

CONTENIDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE CUADROS	VII
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Panorama general de la medicina tradicional.....	2
2.2. <i>Argemone mexicana</i> : uso medicinal en México.....	3
2.3. Distribución geográfica y descripción botánica.....	4
2.4. Descripción fitoquímica de <i>Argemone mexicana</i>	5
2.5. Alcaloides bencilisoquinolínicos.....	5
2.5.1. Biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos.....	6
2.5.3. Formación de norcoclaurina.....	7
2.5.4. Formación de reticulina a partir de norcoclaurina.....	8
2.5.5. Síntesis de sanguinarina y berberina.....	9
2.5.6. Distribución de sanguinarina y berberina en <i>Argemone mexicana</i>	11
2.6. Aplicaciones farmacológicas de <i>Argemone mexicana</i> : efecto de sanguinarina y berberina en el tratamiento de diferentes padecimientos.....	12
2.6.1. Efecto antineoplásico.....	12
2.6.2. Efectos neurológicos.....	13
2.6.3. Efecto anti-inflamatorio y anti-espasmódico.....	14
2.6.4. Actividad anti-diabética.....	14
2.6.5. Otros efectos.....	15
2.7. Perspectivas de la utilización de berberina y sanguinarina en la medicina.....	15
2.8. Metodologías para la separación y cuantificación de alcaloides bencilisoquinolínicos.....	15
2.8.1. La cromatografía en capa fina.....	17
2.9. Validación de métodos cuantitativos.....	19
III. OBJETIVO GENERAL	22
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
V. METODOLOGÍA	23

	Página
5.1. Colecta y procesamiento del material vegetal.....	24
5.2. Extracción de alcaloides bencilisoquinolínicos.....	24
5.3. Desarrollo de la cromatografía.....	25
5.4. Curva de calibración de los estándares de sanguinarina y berberina.....	26
5.5. Detección y cuantificación de sanguinarina y berberina.....	27
5.6. Comparativo de la eficiencia del metanol y metanol acidulado en la extracción de sanguinarina y berberina.....	29
5.7. Estabilidad del analito durante el proceso cromatográfico.....	30
5.7.1 Estabilidad de la muestra en la solución de extracción.....	30
5.7.2 Estabilidad de la muestra en la fase estacionaria.....	30
5.7.3. Estabilidad del analito durante el desarrollo cromatográfico.....	31
5.8. Criterios de validación del método.....	32
5.8.1. Especificidad.....	32
5.8.2. Linealidad.....	33
5.8.3. Límites de detección y cuantificación.....	33
5.8.4. Precisión (Repetibilidad).....	33
5.8.5. Exactitud.....	34
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
7.1. Comparativo de dos disolventes empleados para la extracción de sanguinarina y berberina.....	35
7.2. Estabilidad de los analitos en solución.....	39
7.3. Estabilidad de la muestra en la fase estacionaria.....	40
7.4. Estabilidad durante el proceso cromatográfico.....	40
7.5. Especificidad.....	42
7.6. Linealidad, límites de detección y de cuantificación.....	43
7.7. Precisión (Repetibilidad).....	45
7.8 Exactitud.....	46
VII.CONCLUSIONES.....	47
VIII. PERSPECTIVAS.....	48
IX. REFERENCIAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización mundial de la salud
IMSS	Instituto mexicano del seguro social
ABI's	Alcaloides bencilisoquinolínicos
TyDC	Tirosina/dopa descarboxilasa
PPO	Polifenol oxidasa
TH	Tirosina hidroxilasa
4-HPAA	4-hidroxifenilacetaldehído
NCS	Norcocclaurina sintasa
6 OMT	6-O-metiltransferasa
CNMT	<i>N</i> -metilcocclaurina 3'hidroxilasa
4'OMT	4'-hidroxi- <i>N</i> -metilcocclaurina <i>O</i> -metiltrasferasa
CFS	(S)-chelantiofolia sintasa
SPS	(S)-estilopina sintasa
TPNMT	Tetrahidroprotoberberina-cis- <i>N</i> -metiltransferasa
MSH	(S)-cis- <i>N</i> -metilestilopina 14-hidroxilasa
PPH	Protopina-6-hidroxilasa
DBOX	Dihidrobenzofenantridina oxidasa
SOMT	Escoulerina-9-O-metiltransferasa
STOX	(S)-tetrahidroprotoberberina oxidasa
CDK	cinasas dependientes de ciclinas
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
ERO	Especies reactivas de oxígeno

SOD	Superóxido dismutasa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
COX-2	Ciclooxogenasa-2
AMPK	Proteína cinasa por AMP
LDL	Lipoproteína de baja densidad
CC	Cromatografía de columna
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CG	Cromatografía de gases
CCF	Cromatografía de capa fina
Sa	Sanguinarina
Be	Berberina
mL	Mililitros
μL	Microlitros
nm	Nanometros
mg	Miligramos
mg /g PS	Miligramos de alcaloide por gramo de peso seco de tejido

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta adulta de <i>Argemone mexicana</i>	4
Figura 2. Ruta general de la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos.....	7
Figura 3. Ruta de biosíntesis de norcoclaurina a partir de tirosina.....	8
Figura 4. Síntesis de reticulina a partir de norcoclaurina.....	9
Figura 5. Síntesis de sanguinarina.....	10
Figura 6. Síntesis de berberina.....	11
Figura 7. Estrategia experimental para la validación de la metodología de cuantificación de sanguinarina y berberina.....	23
Figura 8. Diagrama ilustrativo de las dimensiones de la placa cromatográfica.....	25
Figura 9. Cromatogramas de sanguinarina y berberina en <i>Argemone mexicana</i>	26
Figura 10. El densitómetro y sus componentes.....	28
Figura 11. Señal registrada por el densitómetro para las bandas cromatográficas de sanguinarina y berberina.....	29
Figura 12. Estabilidad del analito durante el proceso cromatográfico por cromatografía bidimensional.....	32
Figura 13. Cromatogramas de sanguinarina en raíz y parte aérea de <i>Argemone mexicana</i>	36
Figura 14. Cromatogramas de berberina en raíz y parte aérea de <i>Argemone mexicana</i>	37
Figura 15. Gráficas de estabilidad de sanguinarina y berberina en los diferentes tiempos en solución.....	39
Figura 16. Estabilidad de sanguinarina y berberina en la fase estacionaria.....	40
Figura 17. Cromatogramas de estándar de sanguinarina y sanguinarina tejido de raíz, desarrolladas por cromatografía bidimensional.....	41

Figura 18.	Cromatogramas de estándar de berberina y berberina en tejido de raíz, desarrolladas por cromatografía bidimensional	41
Figura 19.	Análisis espectral de sanguinarina.....	42
Figura 20.	Análisis espectral de berberina.....	43
Figura 21.	Curva de calibración de sanguinarina.....	44
Figura 22.	Curva de calibración de berberina.....	44

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Parámetros de validación de métodos cuantitativos y cualitativo	21
Cuadro 2. Curva de calibración de los estándares de sanguinarina y berberina.....	27
Cuadro 3. Porcentaje de recuperación de sanguinarina en raíz de <i>Argemone mexicana</i>	35
Cuadro 4. Porcentaje de recuperación de berberina de raíz de <i>Argemone mexicana</i>	38
Cuadro 5. Porcentaje de recuperación de berberina en material vegetal aérea de <i>Argemone mexicana</i>	38
Cuadro 6. Parámetros de linealidad, límites de detección y cuantificación...	45
Cuadro 7. Datos de precisión de sanguinarina.....	45
Cuadro 8. Datos de precisión de berberina.....	46
Cuadro 9. Determinaciones de sanguinarina y berberina en tejido radicular de <i>Argemone mexicana</i> en HPLC y CCF-densitometría.....	47

RESUMEN

Argemone mexicana es una planta que produce sanguinarina y berberina, dos alcaloides con interés farmacéutico debido a su potencial en el tratamiento de diversas enfermedades. Por ello, existe la necesidad de desarrollar métodos que permitan la separación y análisis eficientes de los extractos de esta planta, como lo es la cromatografía en capa fina. Con el fin de asegurar los parámetros de desempeño de esta técnica, se realiza un proceso de validación que es esencial para producir datos analíticos confiables.

En el presente trabajo se llevó a cabo un proceso de validación interna para el método de cuantificación de sanguinarina y berberina en extractos de *A. mexicana* por cromatografía de capa fina acoplado a densitometría *in situ* (CCF-D). Previo a esta validación, se estableció el uso de metanol como disolvente para realizar las extracciones de los diferentes tejidos, debido a su mejor desempeño en comparación con el metanol acidulado (0.5% de HCl en metanol v/v). También se determinó la estabilidad de los alcaloides, tanto en los extractos como durante el proceso cromatográfico, para asegurar que diferentes factores externos no los afecten durante la separación. Los parámetros de validación incluidos fueron especificidad, los límites de detección y de cuantificación y la precisión, siguiendo las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés). La especificidad se estableció comparando los espectros de absorción de los alcaloides presentes en los extractos con estándares comerciales de sanguinarina y berberina. El rango lineal fue de 10 a 40 $\eta\text{g/punto}$, mientras que los límites de detección fueron de 1.06 y 1.19 $\eta\text{g/punto}$ para sanguinarina y berberina, respectivamente. Por su parte, los límites de cuantificación fueron de 3.5 y 3.9 $\eta\text{g/punto}$ para sanguinarina y berberina respectivamente, mientras que la precisión del método estuvo dentro del criterio de aceptación de la ICH. Los resultados de cuantificación del método fueron comparables con métodos de cromatografía líquida ya establecidos para estos alcaloides, lo cual permitió inferir la exactitud del método para ambos alcaloides.