1027, no. 1–2, pp. 127–130, Feb. 2004.
- [31] M. Schäffer, T. Gröger, M. Pütz, and R. Zimmermann, "Assessment of the presence of damiana in herbal blends of forensic interest based on comprehensive two-dimensional gas chromatography," *Forensic Toxicol.*, vol. 31, no. 2, pp. 251–262, Apr. 2013.
- [32] J. R. Lucio-Gutiérrez, A. Garza-Juárez, J. Coello, S. MasPOCH, M. L. Salazar-Cavazos, R. Salazar-Aranda, and N. Waksman de Torres, "Multi-wavelength high-performance liquid chromatographic fingerprints and chemometrics to predict the antioxidant activity of *Turnera diffusa* as part of its quality control.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1235, pp. 68–76, Apr. 2012.
- [33] J. Zhao, R. S. Pawar, Z. Ali, and I. A. Khan, "Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 48, pp. 289–292, 2007.
- [34] L. Alcaraz-Meléndez, J. Delgado-Rodríguez, and S. Real-Cosío, "Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*)," *Fitoterapia*, vol. 75, no. 7–8, pp. 696–701, 2004.
- [35] A. G. Bezerra, F. R. Mendes, R. Tabach, and E. a. Carlini, "Effects of a hydroalcoholic extract of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae, in tests for adaptogenic activity," *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 21, no. 1, pp. 121–127, Feb. 2011.

- [36] J. Zhao, A. K. Dasmahapatra, S. I. Khan, and I. A. Khan, "Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 120, pp. 387–393, 2008.
- [37] T. Hernández, M. Canales, J. G. Avila, A. Duran, J. Caballero, A. R. De Vivar, and R. Lira, "Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas , Puebla (México)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 88, no. 2, pp. 181–188, 2003.
- [38] R. M. Pérez, A. Ocegueda, J. L. Mugoiz, J. G. Avila, and W. W. Morrow, "A study of the hypoglucemic plants effect of some mexican," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 12, pp. 253–262, 1984.
- [39] F. J. Alarcon-Aguilara, R. Roman-Rramos, S. Perez-Gutierrez, A. Aguilar-Contreras, C. Contreras-Weber, and J. L. Flores-Saenz, "Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 61, pp. 101–110, 1998.
- [40] A. Garza-Juárez, M. de la L. Salazar-Cavazos, R. Salazar-Aranda, J. Pérez-Meseguer, and N. Waksman de Torres, "Correlation between Chromatographic Fingerprint and Antioxidant Activity of *Turnera diffusa* (*Damiana*)," *Planta Med.*, vol. 77, pp. 958–963, 2011.
- [41] L. de A. A. Soriano-Melgar, L. Alcaraz-Meléndez, L. C. Méndez-Rodríguez, E. M. Puente, F. Rivera-Cabrera, and T. Zenteno-Savín, "Antioxidant and trace element content of damiana (*Turnera diffusa* Willd) under wild and cultivated conditions in semi-arid zones," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 37, no. 1, pp.

321–327, 2012.

- [42] R. Salazar, M. E. Pozos, P. Cordero, J. Perez, M. C. Salinas, and N. Waksman, “Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico,” *Inf. Healthc.*, vol. 46, no. 3, pp. 166–170, 2008.
- [43] M. M. Neven, A. A. Sahar, K. Nematalla, and M. H. M. Abdelaziz, “Comparative Study between Damiana and Tyme on Nervous system Impairment during Aging,” *New York Sci. J.*, vol. 5, no. 5, pp. 50–61, 2012.
- [44] T. Andersen and J. Fogh, “Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients,” *J. Hum. Nutr. Diet.*, vol. 14, pp. 243–250, 2001.
- [45] J. A. Harrold, G. M. Hughes, K. O’Shiel, E. Quinn, E. J. Boyland, N. J. Williams, and J. C. G. Halford, “Acute effects of a herb extract formulation and inulin fibre on appetite , energy intake and food choice,” *Appetite*, vol. 62, pp. 84–90, 2013.
- [46] O. Hnatyszyn, V. Moscatelli, J. Garcia, R. Rondina, M. Costa, C. Arranz, A. Balaszczuk, G. Ferraro, and J. D. Coussio, “Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of Guinea pig,” *Phytomedicine*, vol. 10, pp. 669–674, 2003.
- [47] D. Israel and E. Q. Youngkin, “Herbal Therapies for Perimenopausal and Menopausal Complaints,” *Pharmacotherapy*, vol. 17, no. 5, pp. 970–984, 1997.
- [48] H. H. Aung, L. Dey, V. Rand, and C.-S. Yuan, “Alternative Therapies for Male

and Female Sexual Dysfunction,” *Am. J. Chin. Med.*, vol. 32, no. 2, pp. 161–173, 2004.

- [49] S. Kumar, R. Madaan, and A. Sharma, “Evaluation of Aphrodisiac Activity of *Turnera aphrodisiaca*,” *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–4, 2009.
- [50] N. K. Saini, M. Singhal, and S. Sharma, “Natural plants effective in treatment of sexual dysfunction : A Review,” *Pharma Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 206–224, 2010.
- [51] R. Arletti, A. Benelli, E. Cavazzuti, G. Scarpetta, and A. Bertolimi, “Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats,” *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 143, pp. 15–19, 1999.
- [52] T. Y. Ito, M. L. Polan, B. Whipple, and A. S. Trant, “The Enhancement of Female Sexual Function with ArginMax , a Nutritional Supplement , Among Women Differing in Menopausal Status,” *J. Sex Marital Ther.*, vol. 32, pp. 369–378, 2006.
- [53] R. Estrada-Reyes, P. Ortiz-López, J. Gutiérrez-Ortíz, and L. Martínez-Mota, “*Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) recovers sexual behavior in sexually exhausted males,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 123, pp. 423–429, 2009.
- [54] S. Piacente, E. E. S. Camargo, A. Zampelli, J. S. Gracioso, A. R. Saouza Brito, C. Pizza, and W. Vilegas, “Flavonoids and Arbutin from *Turnera diffusa*,” *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch.*, vol. 57, pp. 983–985, 2002.

- [55] J. Pérez-Meseguer, A. Garza-Juarez, R. Salazar-Aranda, M. de la L. Salazar-Cavazos, Y. de la Torre Rodríguez, V. Rivas-Galindo, and N. Waksman de Torres, "Development and Validation of an HPLC-DAD Analytical Procedure for Quality Control of Damiana (*Turnera diffusa*), Using an Antioxidant Marker Isolated from the Plant," *J. AOAC Int.*, vol. 93, no. 4, pp. 1161–1168, 2010.
- [56] C. Delgado-Montemayor, J. Pérez-Meseguer, R. Salazar-Aranda, P. Cordero-Pérez, and N. Waksman, "Hepatodamianol as the hepatoprotective constituent of *Turnera diffusa*," *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. In press, 2017.
- [57] C. Delgado Montemayor, "Aislamiento biodirigido de compuesto(s) con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*," 2013.
- [58] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [59] G. Granados-Guzmán, R. Salazar-Aranda, M. Garza-Tapia, R. Castro-Ríos, and N. Waksman de Torres, "Optimization and Validation of Two High-Throughput Methods Indicating Antiradical Activity," *Curr. Anal. Chem.*, vol. 13, no. 6, 2017.
- [60] L. Sun, J. Zhang, X. Lu, L. Zhang, and Y. Zhang, "Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 10, pp. 2689–2696, 2011.
- [61] Z. L. Sheng, P. F. Wan, C. L. Dong, and Y. H. Li, "Optimization of total

- flavonoids content extracted from Flos Populi using response surface methodology,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 43, no. 1, pp. 778–786, 2013.
- [62] A. Carotenuto and M. Dell ’Isola, “An Experimental Verification of Saturated Salt Solution-Based Humidity Fixed Points,” *International J. Thermophys.*, vol. 17, no. 6, 1996.
- [63] J. A. Dávila Pacheco, “Validación del metodo de calibración de higrtómetros capacitivos con soluciones sal-agua como generadoras de humedad,” *Cent. Nac. Metrol. Publicaciones Técnicas*, 2007.
- [64] P. Sandusky and D. Raftery, “Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: Application to the metabonomics of amino acids in honey,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 8, pp. 2455–2463, 2005.
- [65] P. Cordero-Pérez, L. Torres-González, M. Aguirre-Garza, C. Camara-Lemarroy, F. Guzmán-de la Garza, G. Alarcón-Galván, H. Zapata-Chavira, M. de Jesús Sotelo-Gallegos, C. Nadjedja Torres-Esquivel, E. Sánchez-Fresno, D. Cantú-Sepúlveda, G. González-Saldivar, J. Bernal-Ramirez, and L. E. Muñoz-Espinosa, “Hepatoprotective effect of commercial herbal extracts on carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats,” *Pharmacognosy Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 150–156, May 2013.
- [66] INEGI, “Estadísticas Mortalidad,” *Estadística población, hogares y vivienda*, 2015. .
- [67] N. Méndez-Sánchez, A. R.-Villa, N. C. Chavez-Tapia, G. Ponciano-

- Rodriguez, P. Almeda-Valdés, D. González, and M. Uribe, "Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data," *Ann. Hepatol.*, vol. 4, no. 1, pp. 52–55, 2005.
- [68] COFEPRIS, "Registro Sanitario de Medicamentos," *Registro Sanitario de Medicamentos Herbolarios*, 2016. .
- [69] J. H. Baek, A. A. Nierenberg, and G. Kinrys, "Clinical applications of herbal medicines for anxiety and insomnia; targeting patients with bipolar disorder.," *Aust. N. Z. J. Psychiatry*, vol. 48, no. 8, pp. 705–15, Aug. 2014.
- [70] "CMD, Medicamentos herbolarios." [Online]. Available: <http://www.cmd.com.mx/#herbolarios>.
- [71] A. Becker, F. Felgentreff, H. Schröder, B. Meier, and A. Brattström, "The anxiolytic effects of a Valerian extract is based on valerenic acid.," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 14, no. 267, pp. 1–5, 2014.
- [72] Salud Natural Mexicana, "Insomnio Estrés, Medicamento herbolario Passiflora incarnata y Valeriana officinalis." [Online]. Available: https://www.saludnatural.mx/insomnio_.
- [73] K. J. Astell, M. L. Mathai, and X. Q. Su, "Plant extracts with appetite suppressing properties for body weight control: a systematic review of double blind randomized controlled clinical trials.," *Complement. Ther. Med.*, vol. 21, no. 4, pp. 407–16, Aug. 2013.
- [74] P. Fassina, F. Scherer Adami, V. Terezinha Zani, I. C. Kasper Machado, J. Garavaglia, M. T. Quevedo Grave, R. Ramos, and S. Morelo Dal Bosco,

“The Effect of *Garcinia Cambogia* as Coadjuvant in the Weight Loss Process.,” *Nutr. Hosp.*, vol. 32, no. 6, pp. 2400–8, Dec. 2015.

- [75] “CMD, Medicamentos herbolarios.” .
- [76] S. Villet, V. Vacher, A. Colas, K. Danno, J.-L. Masson, P. Marijnen, and M.-F. Bordet, “Open-label observational study of the homeopathic medicine *Passiflora Compose* for anxiety and sleep disorders.,” *Homeopathy*, vol. 105, no. 1, pp. 84–91, Feb. 2016.
- [77] M. Miroddi, G. Calapai, M. Navarra, P. L. Minciullo, and S. Gangemi, “*Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials.,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 150, no. 3, pp. 791–804, Dec. 2013.
- [78] J. H. Baek, A. A. Nierenberg, and G. Kinrys, “Clinical applications of herbal medicines for anxiety and insomnia; targeting patients with bipolar disorder.,” *Aust. N. Z. J. Psychiatry*, vol. 48, no. 8, pp. 705–15, Aug. 2014.
- [79] Salud Natural Mexicana, “Insomnio Estrés, Medicamento herbolario *Passiflora incarnata* y *Valeriana officinalis*.” .
- [80] N. T. Rokot, T. S. Kairupan, K.-C. Cheng, J. Runtuwene, N. H. Kapantow, M. Amitani, A. Morinaga, H. Amitani, A. Asakawa, and A. Inui, “A Role of Ginseng and Its Constituents in the Treatment of Central Nervous System Disorders.,” *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2016, p. 2614742, 2016.
- [81] M. R. Ramanathan and S. R. Penzak, “Pharmacokinetic Drug Interactions

with *Panax ginseng*,” *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, Nov. 2016.

- [82] E. F. F. Matias, E. F. Alves, B. S. Santos, C. E. Sobral de Souza, J. V. de Alencar Ferreira, A. K. L. Santos de Lavor, F. G. Figueredo, L. Ferreira de Lima, F. A. Vieira Dos Santos, F. S. Neves Peixoto, A. Viana Colares, A. Augusti Boligon, R. de A. Saraiva, M. L. Athayde, J. B. T. da Rocha, I. R. Alencar Menezes, H. Douglas Melo Coutinho, and J. G. M. da Costa, “Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage.,” *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2013, p. 164215, 2013.
- [83] S. P. Pimentel, G. E. Barrella, R. C. V. Casarin, F. R. Cirano, M. Z. Casati, M. A. Foglio, G. M. Figueira, and F. V. Ribeiro, “Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays.,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 12, p. 224, Nov. 2012.
- [84] O. Babova, A. Occhipinti, and M. E. Maffei, “Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin.,” *Phytochemistry*, vol. 123, pp. 33–9, Mar. 2016.
- [85] Salud Natural Mexicana, “Hepaprotector, Medicamento herbolario *Silybum marianum*.” [Online]. Available: https://www.saludnatural.mx/hepa_.
- [86] Neha, A. S. Jaggi, and N. Singh, “Silymarin and Its Role in Chronic Diseases.,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 929, pp. 25–44, 2016.

- [87] M. Bahmani, H. Shirzad, S. Rafieian, and M. Rafieian-Kopaei, "Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection.," *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.*, vol. 20, no. 4, pp. 292–301, Oct. 2015.
- [88] S. Y. Zhu, Y. Dong, J. Tu, Y. Zhou, X. H. Zhou, and B. Xu, "Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose.," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 10, no. Suppl 1, pp. S92-9, Jan. 2014.
- [89] S. Liu, Z. Chen, D. Cao, F. Liu, X. Wang, L. Zhao, R. Liu, and Z. Xiao, "A study on the protective effect of Silybum marianum extract on hepatic ischemia-reperfusion injury.," *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM*, vol. 10, no. 5, pp. 310–2, 2013.
- [90] A. F. Freitag, G. F. E. Cardia, B. A. da Rocha, R. P. Aguiar, F. M. de S. Silva-Comar, R. A. Spironello, R. Grespan, S. M. Caparroz-Assef, C. A. Bersani-Amado, and R. K. N. Cuman, "Hepatoprotective Effect of Silymarin (Silybum marianum) on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Spontaneously Hypertensive Rats.," *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2015, p. 538317, 2015.
- [91] S. Aghazadeh, R. Amini, R. Yazdanparast, and S. H. Ghaffari, "Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of Silybum marianum in treatment of experimental steatohepatitis.," *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 63, no. 6, pp. 569–74, Sep. 2011.
- [92] C. Lang, P. Röttger-Lüer, and C. Staiger, "A Valuable Option for the

Treatment of Respiratory Diseases: Review on the Clinical Evidence of the Ivy Leaves Dry Extract EA 575®.” *Planta Med.*, vol. 81, no. 12–13, pp. 968–74, Aug. 2015.

- [93] F. Holzinger and J.-F. Chenot, “Systematic review of clinical trials assessing the effectiveness of ivy leaf (*hedera helix*) for acute upper respiratory tract infections.” *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2011, p. 382789, 2011.
- [94] K. J. Song, Y.-J. Shin, K. R. Lee, E. J. Lee, Y. S. Suh, and K.-S. Kim, “Expectorant and antitussive effect of *Hedera helix* and *Rhizoma coptidis* extracts mixture.” *Yonsei Med. J.*, vol. 56, no. 3, pp. 819–24, May 2015.
- [95] Salud Natural Mexiana, “Memoria, Medicamento herbolario Ginkgo biloba.” [Online]. Available: https://www.saludnatural.mx/memoria_.
- [96] M.-S. Tan, J.-T. Yu, C.-C. Tan, H.-F. Wang, X.-F. Meng, C. Wang, T. Jiang, X.-C. Zhu, and L. Tan, “Efficacy and adverse effects of ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis.” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 43, no. 2, pp. 589–603, 2015.
- [97] T. K. Mohanta, Y. Tamboli, and P. K. Zubaidha, “Phytochemical and medicinal importance of *Ginkgo biloba* L.” *Nat. Prod. Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 746–52, 2014.
- [98] M. Zhao, Z. Dong, Z. Yu, S. Xiao, and Y. Li, “[Effects of *Ginkgo biloba* extract in improving episodic memory of patients with mild cognitive impairment: a randomized controlled trial].” *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, vol. 10, no. 6, pp.

628–34, Jun. 2012.

- [99] R. Crupi, Y. A. K. Abusamra, E. Spina, and G. Calapai, “Preclinical data supporting/refuting the use of *Hypericum perforatum* in the treatment of depression.,” *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, vol. 12, no. 4, pp. 474–86, Jun. 2013.
- [100] E. Russo, F. Scicchitano, B. J. Whalley, C. Mazzitello, M. Ciriaco, S. Esposito, M. Patanè, R. Upton, M. Pugliese, S. Chimirri, M. Mammì, C. Palleria, and G. De Sarro, “*Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions.,” *Phytother. Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 643–55, May 2014.
- [101] I. A. Bukhari and A. Dar, “Behavioral profile of *Hypericum perforatum* (St. John’s Wort) extract. A comparison with standard antidepressants in animal models of depression.,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 17, no. 8, pp. 1082–9, Apr. 2013.
- [102] J. Tian, F. Zhang, J. Cheng, S. Guo, P. Liu, and H. Wang, “Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L.,” *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 5632, Jul. 2014.
- [103] B. Barrett, R. Brown, D. Rakel, M. Mundt, K. Bone, S. Barlow, and T. Ewers, “Echinacea for treating the common cold: a randomized trial.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 153, no. 12, pp. 769–77, Dec. 2010.
- [104] R. Nahas and A. Balla, “Complementary and alternative medicine for prevention and treatment of the common cold.,” *Can. Fam. Physician*, vol.

57, no. 1, pp. 31–6, Jan. 2011.

- [105] M. Karsch-Völk, B. Barrett, D. Kiefer, R. Bauer, K. Ardjomand-Woelkart, and K. Linde, “Echinacea for preventing and treating the common cold.,” *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 2, p. CD000530, Feb. 2014.
- [106] S. M. Ross, “Echinacea purpurea: A Proprietary Extract of Echinacea purpurea Is Shown to be Safe and Effective in the Prevention of the Common Cold.,” *Holist. Nurs. Pract.*, vol. 30, no. 1, pp. 54–7.
- [107] A. E. Yanni, V. Efthymiou, P. Lelovas, G. Agrogiannis, N. Kostomitsopoulos, and V. T. Karathanos, “Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits.,” *Food Funct.*, vol. 6, no. 3, pp. 963–71, Mar. 2015.
- [108] M. Akaberi and H. Hosseinzadeh, “Grapes (*Vitis vinifera*) as a Potential Candidate for the Therapy of the Metabolic Syndrome.,” *Phytother. Res.*, vol. 30, no. 4, pp. 540–56, Apr. 2016.
- [109] M. del C. Avelino-Flores, M. del C. Cruz-López, F. Jiménez-Montejo, and J. Reyes-Leyva, “Cytotoxic Activity of the Methanolic Extract of *Turnera diffusa* Willd on Breast Cancer Cells,” *J. Med. Food*, vol. 0, no. 0, pp. 1–7, 2014.
- [110] V. Vukics and A. Guttman, “Structural characterization of favonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 29, pp. 1–16, 2010.
- [111] B. Domon and C. E. Costello, “A Systematic Nomenclature for Carbohydrate

Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates,” *Glycoconj. J.*, vol. 5, no. 4, pp. 397–409, 1988.

- [112] K. Waridel, P., Wolfender, J-L., Ndjoko, K., Hobby, K.R., Major, H.J., Hostettmann, “Evaluation of quadruple time of flight tandem mass spectrometry and ion trap multiple stage mass spectrometry for differentiation of c-glucosidic flavonoid isomers,” *J Chromatogr A*, vol. 926, no. 1, pp. 29–41, 2001.
- [113] F. Ferreres, A. Gil-izquierdo, P. B. Andrade, P. Valentao, and F. A. Tomás, “Characterization of C -glycosyl flavones O -glycosylated by liquid chromatography – tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1161, pp. 214–223, 2007.
- [114] A. Figueirinha, A. Paranhos, J. J. Pérez-Alonso, C. Santos-Buelga, and M. T. Batista, “Cymbopogon citratus leaves : Characterisation of flavonoids by HPLC – PDA – ESI / MS / MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols,” *Food Chem.*, vol. 110, pp. 718–728, 2008.
- [115] K. Hoffmann-Bohm, H. Lotter, O. Seligmann, and H. Wagner, “Antihepatotoxic C-Glycosylflavones from the Leaves of *Allophyllus edulis* var . *edulis* and *gracilis*,” *Planta Med.*, vol. 80, pp. 544–548, 1991.
- [116] D. D. Orhan, M. Aslan, G. Aktay, E. Ergun, E. Yesilada, and F. Ergun, “Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle,” *Life Sci.*, vol. 72, no. 20, pp. 2273–2283, 2003.

- [117] F. L. Courts and G. Williamson, "The occurrence, fate and biological activities of C-glycosyl flavonoids in the human diet.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 8398, no. December, pp. 37–41, 2013.
- [118] J. Wolfender, S. Rudaz, Y. H. Choi, and H. K. Kim, "Plant Metabolomics : From Holistic Data to Relevant Biomarkers," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, pp. 1056–1090, 2013.
- [119] C. Papaemmanouil, C. G. Tsiafoulis, D. Alivertis, O. Tzamaloukas, D. Miltiadou, A. G. Tzakos, and I. P. Gerothanassis, "Selective One-Dimensional Total Correlation Spectroscopy Nuclear Magnetic Resonance Experiments for a Rapid Identification of Minor Components in the Lipid Fraction of Milk and Dairy Products: Toward Spin Chromatography?"
- [120] C. Tistaert, B. Dejaegher, G. Chataign?, C. Rivi?re, N. Nguyen Hoai, M. C. Van, J. Quetin-Leclercq, and Y. Vander Heyden, "Potential antioxidant compounds in Mallotus species fingerprints. Part II: Fingerprint alignment, data analysis and peak identification," *Anal. Chim. Acta*, vol. 721, pp. 35–43, Apr. 2012.
- [121] J. Ricardo Lucio Gutiérrez and J. Coello Bonilla, "Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales," 2012.
- [122] N. J. N. Brito, J. a. López, M. A. Do Nascimento, J. B. M. Macêdo, G. A. Silva, C. N. Oliveira, A. A. de Rezende, J. Brandão-Neto, A. Schwarz, and M. D. G. Almeida, "Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia*

Linn. var. elegans against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 12, pp. 4340–4347, 2012.