



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Biológicas
Centro de Química del ICUAP
Laboratorio de Adsorción y Cromatografía

“Identificación de glucósidos de kaempferol en extractos de
Justicia spicigera”

Tesis para obtener el título de:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
Adriana Carbajal Armenta

DIRECTORA:
Dra. Lidia Esmeralda García Díaz

Puebla, Puebla.

Mayo 2023



“Es mejor encender una vela,
que maldecir la oscuridad”

-Confucio

Dimidium facti, qui coepit, habet:
sapere aude, incipe.

(Quien ha comenzado,
ya ha hecho la mitad:
atrévete a saber,
empieza)

-Horacio

A mis hermanas, por ser siempre refugio,
apoyo y ejemplo, gracias por estar
y ser conmigo.
A mis papás por su apoyo y esfuerzo
en cada etapa de mi vida,
gracias.
A mi familia, por su apoyo y
aliento, siempre gracias.
A mis abuelitos, por todo
su amor y cariño.

Agradecimientos

A la universidad pública, por ser cúmulo de conocimientos, por ser catalizador de la transformación de conciencias y sujetos.

A la Dra. Lidia Esmeralda García Díaz, por la oportunidad de aprender, por compartir su tiempo y conocimiento, por su confianza, paciencia y guía en el desarrollo de este proyecto. Gracias por su apoyo, palabras y enseñanzas en todos los ámbitos.

A la Dra. María de la Paz Elizalde González por compartir su conocimiento, tiempo y dedicación en las correcciones a este trabajo, y por permitirme aprender en su laboratorio. A la Dra. María Guadalupe Delgado López, por su conocimiento, tiempo y dedicación en las correcciones a este trabajo.

A la Dra. María del Rayo Guevara Villa, por su siempre amable trato y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio, Emanuel, M.C. Alejandra, M. C Montserrat, M. C. Daniela, por su apoyo, amistad y conocimiento, gracias.

A mis amigos Jess, Tom, Miriam, Belén, Adri, Alejandra, Alberto, Sabri, Thaís, Elizabeth, Héctor, Yami, Vicky, M. C. Lesther. Gracias por compartir conmigo su amistad y su tiempo.

A todos mis maestros y guías que en diferentes trincheras tuve la oportunidad de conocer, gracias.

Cultivaron mi ser.

Comunicaciones derivadas

- Coloquio de avances de tesis del Cuerpo Académico BUAP-365, otoño 2022.
- Infografía Metabolitos secundarios-Productos naturales, 1er concurso de infografías ICUAP.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	3
1.1 Metabolitos secundarios.....	3
1.1.2 Flavonoides.	4
1.1.3 Kaempferol y glicósidos de kaempferol.....	6
1.2 <i>Justicia spicigera</i> y sus propiedades medicinales.....	9
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Fundamentos de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	11
2.2 Detector DAD UV-vis.	13
2.3 Espectrometría de masas.....	16
2.4 Validación de métodos analíticos.	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1 Obtención del extracto de <i>J. spicigera</i>	21
3.2 Detección preliminar de flavonoides.	21
3.3 Análisis cromatográfico.	22
3.4 Determinación de la aptitud del método cromatográfico.....	24
3.5 Validación del método cromatográfico.....	25
3.6 Parámetros de Detección DAD.....	29
3.7 Análisis de masas y masas/masas.	30
3.8 Estrategias utilizadas para la identificación de compuestos.	31
3.9 Cuantificación de kaempferitrina en el extracto de <i>J. spicigera</i>	32
3.10 Cuantificación de compuestos por estándar interno	33
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Detección preliminar de flavonoides.	35
4.2 Aptitud del método cromatográfico.	36
4.3 Identificación de compuestos.....	40
4.4 Análisis MS/MS.....	49
4.5 Cuantificación de la kaempferitrina y glicósidos de kaempferol.....	54
4.6 Validación del método cromatográfico.....	55

4.7 Determinación de la pureza de los picos.....	56
CONCLUSIONES.....	59
PERSPECTIVAS	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXOS	67
I. Mecanismo de reacción de la fragmentación de flavonoides.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Columnas utilizadas para el análisis cromatográfico del extracto de <i>J. spicigera</i>	23
Tabla 3.2 Composición de la fase móvil en el método de gradiente.	24
Tabla 3.3 Parámetros utilizados en el detector de masas.....	30
Tabla 4.1 Resultados de prueba de Shinoda.	36
Tabla 4. 2 Aptitud de los métodos cromatográficos	38
Tabla 4. 3 Identificación de compuestos del extracto de <i>J. spicigera</i> por HLPC-QTOF-MS	43
Tabla 4.4 Espectros de masas y de absorción UV-vis correspondientes a los picos observados.	45
Tabla 4.5 Parámetros de linealidad.....	55
Tabla 4.6 Parámetros de precisión.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 2-fenil- γ -cromona, estructura base de los flavonoides.	5
Figura 1.2 Estructura base de las subclases de los flavonoides.....	5
Figura 1.3 Estructura de la aglicona de kaempferol.	7
Figura 1. 4 <i>Justicia spicigera</i> Schtdl.	9
Figura 2.1 Esquema del equipo cromatográfico HPLC.....	13
Figura 2.2 Esquema del detector de arreglo de diodos.....	14
Figura 2.3 Espectros UV-vis de flavonas y flavonoles	15
Figura 2.4 Detector 1260 Infinity DAD®	16
Figura 3.1 Reacción de Shinoda.....	22
Figura 3.2 Mecanismo de fragmentación de los flavonoides.	32
Figura 4.1 Cromatogramas del extracto	37
Figura 4.2 Cromatograma UV-vis del extracto a diferentes longitudes de onda	40
Figura 4.3 Cromatograma de iones totales del extracto en modo negativo (-TIC)	41
Figura 4.4 Cromatogramas -EIC del extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i>	41
Figura 4.5 Curva de calibración con estándar de KFA.	54
Figura 4.6 Curva de calibración relativa.	54
Figura 4.7 Superposición de 10 espectros de absorción UV de los picos	56
Figura 4.8 Ajuste por mínimos cuadrados de los espectros para la obtención del factor de similitud	57
Figura 4. 9 Espectros de masas de los picos 11, 13 y 15.....	58

RESUMEN

A lo largo de la historia, las plantas se han aprovechado con fines antropogénicos diversos, como en la medicina tradicional, práctica común en nuestro país. Esta práctica cultural tiene un trasfondo que incluye la presencia de moléculas capaces de ejercer efectos sobre el organismo. Estas moléculas, hoy conocidas como metabolitos secundarios incluyen una variedad de estructuras químicas cuyo papel en el organismo productor es principalmente ecológico o adaptativo, pero que pueden tener diversos efectos biológicos en otros organismos.

Justicia spicigera Schltdl. es una planta con propiedades medicinales, usada tradicionalmente para tratar diversos padecimientos. Basados en la práctica tradicional, varios extractos de esta planta han sido evaluados, confirmando efectos biológicos de interés como hipoglucemiante, antihipertensivo, antitumoral, inmunomodulador y anticonvulsivo. En extractos de esta planta se han identificado metabolitos como el kaempferol y la kaempferitrina, pertenecientes a un grupo de compuestos conocidos como flavonoides, que poseen efecto antioxidante, antimicrobiano, hepatoprotector, antiinflamatorio, antitumoral y vasodilatador. Existe una gran diversidad de estructuras de flavonoides, por lo que es necesario aislar e identificar estas moléculas en los extractos y determinar qué compuestos son los responsables de los efectos biológicos. La cromatografía es un método fisicoquímico de separación en la que los componentes de una mezcla interactúan con una fase móvil que arrastra las moléculas a través de un material adsorbente, denominado fase estacionaria, provocando así la separación de los analitos. La separación permite que los compuestos presentes en la mezcla puedan ser detectados y analizados ‘individualmente’ a través de diversos detectores que proporcionan información acerca de la identidad del compuesto. Las técnicas analíticas con alta sensibilidad como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detectores UV-vis y de masas, representan uno de los métodos cualitativos y cuantitativos más eficaces en el estudio de matrices multicomponentes como los extractos vegetales. Por lo que, en este trabajo se desarrolló y validó un método cromatográfico para la identificación y cuantificación de compuestos de la familia del kaempferol presentes en un extracto de *J. spicigera* que se ha reportado, tiene actividad biológica de interés.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son capaces de producir y acumular moléculas bioactivas, conocidas como metabolitos secundarios, que son sustancias con una amplia variedad de estructuras químicas que desempeñan una función ecológica o adaptativa principalmente. Estas estructuras pueden ser compartidas entre ciertos grupos taxonómicos y variar sus concentraciones bajo ciertas condiciones ambientales. Los metabolitos secundarios de plantas pueden ser aprovechados con fines diversos en la industria farmacéutica, alimentaria, agrícola, entre otras (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009). En la medicina tradicional, las plantas han sido un recurso aliado para el tratamiento de enfermedades debido a la presencia de este tipo de compuestos que, con el avance científico se han logrado aislar y utilizar como principios activos. De ahí la importancia del estudio de plantas que se han usado culturalmente como remedios para enfermedades.

Justicia spicigera Schltdl. es una planta arbustiva de hoja perenne y flores tubulares naranjas o rojizas, comúnmente llamada ‘muitle’, que se usa en la medicina tradicional como tinte natural; en infusiones como remedio antiespasmódico, antipirético, hipoglucemiante, antidisentérico, contra padecimientos respiratorios y de la sangre (Argueta-Villamar, Cano-Asseleih, y Rodarte-García, 1994; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2020; Navarrete-Mora *et al.*, 2016; Mendoza-Zuñiga, 2010). Diferentes extractos de esta planta han sido evaluados por sus efectos hipoglucemiantes, antihipertensivos, antinociceptivos, antitumorales, inmunomoduladores y anticonvulsivos (Alonso-Castro *et al.*, 2012; Ortiz-Andrade *et al.*, 2012; Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013; Zapata-Morales *et al.*, 2016; González-Trujano *et al.*, 2017). Algunos compuestos de interés descritos en esta planta son terpenoides, lignanos, alcaloides y flavonoides como el kaempferol y la kaempferitrina (Corrêa y Alcântara *et al.*, 2012; Euler y Alam, 1982). Sin embargo, son pocos los trabajos enfocados a la caracterización fitoquímica de esta planta en los que se determinen las estructuras de los compuestos con actividad biológica. En este trabajo se identificaron los principales compuestos de naturaleza flavonoide derivados del Kaempferol, presentes en un extracto acuoso de *J. spicigera* que ha sido evaluado y demostrado que posee efectos anticonvulsivos. La identificación se realizó a través de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), acoplada a los detectores: DAD-Uv-Vis y espectrómetros de masas (Q-ToF). Asimismo, se validó el método con el que se logró separar y cuantificar la mayor cantidad de compuestos derivados del kaempferol.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Metabolitos secundarios.

Todos los organismos vivos son capaces de transformar y convertir una gran variedad de compuestos a través de una red de reacciones bioquímicas interconectadas y altamente reguladas que les permiten obtener energía, crecer y reproducirse; este conjunto de redes es conocido como metabolismo intermediario o primario y está conformado por un conjunto de rutas metabólicas. A los compuestos químicos intermediarios de estas reacciones se les conoce como metabolitos que al romperse, liberan energía para el mantenimiento, reparación y crecimiento de la célula. Algunas de las biomoléculas sustrato y producto de estas reacciones incluyen: carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y ácidos nucleicos. A pesar de la gran diversidad biológica, existen metabolitos comunes para la mayoría de los organismos y otros que sólo producen organismos o grupos específicos. Este tipo de metabolitos se conocen como metabolitos secundarios o productos naturales y son moléculas de diversa naturaleza, que no cumplen un rol fundamental en el desarrollo de la vida del organismo, sin embargo, le representan una ventaja ecológica (Dewick, 2009). De acuerdo con Jones y Firn (2003), en su teoría de ‘screening’ o detección, los organismos capaces de generar y retener diversidad química a bajo costo, poseen mayor probabilidad de producir un metabolito con actividad biológica potente y útil que les represente una ventaja en su ambiente (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006).

El metabolismo secundario está presente en organismos que carecen de un sistema inmunológico, aunque no está limitado a estos (Hadacek, 2002). Las plantas son organismos sésiles y carentes de un sistema inmunológico, por lo que, la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios con diversas estructuras y funciones, les proporcionan una estrategia ecológica frente a depredadores y patógenos. Los metabolitos secundarios actúan como inhibidores o repelentes de patógenos, como protectores contra la radiación UV, atrayentes de polinizadores y como respuesta de defensa de la planta (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006). Dado que las plantas poseen una alta variedad de metabolitos secundarios, representan un recurso aprovechable antropológicamente para la obtención de moléculas bioactivas aplicables en el área médica, alimenticia y agronómica, de ahí su designación como productos naturales (Dewick, 2009).

1.1.2 Flavonoides.

De manera general, los metabolitos secundarios se pueden clasificar por su origen biosintético en: compuestos fenólicos, terpenos y compuestos nitrogenados. Los compuestos fenólicos son los más abundantes en plantas e incluyen a los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006). Los flavonoides son sustancias sólidas cristalinas de color blanco a amarillento, poco solubles en agua cuando se encuentran en estado libre, cuando se encuentran como heterósidos, son solubles en agua, alcohol y disolventes orgánicos polares. Este grupo de compuestos se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal, principalmente en familias de plantas superiores, comúnmente en la parte aérea. Su biosíntesis proviene de una ruta biosintética mixta, conformada por la ruta de los policétidos y la ruta del ácido shikímico (López-Luengo, 2002). Los flavonoides representan el grupo más amplio de compuestos fenólicos encontrados en plantas y están involucrados en la protección contra el estrés biótico y abiótico, la respuesta contra patógenos y la protección contra radiación UV; participan también en el olor, sabor y color de algunas especies de plantas (Ochoa y Ayala, 2004; Soriano-Santos *et al.*, 2006). Tienen efecto antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotector, como quelantes de metales, entre otros (Shamsudin *et al.*, 2022; Soriano-Santos *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2018).

Los flavonoides poseen un esqueleto de 15 carbonos (C6-C3-C6) derivado de la 2-fenil- γ -cromona (Fig. 1.1), constituido por dos anillos aromáticos A y B (con sustituciones en las posiciones 5, 6 y 7 en A, y en 3', 4' y 5' en B), unidos por una cadena alifática de 3 carbonos que puede formar un anillo de pirano, C. Los diferentes niveles de oxidación del anillo C aportan diversidad estructural a los flavonoides, que se clasifican en las siguientes subclases (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006; Ochoa y Ayala, 2004; Soriano-Santos *et al.*, 2006):

- Flavonoles: Poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C. Este grupo OH permite que se unan glicósidos, formando enlaces O-glicosídicos (Fig. 1.2a). Algunos flavonoles de interés son la rutina, silimarina, quercetina y el kaempferol (López-Luengo, 2002).
- Flavonas: Presentan un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, pero a diferencia de los flavonoles, no poseen un grupo hidroxilo en posición 3 (Fig. 1.2b).
- Flavanoles: Poseen un grupo -OH en posición 3 del anillo C y un enlace simple en posición 2-3 (Fig. 1.2c).
- Flavanonas: Tienen una sustitución de un grupo carbonilo en posición 4, sin doble enlace en la posición 2-3 del anillo C (Fig. 1.2d).

- **Antocianinas:** Se conocen como antocianidinas cuando tienen una sustitución de un grupo -OH en posición 3 y un doble enlace en 2-3 del anillo C, se presentan como cationes y carecen del grupo carbonilo en posición 4. Cuando las antocianidinas están unidas a un glicósido, se les conoce como antocianinas (Fig. 1.2e), que son pigmentos de color rojo hidrosolubles (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2011).
- **Isoflavonas:** En la posición 4 del anillo C tienen un grupo carbonilo y el anillo B se encuentra ligado a la posición 3, a diferencia de todos los demás flavonoides que tienen ligado el anillo B a la posición 2 del anillo C (Fig. 1.2f).

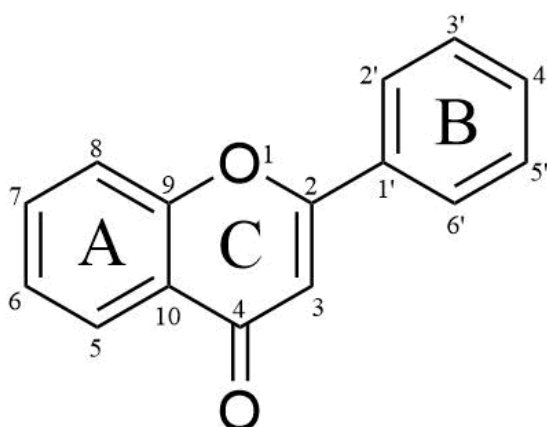


Figura 1.1 2-fenil- γ -cromona, estructura base de los flavonoides.

En la Figura 1.2. se muestran las estructuras de las subclases de flavonoides.

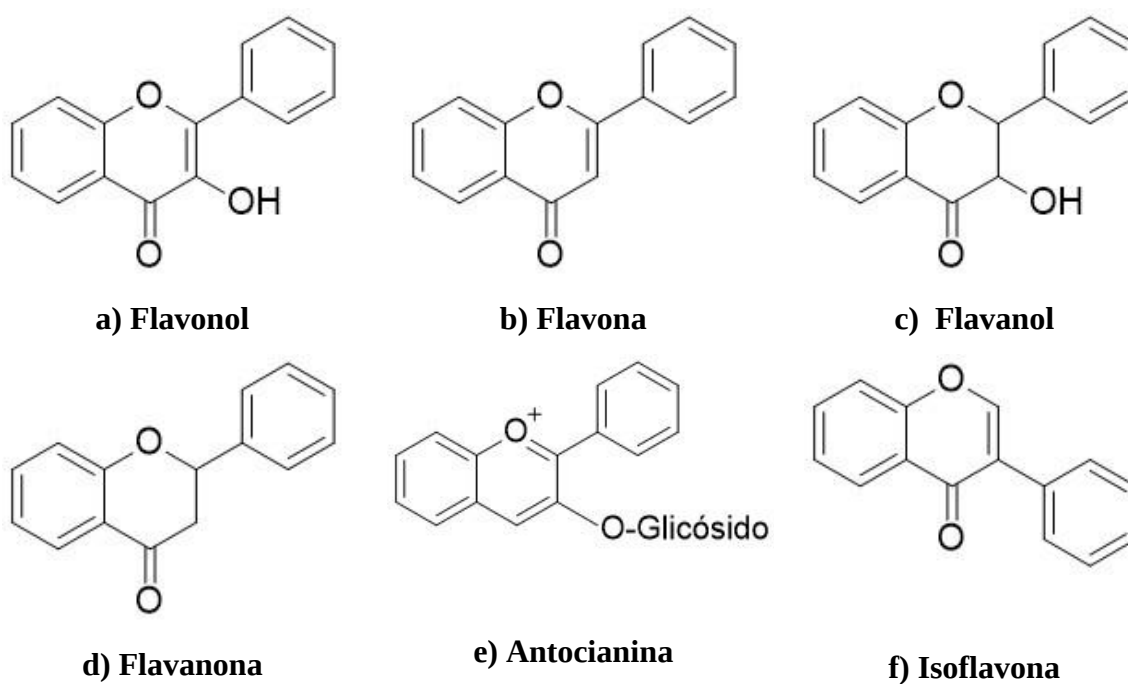


Figura 1.2 Estructura base de las subclases de los flavonoides.

En las plantas, los flavonoides tienen modificaciones como hidroxilaciones, metilaciones y glicosilaciones. Los patrones de sustitución en la estructura tienen relación con la actividad biológica (SAR, por sus siglas en inglés: Structure Activity Relationship). La presencia de ciertos grupos funcionales influye en el efecto biológico que ejercen. Por ejemplo, el doble enlace en la posición 2-3, el grupo carbonilo en C4, la hidroxilación en C3 y el grupo catecol del anillo B se relacionan con el efecto antiviral, antibacteriano, cardioprotector, antiinflamatorio, antioxidante y anticancerígeno de los flavonoides. La actividad antioxidante de los glicósidos de flavonoides es menor que la de sus agliconas correspondientes, sin embargo, la ruptura de los enlaces glicosídicos que se produce *in vivo* conlleva a un aumento de la biodisponibilidad, aumentando así la acción antioxidante. Algunos flavonoides ejercen una fuerte actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer a través de mecanismos como la inducción de la apoptosis, la inducción del arresto del ciclo celular, la inhibición del proteasoma y la citotoxicidad (Wang *et al.*, 2018).

Además de la SAR, se estudia la interacción de cada fracción estructural con las dianas moleculares, pues las contribuciones de cada fracción estructural modifican las propiedades fisicoquímicas de la molécula como la polaridad y el impedimento estérico, de ahí la importancia de realizar la identificación de las estructuras de los flavonoides (Wang *et al.*, 2018).

La subclase de flavonoides más común en plantas son los flavonoles y pueden encontrarse unidos a un glicósido (forma glicosilada denominada heterósido) o sin residuos de glicósidos (aglicona). Existen dos formas de glicosilación, dependiendo del átomo de enlace con el residuo glicosídico: si forma un enlace con carbono se denomina C-glicósido, y si forma un enlace con un oxígeno se denomina O-glicósido. La mayor parte de los flavonoles se encuentran en forma de O-glicósidos, también denominados O-heterósidos (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006; López-Luengo, 2002). Los flavonoles participan como agentes antioxidantes, antimicrobianos, hepatoprotectores, antiinflamatorios, antitumorales y vasodilatadores (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006; Álvarez-Castro y Orallo-Cambeiro, 2003a; Bangar *et al.*, 2022; Shamsudin *et al.*, 2022).

1.1.3 Kaempferol y glicósidos de kaempferol.

El kaempferol (3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona) es un flavonol de color amarillo con un peso molecular de 286.2 g/mol, ampliamente distribuido en el reino vegetal (Fig. 1.3), que se puede encontrar de forma libre o formando O-heterósidos. Los residuos glicosídicos que comúnmente se encuentran unidos a la aglicona de kaempferol

(KFL) son la galactosa, arabinosa, ramnosa, glucosa, xilosa y rutinósido (glucosa más ramnosa) (Bangar *et al.*, 2022).

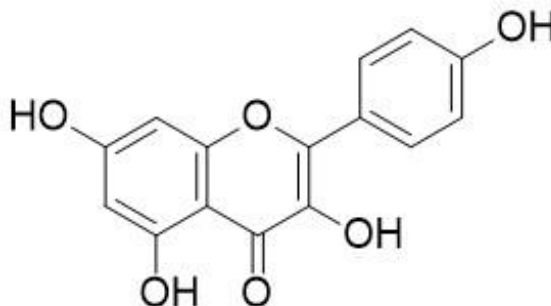


Figura 1.3 Estructura de la aglicona de kaempferol.

La aglicona de kaempferol es lipofílica, mientras que cuando se encuentra glicosilado presenta propiedades hidrofílicas. El KFL puede ser aislado de extractos crudos de plantas a través de diversas metodologías utilizando solventes polares como metanol, etanol, agua y acetona (Bangar *et al.*, 2022). Los principales efectos de la actividad biológica del KFL y sus glicósidos son:

- Quelante de metales: Debido a que poseen un sistema de enlaces conjugado, un átomo de oxígeno y efecto estérico, actúan como un buen ligando quelante de iones metálicos (Bangar *et al.*, 2022).
- Neuroprotección: El KFL y glicósidos como el kaempferol-3-O-ramnósido, kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-7-O-rutinósido, y el kaempferol-4'-metil éter, exhiben acción neuroprotectora, a través de la modulación de diversas vías de señalización proinflamatoria, como la inhibición de metaloproteasas, de especies reactivas de oxígeno (ROS), de la proteína beta-amiloide (involucrada en la enfermedad de Alzheimer) y a través de su efecto antioxidante y antiinflamatorio. Además, el KFL tiene efecto farmacológico a nivel del sistema nervioso central, pues puede atravesar la barrera hematoencefálica (Beg *et al.*, 2018; Silva dos Santos *et al.*, 2021).
- Actividad anticancerígena: Probada en diversas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC) donde el KFL y glicósidos actúan induciendo la apoptosis. Tiene efecto antiproliferativo de células de cáncer hepático humano (HepG2, SK-HEP-1, Huh7); posee también efectos citotóxicos sobre diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón, colorrectal, entre otros (Bangar *et al.*, 2022). Los mecanismos de inhibición de las células cancerígenas son: la inducción de la apoptosis, el arresto del

ciclo celular en la fase G2/M, la activación significativa de las cascadas de proteína quinasa activada por un mitógeno (MAPK), que son vías de señalización clave para la regulación de la proliferación, supervivencia y diferenciación celular normal. Además posee propiedades preventivas contra cáncer debido a su alta capacidad antioxidante (Calderón-Montaña *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017).

- Actividad antimicrobiana: La hidroxilación en la posición 4' del anillo B, en 5 y 7 del anillo A y en 3 del anillo C del KFL, se relaciona con efectos antimicrobianos (Farhadi *et al.*, 2019; Shamsudin *et al.*, 2022). Glucósidos de kaempferol (kaempferol 3-O- α -L-(2''',4'''-di-E-p-coumaroil)-ramnósido y kaempferol 3-O- α -L-(2''-Z-p-coumaroil-4'''-E-p) fueron capaces de inhibir *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y *Enterococcus* resistentes a vancomicina (Otsuka *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que el kaempferol y sus glicósidos actúan sinérgicamente con antibióticos como la rifampicina, vancomicina, eritromicina y clindamicina contra bacterias resistentes a antibióticos (Calderón-Montaña *et al.*, 2011).
- Actividad antioxidante: Varias plantas que contienen kaempferol y algunos de sus glicósidos ejercen efecto antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios SAR demostraron que la presencia del doble enlace en C2-C3 en conjugación con un grupo carbonilo en C4 y la presencia de grupos hidroxilo en C3, C5 y C4' son características estructurales importantes involucradas en la actividad antioxidante del kaempferol (Calderón-Montaña *et al.*, 2011).
- Actividad antiinflamatoria: El KFL y sus glucósidos tienen un efecto antiinflamatorio tanto *in vivo* como *in vitro* a través de la expresión de citocinas y la inhibición de enzimas proinflamatorias (Bangar *et al.*, 2022; Calderón-Montaña *et al.*, 2011). Rho y colaboradores (2011), evaluaron la capacidad antiinflamatoria del kaempferol y sus ramnósidos, demostrando que el grupo 3-hidroxilo del kaempferol es un farmacóforo importante en el control de la inflamación y que los restos de ramnosa adicionales afectan negativamente la acción antiinflamatoria.

La presencia del KFL y sus glicósidos es común en familias de plantas vasculares que pertenecen a las divisiones Pinophyta, Pteridophyta y Magnoliophyta. Otros glicósidos como el kaempferol-3-(p-coumaroiltriglucósido), se encuentran solo en algunas especies dado que las enzimas involucradas en su biosíntesis no están ampliamente distribuidas en las plantas (Calderón-Montaña *et al.*, 2011; Gómez-Mejía *et al.*, 2021). El KFL y glicósidos de KFL han

sido identificados en una variedad de plantas comestibles y de uso medicinal que pueden emplearse como fuente de estos compuestos de interés biológico (Corrêa y Alcântara, 2012).

1.2 *Justicia spicigera* y sus propiedades medicinales.

Justicia spicigera (figura 1.4) es una planta endémica de Mesoamérica, que ha sido utilizada con diversos fines en la medicina tradicional mexicana. Coloquialmente llamada ‘muitle’, ‘muicle’, ‘mohuite’, ‘hierba tinta’, ha sido utilizada como tinte natural, en infusiones como remedio antiespasmódico, antipirético, hipoglucemiante, antidisentérico, contra padecimientos respiratorios y de la sangre (Argueta-Villamar, Cano-Asseleih y Rodarte-García, 1994; Mendoza-Zuñiga, 2010; Navarrete Mora *et al.*, 2016). Es una planta arbustiva de hoja perenne y flores tubulares naranjas o rojizas. Clasificación taxonómica: División Magnoliophyta (planta con flor), Clase Magnoliopsida (dicotiledónea), Subclase Asteridae, Orden Lamiales, Familia Acanthaceae, Género *Justicia* y Especie *Justicia spicigera* Schlechtendal.



Figura 1. 4 *Justicia spicigera* Schtdl.

Extractos de esta planta han sido evaluados y analizados por sus efectos biológicos. Consecuentemente, se han identificado algunos compuestos como: terpenoides, lignanos, alcaloides y flavonoides como el kaempferol y la kaempferitrina (kaempferol-3,7-bisramnósido) (Corrêa y Alcântara, 2012; Euler y Alam, 1982). Algunos de los efectos biológicos estudiados de esta planta se mencionan a continuación:

En 2012, Alonso-Castro y colaboradores, reportaron citotoxicidad de un extracto etanólico de *J. spicigera* en células humanas de carcinoma cervical (HeLa) y en células humanas de queratinocitos inmortalizados (HaCaT, células no cancerosas). Se evaluó la citotoxicidad y la inmunomodulación de células Natural Killer (NK) *in vivo* en modelos murinos atímicos injertados con tumores de células HeLa. En las células HeLa, el extracto mostró un efecto proapoptótico del 35%, no así en células no cancerosas. En los modelos *in vivo*, las

concentraciones de 10, 50 y 100 mg/kg redujeron el crecimiento tumoral en un 28%, 41% y 53% respectivamente, y se indujo la activación de las células NK. La kaempferitrina (KFA) fue el compuesto más abundante en el extracto, sin embargo, se detectaron otros compuestos que no fueron identificados.

En el estudio de Ortíz-Andrade *et al.* (2012), se reportó el efecto del extracto etanólico liofilizado de *J. spicigera* en adipocitos murinos y humanos resistentes y sensibles a insulina, así como en modelos normoglucémicos y T2DM (Type 2 Diabetes Mellitus) de ratas. Los extractos estimularon la captación de glucosa en ambos modelos celulares y murinos (resistentes y sensibles a la insulina). También se reportó a la kaempferitrina como el compuesto más abundante en el extracto.

Por otro lado, Esquivel-Gutiérrez y colaboradores (2013), evaluaron los efectos de los extractos de agua, metanol, hexano y cloroformo de la parte aérea de *J. spicigera* en la presión arterial de ratas hipertensas. Únicamente los extractos clorofórmicos redujeron la presión arterial de los modelos evaluados a niveles normales, mientras que el extracto acuoso sólo redujo la presión diastólica. En el extracto clorofórmico se identificaron compuestos flavonoides como hesperidina, naringenina y kaempferol.

Zapata-Morales *et al.* (2016), demostraron el efecto antinociceptivo del extracto etanólico liofilizado de *Justicia spicigera*, obtenido por Alonso-Castro *et al.* y Ortiz-Andrade *et al.*, en 2012. Los resultados se centraron en la inducción del efecto antinociceptivo a nivel central y periférico en modelos murinos; corroborando el efecto antiinflamatorio de esta planta y fue la kaempferitrina el compuesto más abundante en el extracto. Además, detectaron otros metabolitos con alta actividad antinociceptiva; sin embargo, no fueron identificados.

En 2017, Gonzalez-Trujano y colaboradores, reportaron el potencial anticonvulsivo de un extracto acuoso de *Justicia spicigera*, donde sugieren que la KFA es el compuesto bioactivo responsable de este efecto. En dicho estudio, exploraron la participación a nivel de sistema nervioso central y sistémico el efecto anticonvulsivo del extracto de *J. spicigera* analizado en este trabajo, así como el efecto de la KFA. Demostraron que la administración a nivel sistémico y central redujo la severidad de las convulsiones en modelos de ratas.

Los reportes mencionados se centran primordialmente en los efectos biológicos y no existe una caracterización completa de los extractos de la planta. Algunos de los compuestos identificados son de naturaleza flavonoide como la naringenina, la hesperidina, el kaempferol y la kaempferitrina. Dada la diversidad de estas estructuras, resulta necesario el aislamiento e

identificación de los compuestos que son responsables de los efectos observados, mediante técnicas analíticas con alta sensibilidad como el sistema de análisis utilizado en este trabajo: HPLC-DAD-ESI-Q-ToF-MS-MS/MS.

La evaluación farmacológica de diversos extractos de esta planta ha demostrado su actividad antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antidiabética, antitumoral, inmunomoduladora, antinociceptiva y anticonvulsiva. En los siguientes apartados se describen a mayor profundidad las técnicas utilizadas para el análisis de un extracto acuoso que ejerció actividad anticonvulsiva.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fundamentos de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación en el que los componentes de una mezcla son distribuidos a través de una fase estacionaria (FE) por medio de una fase móvil (FM), donde los componentes de la mezcla se van separando por su interacción con ambas fases. Dependiendo de la naturaleza de las fases y el mecanismo de separación de los analitos, la cromatografía se puede clasificar en: cromatografía de adsorción, de reparto, por exclusión molecular y de intercambio iónico. En la cromatografía de adsorción la separación de los componentes de la muestra se lleva a cabo en la interfase de la FM con la FE. La interacción de los analitos en la interfase provoca la retención momentánea y diferenciada en la superficie de la FE y la elución de los analitos a diferentes tiempos de retención (Quattrocchi, 1992; Skoog *et al.*, 2015). El tipo de interacciones entre los analitos y las fases en la cromatografía de adsorción son: la formación de puentes de hidrógeno, la interacción dipolo-dipolo, dipolo inducido. Dependiendo de la naturaleza del analito tendrá una mayor o menor afinidad con las fases, eluyendo en un tiempo corto si tiene afinidad por la FM, por el contrario, eluirá en mayor tiempo si se retiene en la FE. La separación en la cromatografía de líquidos se debe al fenómeno de adsorción, donde la FE es un sólido adsorbente y la FM es un líquido. La cromatografía permite entonces identificar, cuantificar y purificar compuestos.

En la cromatografía de adsorción, la polaridad de la FE permite dividir en dos tipos de cromatografía (Smith y Braithwaite, 1996):

- Cromatografía de fase normal (NP): La fase estacionaria es un sólido adsorbente de naturaleza polar (sílica gel o alúmina), mientras que la fase móvil posee una constitución de solventes de naturaleza no polar (como hexano y éter).

- Cromatografía de fase reversa (RP): La fase estacionaria consiste en la mayoría de los casos en sílica gel modificada a través de la adición de cadenas hidrocarbonadas de 4, 6, 8, 18 carbonos (columnas C4, C6, C8, C18, respectivamente) o grupos funcionales no polares unidos al silanol (sílice) a través de un enlace tipo siloxano; estas funcionalizaciones le confieren una naturaleza no polar. Por su parte, la fase móvil se constituye por solventes de naturaleza polar; agua, metanol y acetonitrilo son los solventes más utilizados como FM. Este tipo de cromatografía permite separar muestras con analitos de naturaleza no polar.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se lleva a cabo con una fase móvil con flujo a alta presión y una fase estacionaria empacada en una columna con partículas de sílice que varían entre 3 y 7 μm (Cserhádi, 2007). El acoplamiento de la HPLC con distintos tipos de detectores representa uno de los métodos cualitativos y cuantitativos más eficaces en el estudio de matrices multicomponentes.

El equipo cromatográfico en HPLC está compuesto por diversos dispositivos:

- Los reservorios de fase móvil conectados a la bomba a través de una serie de tuberías y un sistema de desgasificación para la FM.
- La bomba, que lleva la FM a un flujo constante a través de la columna y hacia el detector.
- El inyector, que introduce la muestra al sistema sin interrumpir el caudal de la FM.
- La columna cromatográfica donde ocurre la separación.
- El detector que convierte alguna propiedad física o química de los analitos en una señal medible.
- El equipo de cómputo que procesa las señales eléctricas en datos digitalizados que pueden ser analizados.

Los dispositivos están conectados a través de tuberías que llevan la FM desde los reservorios a la bomba, conectan la bomba con el inyector, luego hacia la columna y finalmente hacia los detectores y contenedores de desecho. En la figura 2.1 se muestra el esquema de un sistema HPLC típico.

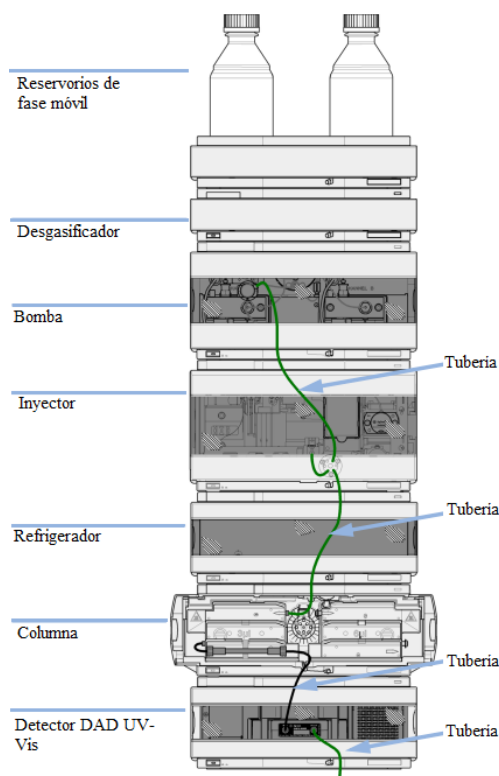


Figura 2.1 Esquema del equipo cromatográfico HPLC (Agilent Technologies, 2011).

La cromatografía de líquidos en fase reversa (RP-HPLC) es la técnica más usada para la separación, cuantificación e identificación de flavonoides (de Rijke *et al.*, 2006). No existe un único método cromatográfico que permita separar diferentes tipos de flavonoides, es necesario elegir la FE, la temperatura, el flujo y composición de la FM. De acuerdo con la literatura, la separación de compuestos fenólicos se lleva a cabo con columnas C18 utilizando sistemas de gradiente en sistemas binarios con agua como solvente con mayor polaridad y acetonitrilo o metanol como solvente orgánico. Asimismo, se reporta la incorporación de ácido fórmico, acético o fosfórico a concentraciones de 0.005-0.5% con el fin de estabilizar la carga de las moléculas y facilitar su ionización en los detectores de masas (López-Fernández *et al.*, 2020).

2.2 Detector DAD UV-vis.

El detector es un dispositivo que permite medir alguna propiedad física o química de alguna sustancia específica y generar una señal que es registrada a través de un software. La espectroscopía se encarga del estudio de la interacción de la radiación con la materia, de esta manera, a través de los métodos espectroscópicos, es posible medir la cantidad de radiación absorbida y emitida por una sustancia de interés. La espectroscopía en longitudes de onda (λ) de 160 hasta 780 nm, se conoce como espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis). En este rango de frecuencia (λ por unidad de tiempo), la radiación UV-vis provoca un estímulo en la distribución electrónica del analito desde el estado basal de baja energía a un estado excitado

de mayor energía. La energía radiante emitida proporciona información sobre la identidad y concentración del analito (Mettler Toledo, 2021; Skoog *et al.*, 2015). Las moléculas que absorben en el intervalo UV-vis son fácilmente identificables a λ específicas, sin embargo, en muestras donde se tienen varios compuestos, es difícil identificar todos los compuestos a una sola λ . El detector de arreglo de diodos (DAD) permite obtener el espectro UV-vis de un analito en tiempo real, una ventaja para el estudio de muestras multicomponentes.

En la Figura 2.2 se muestra el esquema de un detector de arreglo de fotodiodos (DAD-UV-vis) utilizado en este proyecto, y cuyo funcionamiento se detalla a continuación:

El detector DAD emplea un sistema óptico que emite luz no monocromada, ‘luz blanca’ en un intervalo de longitud de onda de 190 hasta 800 nm a partir de una lámpara de deuterio (Figura 2.2-1). La luz es dirigida por medio de un espejo (2) hacia la entrada de la celda de flujo (3); la luz emitida es recibida por otro espejo (4) que la enfoca hacia una red de difracción (5 y 6) donde es dispersada hacia el dispositivo fotosensible (7), que está compuesto por un conjunto de fotocélulas o fotodiodos. Este sistema permite detectar la luz transmitida a una única λ y obtener todo el espectro de absorción de lo que pasa por la celda de flujo en tiempo real (Agilent Technologies, 2012; Quattrocchi, 1992).

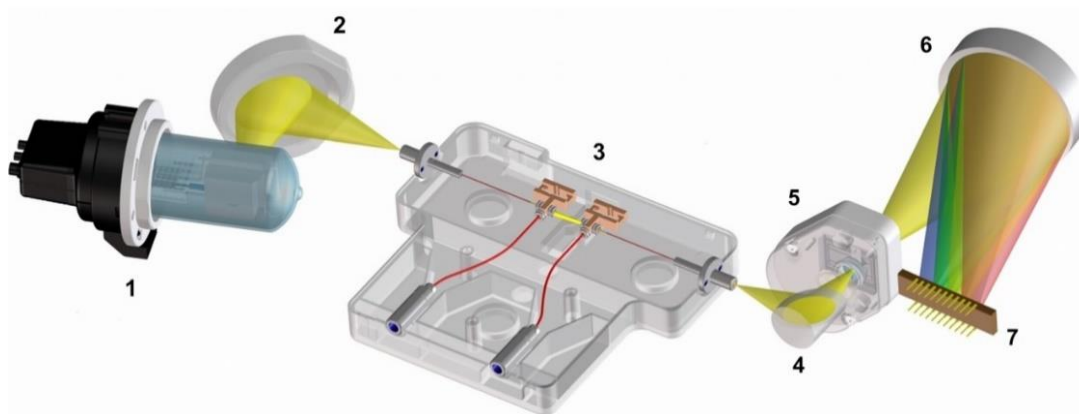


Figura 2.2 Esquema del detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, 2012).

Todas las agliconas de flavonoides contienen al menos un anillo aromático que absorbe luz UV. Los flavonoides poseen una primera banda de absorbancia en un rango de 240-285 nm debido al anillo A y una segunda banda de absorbancia dada por la sustitución y conjugación del anillo B en un rango de 300-385 nm (de Rijke *et al.*, 2006; Jurasekova *et al.*, 2006). Las distintas subclases de flavonoides son distinguibles entre sí por su espectro de absorción, aunque de manera general, los flavonoles dan señal a las longitudes de onda de 250, 265, 290, 350 y 385 nm. Los sustituyentes metilo y metoxilo en la estructura base no producen cambios

significativos en los máximos de absorción; sin embargo, la insaturación en la posición 2-3, la posición de los grupos hidroxilo en las agliconas, y la presencia de glicósidos provocan desplazamientos bato e hipsocrómicos, es decir, la absorción se desplaza hacia longitudes de onda mayores o menores, respectivamente (Gaete-Pérez, 2018; López-Fernández *et al.*, 2020). En la Figura 2.3 se muestran ejemplos de los espectros de absorción UV-vis característicos de agliconas de flavonas (luteolina y apigenina) y flavonoles (KFL y quercetina), obtenidos en etanol/agua (Jurasekova *et al.*, 2006), donde se observan las dos bandas características de absorción de las agliconas y los desplazamientos debido a los patrones de sustitución.

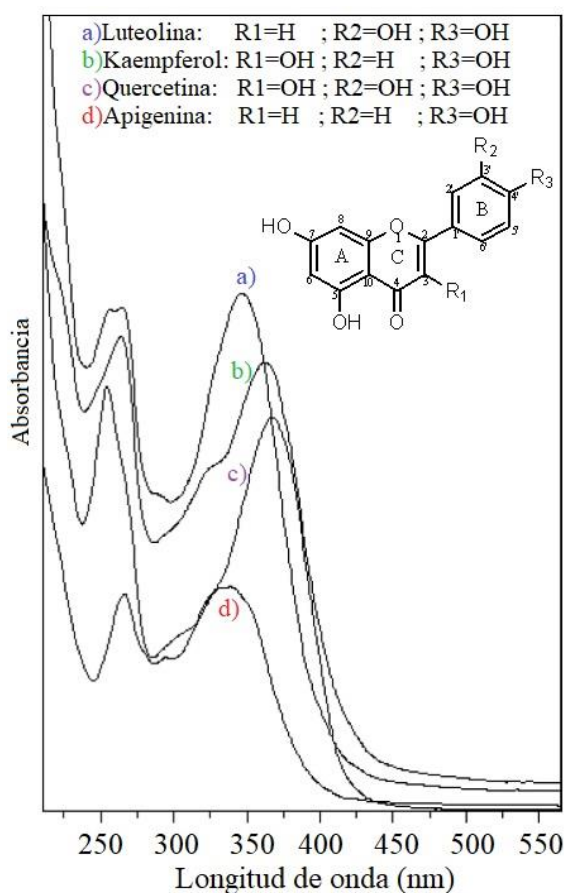


Figura 2.3 Espectros UV-vis de flavonas y flavonoles (Modificado de: Jurasekova *et al.*, 2006).

En este trabajo se utilizó un detector DAD de la marca Agilent Technologies® (Figura 2.4), en serie con el cromatógrafo para obtener el espectro de absorción UV-vis de los componentes de la muestra. Algunas de las ventajas de estos detectores son: bajo costo, robustez y que permiten identificar y cuantificar a través de los tiempos de retención y el uso de estándares (de Rijke *et al.*, 2006; López-Fernández *et al.*, 2020).

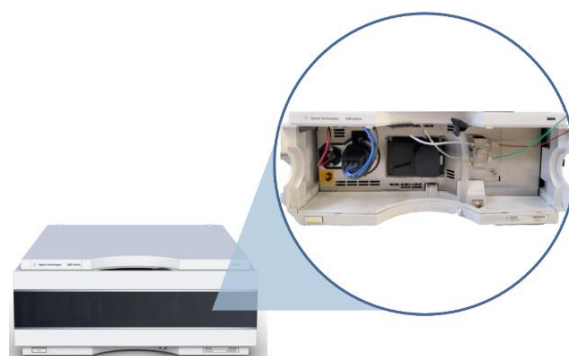


Figura 2.4 Detector 1260 Infinity DAD[®] (Agilent Technologies, 2012).

2.3 Espectrometría de masas.

Los espectrómetros de masas son detectores ‘universales’ que exhiben una alta sensibilidad y permiten obtener información de la masa molecular de los analitos. De manera general, un espectrómetro de masas mide los fragmentos o iones específicos producidos a partir de las moléculas. Su fundamento yace en la aplicación de un voltaje a las moléculas de una muestra para la formación de iones que son separados eléctrica y/o magnéticamente de acuerdo con su relación de masa-carga (m/z) y cuya abundancia (número de iones con esa m/z) es registrada por un procesador de datos. La m/z resulta del cociente de la masa atómica o molecular de un ion (m) dividida por la carga del ion (z), que usualmente es 1 (Cuyckens y Claeys, 2004; Skoog *et al.*, 2015b). Cabe destacar que las técnicas de espectrometría de masas dependen de la formación de iones (positivos o negativos) para ser detectados.

Un espectrómetro de masas está conformado por una fuente de ionización, analizador, detector y procesador de datos. Los analitos son primeramente ionizados, posteriormente los iones son llevados hacia la entrada del analizador donde son separados en función de su m/z , y finalmente captados por el detector que registra la abundancia relativa de cada ion en el espectro de masas (Ahamad *et al.*, 2022).

Existen diversas técnicas de ionización, cuyo uso depende del tipo de moléculas a analizar. Debido a la baja volatilización de los flavonoides, la ionización por electrospray en modo negativo (ESI-) es el método más utilizado para ionizarlos y observar la masa de la molécula desprotonada $[M-H]^-$. En ESI la muestra en solución pasa a través de un capilar con un potencial eléctrico que genera microgotas cargadas, éstas a su vez son calentadas en un capilar, con el objetivo de evaporar el solvente y desolvatar los iones del analito. Las microgotas

‘explotan’ y de esta manera, los analitos ionizados quedan aislados y son enviados a través de alto vacío hacia el analizador (de Rijke *et al.*, 2006; Gómez-Mejía *et al.*, 2021).

El analizador de masas es capaz de resolver los iones de la muestra con base en su relación m/z . Un analizador de masas con cuadrupolo (Q) consiste en cuatro varillas conductoras puestas en paralelo con un espacio central donde los pares opuestos de varillas están conectados eléctricamente. Cuando un voltaje de radiofrecuencia es aplicado a las varillas, se genera un campo eléctrico oscilante a través del cual viajan los iones, pero sólo aquellos con un cierto valor de m/z poseen una trayectoria estable y son capaces de atravesar hasta el detector. Por otro lado, el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (time of flight-ToF) consiste en un tubo a alto vacío donde los analitos cargados son acelerados y viajan hacia el detector a una velocidad que depende directamente de su masa (Ahamad *et al.*, 2022; Silverstein *et al.*, 2005). Una vez que llegan al detector, la abundancia del ion es registrada en cuentas por millón vs el tiempo para construir el cromatograma.

Para obtener más información acerca de la estructura de los compuestos se utiliza el análisis de masas-masas (MS/MS), en donde se dispone de dos o más analizadores de masas en tándem, que permiten seleccionar un solo ion y examinar su fragmentación.

En un sistema tándem, el análisis de los compuestos se lleva a cabo en tres pasos consecutivos:

- 1) El primer analizador actúa como un filtro para los iones seleccionados.
- 2) En una celda de colisión ocurre la disociación de las moléculas cargadas provocada por una colisión inducida (CID).
- 3) Finalmente, los fragmentos iónicos son separados con relación de su m/z en el analizador final (Ahamad *et al.*, 2022; Silverstein *et al.*, 2005).

En la disociación inducida por colisión (CID) el analito ionizado, también conocido como ion precursor, es excitado cinéticamente e impactado por un gas amortiguador (que proporciona la energía de colisión), provocando la ruptura de alguno(s) de sus enlaces y fragmentando al ion precursor (Johnson y Carlson, 2015). Existen sistemas de fragmentación característicos para los flavonoides, que se abordarán a mayor profundidad en la metodología.

Los métodos de cromatografía de líquidos acoplados a sistemas de análisis de MS y en particular MS/MS, con ionización por electrospray, han permitido la caracterización de flavonoides con una alta especificidad, sensibilidad y resolución en diversas matrices como extractos de plantas, alimentos y muestras biológicas (March y Miao, 2004; Yang *et al.*, 2012).

El sistema de análisis utilizado para identificar las estructuras de los glicósidos de kaempferol fue HPLC-DAD-ESI-Q-ToF-MS-MS/MS. Los detectores de MS/MS usados, consisten en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo en serie con un tubo de tiempo de vuelo (QqQ-ToF). El QqQ-ToF consiste en tres cuadrupolos unidos en serie, donde el primer cuadrupolo selecciona un ion específico o precursor; el segundo funciona como una celda de colisión donde ocurre la CID, y el tercero separa los iones fragmento producidos. Finalmente, se separan los iones fragmentos dependiendo su masa en el tubo de tiempo de vuelo (López-Fernández *et al.*, 2020).

2.4 Validación de métodos analíticos.

Un método analítico se compone de una serie de operaciones diseñadas para analizar una muestra, y consta de: técnicas, procedimiento y protocolo. La técnica analítica es el medio utilizado para el estudio de un analito y se basa en un principio y/o propiedad física o química del analito. El procedimiento se refiere a la forma de realizar el análisis y consiste en un conjunto de instrucciones a seguir para aplicar un método analítico y que el resultado del análisis sea aceptable. Por último, el protocolo son las instrucciones escritas en que se detalla el procedimiento para que el análisis sea aceptable (Baeza, 2017; Ravichandran *et al.*, 2010; Paithankar, 2013).

El desarrollo de un método analítico implica la creación de un proceso para analizar y cuantificar compuestos de interés en una matriz determinada, considerando las propiedades químicas de los analitos, la matriz en que se encuentran, el tipo de análisis, (cualitativo o cuantitativo), los límites de detección y cuantificación, rango lineal, precisión y exactitud. El método comprende el muestreo, la preparación de la muestra, separación, detección y la evaluación de los resultados (Ashok Bhosale, 2020; Ravichandran *et al.*, 2010). Los métodos cromatográficos son ampliamente utilizados desde el descubrimiento de nuevas moléculas, hasta los procesos de formulación y control de calidad, y deben cumplir ciertas características para probar su eficacia como métodos de análisis (Paithankar, 2013).

La validación de métodos analíticos tiene el objetivo de comprobar que los resultados obtenidos son confiables (Quattrocchi, 1992). En los ensayos de validación se evalúan los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y robustez, aunque dependiendo de los alcances del método, se pueden evaluar solo algunos parámetros y establecer sus criterios de aceptación (Ravichandran *et al.*, 2010). Los parámetros cromatográficos, así como sus criterios de aceptación serán abordados a mayor profundidad en el capítulo 2.

En este trabajo se desarrolló y validó un método cromatográfico para la identificación de compuestos presentes en el extracto de una planta con propiedades medicinales de acuerdo con los criterios establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos (USP). Si bien, este extracto no forma parte de un producto farmacéutico o herbolario, el uso de plantas medicinales es una práctica común en México, y es de interés conocer los componentes a los que se les atribuyen las propiedades que históricamente se les han conferido.

Los fitomedicamentos, donde se utiliza material vegetal, tinturas o extractos de partes aéreas o subterráneas de la planta, deben analizarse con la misma rigurosidad que los fármacos para asegurar que dichos productos cumplen con los criterios de calidad, efectividad y seguridad del producto (Garza *et al.*, 2010; SSA, 2012; Whelan *et al.*, 2009). En este trabajo se desarrolló y validó un método cromatográfico para la cuantificación de kaempferitrina, nicotiflorina y kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosyl-7-O- α -L-ramnopiranosido en un extracto vegetal, de acuerdo con los criterios establecidos en la USP.

JUSTIFICACIÓN

El uso de técnicas analíticas de alta sensibilidad en la identificación de compuestos, como el sistema de análisis utilizado en este trabajo (HPLC-DAD-ESI-Q-ToF-MS-MS/MS), permite obtener una gran cantidad de información de los compuestos presentes en matrices multicomponentes como lo es un extracto vegetal. El extracto analizado en este trabajo ha demostrado ejercer actividad anticonvulsiva. Asimismo, se han identificado dos compuestos de naturaleza flavónica como la KFA y el KFL, por lo que resulta relevante identificar la mayor cantidad de metabolitos que puedan ser responsables del efecto biológico observado. Por otro lado, la validación del método de análisis permitirá estandarizar la obtención del extracto y como método de aseguramiento de la calidad en productos que contengan esta planta.

HIPÓTESIS

- El extracto acuoso de *Justicia spicigera* Schltdl. contiene diferentes glucósidos derivados del kaempferol que pueden separarse e identificarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de masas.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar por cromatografía de líquidos con detector Q-ToF-MS/MS los principales glucósidos de kaempferol presentes en el extracto de *Justicia spicigera*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar el método cromatográfico para separar los componentes del extracto de *J. spicigera*.
- Identificar y cuantificar la kaempferitrina en el extracto.
- Proponer las estructuras de los principales glucósidos de kaempferol presentes en la muestra, con base en las masas observadas.

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Obtención del extracto de *J. spicigera*.

El extracto de *Justicia spicigera* Schtdl. analizado fue proporcionado por el Centro de Investigación Biomédica de Oriente-IMSS. Éste fue obtenido a partir de muestras de *Justicia spicigera* recolectadas en el estado de Morelos en 2012, con el número de registro IMSS-15877, asignado por la M. C. Abigail Aguilar. La identidad del espécimen fue confirmada en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social, de acuerdo con lo reportado por González-Trujano y colaboradores (2017). El extracto acuoso se obtuvo a partir de 114 g secos en polvo de la parte aérea de *Justicia spicigera*, por medio de un sistema de extracción Soxhlet (Soxtherm automatic, Gerhardt, Germany), durante 3 horas a 60° C. El extracto acuoso fue filtrado y liofilizado. El producto estudiado consistió en un polvo color púrpura soluble en agua y metanol.

3.2 Detección preliminar de flavonoides.

La reacción de Shinoda es un método colorimétrico para la detección de flavonoides. La prueba consiste en una reducción del grupo carbonilo del anillo C, hasta su eliminación, de manera que el resultado es la antocianidina correspondiente. Dado que las antocianidinas son pigmentos de color rojo, el viraje a este color es indicativo de la presencia de flavonoides en la muestra. El viraje observado en la prueba indica el tipo de flavonoide: flavonas y flavonoles producen una coloración amarilla a roja; flavanones rojo a magenta; flavanonas rojo, magenta, violeta y/o azul; isoflavonas amarillo; isoflavononas, chalconas y auronas no producen coloración (Ugaz, 1994; Verde-Star *et al.*, 2016).

Se utiliza un agente reductor como el magnesio o zinc y un medio ácido (HCl y/o H₂SO₄) que permita suministrar los protones para la reducción del carbonilo. En la Figura 3.1 se muestra la reacción ocurrida en la prueba de Shinoda, donde el grupo carbonilo es primeramente reducido a un alcohol y finalmente se elimina resultando en la antocianidina correspondiente. Una de las ventajas de este método rápido es que se puede realizar en campo con muestra en seco, fresca o en un extracto etanólico.

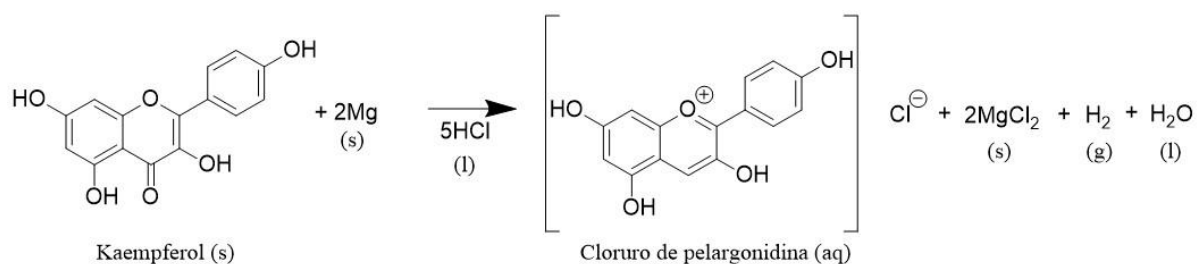


Figura 3.1 Reacción de Shinoda en la que el grupo carbonilo en C4 del kaempferol es reducido hasta su eliminación, resultando en cloruro de pelargonidina.

Para determinar los tipos de flavonoides, se utilizó material vegetal fresco y seco de un espécimen de *Justicia spicigera* que se consiguió en un mercado local (especimen distinto al utilizado para la obtención del extracto). Se hicieron tres procedimientos para observar el viraje de color:

I. Prueba directa con HCl

1. Se trituró el material en mortero de ágata.
2. Se agregó limadura de Mg y se añadieron gotas de HCl.

II. Extracto etanólico por maceración

1. Se maceró el material vegetal con 10 ml de etanol.
2. Al extracto se le añadió limadura de Mg y gotas de H₂SO₄.

III. Prueba directa con H₂SO₄

1. Se trituró el material, se añadió limadura de Mg.
2. Se añadió H₂SO₄ por goteo.

3.3 Análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo HPLC Agilent Technologies 1260 con inyector automático y con dos detectores: el detector UV-vis de arreglo de diodos (DAD) y el detector de masas QqQ-ToF que consta de un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI) y un triple cuadrupolo (QqQ) en serie con un tubo de tiempo de vuelo (ToF). Se probaron 3 columnas de fase reversa:

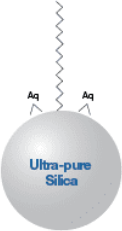
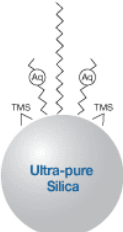
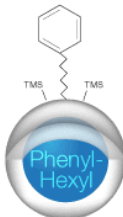
- La columna 1 (EC-250 Nucleosil 100-7 C18) está constituida por una fase estacionaria con partículas esféricas de sílica gel modificada con hidrocarburos alifáticos de 18 carbonos (octadecilsilano-ODS), lo que le confiere su naturaleza no polar.
- La columna 2 (Synergi fusion-RP polar embedded C18), con partículas de sílica gel esféricas con ligandos C18 que le confieren una selectividad hidrófoba; además de un grupo Trimetilsilano (TMS) con baja hidrofobicidad, lo cual le proporciona capacidad

de retención de compuestos con mayor polaridad. Estas características le permiten a la FE separar compuestos polares e hidrofóbicos (Synergi, 2015).

- La columna 3 (Kinetex Phenyl-hexyl), posee partículas tipo Core-Shell, con modificaciones en las partículas de sílica que incluyen grupos fenil-hexilo, y trimetilsilano (TMS), los cuales le confieren selectividad hidrofóbica aromática, y baja hidrofobicidad, respectivamente (Agilent, 2020).

En la Tabla 3.1. se muestran las características de cada una de las columnas utilizadas.

Tabla 3.1 Columnas utilizadas para el análisis cromatográfico del extracto de *J. spicigera*.

No.	Columna	Longitud (mm)	Diámetro (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Fase estacionaria
1	EC-250 Nucleosil 100-7 C18	250	4	7	
2	Synergi fusion - RP polar embedded C18	150	4.6	4	
3	Kinetex Phenyl-hexyl 100 A 150x46 Core Shell, Phenomenex	150	4.6	5	

Se utilizó un método de gradiente, con un flujo de 1 ml/min. Se probaron distintas combinaciones de fases móviles: Para las columnas 1 y 2 se utilizó en A: agua (H₂O) al 0.1% de ácido fórmico (AF) y B: metanol (MetOH) con 0.1% de AF, ó acetonitrilo (ACN) con 0.1% de AF. Para la columna 3 se utilizó en A: H₂O a 5mM de formiato de amonio (FDA) y B:

MetOH al 5 mM de FDA. En la Tabla 3.2 se muestra el método de gradiente que dio la mejor resolución de los componentes de la muestra.

Tabla 3.2 Composición de la fase móvil en el método de gradiente.

Tiempo (min)	Composición A	Composición B
0	90%	10%
20	30%	70%
20.1	10%	90%
25	10%	90%
25.1	90%	10%
30	90%	10%

3.4 Determinación de la aptitud del método cromatográfico.

El cromatograma representa de manera gráfica el proceso cromatográfico, donde, el eje de las abscisas (x) representa el tiempo durante el análisis contra la señal del detector en el eje de las ordenadas (y). A partir del cromatograma se puede obtener información acerca del proceso de separación de los analitos y la eficiencia del método. Los parámetros cromatográficos describen el proceso de separación y son tomados como criterios de aceptación de la aptitud del sistema para la separación de los analitos de interés (López-Murillo, 2013; Skoog *et al.*, 2015). Estos parámetros son:

- **Tiempo muerto (t_0):** Representa el tiempo a partir de la inyección hasta que se detecta una señal, que generalmente corresponde al solvente de la muestra o un soluto no retenido y es el primer pico en el cromatograma.
- **Tiempo de Retención (t_R):** Se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el tiempo en que el analito alcanza el detector. Bajo las mismas condiciones cromatográficas, es característico de un compuesto.
- **Tiempo de Retención Ajustado (t'_R):** Representa la diferencia entre el tiempo muerto (t_0) y el tiempo de retención (t_R), por tanto, es el tiempo neto en que se detecta el analito en el máximo del pico cromatográfico.

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (\text{Ec. 3.1})$$

- **Coeficiente de Capacidad: (k'):** También conocido como factor de capacidad o factor de retención, es un parámetro adimensional cuyo valor representa las velocidades de migración de los analitos, es decir, la retención del analito. Si $k' < 1$, el analito eluye a un tiempo muy cercano al tiempo muerto, indicando una baja

interacción con la columna; por otro lado, si $k' > 20$, indica que la interacción con la fase estacionaria es muy elevada y el analito eluye a tiempos muy prolongados. El valor de k' , debe estar entre un rango de 2-6 para sistemas en los que hay 2-3 picos; de 2-10 para muestras con mayor número de picos, y de 0.5-20 para muestras muy complejas (Quattrocchi, 1992).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

- **Eficiencia de la columna (N):** Se define como la relación entre el grado de retención en comparación con el grado de ensanchamiento del pico, es decir que, entre mayor sea el valor, más esbelto es un pico, y se mide por número de platos teóricos (N).

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W_b} \right]^2 \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Donde: W_b = ancho del pico en la base

- **Resolución:** Parámetro que representa el grado de separación entre dos picos adyacentes, en relación con su anchura, es decir, representa la capacidad de la columna de separar 2 analitos que eluyen contiguos. R debe poseer un valor de 1.5 para considerar que los picos contiguos logran separarse completamente.

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b2} + W_{b1}} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

Donde: W_{b1} y W_{b2} = Ancho del pico 1 y 2 en la base.

- **Factor de Simetría (T):** Refiere a un factor que permite medir la simetría de un pico, con respecto a su punto máximo, por tanto, puede tomarse de diversas formas. En este trabajo, se retoma la definición de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos, que lo define como el cociente del ancho del pico a una altura del 5% del pico ($w_{0.05}$) desde la línea base, dividido por el doble de la distancia horizontal del frente del pico, a una altura del 5% del mismo, hasta el punto máximo del pico. Si $T=1$, el pico es totalmente simétrico, por otro lado, si $T>1$, entonces el pico tiene coleo, y si $T<1$, el pico presenta mayor proporción hacia el frente, es decir, frondeo.

$$T = \frac{w_{0.05}}{2f} \quad (\text{Ec. 3.5})$$

Donde f es la distancia horizontal del máximo del pico hacia el frente.

3.5 Validación del método cromatográfico.

Los métodos de análisis deben ser validados con el fin de determinar que los resultados producidos son confiables para el objetivo para el que son utilizados (Quattrocchi, 1992). La

validación se realiza a través de los parámetros mostrados a continuación, y se determinaron únicamente para el método con que se logró la mejor separación de compuestos.

- **Selectividad (α):** También llamado factor de separación, es un parámetro adimensional que expresa la diferencia en la distribución entre dos analitos que eluyen uno tras otro, es decir, dos picos contiguos (A y B). La selectividad depende de la naturaleza química de los componentes de la fase móvil y la fase estacionaria, por tanto, si $\alpha > 1$, indica que la separación entre ambos picos es alcanzable.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_B - t_0}{t_A - t_0} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

- **Linealidad:** es un parámetro del análisis cuantitativo que determina la respuesta proporcional del detector y la concentración del analito dentro de un intervalo de concentraciones lineal, es decir, un intervalo entre la concentración máxima y mínima para las cuales el método ha sido probado (Montoya y Castaño, 2005). La curva de calibración (área vs concentración) se realizó inyectando por duplicado los estándares de kaempferitrina (KFA) a las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 ppm. Se obtuvo la ecuación de dicha recta, el coeficiente de correlación lineal (r) y la prueba t de Student que permite determinar si existe o no una relación entre las variables a partir del rechazo de la hipótesis nula (H_0), que sería la no correlación entre el área de los picos y la concentración. t_r se determinó con un valor de $n - 2$ grados de libertad (porque son dos las variables cuya correlación se quiere mostrar o rechazar). El valor de t_r es comparado con el valor de t tabulado para los grados de confianza requeridos; si el valor de t_r es mayor que el tabulado, entonces se rechaza la hipótesis nula y se determina que hay una correlación lineal significativa (Moreno-Ayala, 2021; Quattrocchi, 1992).

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Donde:

r = coeficiente de correlación lineal

n = número de muestras (7)

t_r = test estadístico para coeficientes de correlación

- **Precisión:** Expresa el grado de dispersión de las medidas en relación con su valor promedio o central, es decir, el grado de repetibilidad entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidas veces en una muestra. La precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia (precisión con diferentes analistas, equipos y días) y reproducibilidad (precisión entre laboratorios).

Matemáticamente se define como la desviación estándar relativa (RSD), calculada a partir de la desviación estándar (s). El valor de la RSD debe ser $\leq 2\%$ (del valor verdadero) de al menos 5 inyecciones de un estándar para ser aceptada (Quattrocchi, 1992).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Donde:

X_i = cada una de las concentraciones

$\bar{X}$ = promedio de las concentraciones

n = número de mediciones

La RSD o coeficiente de variación se obtiene a partir de la ecuación 3.9

$$RSD = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

RSD = desviación estándar relativa (%)

Para determinar la RSD, se inyectaron 6 réplicas del estándar de KFA a una concentración de 20 ppm, se obtuvo el área de los picos y la concentración de cada muestra con la curva de calibración de KFA.

- **Exactitud:** Corresponde a la relación entre el valor verdadero o aceptado como referencia, con el valor promedio obtenido de manera experimental. Se obtiene a partir de una prueba *t de Student* de las distintas determinaciones de la concentración del estándar, el valor de t_{ob} (t experimental), es comparado con el valor de t tabulado para $n-1$ grados de libertad para el nivel de confianza requerido (normalmente 95%). Si $t_{ob} < t_{tab}$, entonces el método tiene la exactitud requerida para ese nivel de confianza, si $t_{ob} > t_{tab}$, entonces existe un error sistemático para ese intervalo de confianza. El valor de t_{ob} , se puede obtener a partir de la siguiente ecuación:

$$t_{ob} = \frac{[\hat{X} - \bar{X}]}{s \cdot \sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

Donde:

$\hat{X}$ = valor verdadero de la concentración

$\bar{X}$ = valor promedio de la concentración

n = número de mediciones

A partir de los datos de las inyecciones de 6 réplicas del estándar de KFA a 20 ppm, y el valor de la desviación estándar obtenido, se determinó el valor de t_{ob} y se comparó con t_{tab} .

- **Sensibilidad:** Este parámetro se relaciona con la cantidad mínima de analito capaz de producir una señal significativa, determinada en los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) (Montoya, 2005; Quattrocchi, 1992).

- **Límite de detección:** cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra. Es posible determinarlo a partir de 2-3 veces la intensidad del ruido

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \quad (\text{Ec. 3.11})$$

Donde:

Y_{bl} = Estimación de la respuesta a concentración 0

s_{bl} = Desviación estándar de la señal a concentración cero.

b = ordenada al origen de la recta de la curva de calibración.

- **Límite de Cuantificación:** refiere a la cantidad mínima de analito que puede cuantificarse con una exactitud y precisión apropiadas. Se evalúa a partir de la señal del ruido, en la que la intensidad de la señal dada por el analito es aproximadamente 10 veces la señal del ruido.

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \quad (\text{Ec. 3.12})$$

Donde:

Y_{bl} = Estimación de la respuesta a concentración 0

s_{bl} = Desviación estándar de la señal a concentración cero.

b = ordenada al origen de la recta de la curva de calibración.

Usualmente, los límites de detección y cuantificación se determinan para la detección de impurezas y trazas (Quattrocchi, 1992), en el caso de extractos vegetales, los compuestos de interés están en una concentración considerable, sin embargo, estos valores se estimaron para determinar la capacidad que tiene el método cromatográfico para el análisis cualitativo y cuantitativo cuando la concentración tiende a cero.

Se prepararon estándares de KFA a 0.1 ppm para determinar el límite de cuantificación (estimadas a partir de 10 veces la señal del ruido), y a 0.025 ppm para el límite de detección (estimadas a partir de 3 veces la señal del ruido). Se inyectaron 100 μ L del estándar de cada concentración, y los valores obtenidos del área de los picos se sustituyeron en la ecuación de la recta de la curva de calibración de KFA.

- **Robustez:** Corresponde al grado de confiabilidad del ensayo cuando éste es sometido a cambios en variables comunes. En este caso, no se determinó la robustez del método.

3.6 Parámetros de Detección DAD.

El detector DAD permite medir la señal a lo largo de todo el espectro de absorción en tiempo real, de modo que se logra obtener todo el espectro de absorción de un pico (Quattrocchi, 1992). Las longitudes de onda utilizadas en el detector DAD fueron de 220, 265, 300 y 350 nm, que son características de muchos compuestos orgánicos con anillos aromáticos y de los flavonoides (Benayad *et al.*, 2014).

El DAD permite realizar un análisis de pureza de pico para determinar la presencia de algún otro compuesto que no logra separarse a través del método de análisis, produciendo un pico superpuesto al del analito de interés. Para determinar la pureza de los picos de interés, se extrajo el espectro de absorbancia en 10 puntos de cada uno de los picos, con el fin de determinar si existían variaciones en el espectro de absorbancia. Si los espectros en diferentes puntos del pico presentan el mismo perfil de banda, se considera que el pico es “puro” y pertenece a un único compuesto. Por otro lado, si existen distintos perfiles de banda en diferentes posiciones del pico, podría indicar picos sobrelapados correspondientes a más compuestos.

El factor de similitud es un valor numérico que expresa el grado de similitud de los espectros de un pico basado en la coincidencia de los espectros sobre el pico. Este factor es calculado a partir de las absorbancias en un primer y segundo espectro a una misma longitud de onda (Stahl, 2003). Para obtener el factor de similitud, se graficaron las absorbancias de 10 distintos espectros sobre el pico a una misma longitud de onda en el eje de las abscisas, contra las absorbancias de esos mismos espectros a otra longitud de onda en el eje de las ordenadas. Estas λ fueron a 350 nm y 266 nm, mismas que coinciden con las bandas de máxima absorción de los flavonoides. Se realizó un ajuste por mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta descrita por las relaciones de las absorbancias, donde la pendiente representa el cociente de la concentración de los dos espectros. También se obtuvo el coeficiente de correlación lineal (R) a partir de la ecuación 3.14 para poder determinar el factor de similitud que se define como:

$$\text{Similitud} = 1000 \times R^2 \quad (\text{Ec. 3.13})$$

Donde R es definido como el coeficiente correlación lineal:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} [(x-\bar{x})(y-\bar{y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} (x-\bar{x})^2 \sum_{i=1}^{i=n} (y-\bar{y})^2}} \quad (\text{Ec. 3.14})$$

Donde:

x_i, y_i = Absorbancia a una longitud de onda en diferentes espectros sobre el pico.

$\bar{x}, \bar{y}$ = Promedio de absorbancias a esa longitud de onda.

n= número de datos (espectros)

Un factor de similitud cercano a 1000 (<995) indica una alta similitud entre los espectros, valores menores a 990 indican menor similitud entre los espectros y valores menores indican impureza del pico.

El espectro de masas en conjunto con la superposición de los espectros UV-vis permiten a su vez corroborar que el pico únicamente pertenece a un solo compuesto.

En serie con el detector DAD, se utilizó un detector de masas Q-TOF para llevar a cabo un análisis de masas (MS) y análisis masas-masas (MS/MS).

3.7 Análisis de masas y masas/masas.

El análisis MS y MS/MS del extracto de *Justicia spicigera* a una concentración de 50 mg/ml fue analizado en la columna 3 con el sistema HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS, con un volumen de inyección de 10 ppm, a partir del cual, se obtuvo el cromatograma de iones totales (TIC), que permite visualizar la intensidad de las masas de los iones de los compuestos ionizados de la muestra. Basado en las m/z de iones obtenidos del análisis MS, se seleccionaron algunas masas para realizar el análisis MS-MS, y obtener más información estructural sobre dichos iones. Los parámetros de detección del espectrómetro de masas se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Parámetros utilizados en el detector de masas.

Voltaje del capilar	3500 V
Polaridad	negativa
Voltaje del Fragmentor	175 V
Voltaje de Skimmer	65 V
Temperatura del gas de secado	350 °C
Flujo del gas de secado	11 L/min
Presión del nebulizador	60 psi

El análisis MS/MS, consiste en aplicar una energía de colisión a cierto tiempo de elución con el fin de fragmentar el analito objetivo que eluye a ese tiempo de retención. A los iones que se encontraron en el cromatograma TIC del análisis MS dentro de un rango de 50-500, se les aplicó una energía de colisión de 10V, mientras que para las masas de 501-1000, se aplicó un voltaje de 30V, con los parámetros de detección mostrados en la Tabla 2.3 (Jang *et al.*, 2018).

3.8 Estrategias utilizadas para la identificación de compuestos.

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de glicósidos de kaempferol (KFL) reportados en la literatura y en las bases de datos PubChem y Lotus, acotando la búsqueda a aquellos reportados en familias pertenecientes al orden Lamiales (Calderón-Montaña *et al.*, 2011; Hossen *et al.*, 2016). Se determinó la masa de los iones negativos (M-H)⁻ de las estructuras encontradas en las bases de datos y la literatura. En el TIC, se buscó la masa del ion negativo (M-H)⁻ de los diversos glucósidos de KFL reportados, obteniendo el cromatograma de cada ion extraído (EIC) si esa m/z se encontraba presente en la muestra. Se determinó el delta de masa/carga ($\Delta m/z$) entre la masa teórica (calculada) y la masa experimental (observada en el TIC). Este valor sirve como criterio de compatibilidad entre la estructura propuesta y la masa observada experimentalmente, entre menor sea, la exactitud de la asignación entre la m/z teórica y la experimental es mayor (Johnson y Carlson, 2015).

$$\Delta m/z = \left(\frac{m/z_{teórica} - m/z_{experimental}}{m/z_{teórica}} \right) \times 10^6 \quad (\text{Ec. 3.15})$$

Donde:

$m/z_{teórica}$ = masa/carga calculada de las moléculas de referencia.

$m/z_{experimental}$ = pico detectado perteneciente a la m/z detectada.

$\Delta m/z$ = diferencia entre la masa/carga teórica y experimental en ppm.

En el análisis MS, para la asignación de la fórmula molecular, se consideró además que los iones moleculares tuvieran un espectro de absorción característico de los flavonoides.

Para la selección de los iones precursores para el análisis MS/MS, se consideraron aquellas m/z a las cuales se les asignó una fórmula molecular putativa en el análisis MS; que tuvieran una $m/z_{teórica}$ cercana a la $m/z_{experimental}$ y el espectro de absorción característico de las moléculas de interés (flavonoles).

Se siguieron distintas estrategias para proponer algunas estructuras basadas en los iones precursores identificados en el análisis MS/MS, tales como:

- Con ayuda del programa ChemDraw[®], se construyeron estructuras de los glicósidos de KFL de los iones precursores con pérdidas lógicas, es decir, pérdidas de grupos funcionales como H⁺, OH⁻, H₂O, O₂, -CH₃ y azúcares como ramnosa, glucosa, xilosa, etc.
- Se propusieron estructuras con las posibles rupturas de las estructuras de los iones precursores, tomando en cuenta el mecanismo de fragmentación de los flavonoides,

reportado por Benayad y colaboradores (2014), mostrado en la Figura 3.2 (A), en donde mencionan que el principal mecanismo de fragmentación de los flavonoides ocurre por la apertura del anillo C a través de la ruptura de los enlaces C-C, dando como producto los fragmentos A y B. Estos fragmentos indican que tienen el anillo A o B intacto, respectivamente; en superíndices se indica la localización de la ruptura. Asimismo, se muestra el mecanismo de fragmentación de los sustituyentes glicosídicos (B), en donde las etiquetas A₁, B₁ y C₁ designan fragmentos iónicos de un glicósido terminal, mientras que las etiquetas X₀, Y₀ y Z₀ representan iones que aún contienen la aglicona. Los superíndices indican la localización de las rupturas dentro de los anillos de carbohidratos (Domon y Costello, 1988).

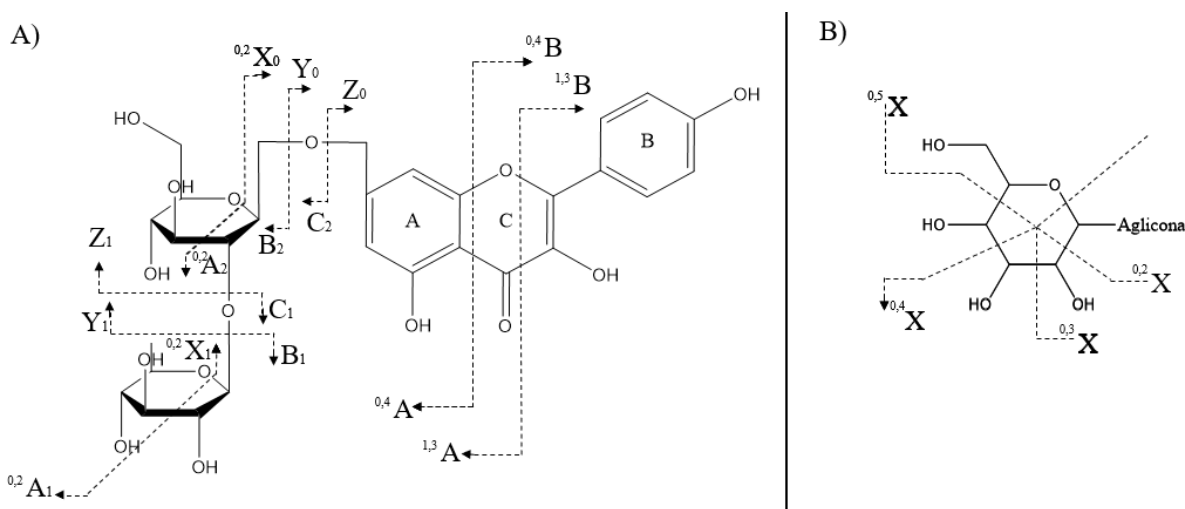


Figura 3.2 Mecanismo de fragmentación de los flavonoides A), y de los glicósidos B) (Benayad *et al.*, 2014).

- Posteriormente, se determinó la masa exacta en modo negativo (M-H)⁻ de todas las estructuras propuestas, y se extrajeron cromatogramas correspondientes a esas masas EIC a partir del cromatograma de iones totales (TIC).
- Finalmente, en el análisis MS-MS se observaron los fragmentos para corroborar las estructuras propuestas.

3.9 Cuantificación de kaempferitrina en el extracto de *J. spicigera*.

Se obtuvo una curva de calibración con el estándar de KFA (Sigma Aldrich[®], con una pureza ≥97%) preparando disoluciones en el intervalo de concentración de 5 a 50 ppm, que se inyectaron por duplicado, con un volumen de inyección 20 µL; también se inyectó por duplicado 20 µL de una dilución 1:20 de la muestra del extracto. La concentración de la muestra inyectada fue de 2500 ppm. Posteriormente se integraron los picos correspondientes

a la kaempferitrina identificados por su tiempo de retención y su espectro a 350 nm, con la herramienta de integración manual del software Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis Navigator B.08.00. Se graficó la concentración de los estándares contra el área de cada pico, se obtuvo la ecuación de dicha recta por el método de mínimos cuadrados y se determinó el coeficiente de correlación lineal R. El coeficiente R describe cuán exacta es la aproximación lineal en relación con los datos, y debe tener un valor cercano a 1 para determinar una correlación de los datos.

$$y = mx + b \quad (\text{Ec. 3.16})$$

Donde:

m = pendiente de la recta

x = concentración

b = ordenada al origen

y = área

La concentración de KFA se determinó a partir de la integración del pico correspondiente en la muestra y sustituyendo el área en la ecuación de la recta y despejando el valor de x.

$$x = \frac{y-b}{m} \quad (\text{Ec. 3.17})$$

3.10 Cuantificación de compuestos por estándar interno

Se logró cuantificar otros compuestos presentes en la muestra usando el método del estándar interno. El método del estándar interno permite cuantificar un analito de interés (AI) a partir de una concentración conocida de un compuesto usado como estándar interno (EI), mismo que debe poseer propiedades estructurales y fisicoquímicas similares a las del AI, por lo que eluye a un tiempo de retención cercano al AI. Además del EI, se utilizan disoluciones a concentraciones conocidas de un analito conocido presente en la muestra (AC), lo que permite relacionar la variación del área del pico del AC con el área del pico del EI (Skoog *et al.*, 2015). Para cuantificar a través de este método, se construyó una curva de calibración relativa, en la que se graficaron el área relativa de los picos (eje y) contra la concentración relativa (eje x) contra, obtenidas de la siguiente manera:

- **Concentración relativa (C_{rel}):** es el cociente de la concentración de las disoluciones del analito conocido presente en la muestra divididas por la concentración del EI.

$$C_{rel} = \frac{\text{Concentración}_{AC}}{\text{Concentración}_{EI}} \quad (\text{Ec. 3.18})$$

- **Área relativa (A_{rel}):** es el cociente de las áreas de los picos del AC dividido por el área del pico del EI.

$$A_{rel} = \frac{\text{Área del pico}_{AC}}{\text{Área del pico}_{EI}} \quad (\text{Ec. 3.19})$$

A partir la regresión lineal de la curva de calibración relativa, se determinaron los parámetros de la ecuación de la recta (Ec. 3.16), donde el valor de y es el área relativa y x la concentración relativa. Posterior a la integración del pico del AI, se determina su área relativa con la ecuación 3.19.

$$A_{rel\ AI} = \frac{\text{Área del pico}_{AI\ muestra}}{\text{Área del pico}_{EI}} \quad (\text{Ec. 3.20})$$

El $A_{rel\ AI}$ se sustituye en la ecuación de la recta de la curva de calibración relativa y se despeja x ($C_{rel\ AI}$). Finalmente, se obtiene la concentración del AI a partir de la siguiente ecuación:

$$C_{AI} = C_{rel} \times C_{EI} \quad (\text{Ec. 3.21})$$

Como EI se utilizó el compuesto Kaempferol-7-o-neohesperidoside a una concentración de 50 ppm (Sigma Aldrich® >95%) y como AC presente en la muestra, se utilizó la KFA en el intervalo de concentración de 5 a 50 ppm. Se inyectaron 3 réplicas del EI y de cada una de las concentraciones de los estándares de KFA, con un volumen de inyección de 20 μ L, y se promediaron las áreas de los picos para calcular las áreas relativas de los mismos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Detección preliminar de flavonoides.

La prueba de Shinoda resultó positiva a la presencia de flavonoides, aunque no en todos los ensayos fue posible observar el cambio de color esperado. En el tratamiento I, en la prueba con material seco no se logró visualizar un resultado característico de algún tipo de flavonoide; mientras que con el material fresco la prueba fue positiva para flavonas y flavonoles debido al viraje de la muestra a amarillo-rojizo. En el tratamiento II, con el material seco, se observó un viraje a amarillo en la parte inferior del tubo, indicando la presencia de flavonas, flavonoles e isoflavonas; en la prueba con el material fresco se observó un oscurecimiento del extracto etanólico, sin embargo, esto no es determinante para la detección de flavonoides. Finalmente, en el tratamiento III, el material seco se carbonizó al entrar en contacto con el H_2SO_4 , por lo que no se obtuvo un resultado determinante; por su parte, con el material fresco, se observó un viraje a color amarillo-rojizo en la parte inferior del tubo, indicando la presencia de flavonas y flavonoles. En la Tabla 4.1 se resumen los resultados de la reacción de Shinoda.

Tabla 4.1 Resultados de prueba de Shinoda.

Tratamiento	Material	Viraje	Resultado	
Prueba directa con HCl	Seco	Negro		No determinante.
	Fresco	Amarillo-rojo		Positivo a flavonas, flavonoles.
Prueba en extracto etanólico.	Seco	Amarillo		Positivo a flavonas, flavonoles e isoflavonas.
	Fresco	Hubo oscurecimiento del extracto.		No determinante.
Prueba directa con H ₂ SO ₄	Seco	Se carbonizó la muestra		No determinante.
	Fresco	Amarillo-rojo		Positivo a flavonas, flavonoles.

4.2 Aptitud del método cromatográfico.

De acuerdo con las características de los analitos de interés, y tomando en cuenta los aspectos de importancia para la elección de la fase estacionaria y fase móvil, se experimentó con tres columnas descritas en la sección de metodología (Tabla 2.1), y los disolventes H₂O con MetOH y H₂O con ACN como constituyentes de la FM para el desarrollo del método cromatográfico.

En la Figura 4.1 se muestran los cromatogramas de la muestra obtenidos con el detector DAD a 350 nm en las tres columnas con sus respectivas variaciones de fase móvil.

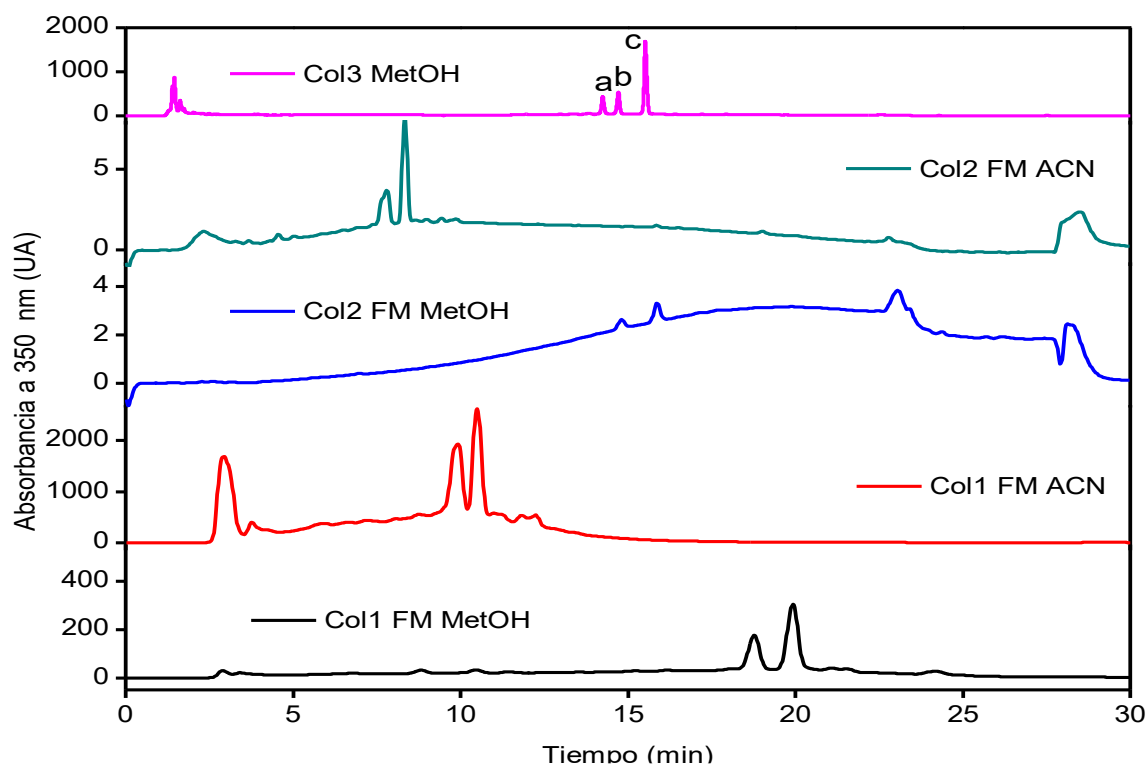


Figura 4.1 Cromatogramas del extracto con detección a 350 nm en cada una de las columnas con fase móvil metanol (MetOH) y acetonitrilo (ACN) como disolventes orgánicos y agua.

Dado que la señal obtenida es proporcional a la concentración del analito en la muestra, se probaron distintas concentraciones y volúmenes de inyección: los cromatogramas mostrados para la columna 1 tuvieron un volumen de inyección de 50 μL con una concentración de la muestra de 10 mg/ml cuando se utilizó la FM de MetOH, y una concentración de 100 mg/ml con la FM de ACN. En la columna 2 se utilizó un volumen de inyección de 100 μL , con una concentración de la muestra de 10 mg/ml con la FM de MetOH, y de 100 mg/ml con la FM de ACN. Finalmente, con la columna 3, se muestra el cromatograma obtenido con un volumen de inyección de 10 μL con una concentración de 50 mg/ml de la muestra.

Con la columna 1, los picos obtenidos con FM MetOH, son anchos a tiempos de retención relativamente largos, lo cual indica que los analitos interactúan mayormente con la FE. Dado que el ACN tiene mayor fuerza de elución, se redujeron los t_R , sin embargo, se obtienen picos menos anchos.

En la columna 2, con FM MetOH, se obtuvieron picos anchos, con menores tiempos de retención que en la columna 1 con MetOH. Por otro lado, con la FM ACN, igualmente, disminuyen los tiempos de retención de los picos observados, y son más esbeltos que con la FM MetOH, sin embargo, los picos son muy anchos.

En el cromatograma de la columna 3, se observó la separación de 3 picos esbeltos y resueltos con FM MetOH, por lo que, con esta columna, se resuelven mejor los compuestos aromáticos con grupos polares, tales como los flavonoides.

A partir de los cromatogramas con sus diversas variaciones de FM y FE, se calcularon los parámetros cromatográficos que se muestran en la Tabla 4.2 para determinar la aptitud de cada método.

Tabla 4. 2 Aptitud de los métodos cromatográficos. Los valores fueron calculados con base en los tiempos de retención de los picos a y b de la Figura 4.2.

Col.	Fase móvil (B)	Pico	Parámetros y criterios de aceptación				
			k' (0.5 - 20)	α (>1)	R (>1.5)	T (~1)	Platos/columna N (>2000)
1	MetOH	a	4.96	1.07	1.21	0.8716	
		b	5.32			0.9619	6893
1	ACN	a	2.87	1.05	0.79	0.8391	
		b	3.04			0.9543	4307
2	MetOH	a	6.11	1.08	2.29	1.2166	-
		b	6.62			1.3803	-
2	ACN	a	1.26	1.12	1.08	0.7967	
		b	1.41			1.1161	5409
3	MetOH	a	7.33	1.04	1.40	1.0202	
		b	7.60		2.46	0.9571	34700
		c	8.07	1.06		1.445	

Los guiones significan que ese parámetro no pudo ser calculado por aspectos del cromatograma obtenido. La eficiencia de la columna (N) se determinó para el pico b en cada uno de los análisis.

- **Factor de capacidad (K):**

En matrices multicomponentes como los extractos vegetales que contienen una gran cantidad de compuestos (por tanto, de picos), los valores de k' pueden encontrarse en un rango de 0.5 a 20. En las condiciones cromatográficas ensayadas con todas las columnas cromatográficas se logró un valor aceptable de k', que indica un buen grado de interacción de los analitos con la columna, sin embargo, se obtuvieron mayores valores de k para cada uno de los picos en la columna 3.

- **Selectividad (α):**

En cada una de las columnas se logró la separación, sin embargo, en la columna 3, se logró la separación de 3 picos contiguos dentro del criterio de aceptación, por tanto, se asume esta columna como aquella con mejor selectividad para los tres picos observables.

- **Resolución (R):**

De acuerdo con López-Murillo (2013), la resolución con un valor de $R > 1.5$, indica un grado aceptable de separación entre picos adyacentes. En la columna 1 con FM MetOH, se observaron 2 picos contiguos con una resolución de 1.21, que indica que no hay una separación hasta la línea base; con FM ACN, se obtiene una resolución menor, pues en el cromatograma se aprecia que los picos no se separan hasta la base. En la columna 2 FM MetOH, los picos se resuelven hasta la base, sin embargo, la línea base no es adecuada para un análisis; con FM ACN, se obtuvo una baja resolución. Con la columna 3, los valores de resolución entre los picos a-b y b-c indican una separación aceptable hasta la línea base, y mejor que en las columnas anteriores.

- **Factor de asimetría (T):**

Con relación a este parámetro, la mayoría de los picos en todas las columnas presentaron un grado de simetría cercano a 1. En la columna 1, los picos poseen valores de T menores a 1, indicando que existe una mayor proporción hacia el frente del pico. Con respecto a la columna 2, los picos poseen valores de T mayores a 1, que indica coleo en el pico, con ambas fases móviles, a excepción del pico 1 con la FM ACN, que presenta claramente frondeo del pico. Por último, en la columna 3, los picos 1 y 3 tuvieron un valor de T muy cercano a 1, indicativo de la simetría, y el pico 2 presenta ligero coleo.

- **Eficiencia de la columna (N):**

El valor de N depende del diámetro y empaquetamiento de la columna, así como de la forma de la partícula (Quattrocchi, 1992). Las columnas evaluadas poseen partículas esféricas (columnas 1 y 2) y tipo Core Shell® (Columna 3), que produce picos esbeltos y simétricos. Este parámetro se determinó únicamente para el segundo pico en cada columna. La columna 3 tiene un mayor número de platos teóricos (N), lo que implica la obtención de picos más esbeltos para cada uno de los analitos.

De acuerdo con los parámetros obtenidos, se determinó la columna 3 como la óptima para la separación del mayor número de analitos del extracto de *J. spicigera*.

Empleando el estándar de kaempferitrina, se identificó el compuesto en el extracto por el tiempo de retención. En la Figura 4.2 se muestra el cromatograma UV-vis obtenido a diferentes longitudes de onda, donde el pico c pertenece a la KFA. Los picos a y b fueron identificados a través del análisis MS y MS/MS como Kaempferol 3-O- β -rutinósido (nicotiflorina) y Kaempferol-3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido, respectivamente.

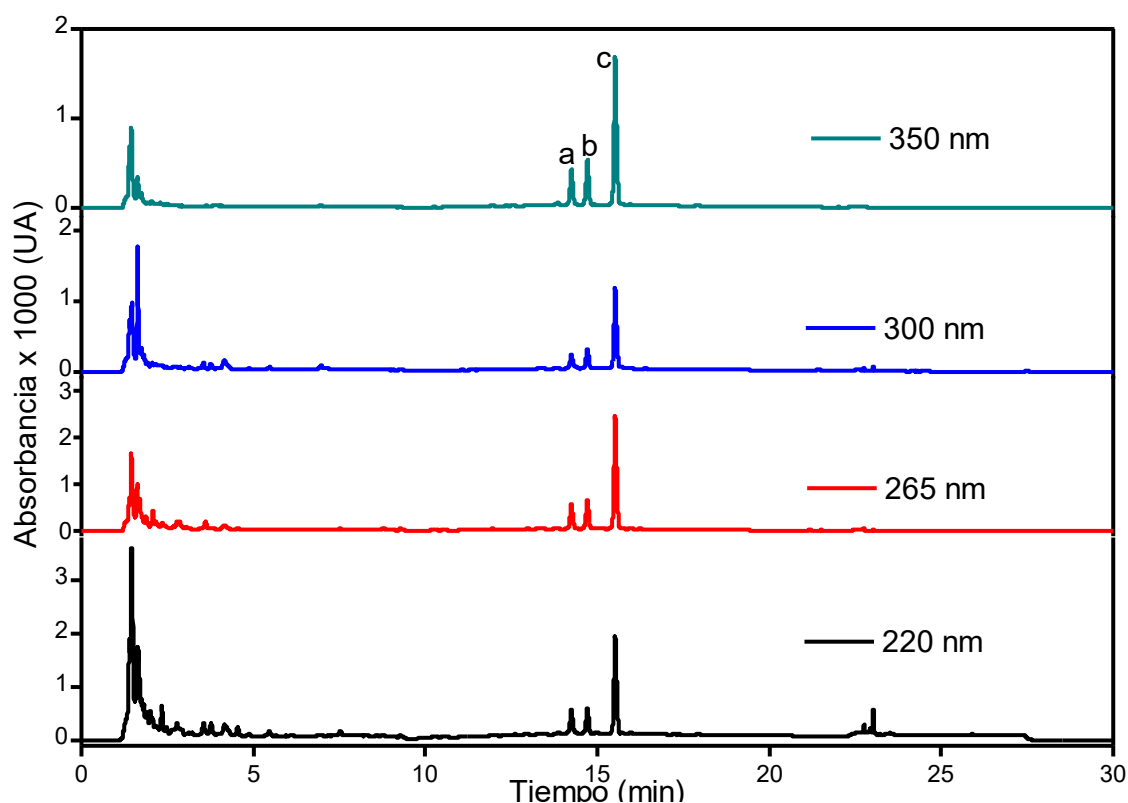


Figura 4.2 Cromatograma UV-vis del extracto a diferentes longitudes de onda. Pico c: KFA

4.3 Identificación de compuestos.

En la Figura 4.3 se muestra el Cromatograma de Iones Totales en modo negativo (-TIC) del extracto, donde se observaron 15 picos cromatográficos que corresponden a glicósidos de kaempferol que se presentan más adelante.

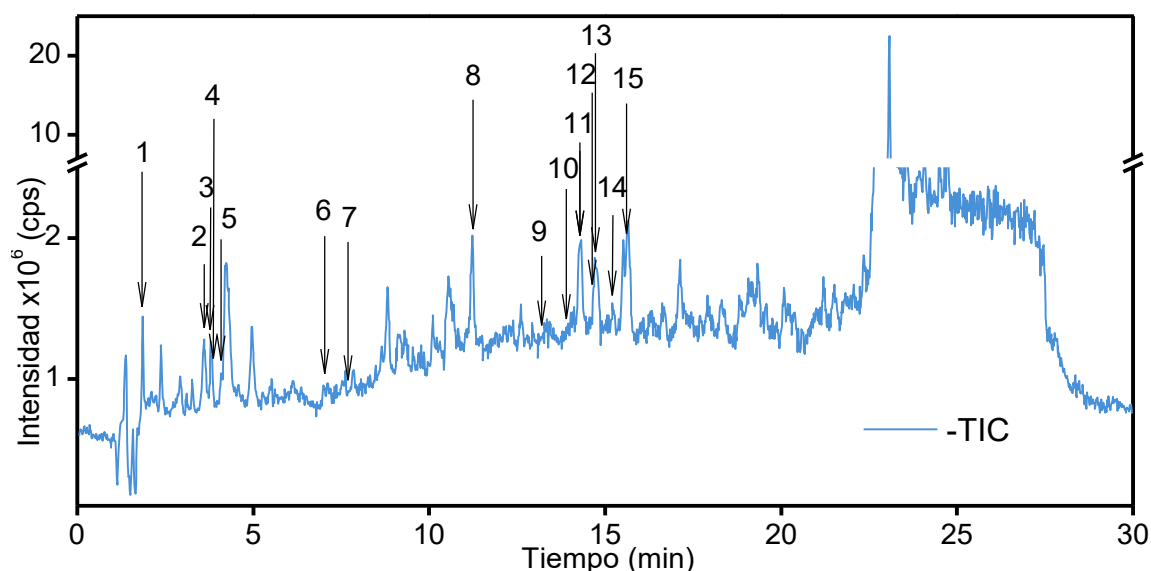


Figura 4.3 Cromatograma de iones totales del extracto en modo negativo (-TIC).

En la Figura 4.4 se muestran los cromatogramas de iones extraídos (-EIC) en modo negativo $[M-H]^-$ de los compuestos listados en la Tabla 4.3. Los picos numerados (1-15) pertenecen a compuestos cuyo EIC reveló abundancia, y que además poseen un espectro en la región UV característico de los compuestos de interés a una longitud de onda a 265 y 350 nm. Cabe aclarar que los picos 11, 13 y 15 corresponden a los picos a, b y c del cromatograma UV-vis de la Figura 4.2.

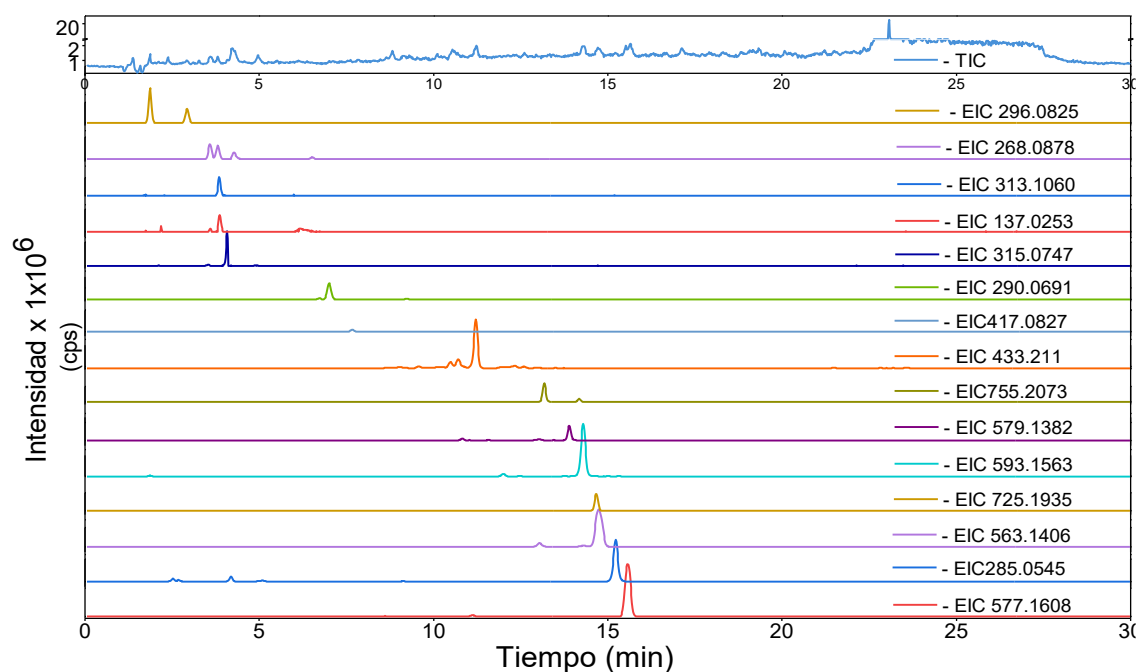
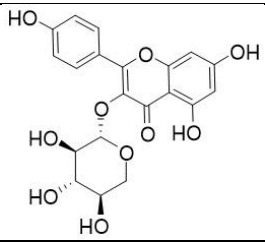
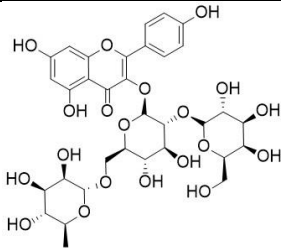
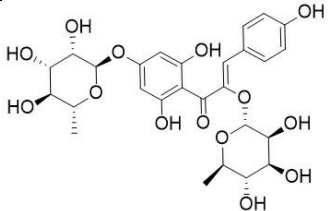
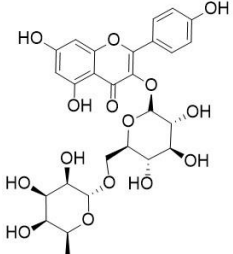
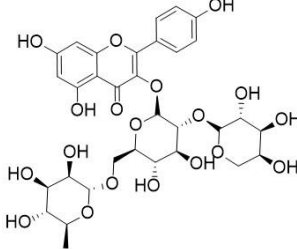
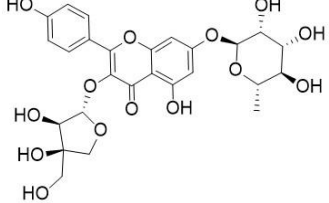
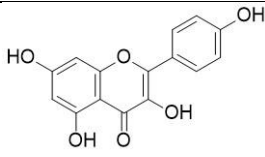
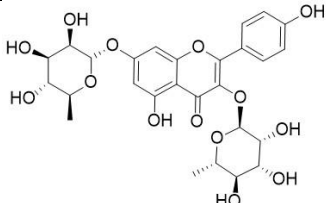


Figura 4.4 Cromatogramas -EIC del extracto acuoso de *Justicia spicigera*.

Para la determinación de una fórmula molecular por medio de análisis de MS, es necesario que el valor de m/z de una molécula, en conjunto con el espectro de absorción UV puedan compararse con una estructura o grupo de estructuras posibles con las que comparta cierta similitud. En este caso, los flavonoides obtenidos a partir de la búsqueda bibliográfica en conjunto con los obtenidos en las bases de datos permitieron comparar la masa teórica con la experimental, a través de $\Delta m/z$ que indica la diferencia en ppm entre ellas.

Tabla 4. 3 Identificación de compuestos del extracto de *J. spicigera* por HPLC-QTOF-MS

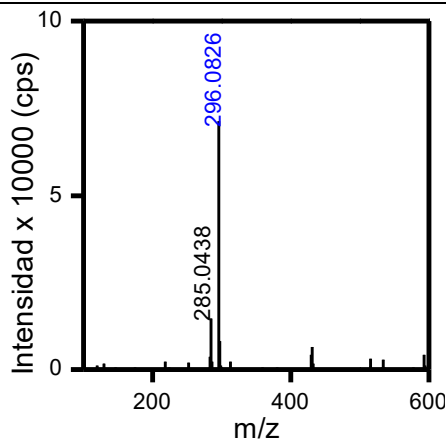
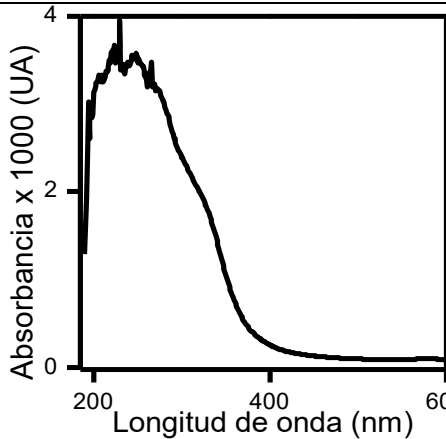
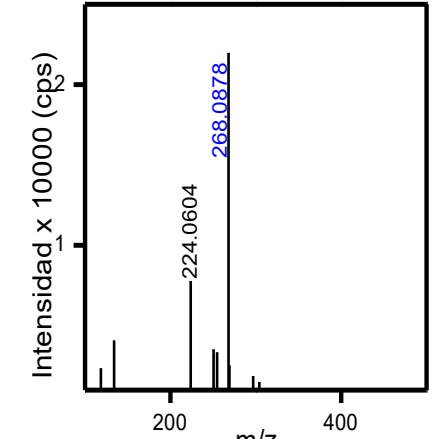
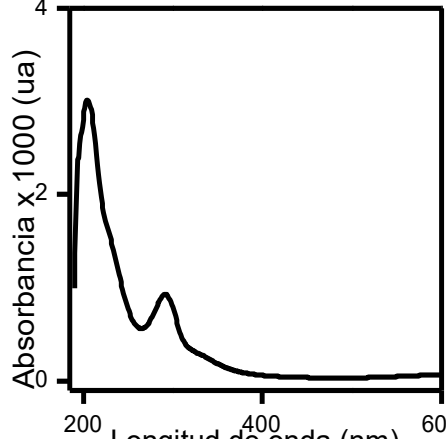
Compuesto	Estructura	Nombre
Pico 1 $t_R = 1.866$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 296.0826$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 296.0843$ $\Delta m/z = 5.67$ Fórmula: $C_{21}H_{13}O_2$	-	-
Pico 2 $t_R = 3.582$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 268.0878$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 268.0894$ $\Delta m/z = 5.83$ Fórmula: $C_{20}H_{13}O$	-	-
Pico 3 $t_R = 3.849$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 313.1060$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 313.1081$ $\Delta m/z = 6.86$ Fórmula: $C_{18}H_{18}O_5$	-	-
Pico 4 $t_R = 3.865$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 137.0253$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 137.0244$ $\Delta m/z = -6.44$ Fórmula: $C_7H_6O_3$	-	-
Pico 5 $t_R = 4.082$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 315.0747$ $[M-H]^-_{\text{calc}} =$ $\Delta m/z =$ Fórmula: -	-	-
Pico 6 $t_R = 7.014$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 290.0705$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 290.0737$ $\Delta m/z = 11.08$ Fórmula: $C_{22}H_{11}O$	-	-
Pico 7 $t_R = 7.681$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 417.0862$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 417.0827$ $\Delta m/z = -8.34$ Fórmula: $C_{20}H_{18}O_{10}$		Kaempferol 3-O- β -D-xilósido
Pico 8 $t_R = 11.229$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 433.2097$ $[M-H]^-_{\text{calc}} =$	-	

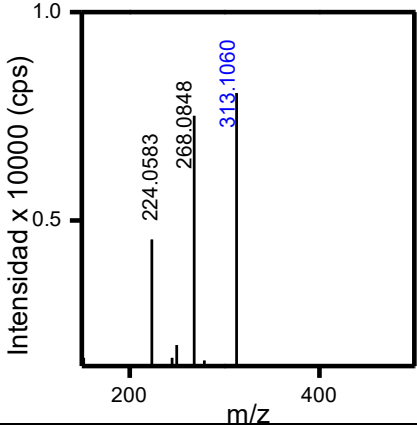
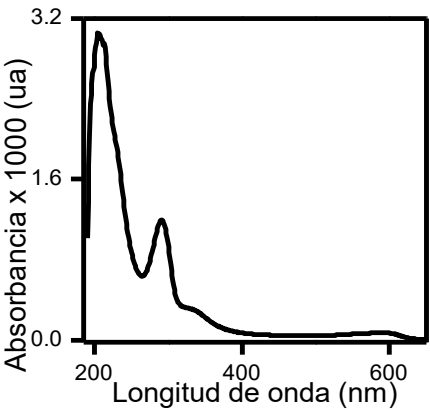
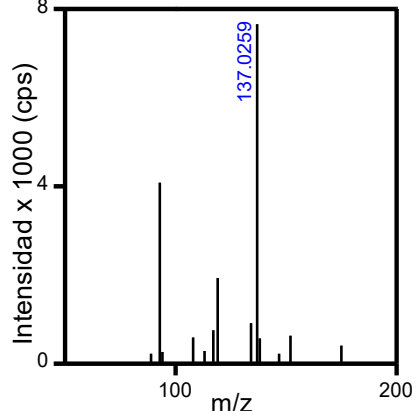
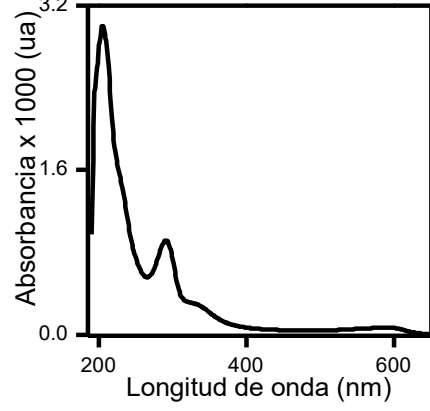
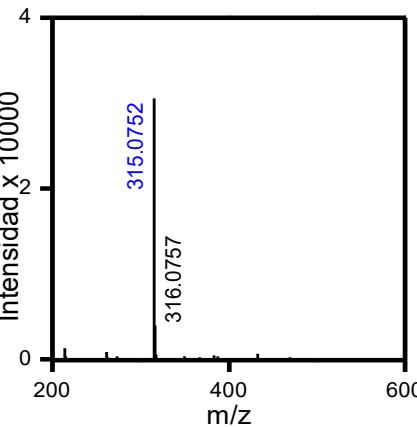
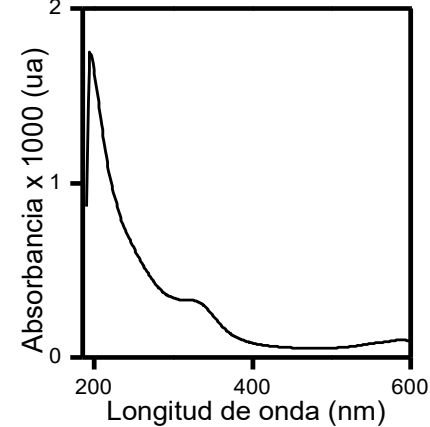
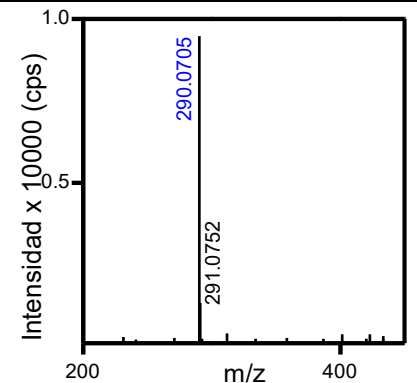
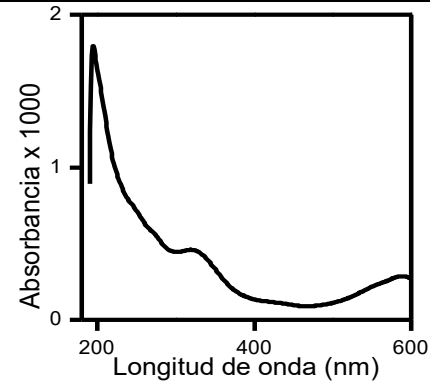
$\Delta m/z = -$ Fórmula: -		
Pico 9 $t_R = 13.179$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 755.2019$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 755.204$ $\Delta m/z = 2.8$ Fórmula: $C_{33}H_{40}O_{20}$		Cameliasida A Kaempferol 3-(6'''-ramnosil-2'''-glucosil-glucósido)
Pico 10 $t_R = 13.895$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 579.1382$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 579.1719$ $\Delta m/z = 58.24$ Fórmula: $C_{27}H_{32}O_{14}$		Kaempferitrina con apertura de anillo C en 1-2
Pico 11 $t_R = 14.295$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 593.1563$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 593.1512$ $\Delta m/z = -8.59$ Fórmula: $C_{27}H_{30}O_{15}$		Kaempferol 3-O- β -rutinósido (nicotiflorina)
Pico 12 $t_R = 14.645$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 725.1884$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 725.1935$ $\Delta m/z = 6.97$ Fórmula: $C_{32}H_{38}O_{19}$		Cameliasida B
Pico 13 $t_R = 14.728$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 563.1453$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 563.1406$ $\Delta m/z = -8.29$ Fórmula: $C_{26}H_{28}O_{14}$		Kaempferol-3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido
Pico 14 $t_R = 15.228$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 285.0545$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 285.0405$ $\Delta m/z = -49.11$ Fórmula: $C_{15}H_{10}O_6$		3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona (Kaempferol)
Pico 15 $t_R = 15.578$ $[M-H]^-_{\text{exper}} = 577.1608$ $[M-H]^-_{\text{calc}} = 577.1563$ $\Delta m/z = -7.79$ Fórmula: $C_{27}H_{30}O_{14}$		4',5-Dihidroxi-3,7-bis(α -L-ramnopiranosiloxi) flavona (Kaempferitrina)

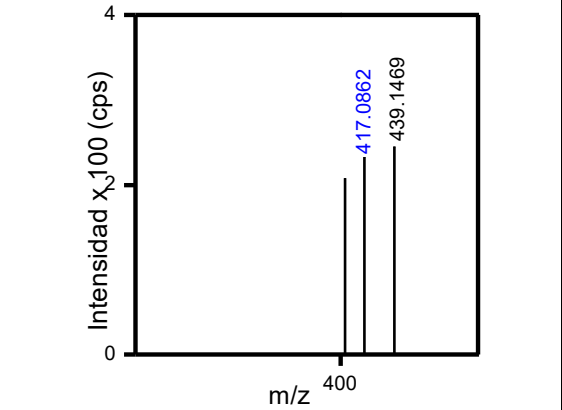
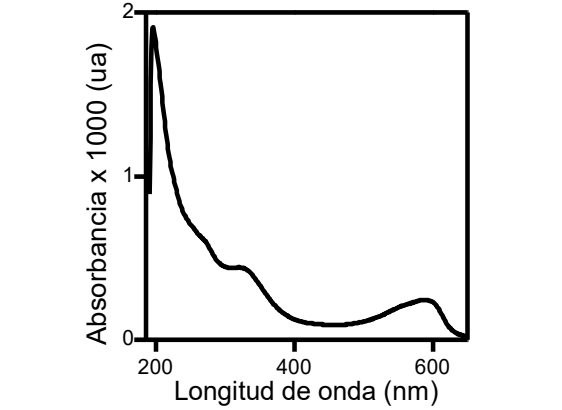
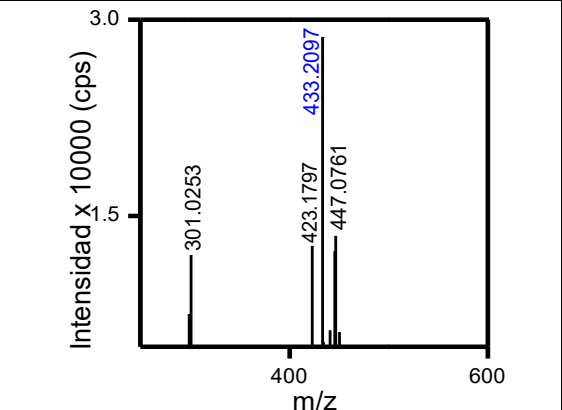
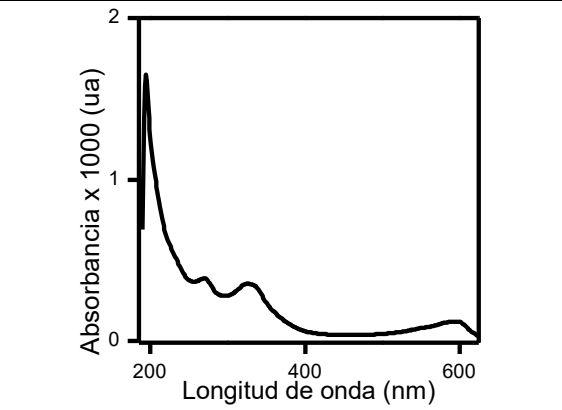
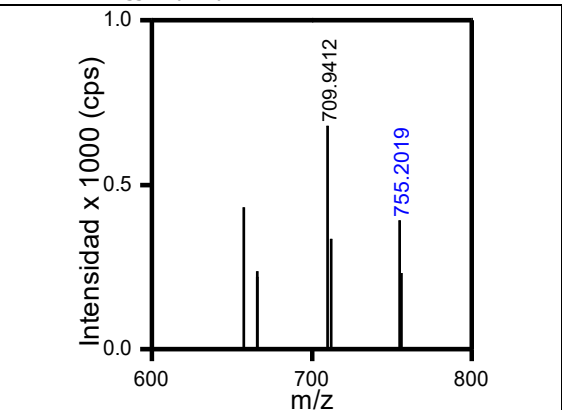
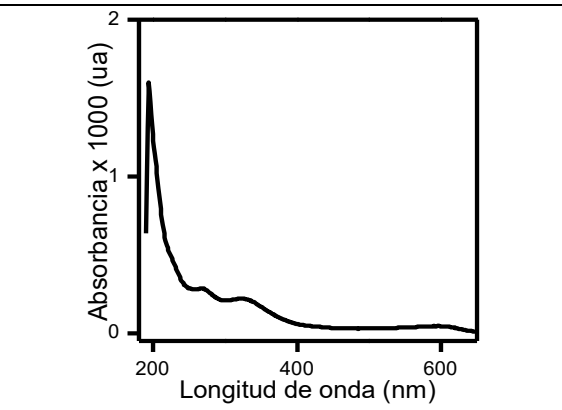
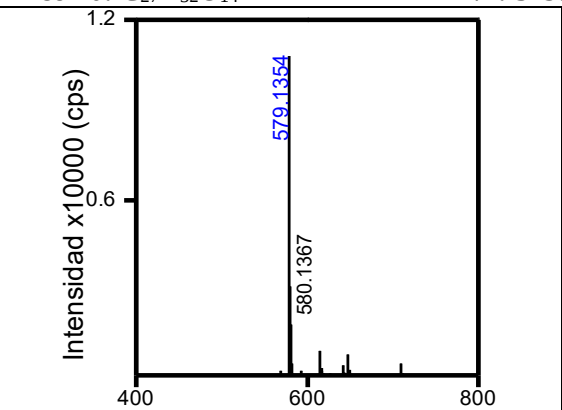
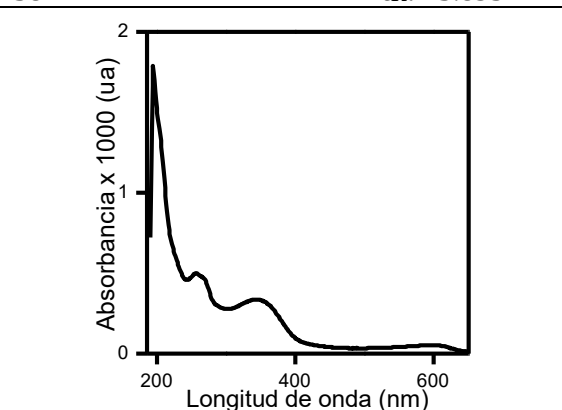
Algunas de las masas de estos iones extraídos corresponden con las masas de algunos glicósidos de kaempferol presentes en el orden Lamiales reportados en la literatura y/o bases de datos, por lo que fue posible asignar una estructura a algunos de estos compuestos, tomando en cuenta los siguientes criterios: la $[M-H]^-_{\text{exper}}$ es cercana a la $[M-H]^-_{\text{calc}}$ ($\Delta m/z < 10$ ppm); asignación de una fórmula molecular putativa, y espectro de absorción característico de flavonoles. En la Tabla 4.3 se muestran las estructuras asignadas a cada compuesto (picos 1-15). Para algunos compuestos no se logró proponer una estructura dado que no cumplían con ninguno de los criterios de asignación.

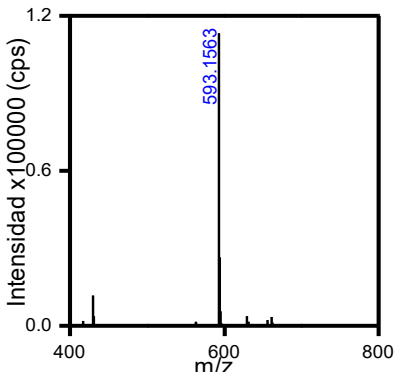
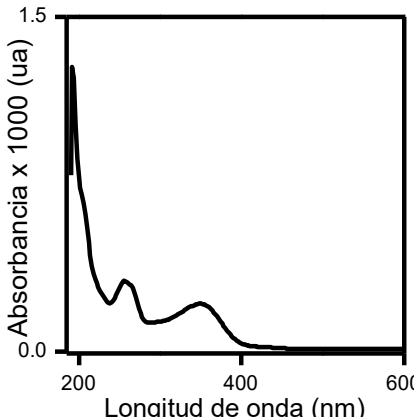
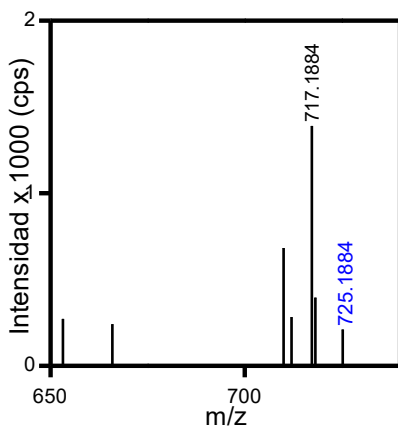
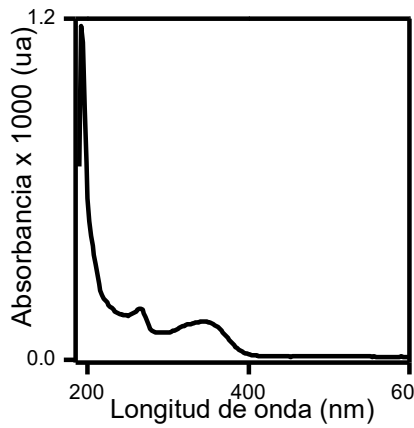
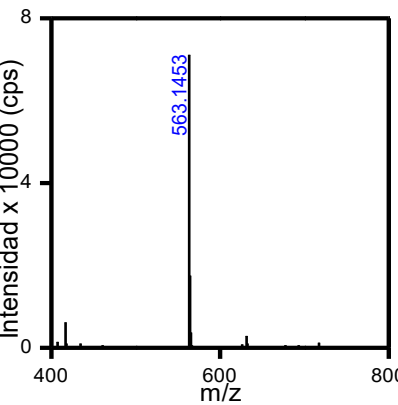
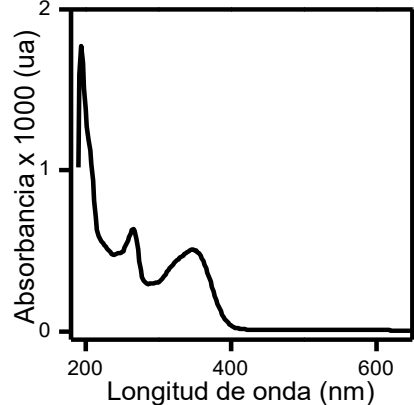
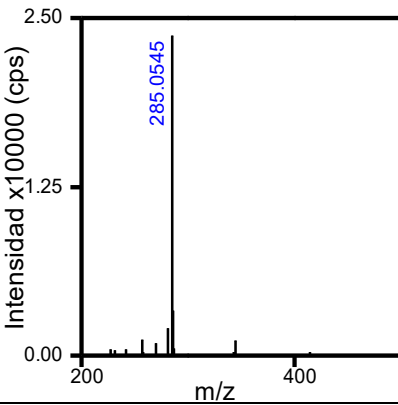
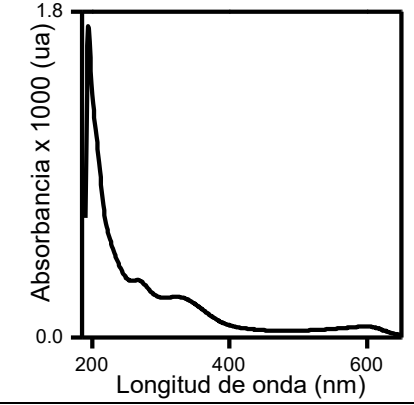
En la Tabla 4.4 se muestran los espectros de masas y los espectros de absorción UV-Vis correspondientes a los compuestos de los 15 picos observados que aportan evidencia sobre su naturaleza. Se reportan también las fórmulas moleculares propuestas para cada analito.

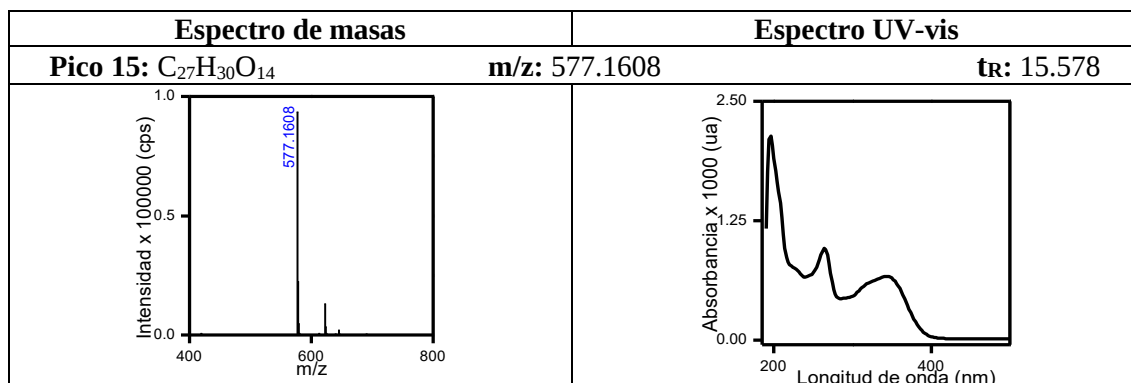
Tabla 4.4 Espectros de masas y de absorción UV-vis correspondientes a los picos observados.

Espectro de masas		Espectro UV-vis	
Pico 1: $C_{21}H_{13}O_2$		m/z: 296.0826	tr: 1.866
 Intensity x 10000 (cps) m/z		 Absorbancia x 1000 (UA) Longitud de onda (nm)	
Pico 2: $C_{20}H_{13}O$		m/z: 268.0878	tr: 3.582
 Intensity x 10000 (cps) m/z		 Absorbancia x 1000 (ua) Longitud de onda (nm)	

Espectro de masas		Espectro UV-vis	
Pico 3: $C_{18}H_{18}O_5$ m/z: 313.1060		tr: 3.849	
 Intensidad x 10000 (cps) m/z		 Absorbancia x 1000 (ua) Longitud de onda (nm)	
Pico 4: $C_7H_6O_3$ m/z: 137.0259		tr: 3.865	
 Intensidad x 1000 (cps) m/z		 Absorbancia x 1000 (ua) Longitud de onda (nm)	
Pico 5: $C_{20}H_{28}O_3$ m/z: 315.0747		tr: 4.082	
 Intensidad x 10000 m/z		 Absorbancia x 1000 (ua) Longitud de onda (nm)	
Pico 6: $C_{22}H_{11}O$ m/z: 290.0705		tr: 7.014	
 Intensidad x 10000 (cps) m/z		 Absorbancia x 1000 Longitud de onda (nm)	

Espectro de masas		Espectro UV-vis	
Pico 7: $C_{20}H_{10}O_{10}$		m/z: 417.0862	tr: 7.681
 Mass spectrum for Pico 7 ($C_{20}H_{10}O_{10}$). The x-axis represents m/z from 400 to 450, and the y-axis represents Intensity x 100 (cps) from 0 to 4. The base peak is at m/z 417.0862. Other labeled peaks include 439.1469.		 UV-vis spectrum for Pico 7. The x-axis represents Longitud de onda (nm) from 200 to 600, and the y-axis represents Absorbancia x 1000 (ua) from 0 to 2. The spectrum shows a sharp peak at 200 nm, a shoulder around 300 nm, and a broad peak around 550 nm.	
Pico 8		m/z: 433.2097	tr: 11.229
 Mass spectrum for Pico 8. The x-axis represents m/z from 400 to 600, and the y-axis represents Intensity x 10000 (cps) from 0 to 3.0. The base peak is at m/z 433.2097. Other labeled peaks include 301.0253, 423.1797, and 447.0761.		 UV-vis spectrum for Pico 8. The x-axis represents Longitud de onda (nm) from 200 to 600, and the y-axis represents Absorbancia x 1000 (ua) from 0 to 2. The spectrum shows a sharp peak at 200 nm, a shoulder around 300 nm, and a broad peak around 550 nm.	
Pico 9: $C_{33}H_{40}O_{20}$		m/z: 755.2019	tr: 13.179
 Mass spectrum for Pico 9 ($C_{33}H_{40}O_{20}$). The x-axis represents m/z from 600 to 800, and the y-axis represents Intensity x 1000 (cps) from 0.0 to 1.0. The base peak is at m/z 709.9412. Other labeled peaks include 579.1354 and 755.2019.		 UV-vis spectrum for Pico 9. The x-axis represents Longitud de onda (nm) from 200 to 600, and the y-axis represents Absorbancia x 1000 (ua) from 0 to 2. The spectrum shows a sharp peak at 200 nm, a shoulder around 300 nm, and a broad peak around 550 nm.	
Pico 10: $C_{27}H_{32}O_{14}$		m/z: 579.1382	tr: 13.895
 Mass spectrum for Pico 10 ($C_{27}H_{32}O_{14}$). The x-axis represents m/z from 400 to 800, and the y-axis represents Intensity x 10000 (cps) from 0 to 1.2. The base peak is at m/z 579.1354. Other labeled peaks include 580.1367.		 UV-vis spectrum for Pico 10. The x-axis represents Longitud de onda (nm) from 200 to 600, and the y-axis represents Absorbancia x 1000 (ua) from 0 to 2. The spectrum shows a sharp peak at 200 nm, a shoulder around 300 nm, and a broad peak around 550 nm.	

Espectro de masas		Espectro UV-vis	
Pico 11: $C_{27}H_{30}O_{15}$		m/z: 593.1563	tr: 14.295
			
Pico 12: $C_{32}H_{38}O_{19}$		m/z: 725.1884	tr: 14.645
			
Pico 13: $C_{26}H_{28}O_{14}$		m/z: 563.1453	tr: 14.728
			
Pico 14: $C_{15}H_{10}O_6$		m/z: 285.0545	tr: 15.228
			



Los flavonoides poseen espectros de absorción con 2 bandas principales de absorción, una primera de 200-270 nm, y una segunda banda de absorción en la zona 300-400 nm (Ortega *et al.*, 2007).

Se observa que el compuesto 1 posee una única banda de absorción en la zona de 220 - 270 nm, también presente en los flavonoides por la presencia de anillos aromáticos, sin embargo, no posee un espectro similar al de los compuestos de interés. Los compuestos de los picos 2-4 poseen las bandas de absorción principales de los flavonoides, sin embargo, no se logró asignar una estructura o fórmula molecular a estos compuestos. Los compuestos 7, 9-15 poseen espectros de absorción UV-vis característicos de los flavonoides.

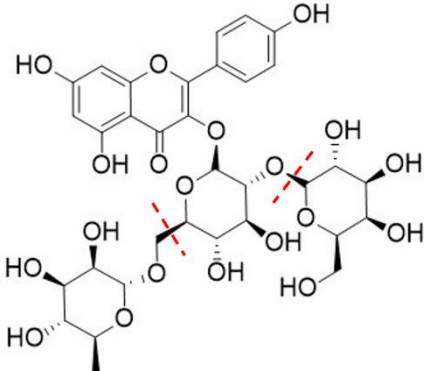
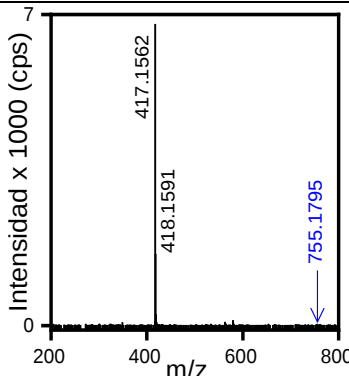
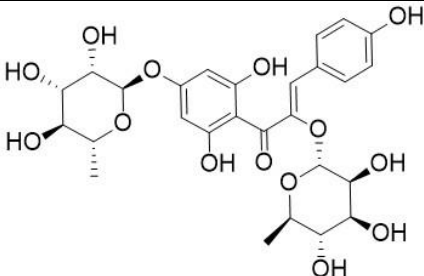
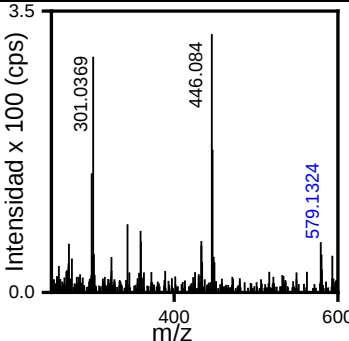
Los iones moleculares seleccionados para realizar el análisis MS/MS fueron los pertenecientes a los picos 7, 9-15, mismos que cumplen con la asignación de una fórmula molecular y una propuesta estructural; una $m/z_{teórica}$ cercana a la $m/z_{experimental}$ y el espectro de absorción UV-vis de los flavonoides.

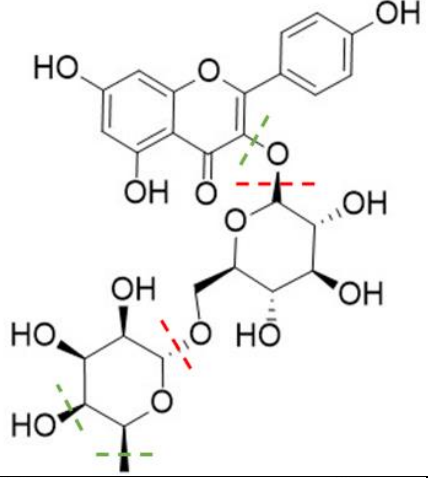
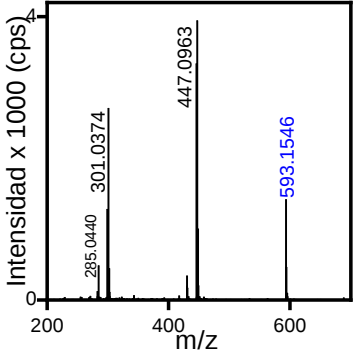
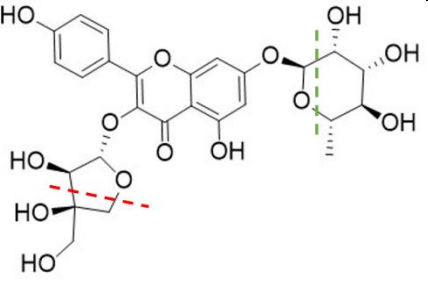
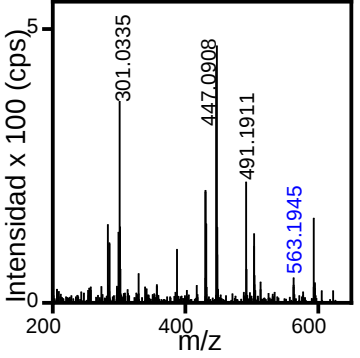
4.4 Análisis MS/MS

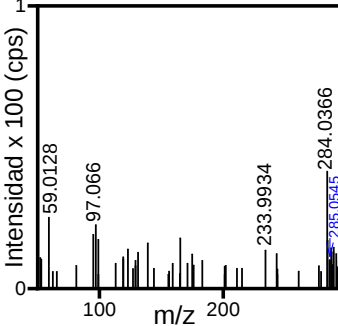
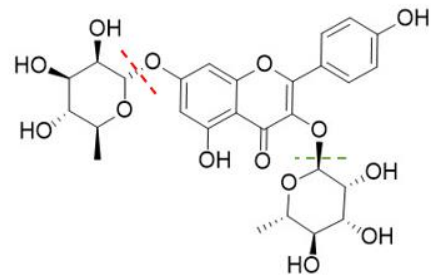
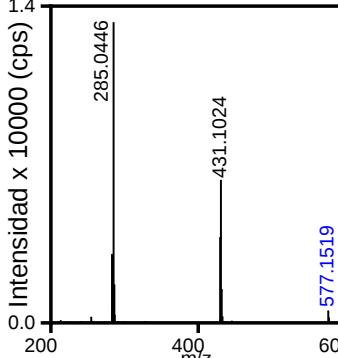
El análisis MS/MS permitió obtener información acerca de la masa del analito y de su estructura molecular a través de la fragmentación de los iones precursores y la obtención de iones producto (fragmentos) (Johnson y Carlson, 2015). En la Tabla 4.5 se muestran los espectros del análisis MS/MS de algunos compuestos, así como de los principales fragmentos observados.

Tomando en cuenta el mecanismo de fragmentación de los flavonoides reportado por Benayad *et al.* (2014), se realizó un análisis estructural para la obtención de la m/z de los fragmentos y se comparó con los observados en los espectros de MS/MS.

Tabla 4.5 Análisis MS/MS de los iones precursores.

Pico	$[M-H]^-$ exper	Estructura	Masa de fragmentos y Iones producto MS/MS	Espectro MS/MS
9	755.2073		417: $[M-H-C_{13}H_{22}O_{10}]^-$	
10	579.1382		446: $[M-H-C_7HO_3]^-$ 301: $[M-H-C_{19}H_2O_3]^-$	

11	593.1563		447: $[M-H-C_6H_{11}O_4]^-$ 301: $[M-H-C_{11}H_{16}O_9]^-$ 285: $[M-H-C_{12}H_{21}O_9]^-$	
13	563.1406		447: $[M-H-C_5H_8O_3]^-$ 301: $[M-H-C_8H_6O_{10}]^-$ 491: $[M-H-C_3H_4O_2]^-$	

14	285.0545		284: $[M-H-H_1]^-$ 97: $[M-H-C_6H_4O_7]^-$ 59: $[M-H-C_5H_6O_{10}]^-$	
15	577.1608		431: $[M-H-C_6H_{11}O_4]^-$ 285: $[M-H-C_{12}H_{20}O_8]^-$	

En el ion precursor cameliasida A (pico 9), se observó el fragmento de 417, que es producto de la pérdida de glucosa y un residuo de ramnosa. Para el ion precursor de la nicotiflorina (pico 11) se observaron fragmentos pertenecientes a la aglicona de kaempferol (285), un fragmento resultante de la pérdida de una ramnosa (447) y un fragmento perteneciente al rutinósido libre con pérdida de un grupo metilo y un grupo OH (301). El ion precursor del compuesto 13 posee fragmentos producto de una ruptura en la ramnosa (447) y en la apiofuranosa (301). Respecto al KFL (pico 14), se observó gran abundancia del fragmento que representa la pérdida de un H. Finalmente, la KFA tiene el fragmento 431, que resultó de la pérdida de una ramnosa, mientras que el fragmento de 285 (aglicona de KFL), resultó de la pérdida de ambas ramnosas. Finalmente, de acuerdo con los fragmentos observados, la energía de colisión utilizada para los iones moleculares produjo principalmente la pérdida de glicósidos en los iones precursores y no una fragmentación de la aglicona de KFL.

4.5 Cuantificación de la kaempferitrina y glicósidos de kaempferol.

La cuantificación de KFA se realizó con la curva de calibración mostrada en la Figura 4.5, a partir del estándar en el intervalo de concentración de 5 a 50 ppm. La ecuación de la recta $y=24.898x-20.181$, obtenida por mínimos cuadrados permitió obtener la concentración de KFA. La concentración de KFA en el extracto resultó de 18.9 mg/g de extracto liofilizado analizado.

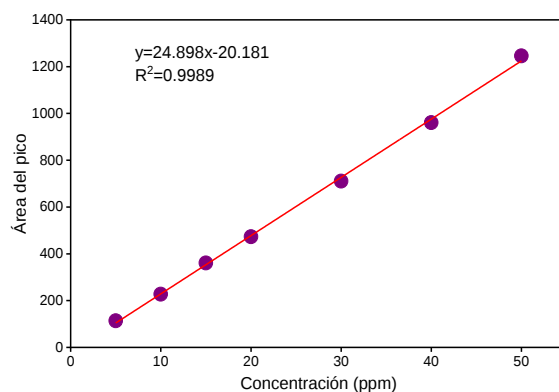


Figura 4.5 Curva de calibración con estándar de KFA.

En el cromatograma mostrado en la Figura 4.2 se observaron el pico c correspondiente a la KFA y 2 picos adicionales (a y b) que resultan de interés debido a su abundancia y su espectro UV-vis. Estos 2 picos corresponden a los picos 11 y 13 en la Figura 4.3. Ambos compuestos se cuantificaron por el método de estándar interno, empleando un compuesto de una naturaleza química muy similar y por tanto similar respuesta en el detector. En la Figura 4.6 se presenta la curva de calibración relativa obtenida con el estándar interno Kaempferol-7-o-neohesperidoside (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 50 ppm.

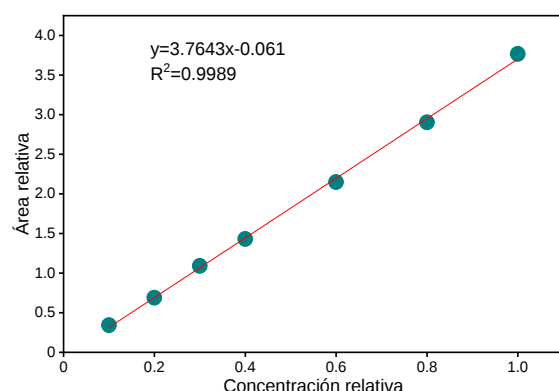


Figura 4.6 Curva de calibración relativa.

La sustitución del área relativa en la ecuación 3.17 para la obtención del área relativa de la muestra, así como la posterior sustitución de dicho valor en la ecuación de la recta de la curva de calibración relativa ($y = 3.7643x - 0.061$), permitió obtener la concentración de los

analitos pertenecientes a los t_R 14.295 y 14.728 (picos 11 y 13), que fueron identificados como kaempferol 3-O- β -rutinósido (nicotiflorina) y kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido, respectivamente. La concentración de nicotiflorina fue de 3.74 mg/g de extracto y la del kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido fue de 6.28 mg/g de extracto.

Los picos 11 y 13 presentan menores concentraciones que la KFA (pico 15) en el extracto, proporcionales al tamaño de los picos.

4.6 Validación del método cromatográfico

• Linealidad

En la Tabla 4.5 se muestran los parámetros determinados para la linealidad, así como sus criterios de aceptación y la correlación que existe entre las variables.

Tabla 4.5 Parámetros de la linealidad.

Pendiente	24.898
Ecuación de la recta	$y=24.898x-20.181$
Coeficiente (r)	0.9989
Test de correlación lineal (t_r)	47.6348
t_{tab}	2.920
Criterio de correlación: Si $t_r > t_{tab}$, entonces existe correlación entre las variables.	

Dado que el valor de t_r es mayor al valor de t_{tab} , se determinó la correlación entre las variables.

• Precisión

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de la desviación estándar relativa que representa el grado de dispersión de las medidas en relación con su valor promedio o central, ésta debe ser menor al 2% del valor verdadero (20 ppm).

Tabla 4.6 Parámetros de precisión

Desviación Estándar (S)	0.1751
Desviación Estándar Relativa (RSD)	0.8917
2% del valor verdadero	0.4
Criterio de aceptación	RSD < 2%

Dado que la RSD tiene un valor mayor al 2% del valor verdadero (0.4), se determinó un sesgo sistemático β para la desviación estándar, así como un límite superior de confianza (U) para la validación de la precisión, suponiendo que el criterio de aceptación definido para la precisión requiere que S sea <0.4 ppm. Esto, porque la desviación estándar tiene cierta incertidumbre asociada, entonces, es requerido el cálculo de un intervalo de confianza estadística para cuantificar la incertidumbre. Los intervalos de confianza estadística proporcionan un rango de

valores posibles para β y S para un nivel dado de confianza. El límite superior calculado de 0.3659 ppm, representa el valor más alto que se puede esperar para S con una confianza del 95%. Ya que $0.3659 \text{ ppm} < 0.4 \text{ ppm}$, la precisión se validó con una confianza del 95% (USPC, 2021).

- **Exactitud**

Se determinó el promedio de las concentraciones experimentales, y a partir del valor verdadero (20 ppm), la desviación estándar y el número de muestras (6), se obtuvo el valor de t_{ob} , y se comparó con el valor tabulado (t_{tabla}) para $n-1$ grados de libertad y $\alpha=0.05$. Si $t_{ob} < t_{tabla}$, entonces el método tiene la exactitud requerida para ese nivel de confianza. Como: $t_{ob} = 0.8391 < t_{tabla} = 2.015$, entonces, el método tiene la exactitud requerida para este nivel de confianza.

- **Sensibilidad**

A partir de la curva de calibración de KFA construida con los estándares de KFA a concentraciones 0.025, 0.1 y 5 ppm, se estimó el valor del intercepto ($y_{bl}=5.61$), su desviación estándar ($s_{bl}=2.84$) y la ordenada al origen ($b=5.61$). Los valores de LD fueron 2.5187 ppm, mientras que el LC fue de 6.0623 ppm.

4.7 Determinación de la pureza de los picos.

La superposición de los espectros de absorción de las zonas creciente, vértice y decreciente de un pico es uno de los criterios de pureza más extendidos cuando se utiliza un detector DAD. En la Figura 4.7 se muestra la superposición de los espectros de absorción de diferentes puntos del pico de interés.

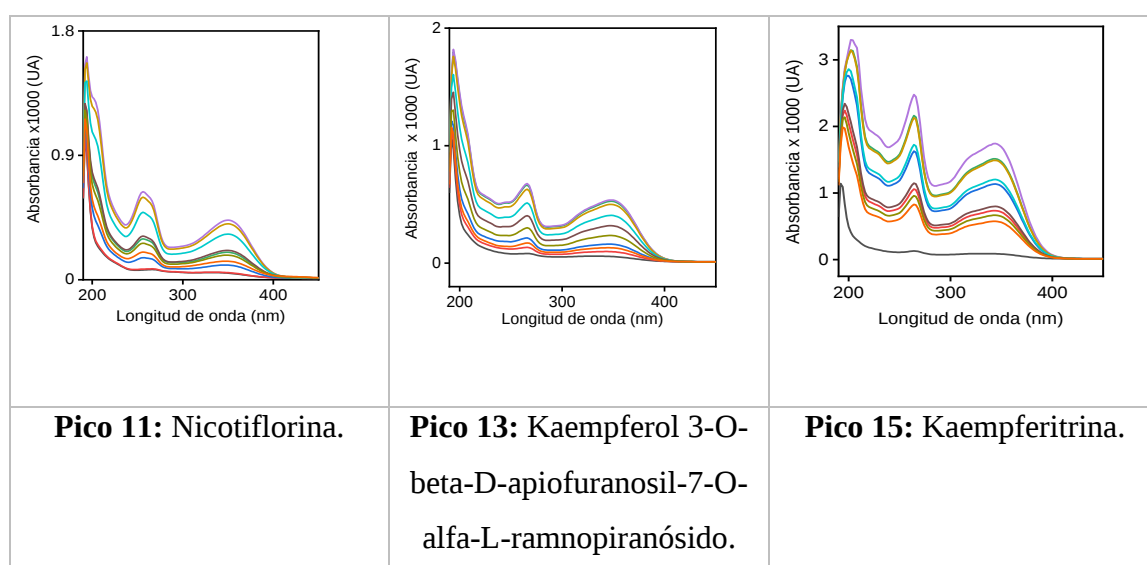


Figura 4.7 Superposición de 10 espectros de absorción UV de la zona creciente, ápice y decreciente de los picos cromatográficos 11, 13 y 15.

Se observa homogeneidad en la superposición de los espectros de absorción en el perfil de cada uno de los picos, indicando que pertenecen a un único compuesto. Asimismo, los espectros de absorción de estos 3 picos poseen bandas con un máximo a las longitudes de onda de 180, 265 y 360 nm, mismas que son características de los flavonoides.

El factor de similitud entre los espectros del pico 11 fue de 999.98; para el pico 13 fue de 999.94, y 999.96 para el pico 15, demostrando que existe un alto grado de similitud entre los espectros en diferentes puntos de cada uno de los picos. El factor de similitud y la superposición de los espectros son dos criterios ampliamente utilizados para la determinación de pureza de pico con un detector de arreglo de diodos.

En la Figura 4.8 se muestra el ajuste por mínimos cuadrados para obtener el factor de similitud entre los espectros de cada pico, donde se aprecia la linealidad entre la absorbancia de dos bandas para los tres compuestos identificados.

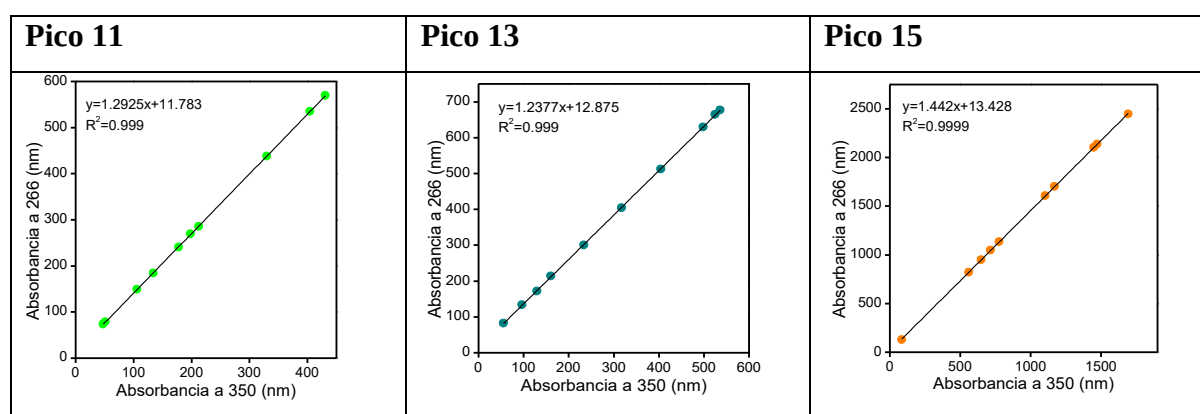


Figura 4.8 Ajuste por mínimos cuadrados de los espectros para la obtención del factor de similitud.

Un sistema de acoplamiento HPLC-MS, permite una mejor y más detallada determinación de la pureza de un pico cromatográfico, puesto que, con un detector DAD no puede determinarse la coelución de analitos cuya similitud estructural genere un espectro de absorción muy similar (Quattrocchi, 1992). El espectro de masas de cada uno de los picos cromatográficos permitió determinar que los espectros de absorción pertenecían a analitos con los siguientes iones moleculares m/z : el pico 11 tiene una $m/z = 593.1542$; el pico 13 tiene una $m/z = 563.1463$ y el pico 15 tiene una $m/z = 577.1593$. Los espectros de masas de estos picos se muestran en la Figura 4.9.

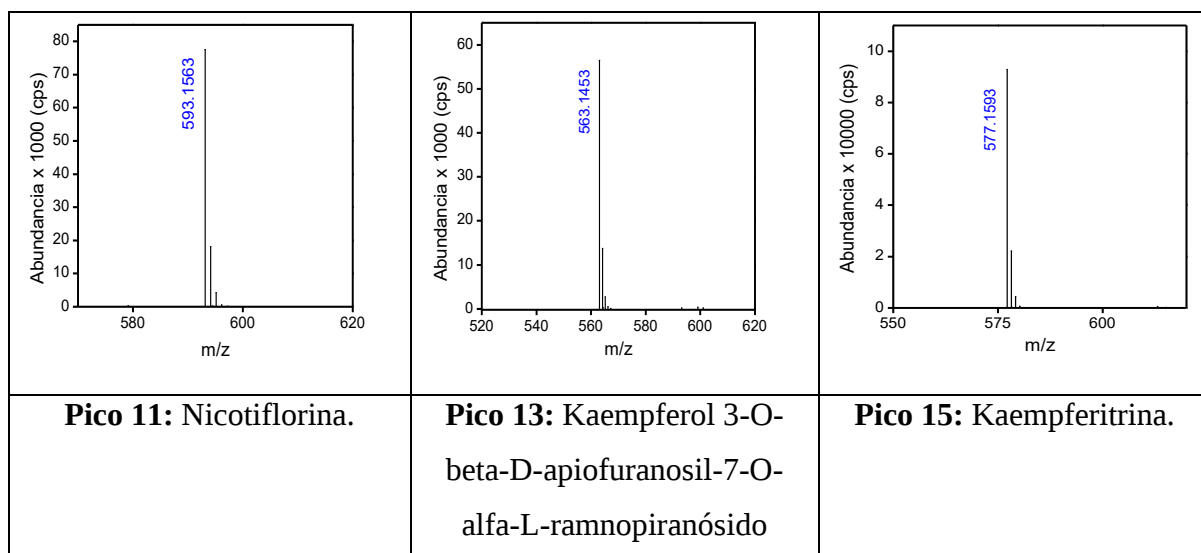


Figura 4. 9 Espectros de masas de los picos 11, 13 y 15 que muestran la m/z de los analitos identificados.

CONCLUSIONES

- Se confirma la presencia de flavonoles en un espécimen de *Justicia spicigera*.
- Los grupos fenil-hexilo y trimetilsilano en la fase estacionaria de la columna Kinetex Phenyl-hexyl[®], en conjunto con la composición de la FM (metanol/agua) en sistema de gradiente, permitieron una mejor resolución de los compuestos polifenólicos en una matriz multicomponente.
- Con el método cromatográfico validado se confirma la presencia de KFA con una concentración de 18.9 mg/g en el extracto. Dos glicósidos de kaempferol, la nicotiflorina y el kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido, fueron identificados con una concentración de 3.74 mg y 6.28 mg por gramo de extracto, respectivamente. Asimismo, se confirmó la pureza de los picos a, b y c, indicando que cada pico pertenece a un solo compuesto.
- Los compuestos de la familia del kaempferol: kaempferol 3-O- β -D-xilósido, Cameliasida A kaempferol 3-(6'''-ramnosil-2'''-glucosil-glucósido), kaempferol 3-O- β -rutinósido (nicotiflorina), cameliasida B, kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido, kaempferol y kaempferitrina se encuentran presentes en el extracto.
- Se corroboró la propuesta estructural de la cameliasida A, nicotiflorina, kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido, KFL y KFA.
- La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a los detectores DAD UV-vis y de masas (Q-ToF) representan una estrategia invaluable en la identificación de metabolitos secundarios de plantas.

PERSPECTIVAS

- Es necesario evaluar la actividad biológica de manera individual de los compuestos kaempferol 3-O- β -D-xilósido, cameliasida A, nicotiflorina, cameliasida B, kaempferol 3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido, KFL y KFA, para conocer su papel en el efecto biológico que ejerció el extracto.
- Se precisa conocer, aprovechar y conservar las plantas medicinales ya que son “recursos” biológicos y fuentes de “nuevos” compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (2011). HPLC Agilent 1260 Infinity [Esquema adaptado]. En *Manual de Usuario de la Bomba binaria VL Agilent 1290 Infinity*. Recuperado de: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4220-95006_BinPump_USR_RevB_ES.pdf
- Agilent Technologies (2012). Detector 1260 Infinity DAD® [Esquema adaptado]. En *Manual de usuario del detector de diodos Agilent serie 1200 Infinity*. Recuperado de https://www.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4212-95012_DAD-A-B_USR_ES.pdf
- Agilent Technologies. (2011). *Manual de Usuario de la Bomba binaria VL Agilent 1290 Infinity*.
- Agilent Technologies. (2012). *Manual de usuario del detector de diodos Agilent Serie 1200 Infinity Avisos*.
- Aguilera-Ortíz, M., Reza-Vargas, M. C., Chew-Madinaveitia, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 13(2), 16–22.
- Ahamad, J., Ali, F., Sayed, M. A., Ahmad, J., & Nollet, L. M. L. (2022). Basic Principles and Fundamental Aspects of Mass Spectrometry. In *Mass Spectrometry in Food Analysis* (pp. 3–17). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003091226-2>
- Almaraz-Abarca, N., Antonio Ávila-Reyes, J., Amanda Delgado-Alvarado, E., & Naranjo-Jiménez Jesús Herrera-Corral, N. (2006). *EL METABOLISMO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS, UN NUEVO CONCEPTO*.
- Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M. D. C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., & García-Carrancá, A. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.036>
- Álvarez-Castro, E., & Orallo-Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (II), acción cardiovascular y sanguínea. *Journal of Farmacología*, 22(Ii), 102–107.
- Argueta-Villamar, A., M., C.-A. L., & Rodarte-García, M. E. (1994). *Justicia spicigera* Schlechtendal — Acanthaceae. In *Atlas de las plantas de la medicina tradicional*

mexicana.

UNAM.

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=justicia-spicigera>

Ashok Bhosale, A. (2020). *Bioanalysis by LC-MS/MS: A review*.
<https://www.researchgate.net/publication/347973771>

Ávalos García, E., & Pérez-Urria Carril, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.

Bangar, S. P., Chaudhary, V., Sharma, N., Bansal, V., Ozogul, F., & Lorenzo, J. M. (2022). Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–25.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2067121>

Beg, T., Jyoti, S., Naz, F., Rahul, Ali, F., Ali, S. K., Reyad, A. M., & Siddique, Y. H. (2018). Protective Effect of Kaempferol on the Transgenic Drosophila Model of Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17(6), 421–429.
<https://doi.org/10.2174/1871527317666180508123050>

Benayad, Z., Gómez-Cordovés, C., & Es-Safi, N. E. (2014). Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35(1), 21–29.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.04.002>

Calderón-Montaña, J. M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. In *Reviews in Medicinal Chemistry* (Vol. 11).

Corrêa, G. M., & Alcântara, A. F. de C. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*-a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(1), 220–238. <https://doi.org/10.1590/S0102>

Cserhádi, T. (2007). liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes. *Journal of Chromatography Library*, 71(First edition), 573.

Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/jms.585>

de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006).

- Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products : a biosynthetic approach* (3rd ed.). Wiley.
- Domon, B., & Costello, C. E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5(4), 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF01049915>
- Esquivel-Gutiérrez, R., Noriega-Cisneros, E., Saavedra-Molina, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Barajas, M., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, A. (2013). Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Pharmacologyonline*, 2, 120–127. <https://www.researchgate.net/publication/263506672>
- Euler, K. L., & Alam, M. (1982). *ISOLATION OF KAEMPFERITRIN FROM JUSTICIA SPICIGERA*.
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33(1), 13–40. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>
- Firn, R. D., & Jones, C. G. (2003). Natural products - A simple model to explain chemical diversity. In *Natural Product Reports* (Vol. 20, Issue 4, pp. 382–391). <https://doi.org/10.1039/b208815k>
- Gaete-Pérez, J. (2018). IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS DE NATURALEZA FLAVÓNICA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA UV-VIS A PARTIR DE ESTÁNDARES DE FLAVONOIDES. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA A UN EXTRACTO VEGETAL COMERCIAL. In *Biomass Chem Eng* (Vol. 3, Issue 2). http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127%0Ahttp://publicacoes.cardiol.br/portal/ijcs/portugues/2018/v3103/pdf/3103009.pdf%0Ahttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-75772018000200067&lng=en&tlng=
- Garza, A., Perez, J., Salazar, R., MA, S., & Waksman, N. (2010). Desarrollo y validación de métodos analíticos par a estandarización de fitofármacos con *Turnera diffusa* (damiana). *Ciencia UANL*, XIII(4), 397–404.
- Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., & León-González, M. E. (2021). Kaempferol and

- glucosides. In *A Centum of Valuable Plant Bioactives* (pp. 291–317). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822923-1.00010-8>
- González-Trujano, M. E., Domínguez, F., Pérez-Ortega, G., Aguillón, M., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S., & Martínez, A. (2017). Justicia spicigera Schltdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 92, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.075>
- Grisel, M., & Georgina, L. (2007). *Estudios de Caracterizacion y separacion de pigmentos en caldos de fermentacion de Botryodiplodia Theobromae*.
- Hadacek, F. (2002). Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. In *Critical Reviews in Plant Sciences* (Vol. 21, Issue 4, pp. 273–322). CRC Press LLC. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044269>
- Hernández-Rodríguez, S., Quiroz-Reyes, C. N., Ramírez-Ortiz, M. E., Ronquillo-de Jesús, E., & Aguilar-Méndez, M. Á. (2020). Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de Justicia spicigera Schltdl. mediante la metodología de superficie de respuesta. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.246>
- Hossen, M. J., Uddin, M. B., Syed, A., & Uddin, S. (2016). *Review on Natural Sources and Bioavailability One Health Education View project surveillance of avian influenza virus type A View project*. <https://www.researchgate.net/publication/309487222>
- Jang, G. H., Kim, H. W., Lee, M. K., Jeong, S. Y., Bak, A. R., Lee, D. J., & Kim, J. B. (2018). Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the Prunus genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), 1622–1631. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.08.001>
- Johnson, A. R., & Carlson, E. E. (2015). Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation. *Analytical Chemistry*, 87(21), 10668–10678. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01543>
- Jurasekova, Z., García-Ramos, D., & Sánchez-Cortés, C. (2006). *Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids*. *July 2016*, 8–11. <https://doi.org/10.1002/jrs.1634>
- Li, S., Yan, T., Deng, R., Jiang, X., Xiong, H., Wang, Y., Yu, Q., Wang, X., Chen, C., & Zhu, Y. (2017). Low dose of kaempferol suppresses the migration and invasion of triple-

- negative breast cancer cells by downregulating the activities of RhoA and Rac1. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4809–4819. <https://doi.org/10.2147/OTT.S140886>
- López-Fernández, O., Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., & Lorenzo, J. M. (2020). Determination of polyphenols using liquid chromatography–tandem mass spectrometry technique (LC–MS/MS): A review. *Antioxidants*, 9(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/antiox9060479>
- López-Luengo, M. T. (2002). *Flavonoides* (Vol. 21, Issue 4).
- López-Murillo, O. F. (2013). *Propuesta de un Método para el análisis de nimesulida por cromatografía de líquidos de alta resolución*. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/209557>
- March, R. E., & Miao, X. S. (2004). A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 231(2–3), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.10.008>
- Mendoza-Zuñiga, M. (2010). *UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA Unidad Iztapalapa Establecimiento de cultivos celulares de UAM*.
- Mettler Toledo GmbH. (2021). UV / VIS Spectrophotometry. *Mettler-Toledo International*, 56. <https://www.mt.com/es/es/home/library/guides/laboratory-division/1/uvvis-spectrophotometry-guide-applications-fundamentals.html>
- Montoya P., C. J. G. (2005). Validación de un método cromatográfico y determinación de sulfatos en productos de corrosión atmosférica del zinc expuesto en ambientes de SO₂ y NO₂. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 84, 96.
- Moreno-Ayala, A. A. (2021). *Extracción y detección de bajas concentraciones de estrógenos en muestras sólidas*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Navarrete Mora, T. D. J., Delgado Sandoval, S. D. C., Padilla Raygoza, N., Sumaya Martínez, M. T., Calixto Olalde, G., Robles Bermúdez, A., & García López, M. (2016). Propiedades hipoglucemiantes de la especie *Justicia spicigera* Schlechtendal (Scrophulariales: Acanthaceae). *Métodos En Ecología y Sistemática*, 11(1), 24.
- Ochoa, C. I., & Ayala, A. A. (2004). *Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos*.

- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., & García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>
- Otsuka, N., Liu, M.-H., Shiota, S., Ogawa, W., Kuroda, T., Hatano, T., & Tsuchiya, T. (2008). Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Compounds Isolated from *Laurus nobilis*. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 31, Issue 9).
- Paithankar, H. V. (2013). HPLC Method validation for pharmaceuticals: A review. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, 2(June), 285–297.
- Quattrocchi, O. (1992). *Introduccion a la HPLC, Aplicacion y Practica*. <https://www.researchgate.net/publication/315771927>
- Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K. M., & Rajak, H. (2010). Validation of analytical methods - Strategies & importance *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 18–22.
- Rho, H. S., Ghimeray, A. K., Yoo, D. S., Ahn, S. M., Kwon, S. S., Lee, K. H., Cho, D. H., & Cho, J. Y. (2011). Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*, 16(4), 3338–3344. <https://doi.org/10.3390/molecules16043338>
- Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Shah, S. A. A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., & Zakaria, Z. A. (2022). Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>
- Silva dos Santos, J., Gonçalves Cirino, J. P., de Oliveira Carvalho, P., & Ortega, M. M. (2021). The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.565700>
- Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). Mass Spectrometry. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7th ed.). John & Wiley Sons.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2015a). Análisis espectroquímico -

- Introducción a los métodos espectroquímicos. In *Fundamentos de Química Analítica* (9na ed.).
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2015b). Introducción a las separaciones analíticas. In *Fundamentos de Química Analítica* (9th ed., pp. 847–872). Cengage Learning.
- Smith, F. J., & Braithwaite, A. (1996). *Chromatographic Methods 5th ed* - A. Braithwaite, F. Smith (Kluwer, 1996) (p. 571).
- Soriano-Santos, J., Guerrero-Legarreta, I., & Ponce-Alquicira, E. (2006). Acción antioxidante de los flavonoides de frutas y verduras para la preservación de la salud. 62, 46–54.
- DOF - Diario Oficial de la Federación NOM-072-SSA1-2012, Pub. L. No. NOM-072-SSA1-2012 (2012).
- Stahl, M. (2003). Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology Application. *Agilent Technologies*, 8, 5988–8647.
- USPC. (2021). *MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA LA VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS* (pp. 9–14).
- Wang, T. yang, Li, Q., & Bi, K. shun. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. In *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 13, Issue 1, pp. 12–23). Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Whelan, A. M., Jurgens, T. M., & Lord, L. (2009). Evaluating the Quality of Randomized Controlled Trials that Examine the Efficacy of Natural Health Products: A Systematic Review of Critical Appraisal Instruments. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(4), 441–448. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem186>
- Yang, W. Z., Ye, M., Qiao, X., Wang, Q., Bo, T., & Guo, D. A. (2012). Collision-induced dissociation of 40 flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 18(6), 493–503. <https://doi.org/10.1255/ejms.1206>
- Zapata-Morales, J. R., Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Carranza-Álvarez, C., Castellanos, L. M. O., Martínez-Medina, R. M., & Pérez-Urizar, J. (2016). Antinociceptive Activity of

an Ethanol Extract of *Justicia spicigera*. *Drug Development Research*, 77(4), 180–186.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21307>

ANEXOS

I. Mecanismo de reacción de la fragmentación de flavonoides.

En el análisis estructural de los flavonoides, la disociación inducida por colisión en modo negativo permite mayor sensibilidad que el modo positivo. Uno de los mecanismos observados en la fragmentación CID(-) es la ruptura del anillo C por reacción Retro Diels-Alder, que produce dos fragmentos: ^{1,3}A y ^{1,3}B, en mayor y menor proporción, respectivamente. Estos fragmentos brindan información acerca del tipo y número de sustituyentes de los anillos A y B (Cuyckens y Claeys, 2004). En la Figura I.I se muestra el mecanismo de eliminación del anillo C ocurrido en la disociación inducida por colisión en modo negativo, en donde la ruptura da lugar a etileno y 1,3-butadieno.

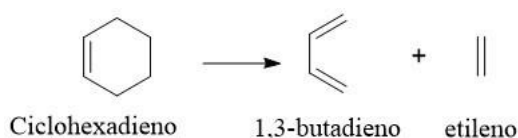


Figura I.I Reacción de ciclo eliminación (Retro Diels-Alder) ocurrida en la CID (-).