



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

FACULTAD DE FARMACIA

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL SUR

**ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE  
*Salvia elegans*, ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD  
CEREBRO VASCULAR**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN FARMACIA**

QUE PRESENTA

**IBT. GUADALUPE ANISLADA SANTIBÁÑEZ GARCÍA**

**CODIRECTORES DE TESIS:**

Dr. Enrique Jiménez Ferrer

Dra. Verónica Rodríguez López

**CUERNAVACA, MORELOS**

**MAYO, 2019**



Cuernavaca, Morelos a 20 de marzo de 2019  
Folio: FF/D/SAC/ CIP /MF/044/2019

**I.B.T. GUADALUPE ANISLADA SANTIBÁÑEZ GARCÍA**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "**Estudio farmacocinético de los compuestos activos de *Salvia elegans*, útiles en el tratamiento de la Enfermedad Cerebro Vascular**"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE: Dr. Germán Bernal Fernández**

**SECRETARIO: Dr. Juan Gabriel Navarrete**

**V.1. Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez**

**V.2. Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**

**V.3. Dr. Rodolfo Abarca Vargas**

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
***Por una humanidad culta***  
*Una universidad de excelencia*



**Dr. Julio César Rivera Leyva.**

**Jefatura de Posgrado**



ccp: archivo: Dr. German Bernal Fernández, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez  
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Rodolfo Abarca Vargas

mitv

El presente trabajo se realizó en:



Los laboratorios de fitoquímica y farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos; bajo la dirección del Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer, la Dra. Maribel Herrera Ruíz, el Dr. Manasés González Cortázar y el Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

Agradezco a CONACYT el apoyo otorgado para la realización de este trabajo, desde enero 2017 a enero 2019, con número de becario 825903.

De igual forma agradezco al Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo económico brindado durante el periodo 2018-2019, con número de matrícula 99188275.

**Yo te instruiré y te guiaré por  
el mejor camino para tu vida;  
yo te aconsejaré y velaré por  
ti.**

**Salmo 32:8**

## AGRADECIMIENTOS

He escuchado decir que, el éxito no es un accidente. Es trabajo duro, perseverancia, aprendizaje, sacrificio, amor por lo que haces, o estás aprendiendo a hacer. A lo largo de mi proceso de formación, en el Centro de Investigación Biomédica del Sur, donde realicé el presente trabajo, encontré una gran cantidad de personas dedicadas a construir y compartir su éxito. Hoy quiero agradecer a todas ellas por haber formado parte de mi crecimiento profesional, y hacerles saber que, directa o indirectamente, se encuentran plasmadas aquí sus opiniones, correcciones, apoyo, acompañamiento, y ánimos en los momentos difíciles y de felicidad.

En primer lugar, a mi codirector de tesis, Enrique Jiménez Ferrer, por brindarme la oportunidad de participar con su grupo de investigación, apoyarme y brindarme su confianza. Su capacidad y paciencia para guiar mis ideas, han sido un aporte invaluable para el desarrollo de este trabajo. Es la imagen clara de un líder, y me siento privilegiada de que haya compartido conmigo su sabiduría y experiencia. Le agradezco de igual forma, la facilidad de los medios necesarios para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo del estudio. Gracias por ser la fuente de motivación y curiosidad en este par de años. La pasión con la que se entrega a su labor es el camino que he decidido seguir.

Un agradecimiento especial a los Doctores: Manasés González, Alejandro Zamilpa, Maribel Herrera y Jaime Tortoriello, por abrirme ampliamente las puertas del conocimiento en este centro, sin su aceptación no hubiera concluido con esta extensa preparación.

Doctor Manasés, gracias por insistir continuamente en mis avances ante la falta de constancia que en ocasiones aparentaba, le estoy muy agradecida por sus consejos, por motivarme a ser mejor, abrirme los ojos ante nuevas oportunidades y demostrar que todos los días pueden ser alegres, sin importar lo mal que vayan las cosas. Doctor Ale, gracias por el entusiasmo que imprime en cada una de las tareas que realiza, por repartir generosamente su inteligencia con todos los que aprendemos a diario de usted, y confiar plenamente en que el conocimiento debe compartirse para acrecentarlo. Es increíble encontrar personas tan sencillas y valiosas como ustedes. Gracias a ambos por hacer la química mucho más sencilla.

Dra. Verónica Rodríguez, gracias por las facilidades otorgadas para que a través de la máxima casa de estudios del Estado de Morelos, UAEM, y de la Facultad de Farmacia, de la que usted honorablemente forma parte, pudiera alcanzar esta meta, sin sus recomendaciones, observaciones y apoyo, esto hubiera sido un camino complicado. Doctora Vero, el gran aporte con su vasto conocimiento en el área de productos naturales, me llevó a determinar que lo que hago en este momento va más allá de un conocimiento intelectual, uno también debe venerar lo que hace, su orientación, mucho más que útil, es indiscutible, sus comentarios y sugerencias le dieron el realce propicio a esta investigación.

De igual forma, agradezco a las personas en CIBIS, tanto a mis compañeros como al personal que labora dentro de la institución. Gracias Lolita Pérez, Ixchel Gómez, Jonathan Orduño, Arturo Pérez, por mencionar algunos, que hicieron el trabajo mucho más sencillo, divertido y agradable. A mis compañeros de los diferentes laboratorios Ricardo Rodríguez (por las gomitas), Anita Gutiérrez, Abraham Gómez, Isis López, Jonathan Cortés, Jade Serrano, y a todos los que compartieron su valioso conocimiento conmigo, y su maravillosa amistad, gracias por los increíbles y entretenidos momentos.

## DEDICATORIAS

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”

Teresa de Calcuta

Mar, antes que nada y que nadie sabes que este trabajo es para ti. Cada uno de mis triunfos, metas, sueños, aspiraciones y deseos en la vida te los dedico a ti, todo aquello que he cumplido y mucho más te pertenece. Gracias por ser la luz que guía mi camino en todo momento. Sin tu tenacidad, soporte y amor incondicional nunca habría llegado tan lejos. Gracias por convertirme en la princesa de tus fantasías, sé que aún me queda mucho por recorrer, pero tengo la certeza de que la vida y tú, me han llevado por el camino que tienen planeado para mí. Te dedico toda la felicidad, frustraciones, lágrimas, energía y satisfacción que están impresas en cada una de las letras de mi tesis. Sabes que te amo y estoy bendecida por tener a la mejor mamá del Universo. Aunque te encuentres cerca o lejos sé que siempre estás sosteniendo mi mano. Te amo infinitamente, mucho más allá de lo que la vida me permita.

Altair, te dedico los anhelos que tengo escritos en este proyecto, eres el compañero de vida con el que dichosamente he podido compartir desde que llegaste a este mundo. Gracias por hacerme una mejor persona, porque sin saberlo me hiciste avanzar con el afán de que pudiera enseñarte mis pasos. Aunque la vida nos lleve por trayectos distintos siempre debes saber que voy a apoyarte. Ha sido maravilloso crecer con alguien como tú, alguien en quien apoyarse, alguien con quien contar, no desearía poner a nadie más en tu lugar. Vive tus sueños, hazlos realidad.

Este escrito también está dedicado a mis abuelitos, gracias por hacer los días más alegres, por llenarlos de vida, por hacerme entender que las cosas no siempre serán sencillas pero que todo tiene un arreglo. Son la motivación necesaria para saber que la edad nunca será excusa para dejar de luchar y trabajar por todo lo que deseo, son mi inspiración y la fuerza para salir todos los días a construir los cimientos sobre los que deseo poner el éxito que me aguarda. El amor es el regalo más grande que nos han brindado de una generación a otra. Lo único que me queda decirles, es que deseo que sean “eternos”.

No todos habremos aprendido lo que realmente es ser *un humano*. Antes de que la hora llegue a nuestra puerta. Porque hay ángeles que nacen sin plumas y sin vuelo. Adrián, me has mostrado que las cosas extraordinarias llegan siempre en el momento adecuado, que no existen decisiones equivocadas, y que todas mis decisiones me llevan a aprender de ellas, o a un mejor lugar. Hoy la vida me ha puesto en ese lugar. Gracias por la maravilla de conocerte y coincidir en este momento, por impulsarme a ser mejor y sobre todo por no permitir que me conforme con lo que tengo, por ser el presente que hoy deseo vivir. Por tu apoyo y cariño, gracias.

## CONTENIDO

	Página
Índice General.....	i
Índice Figuras.....	v
Índice Tablas.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
2.1. Enfermedad Cerebrovascular.....	7
2.2. Incidencia mundial y nacional de la ECV.....	8
2.3. Factores de riesgo relacionados con la ECV.....	10
2.4. Hipertensión en la ECV.....	11
2.5. Tratamiento de la hipertensión y ECV.....	12
2.6. <i>Salvia elegans</i> Vahl.....	13
2.7. Farmacología y biodisponibilidad de los compuestos activos contra ECV presentes en <i>Salvia elegans</i> .....	18
2.7.1. Ácido cafeico.....	20
2.7.2. Ácido rosmarínico.....	21
2.7.3. Jaceosidina.....	22
2.8. Validación.....	23
2.8.1. Selectividad.....	24
2.8.2. Recobro.....	24
2.8.3. Linealidad.....	25
2.8.4. Límite de detección.....	25
2.8.5. Límite de cuantificación.....	26
2.8.6. Precisión.....	27
2.8.6.1. Repetibilidad.....	27

2.8.6.2.	Reproducibilidad.....	28
2.8.7.	Exactitud.....	28
2.8.8.	Estabilidad.....	29
2.9.	Análisis del comportamiento farmacocinético.....	30
2.9.1.	Modelo monocompartimental.....	31
2.9.2.	Modelo bicompartimental.....	36
2.9.3	Diagnósticos para la evaluación de modelos farmacocinéticos.....	39
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>43</b>
5.1.	Objetivos particulares.....	43
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
6.1.	Colecta de material vegetal.....	44
6.2.	Obtención de la fracción de acetato de etilo de <i>Salvia elegans</i> .....	44
6.3.	Separación química de la fracción activa de <i>Salvia elegans</i> .....	45
6.3.1.	Identificación de los compuestos AC, AR y JC.....	46
6.4.	Animales.....	47
6.5.	Obtención de matriz de trabajo.....	47
6.6.	Preparación de soluciones stock y solución de trabajo.....	47
6.7.	Curvas de calibración de AC, AR y JC de la fracción activa de <i>Salvia elegans</i> .....	48
6.8.	Método de extracción de compuestos en plasma.....	48
6.9.	Condiciones de análisis por CLAR.....	49
6.10.	Validación del método analítico para la cuantificación de compuestos activos.....	50
6.10.1.	Puntos de control para validación de método de cuantificación de AC, AR y JC.....	50
6.10.2.	Rendimiento de extracción de los compuestos AC, AR y JC en plasma.....	50
6.10.3.	Selectividad.....	51
6.10.4.	Linealidad.....	51

6.10.5.	Límite de detección (LDD).....	52
6.10.6.	Límite de cuantificación (LDC).....	52
6.10.7.	Precisión.....	52
6.10.7.1	Repetibilidad.....	52
6.10.7.2	Reproducibilidad (Precisión Intermedia).....	53
6.10.8.	Exactitud.....	53
6.10.9.	Estabilidad.....	53
6.10.9.1	Estabilidad de congelación y descongelación.....	54
6.10.9.2	Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente (24 horas).....	54
6.10.9.3	Estabilidad a temperatura de congelamiento (-70°C).....	54
6.11.	Estudio Farmacocinético.....	54
6.11.1.	Administración de la fracción activa SeASC <sub>2</sub> R <sub>1</sub> y obtención de muestras sanguíneas .....	54
6.11.2.	Análisis Farmacocinético.....	55
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
7.1.	Rendimiento de extracción.....	56
7.2.	Determinación de la composición química de la fracción activa SeASC <sub>2</sub> R <sub>1</sub> .....	56
7.3.	Validación del método analítico para cuantificación de los compuestos activos presentes en la fracción SeASC <sub>2</sub> R <sub>1</sub> .....	58
7.3.1.	Rendimiento de extracción de los compuestos en plasma.....	58
7.3.2.	Selectividad.....	60
7.3.3.	Curvas de calibración.....	60
7.3.4.	Linealidad.....	60
7.3.5.	Límites de detección y cuantificación.....	60
7.3.6.	Precisión.....	64
7.3.6.1	Repetibilidad.....	64
7.3.6.2	Reproducibilidad.....	64
7.3.7.	Exactitud.....	65
7.3.8.	Estabilidad.....	65
7.4.	Estudio Farmacocinético preliminar.....	69
7.5.	Parámetros farmacocinéticos de ácido cafeico en un modelo monocompartimental y bicompartimental.....	72

7.6.	Parámetros farmacocinéticos de ácido rosmarínico en un modelo monocompartimental y bicompartimental.....	75
7.7.	Parámetros farmacocinéticos de jaceosidina en un modelo monocompartimental y bicompartimental.....	78
8.	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
9.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>
10.	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Frecuencia de los subtipos de la enfermedad cerebrovascular.....	7
Figura 2.	Número total de defunciones y tasa de mortalidad general atribuidas a enfermedad cerebrovascular en México.....	9
Figura 3.	Distribución de la frecuencia de casos de muerte a 30 días de ocurrido el evento cerebrovascular agudo, de acuerdo a las cifras de presión arterial sistólica.....	11
Figura 4.	<i>Salvia elegans</i> .....	13
Figura 5.	Efecto producido por la administración de diferentes tratamientos sobre la latencia de escape de ratones ICR.....	14
Figura 6.	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración cerebral de Malondialdehído (MDA) de ratones ICR.....	15
Figura 7.	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de glutatión reductasa cerebral de ratones ICR.....	16
Figura 8.	Efecto de diferentes tratamientos sobre la hipertensión provocada por la administración crónica de AGII.....	17
Figura 9.	Inhibición de ECA por los compuestos aislados de <i>Salvia elegans</i> .....	18
Figura 10.	Estructura química de ácido cafeico, ácido rosmarínico y jaceosidina.....	19
Figura 11.	Representación del modelo monocompartimental de administración extravasal.....	31
Figura 12.	Representación gráfica de la curva semilogarítmica de niveles plasmáticos posterior a la administración extravasal.....	33
Figura 13.	Representación del modelo bicompartimental de administración extravasal.....	36
Figura 14.	Planteamiento diferencial de la variación de la concentración de fármaco por unidad de tiempo en el compartimiento central.....	36
Figura 15.	Curva representativa de una administración extravasal en la que se exponen los parámetros $C_{max}$ y $t_{max}$ .....	37
Figura 16.	Cromatografía en columna abierta (CCA).....	45
Figura 17.	Cromatopla de composición química de la fracción SeASC <sub>2</sub> R <sub>1</sub> .....	56
Figura 18.	Comparación de los cromatogramas de la fracción SeASC <sub>2</sub> R <sub>1</sub> , y estándares de AC, AR y JC.....	57

Figura 19. Cromatogramas típicos de compuestos en plasma de ratón.....	61
Figura 20. Cromatogramas típicos de la curva de calibración a distintos puntos de concentración.....	62
Figura 21. Linealidad del método de cuantificación para los compuestos AC, AR y JC.....	63
Figura 22. Promedio de concentración de AC, AR y JC, posterior a los tres ciclos de congelamiento y descongelamiento.....	66
Figura 23. Promedio de concentración de AC, AR y JC posterior a 24 h en el automuestreador a T = 25°C.....	67
Figura 24. Promedio del porcentaje de desviación de la concentración en evaluación de estabilidad en almacenamiento a -70°C.....	68
Figura 25. Perfil farmacocinético preliminar de ácido cafeico.....	69
Figura 26. Perfil farmacocinético preliminar de ácido rosmarínico.....	70
Figura 27. Perfil farmacocinético preliminar de jaceosidina.....	71
Figura 28. Curva aritmética concentración-tiempo de ácido cafeico en plasma.....	74
Figura 29. Curva semilogarítmica concentración-tiempo de ácido cafeico en plasma...	75
Figura 30. Curva aritmética concentración-tiempo de ácido rosmarínico en plasma.....	77
Figura 31. Curva semilogarítmica concentración-tiempo de ácido rosmarínico en plasma.....	78
Figura 32. Curva aritmética concentración-tiempo de jaceosidina en plasma.....	80
Figura 33. Curva semilogarítmica concentración-tiempo de jaceosidina en plasma.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Efecto de producido por la administración de diferentes tratamientos sobre concentración de diferentes citosinas en cerebro de ratones ICR.....	15
Tabla 2.	Fraccionamiento cromatográfico de SeAS.....	45
Tabla 3.	Separación química de SeASC <sub>1</sub> R <sub>1</sub> .....	46
Tabla 4.	Concentraciones de AC, AR y JC en la curva de calibración.....	48
Tabla 5.	Parámetros del método analítico por CLAR.....	49
Tabla 6.	Puntos de control para validación del método de cuantificación de AC, AR y JC.....	50
Tabla 7.	Parámetros de análisis de datos por CLAR.....	57
Tabla 8.	Evaluación del porcentaje de recobro de AC, AR y JC en plasma.....	58
Tabla 9.	Límites de detección y de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma.....	60
Tabla 10.	Repetibilidad del método de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma.....	64
Tabla 11.	Reproducibilidad del método de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma.....	64
Tabla 12.	Exactitud del método de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma.....	65
Tabla 13.	Concentraciones plasmáticas de ácido cafeico de 0 a 240 minutos.....	69
Tabla 14.	Concentraciones plasmáticas de ácido rosmarínico de 0 a 240 minutos.....	70
Tabla 15.	Concentraciones plasmáticas de jaceosidina de 0 a 240 minutos.....	71
Tabla 16.	Variaciones de concentración de AC en plasma de ratón en las primeras cuatro horas posteriores a la administración.....	72
Tabla 17.	Parámetros farmacocinéticos de ácido cafeico en plasma de ratón.....	73
Tabla 18.	Variaciones de concentración de AR en plasma de ratón en las primeras cuatro horas posteriores a la administración.....	75
Tabla 19.	Parámetros farmacocinéticos de ácido rosmarínico en plasma de ratón.....	76
Tabla 20.	Variaciones de concentración de JC en plasma de ratón en las primeras cuatro horas posteriores a la administración.....	78
Tabla 21.	Parámetros farmacocinéticos de jaceosidina en plasma de ratón.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido cafeico
ABC	Área bajo la curva
ADME	Procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
AG II	Angiotensina II
AIC	Criterio de Información de Akaike
AIT	Ataque Isquémico Transitorio
AR	Ácido rosmarínico
ARA II	Antagonistas de los receptores de la angiotensina II
BC	Bicompartimental
BHE	Barrera hematoencefálica
CC	Compartimiento Central
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
$C_{max}$	Concentración máxima
CP	Compartimiento Periférico
CV%	Coeficiente de variación
D	Dosis
DE	Desviación estándar
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECV	Enfermedad Cerebrovascular
EI	Estándar interno
EE	Error estándar
FA	Fracción activa
FDA	Food and Drugs Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FR	Factores de riesgo
FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral
g	Gramos
GBD	Global Burden Disease
HA	Hidroalcohólico

HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
HIC	Hemorragia intracerebral
HTA	Hipertensión arterial
IC	Infarto Cerebral
IECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
JC	Jaceosidina
$k_a$	Constante de absorción
$k_{12}$	Constante de distribución del fármaco del compartimiento central al periférico
$k_{21}$	Constante de retorno del periférico al central
$k_{10}$	Constante de eliminación del fármaco
kg	Kilogramos
L	Litros
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
MC	Monocompartimental
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MRT	Tiempo Medio de Residencia
MX	Meloxicam
n	Número de repeticiones
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión arterial
$Q_a$	Fármaco absorbido
$r^2$	Coefficiente de correlación
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
rpm	Revoluciones por minuto

SC	Criterio de Schwarz
SeAS	Extracto de acetato de etilo
SeBuOH	Extracto butanólico
SeHA	Extracto hidroalcohólico
SEM	Error estándar de la media
SINAIS	Sistema Nacional de Información en Salud
SNC	Sistema Nervioso Central
SS	Suma de cuadrados
SSI	Solución salina isotónica
ST	Solución de trabajo
$t_{a\frac{1}{2}}$	Semivida de absorción
Tel	Telmisartán
TFA	Ácido trifluoroacético
$t_{\max}$	Tiempo máximo
TR	Tiempo de retención
USP	United States Pharmacopea
UV	Ultravioleta
V	Volumen
$V_d$	Volumen de distribución
Veh	Vehículo
$\alpha$	Constante de decaimiento en el compartimiento central
$\beta$	Constante de decaimiento en el compartimiento periférico
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\lambda$	Longitud de onda
$\bar{x}$	Promedio

## RESUMEN

La Enfermedad Cerebrovascular (ECV), ocupa uno de los primeros lugares como causa de muerte, a nivel mundial y nacional. Se sabe que existen diversos factores de riesgo asociados a la ECV: la hipertensión arterial, se ha determinado como el factor de riesgo más importante, al estar presente en más de la mitad de los pacientes con ECV. Por lo que el desarrollo de terapias farmacológicas efectivas contra este factor de riesgo asociado, es de orden prioritario. Por lo anterior, se realizó una caracterización farmacocinética de una fracción activa, con efecto antihipertensivo, evaluado previamente con la intención de determinar parámetros útiles en el desarrollo de un nuevo tratamiento preventivo de la ECV.

Los compuestos activos contenidos en la fracción estandarizada, se obtuvieron a partir de un extracto de acetato de etilo de *Salvia elegans*, esta planta ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional para la reducción de la presión arterial, así como los estudios realizados que prueban su efecto ansiolítico y antidepresivo, por lo cual se propone diseñar un fitomedicamento útil en el tratamiento de la ECV. En la fracción, se encontraron los compuestos ácido cafeico (AC), ácido rosmarínico (AR) y jaceosidina (JC), como compuestos mayoritarios y farmacológicamente activos.

El proceso de validación del método analítico, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), se realizó previo al estudio farmacocinético, con el fin de evaluar los parámetros: selectividad, recobro, linealidad, límite de detección (LDD), límite de cuantificación (LDC), precisión, exactitud, y estabilidad; para asegurar que la cuantificación de las concentraciones de los compuestos en muestras de plasma se realizara correctamente.

El estudio farmacocinético se llevó a cabo en ratones cepa ICR, los cuales recibieron una administración oral de la fracción activa a una dosis única de 500 mg/kg, de acuerdo a la estandarización de la fracción, la dosis contenía: 8.5 mg/kg de AC, 20 mg/kg AR y 70 mg/kg de JC. El análisis de las concentraciones a través del tiempo se desarrolló con el complemento en Microsoft Excel, PKSolver, evaluando para modelos monocompartimentales y bicompartimentales. Una vez obtenidos los parámetros farmacocinéticos se procedió a seleccionar los modelos con mejor ajuste del sistema para cada compuesto, basado en los valores del Criterio de Información de Akaike (AIC) y el criterio de Schwarz (SC).

El AC se detectó en plasma dos minutos posteriores a la administración oral, alcanzando concentraciones de 3.63  $\mu\text{g/mL}$ . Entre los principales parámetros farmacocinéticos se determinó una  $C_{\text{max}}$  de 3.01  $\mu\text{g/mL}$  a un  $t_{\text{max}}$  de 10.74 min para el modelo monocompartimental, mientras que para el modelo bicompartmental se obtuvieron  $C_{\text{max}}$  de 3.14  $\mu\text{g/mL}$ , a los 9.31 min. Para el  $\text{AUC}_{0 \rightarrow 240\text{min}}$  se observaron valores promedio de 227.12 y 222.25  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ , respectivamente, a partir de los cuales se pudo definir un comportamiento monocompartimental del compuesto.

Respecto al AR, se obtuvo un  $\text{AUC}_{0 \rightarrow 240\text{min}}$  con valores promedio de 100.69 y 149.57  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$  en cada modelo. La  $C_{\text{max}}$  observada en el modelo monocompartimental es de 8.10  $\mu\text{g/mL}$ , la cual se alcanzó rápidamente un  $t_{\text{max}}$  de 4.35 min, con una  $k_a$  de 0.31  $\text{min}^{-1}$ ; los valores para los mismos parámetros en el modelo bicompartmental son: 8.12  $\mu\text{g/mL}$  de  $C_{\text{max}}$ , a los 4.16 min, con una  $k_a$  de 0.27  $\text{min}^{-1}$ , su presencia en plasma se pudo detectar desde el mismo tiempo que el AC, sin embargo, este compuesto tiene un mejor ajuste al modelo bicompartmental de forma gráfica.

Finalmente, la JC tuvo una rápida disminución, alcanzando su concentración máxima en tiempos muy cortos, con un tiempo de residencia media en el modelo bicompartmental de 45.40 min. Este mismo modelo, se eligió como descriptor del comportamiento farmacocinético del compuesto. El estudio de las concentraciones de los compuestos en la fracción con actividad antihipertensiva, proporcionan una aproximación de sus comportamientos en los procesos de absorción, distribución y excreción del fármaco, para ser implementados en el desarrollo de un potencial fitomedicamento.

## ABSTRACT

The Vascular Brain Disease (VBD) is among the leading causes of death, worldwide and nationally. It is known that there are several risk factors associated with this disease. Arterial hypertension has been determined as the most important risk factor, being present in more than half of patients with VBD, so the development of pharmacological therapies effective against this associated risk factor, is of priority order. Therefore, in the present work a pharmacokinetic characterization of an active fraction was carried out, which had previously been proven its potential antihypertensive effect, for determining useful parameters in the development of a new phytomedicine.

The active compounds contained in a standardized fraction, were obtained from an extract of ethyl acetate of *Salvia elegans*, this plant has been widely used in traditional medicine for the reduction of blood pressure. In the fraction, the compounds caffeic acid (CA), rosmarinic acid (RA) and jaceosidin (JC) were found, as major and pharmacologically active compounds.

The process of validation of the analytical method, high performance liquid chromatography (HPLC), was carried out prior to the pharmacokinetic study, in order to evaluate the parameters: selectivity, recovery, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy, and stability; to ensure that the quantification of the concentrations of the compounds in plasma samples will be carried out correctly.

The pharmacokinetic study was carried out in ICR strain mice, which received an oral administration of the active fraction at a single dose of 500 mg/kg, according to the standardization of the fraction, the dose contained: 8.5 mg/kg of CA, 20 mg/kg RA and 70 mg/kg of JC. The analysis of the concentrations through time was developed with the complement in Microsoft Excel, PKSolver, evaluating for one-compartment and two-compartment models. Once the pharmacokinetic parameters were obtained, the models with the best adjustment of the system for each compound were selected, based on the values of the Akaike Information Criterion (AIC) and the Schwarz (SC) criterion.

CA was detected in plasma two minutes after oral administration, reaching concentrations of 3.63  $\mu\text{g/mL}$ . Among the main pharmacokinetic parameters,  $C_{\text{max}}$  of 3.01  $\mu\text{g/mL}$  was determined at a  $t_{\text{max}}$  of 10.74 min for the one-compartment model, while for the two-compartment model  $C_{\text{max}}$  of 3.14  $\mu\text{g/mL}$  was obtained at 9.31 min. For the  $\text{AUC}_{0 \rightarrow 240\text{min}}$ , mean values of 227.12 and 222.25  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$  were observed, respectively, from which a one-compartment behavior of the compound could be defined.

Regarding RA, an  $\text{AUC}_{0 \rightarrow 240\text{min}}$  was obtained with average values of 100.69 and 149.57  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$  in each model. The  $C_{\text{max}}$  observed in the one-compartment model is 8.10  $\mu\text{g/mL}$ , which was quickly reached at a  $t_{\text{max}}$  of 4.35 min, with a  $k_a$  of 0.31  $\text{min}^{-1}$ ; the values for the same parameters in the two-compartment model are: 8.12  $\mu\text{g/mL}$  of  $C_{\text{max}}$ , at 4.16 min, with a  $k_a$  of 0.27  $\text{min}^{-1}$ , its presence in plasma could be detected from the same time as the CA. However, this compound has a better fit to the two-compartment model graphically.

Finally, the JC had a rapid decrease, reaching its maximum concentration in very short times, with an average residence time in the two-compartment model of 45.40 min, this same model was chosen as a descriptor of the compound's pharmacokinetic behavior. The study of the concentrations of the compounds in the fraction with antihypertensive activity, provide an approximation of their behavior in the processes of absorption, distribution and excretion of the drug, to be implemented in the development of a potential phytomedicine.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (ECV), se encuentra entre las principales causas de mortalidad tanto a nivel mundial como nacional entre la población (INEGI, 2016; OMS, 2015). Este padecimiento se describe como una alteración en las neuronas, que provoca la disminución de flujo sanguíneo en el cerebro, acompañada de alteraciones cerebrales de manera momentánea o permanente (IMSS, 2015). La EVC ocurre principalmente en países en vías de desarrollo, en México por ejemplo, tiene una incidencia acumulativa de 232.2 por cada 100,000 personas; mientras que la prevalencia entre personas de más de 60 años es de 18.2 por cada 1000 personas (Márquez-Romero *et al.*, 2013; Rodríguez, 2016).

El recurso destinado al cuidado y tratamiento del paciente para esta enfermedad y en su recuperación, supone un importante problema de salud y gasto sanitario (Feiging *et al.*, 2016; Rodríguez, 2016), por lo que es requerida una prevención con base en la identificación y el control de los principales factores de riesgo modificables en la enfermedad, tales como la hipertensión arterial (HTA, Alcalá & González, 2007; Murray *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2010). A pesar del vasto número de tratamientos para la HTA, la presencia de reacciones adversas de dichos fármacos, provocan la suspensión por parte del paciente, por lo que se busca el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, como la generación de nuevos fármacos, a partir del estudio de plantas medicinales (Bragulat & Antonio, 2001; Segura, 2006; Tabassum & Ahmad, 2011).

*Salvia elegans* Vahl., es una especie vegetal que ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional en algunos padecimientos del Sistema Nervioso Central (SNC), tales como la ansiedad y la depresión (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006; Mora *et al.*, 2006). El uso de esta planta, basado en infusiones de sus flores y hojas para la reducción de la presión arterial consigue la actividad terapéutica más popular que esta especie tiene en la medicina tradicional. Jiménez-Ferrer y colaboradores (2010), reportan la medición de la respuesta aguda de la presión sanguínea a la administración de angiotensina II (AG II), el efecto inhibitorio *in vitro* en la enzima convertidora de angiotensina (ECA), así como la caracterización farmacológica de las fracciones del extracto obtenido; donde señalan una disminución significativa en la presión sanguínea posterior a la administración del extracto hidroalcohólico (SeHA), mientras que la fracción del extracto butanólico (SeBuOH), y una fracción derivada del mismo mostraron una actividad inhibitoria de la ECA del 78.40% y del 82.61%, respectivamente, comparados con lisinopril (87.18%). En dichas fracciones, se encontraron compuestos principales del tipo flavonoides y fenilpropanoides.

Lo anterior, plantea una propuesta del uso de *S. elegans* como un potencial fitomedicamento, por lo cual deben establecerse en un principio los compuestos mayoritarios y activos dentro de la fracción, para posteriormente cuantificar la concentración en plasma de cada uno de dichos compuestos, a través de una evaluación farmacocinética.

Con el fin proporcionar resultados fiables y adecuados para dicho propósito se diseñó y se llevó a cabo un proceso de validación del método de cuantificación que se empleó para el análisis de las muestras, y recolección de los valores de concentración de cada compuesto presentes en el plasma a determinados tiempos, previamente establecidos. Una vez obtenidos dichos valores, el estudio farmacocinético de los analitos de interés se realizó para determinar las constantes farmacocinéticas en modo preclínico, otorgando una aproximación del comportamiento de los fitofármacos incluidos en la fracción activa a lo largo de su circulación en el organismo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La enfermedad cerebrovascular (ECV), también conocida como *ictus*, es un conjunto de trastornos clínicos caracterizados por síntomas y signos neurológicos que derivan de la disminución de flujo sanguíneo en el cerebro. Dichos síntomas pueden persistir por 24 horas o más, e incluso pueden llevar a la muerte sin ninguna otra causa evidente, más que el daño de origen vascular (Ruiz-Sandoval *et al.*, 2010; Cabrera *et al.*, 2008;).

Se clasifican en dos subtipos: isquémica y hemorrágica. La isquemia cerebral, es la consecuencia de la oclusión de una arteria interrumpiendo el flujo sanguíneo cerebral, con manifestaciones transitorias (ataque isquémico transitorio, AIT) o permanentes (infarto cerebral, IC). El otro tipo resulta de la ruptura de un vaso que da lugar a una colección hemática en el parénquima cerebral provocando una hemorragia intracerebral (HIC), o en el espacio subaracnoideo (Ávila, Ordóñez & Ramírez, 2012; IMSS, 2015). La forma predominante de ECV es el ictus isquémico (Figura 1), precedido por el ictus hemorrágico, con base en sus derivaciones (Arauz & Ruíz-Franco, 2012).

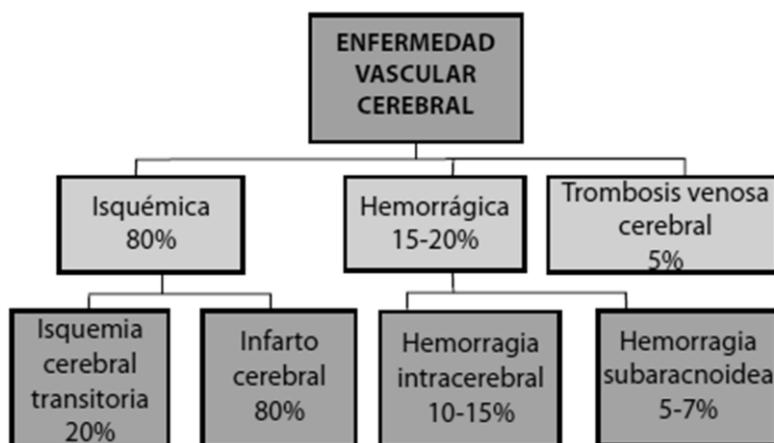


Figura 1. Frecuencia de los subtipos de la enfermedad cerebrovascular.

Adaptado de: Arauz & Ruíz-Franco (2012)

## 2.2. INCIDENCIA MUNDIAL Y NACIONAL DE LA ECV

La ECV es un problema de salud en países con transición epidemiológica. Esto es, en países desarrollados en los últimos 40 años la incidencia de ECV ha disminuido consistentemente, mientras que en países en vías de desarrollo casi se ha duplicado (Casares, 2015). Aproximadamente, 87% de las muertes relacionadas a una ECV ocurren en países de bajos y medianos ingresos (Rodríguez, 2016).

Según la OMS en 2015, del total de 56,4 millones defunciones en el mundo, 54% fueron consecuencia de las 10 principales causas de mortalidad, la ECV se posicionó en el segundo puesto, solo precedida por la cardiopatía isquémica, donde ambas ocasionaron 15 millones de defunciones en 2015 y se han mantenido como las principales causas de mortalidad durante los últimos 15 años (OMS, 2017; Arauz & Ruíz-Franco, 2012). La incidencia mundial de ECV es 1.5 a 4/1000 habitantes y la prevalencia es de 8-20/1000 habitantes, y se calcula que para el 2030, su incidencia incrementará hasta 44% (Cabrera *et al.*, 2008; OMS, 2017).

Los estimados globales del riesgo de por vida de padecer ECV incrementó del 22.8% en 1990 a 24.9% en 2016, representando un incremento relativo del 8.9% (95% intervalo de incertidumbre, 6.2 a 11.5), lo que indica una diferencia significativa (GBD, 2018).

En México, un estudio que realizó el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 2010, encontró que, a nivel nacional, existe una tendencia creciente y sostenida para la ECV (Figura 2), que implicó un incremento de 27.7% entre 2004 y 2010 (Chiquete *et al.*, 2011). En el 2015 la ECV ocupó el sexto lugar en mortalidad con 34,106 defunciones; cuarto lugar entre las mujeres, solo precedida por enfermedades del corazón, diabetes mellitus y cáncer; en hombres ocupa séptimo lugar como causa de muerte (INEGI, 2016).

Se identificó una zona geográfica con mayor carga de mortalidad por ECV, particularmente siete estados de la República presentaron una tasa de mortalidad en 2008 >30/100,000 habitantes: Ciudad de México, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Chiquete *et al.*, 2011).

La tasa de mortalidad fue de 26.9/100,000 habitantes, para el año 2015. La mortalidad por sexo, correspondió a 51.6% en mujeres y 48.4% en hombres. La edad promedio para los hombres fue de 71.9 años y para las mujeres 74.6 años (INEGI, 2016).

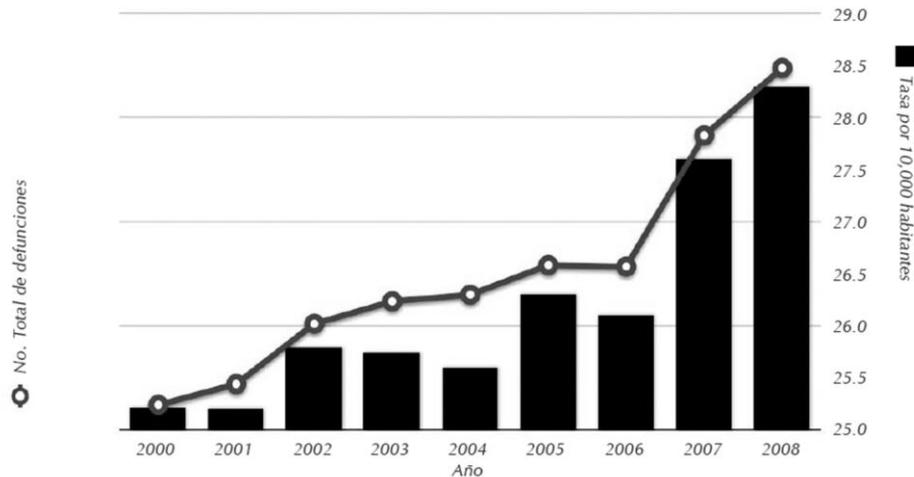


Figura 2. Número total de defunciones y tasa de mortalidad general (ambos géneros, todas las edades) por 100,000 habitantes, atribuidas a enfermedad cerebrovascular en México (Chiquete *et al.*, 2011).

Se estima que la ECV contribuye con la mitad de los problemas neurológicos atendidos en los hospitales generales en el país. Según los registros hospitalarios del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), los egresos hospitalarios por ECV atendidos en los hospitales de las principales instituciones del sector salud aumentaron 27.4% desde 2008 a 2015, lo que sitúa a la ECV entre las principales causas de hospitalización en México (Rodríguez, 2016).

Su elevada incidencia y prevalencia suponen un notable costo humano y económico. Se estima que aproximadamente 20% de los supervivientes requieren cuidados especiales durante tres meses después del evento y casi 30% quedan con una grave discapacidad permanente (Arauz & Ruíz-Franco, 2012; INEGI, 2016). Esta patología es responsable de un importante gasto sanitario por el número de recursos que se utilizan en los servicios de salud, por lo que el padecimiento se considera un problema de salud de orden prioritario en nuestro país (Rodríguez, 2016).

La ECV, se mantiene como un importante problema de salud mundial, y es posible que incremente en el futuro, debido a los cambios demográficos, incluyendo el envejecimiento de la población y las transiciones de salud observadas en países en desarrollo (Feiging *et al.*, 2016).

### 2.3. FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON LA ECV

Los factores de riesgo (FR) son las características biológicas o hábitos que identifican a un grupo de personas con mayor probabilidad de presentar una determinada enfermedad a lo largo de su vida, sin que implique obligatoriamente una relación causa-efecto (Fernández-Travieso, 2014). La identificación de los FR, permite controlarlos en los sujetos que no han padecido la enfermedad (prevención primaria) y reducir las recurrencias (prevención secundaria) (Sacco *et al.*, 2013). Debido a que ECV causa una gran mortalidad y morbilidad, se requiere prevenirla con base en la identificación y el control de los FR.

Se han podido identificar FR típicos de un primer accidente por ECV y se clasifican como FR modificables y no modificables. Ciertos FR, tiene una menor correlación con ECV, se les conoce como FR potencialmente modificables (Fernández-Travieso, 2014).

Los FR no modificables relacionados con la ECV son: edad, en personas mayores de 55 años se duplica el riesgo; sexo, las mujeres tiene una mayor prevalencia y la historia familiar de ECV. Algunos autores señalan como otro factor no modificable a la raza o la etnia (Fernández-Travieso, 2014; Santos, 2011). Entre los FR potencialmente modificables para la ECV se mencionan: uso de anticonceptivos orales, presencia de inflamación sistémica, proteína C reactiva, elevación de la lipoproteína A, hiperhomocisteinemia, síndrome metabólico y estrés oxidante (Alcalá & González, 2007; Fernández-Travieso, 2014).

El *Global Burden Disease* (GBD) 2010, indicó los 3 FR principales, los cuales son: consumo de tabaco (incluyendo fumadores pasivos), consumo de alcohol, e hipertensión; este último es el factor de riesgo mayormente relacionado con la ECV (Murray *et al.*, 2012; Alcalá & González, 2007).

El estudio INTERSTROKE, presentó pruebas de que, colectivamente, 10 factores de riesgo representaron el 88.1% del riesgo atribuible a la población para todos los ECV. Debido a que la mayoría de los FR son modificables, sugiere que las intervenciones para reducir la presión arterial, promover la actividad física, cesar el consumo de tabaco, y una dieta sana, reducirán substancialmente el problema de EVC (O'Donnell *et al.*, 2010).

## 2.4. HIPERTENSIÓN EN LA ECV

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es la enfermedad crónica más frecuente en el mundo, que afecta a 31% de la población adulta, aumentando su incidencia conjuntamente con el incremento de la edad (Bloch, 2016; Santana, 2001). Se reporta que la HTA aumenta el riesgo relativo de padecer ECV 3.1 en hombres y 2.9 en mujeres, en comparación con pacientes normotensos; así, el riesgo atribuible para EVC es de 56% para hombres y 66% para mujeres hipertensos en ambos casos, así la HAS constituye el factor de riesgo más importante para eventos isquémicos y hemorrágicos y se le encuentra en el 70% de los pacientes con ECV (Cabrera, 2008; Pedelty & Goreick, 2008).

Las evidencias sustentan el beneficio de aplicar terapia antihipertensiva para la reducción entre un 35 a un 44% de la incidencia de ictus; por lo que se recomienda la reducción de la presión sistólica/diastólica a <140/90 mmHg, con límites más restringidos para algunos subgrupos de mayor riesgo, como los diabéticos (<120/85 mmHg) (Lawes, Vander-Hoorn & Rodgers, 2008).

En el estudio realizado por Baños-González *et al.* (2011), se evaluó el desenlace clínico final posterior al ECV agudo (Figura 3).

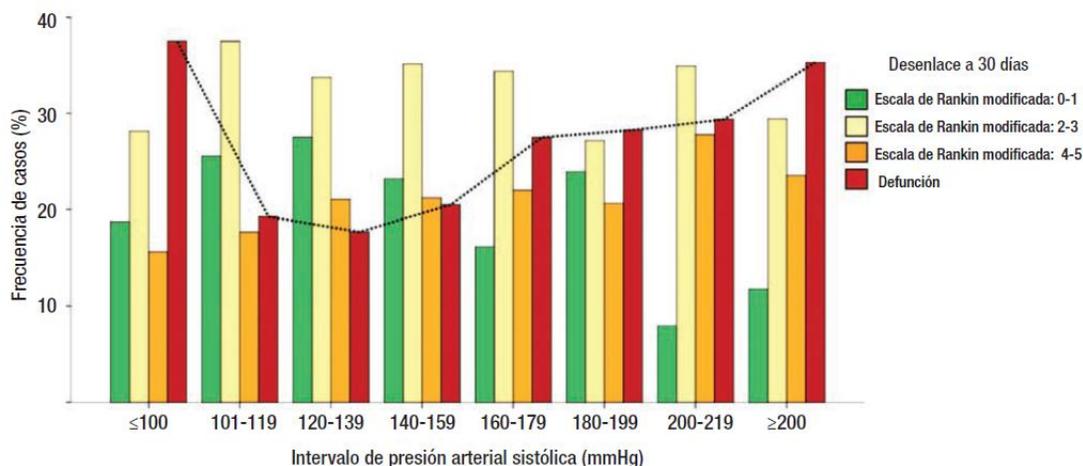


Figura 3. Distribución de la frecuencia de casos de muerte a 30 días de ocurrido el evento cerebrovascular agudo, de acuerdo a las cifras de presión arterial sistólica. Se utilizó la escala de Rankin modificada que incluye los siguientes grados de discapacidad: 0=recuperación completa, 1=síntomas leves, 2=leve con independencia en actividades de vida cotidiana, 3=moderada, 4=moderada a grave, 5=grave incluyendo estado vegetativo persistente, y finalmente, defunción (Baños-González *et al.*, 2011).

## 2.5. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y ECV

Los fármacos antihipertensivos por su mecanismo de acción, se clasifican en: diuréticos, antagonistas beta-adrenérgicos, bloqueadores de canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), y antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II); Los pacientes con HT que reciben un tratamiento antihipertensivo regular, la mayoría (80.1%) recibe un inhibidor de la ECA I, seguido de los antagonistas beta-adrenérgicos (46.2%), bloqueadores de canales de calcio (44.6%) y diuréticos (35.7%) (Bragulat & Antonio, 2001, Baños-González *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la reducción de ictus es proporcional a la magnitud de reducción de la presión arterial. Sin embargo, en la prevención secundaria de ictus isquémico se han realizado estudios con diversos antihipertensivos, con resultados variables. Los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos no han mostrado beneficios significativos. Los diuréticos han obtenido resultados contradictorios con un estudio positivo con indapamida 2.5 mg/día. Los IECA como ramipril 10 mg/día, o el tratamiento combinado de perindopril (4 mg/día) e indapamida (2.5 mg/día) reducen el riesgo de ictus recurrentes, aún en pacientes sin antecedentes de HTA. Con respecto a los ARA-II, se han ensayado eprosartán, que ha sido superior a nitrendipino; telmisartán, no superior a placebo y similar a ramipril, y la combinación de telmisartán y ramipril que asocia mayor frecuencia de efectos secundarios sin beneficio significativo (Fuentes *et al.*, 2012).

Su uso se basa en: presencia de enfermedades asociadas, efectividad, efectos secundarios, tolerancia o impacto sobre la calidad de vida (Bragulat & Antonio, 2001). Sin embargo, los tratamientos farmacológicos pueden presentar reacciones adversas como: depresión, trastornos gastrointestinales, fatiga, pesadillas, trastornos hepáticos, vértigos, entre otros que constituyen, probablemente, la causa más importante de incumplimiento terapéutico en pacientes de edad avanzada (Córdoba, 1996).

## 2.6. *Salvia elegans* Vahl.

*Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae). Es un arbusto perenne nativo de México y Guatemala, que alcanza de 80 cm a 2 m de altura, con flores tubulares rojas y hojas ovaladas verde pálido, pubescentes por ambas caras; tallo con características similares de color y textura (Figura 4). Crece en clima templado, asociada a bosques de pino-encino, entre los 2,280 a los 3,100 msnm (Figuroa, 2009; CONABIO, 2009; MBG, 2012).

Las hojas y flores de *S. elegans* son comestibles y se emplean contra el dolor de estómago, el insomnio; en cataplasmas se emplea para tratar edema, golpes y dolores postparto (CONABIO, 2009). Otros usos ampliamente difundidos son el tratamiento de la ansiedad y la reducción de la presión arterial, los cuales son las actividades terapéuticas más populares de la planta, tales actividades han sido comprobadas por estudios farmacológicos (Herrera-Ruíz *et al.*, 2006; Martínez-Hernández, 2015).



Figura 4. *Salvia elegans*, fotografiada en Jardín Botánico de San Francisco (Hunt, 2006).

En primer término, el efecto sobre sistema nervioso central (SNC) resulta en la actividad ansiolítica y antidepresiva como lo reportó Herrera-Ruíz, *et al.*, (2006) y la actividad neuroprotectora al disminuir daño por neuroinflamación y estrés oxidante secundarios a hipertensión arterial crónica (Martínez-Hernández, 2015); estos efectos se asocian con la presencia jaceosidina y ácido rosmarínico (Martínez-Hernández, 2015).

Como se destaca de la Figura 5, la hipertensión arterial crónica, genera daño neurológico evidenciado por la pérdida de memoria espacial (laberinto acuático de Morris), derivada de la afectación vascular secundaria a hipertensión. Este efecto es contrarrestado por la administración de extractos y fracciones de *S. elegans*.

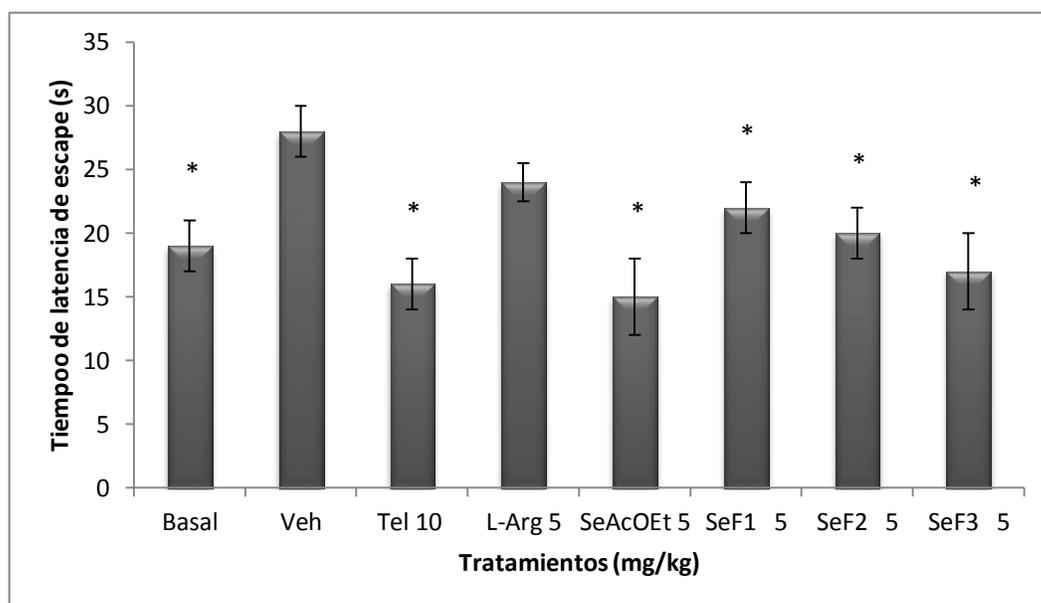


Figura 5. Efecto producido por la administración de diferentes tratamientos sobre la latencia de escape de ratones ICR. Grupo basal, animales sin tratamiento. (Veh) Grupo de daño, administración diaria de AGII por 12 semanas 0.2  $\mu$ g/kg i.p. Grupos control positivo (Tel) telmisartán 10 mg/kg v.o. y (L-Arg) L-arginina 5 mg/kg v.o., ambos mas AGII crónica. Grupos de tratamientos (SeAcOEt) extracto de acetato de etilo *S. hispánica* 5 mg/kg v.o.; (SeF1) *S. elegans* fracción 1, 5 mg/kg v.o.; (SeF2 5) *S. elegans* fracción 2, 5 mg/kg v.o. (SeF3 5) *S. elegans* fracción 3, 5 mg/kg v.o. Prueba del Laberinto Acuático de Morris desde el cuadrante contrario de la plataforma. Los datos son media  $\pm$  DE., \* $p < 0.01$  ANOVA Vs. Veh *post hoc* Dunnet (n=12) (Martínez-Hernández, 2015).

Este daño neurológico es provocado por estado proinflamatorio presente en el cerebro bajo condiciones de hipertensión (Tabla 1). La principales interleucinas pro inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6), en el cerebro de ratones expuestos a hipertensión, muestran un aumento significativo; este incremento en el nivel de interleucinas es controlado por el tratamiento con *S. elegans*.

Tabla 1. Efecto de producido por la administración de diferentes tratamientos sobre concentración de diferentes citocinas en cerebro de ratones ICR. Los datos son media  $\pm$  DE., \* $p < 0.05$  ANOVA Vs. Veh *post hoc* Tukey (n=12) (Martínez-Hernández, 2015).

Tratamiento mg/kg	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	IL-4
Basal	55.9 $\pm$ 9.0*	3.1 $\pm$ 1.72*	848.9 $\pm$ 32.2*	280.2 $\pm$ 71.9*	57.9 $\pm$ 3.5*
Veh	146.3 $\pm$ 0.3	19.6 $\pm$ 3.9	971.6 $\pm$ 16.3	386.5 $\pm$ 48.9	71.0 $\pm$ 6.1
Tel 10	149.0 $\pm$ 12.6	13.1 $\pm$ 5.7*	818.0 $\pm$ 15.3*	437.7 $\pm$ 67.7	71.1 $\pm$ 8.3
L-Arg 5	149 $\pm$ 15.1	13.7 $\pm$ 5.7*	910.0 $\pm$ 59.1*	264.2 $\pm$ 63.0*	62.5 $\pm$ 8.4
SeAcOEt 5	66.9 $\pm$ 11.0*	4.6 $\pm$ 1.2*	1115.8 $\pm$ 83.4*	84.6 $\pm$ 10.0*	99.9 $\pm$ 14.4*
SeF1 5	59.8 $\pm$ 1.1*	19.6 $\pm$ 8.5*	1150.4 $\pm$ 53.8*	99.5 $\pm$ 37.6*	90.5 $\pm$ 6.8*
SeF2 5	17.5 $\pm$ 2.6*	10.4 $\pm$ 4.2*	799.3 $\pm$ 50.8*	85.8 $\pm$ 44.2*	75.2 $\pm$ 8.3
SeF3 5	52.6 $\pm$ 4.5*	12.1 $\pm$ 2.7*	1344 $\pm$ 61.2*	72.6 $\pm$ 9.7*	77.8 $\pm$ 9.5

Por otro lado, la hipertensión provoca el daño neurológico asociado estrés oxidante (Figura 6); la administración crónica de angiotensina II (AGII), aumenta en una vez y media la concentración cerebral de Malondialdehído (marcador de lipoperoxidación provocada ROS).

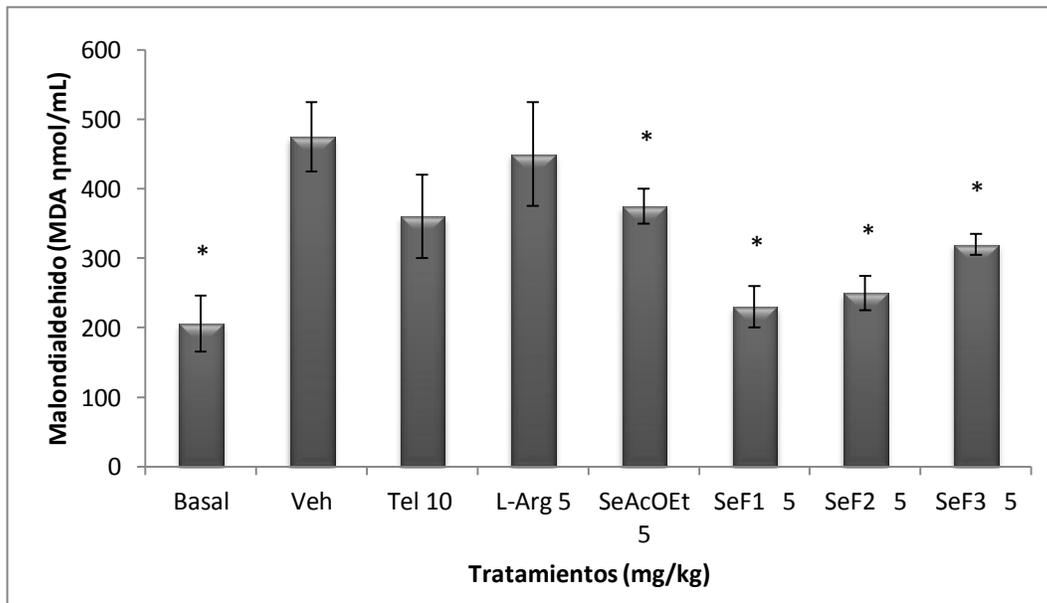


Figura 6. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración cerebral de Malondialdehído (MDA) de ratones ICR. Los datos son media  $\pm$  DE., \* $p < 0.05$  ANOVA Vs. Veh *post hoc* Tukey (n=12) (Martínez-Hernández, 2015).

El estrés oxidante disminuye por el tratamiento con extracto y fracciones de *S. elegans*. En el mismo sentido, el estrés oxidante en cerebro incrementa la actividad de glutatión reductasa (Figura 7) y nuevamente el tratamiento con *S. elegans* disminuye, la condición de daño, pues se observa un descenso en la actividad de la enzima.

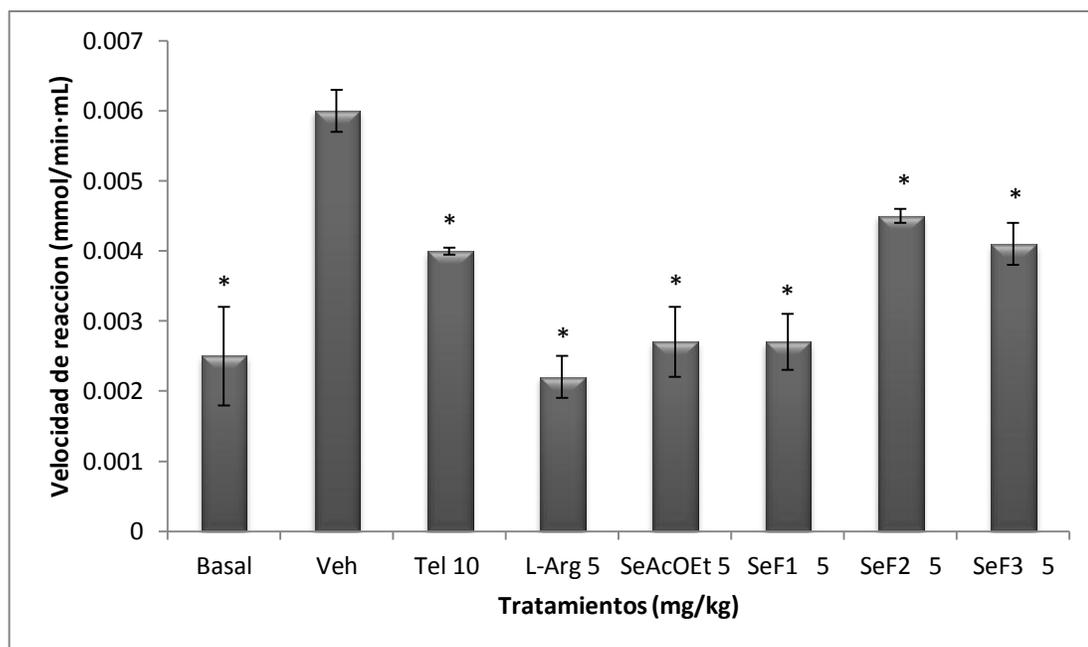


Figura 7. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de glutatión reductasa cerebral de ratones ICR. Los datos son media  $\pm$  DE., \* $p < 0.05$  ANOVA Vs. Veh *post hoc* Tukey (n=12) (Martínez-Hernández, 2015).

Adicionalmente, se ha descrito efecto antihipertensivo como se observa en la figura 8, asociado a la capacidad como inhibidor de la ECA (IECA) y antagonista de la angiotensina II (ARAI) (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2010; Marquina, *et al.*, 2008).

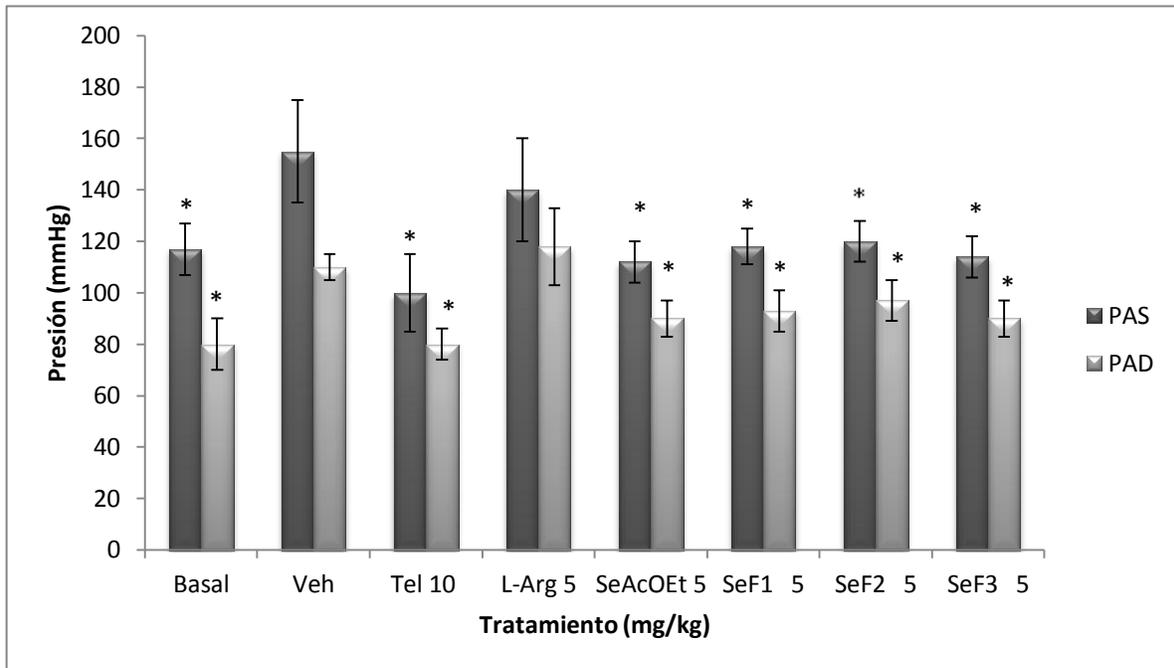


Figura 8. Efecto de diferentes tratamientos sobre la hipertensión provocada por la administración crónica de AGII. Basal, sin tratamiento; (Veh), grupo control negativo administración diaria de AGII por 12 semanas 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p. Controles positivos, (Tel) telmisartán + AGII crónico, (L-Arg)L-arginina;(SeAcOEt) extracto de acetato de etilo de *S. elegans* + AGII;(SeF1) Fracción F1 de *S. elegans* + AGII; (SeF2) Fracción F2 de *S. elegans* + AGII; (SeF3) Fracción F3 de *S. elegans* + AGII. Los datos son media  $\pm$  DE., \* $p < 0.05$  ANOVA Vs. Veh, post hoc Tukey (n=12) (Martínez-Hernández, 2015).

La hipertensión es una respuesta adaptativa para disminuir el estrés sobre las paredes de la vasculatura, al proteger a la microvasculatura cerebral de un colapso (Baumbach *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2014). La falla de este mecanismo de protección produce alteraciones de la barrera hematoencefálica (BHE), provocando edema cerebral (Pires *et al.*, 2013; Sadoshima *et al.*, 1983; Benjo *et al.*, 2007). Por otro lado, la hipertensión derivada de disfunción endotelial provoca daño vascular por remodelamiento y rigidez arterial, lo que explica porque ECV genera daño cognitivo (Waldstein *et al.*, 2008), al reducir el Flujo Sanguíneo Cerebral (FSC), que preceden a las alteraciones cerebrovasculares o lesiones en la materia blanca (Brickman *et al.*, 2009).

## 2.7. FARMACOLOGÍA Y BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA ECV PRESENTES EN *Salvia elegans*

En estudios fitoquímicos previos, realizando un fraccionamiento biodirigido, se elucidó la estructura química de los compuestos activos de *S. elegans* para el tratamiento de ECV. Los principios activos presentes en los extractos y fracciones (Figura 9), con la actividad farmacológica referida son: ácidos fenilpropanoides como ácido rosmarínico (73% IECA, ) y ácido cafeico; las flavonas 5-O-rutinósido de isosacuranetina (71% IECA), neoeriocitrina (100% IECA); triterpenos pentacíclicos como antiinflamatorios, flavonoides vasorelajantes, tales como jaceosidina, al provocar liberación de óxido nítrico y ARAll, entre otros (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2010; Marquina *et al.*, 2008; Gutiérrez-Román, 2018; Sánchez-Sánchez, 2017). Por todo esto, se ha propuesto una fracción estandarizada en tres compuestos activos y mayoritarios (Figura 10) de *S. elegans* como posible tratamiento contra ECV.

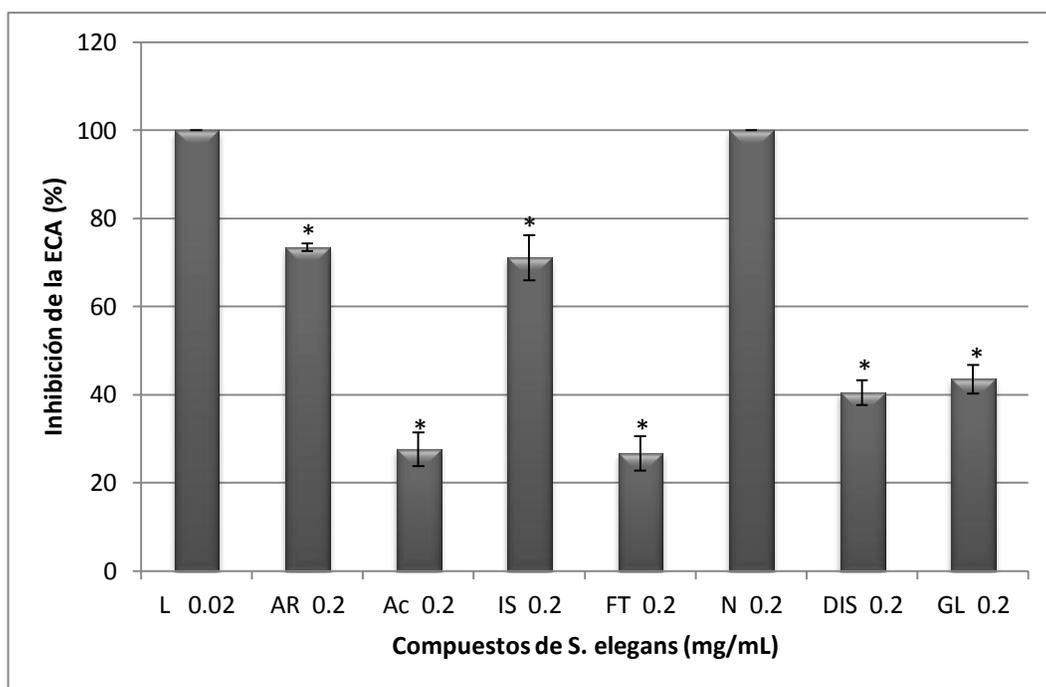


Figura 9. Inhibición de ECA por los compuestos aislados de *S. elegans*. Control Lisinopril (L), ácido rosmarínico (AR), ácido cafeico (AC), 5-O-rutinósido de isosacuranetina (IS), flavonas trimetoxiladas (FT), neoeriocitrina (N), derivado de isosacuranetina (DIS), glucósido de luteolina (GL). Las barras son media  $\pm$  EE., \* $p < 0.01$  ANOVA Vs. Lisinopril, *post hoc* Tukey (n=3) (Gutiérrez-Román, 2018).

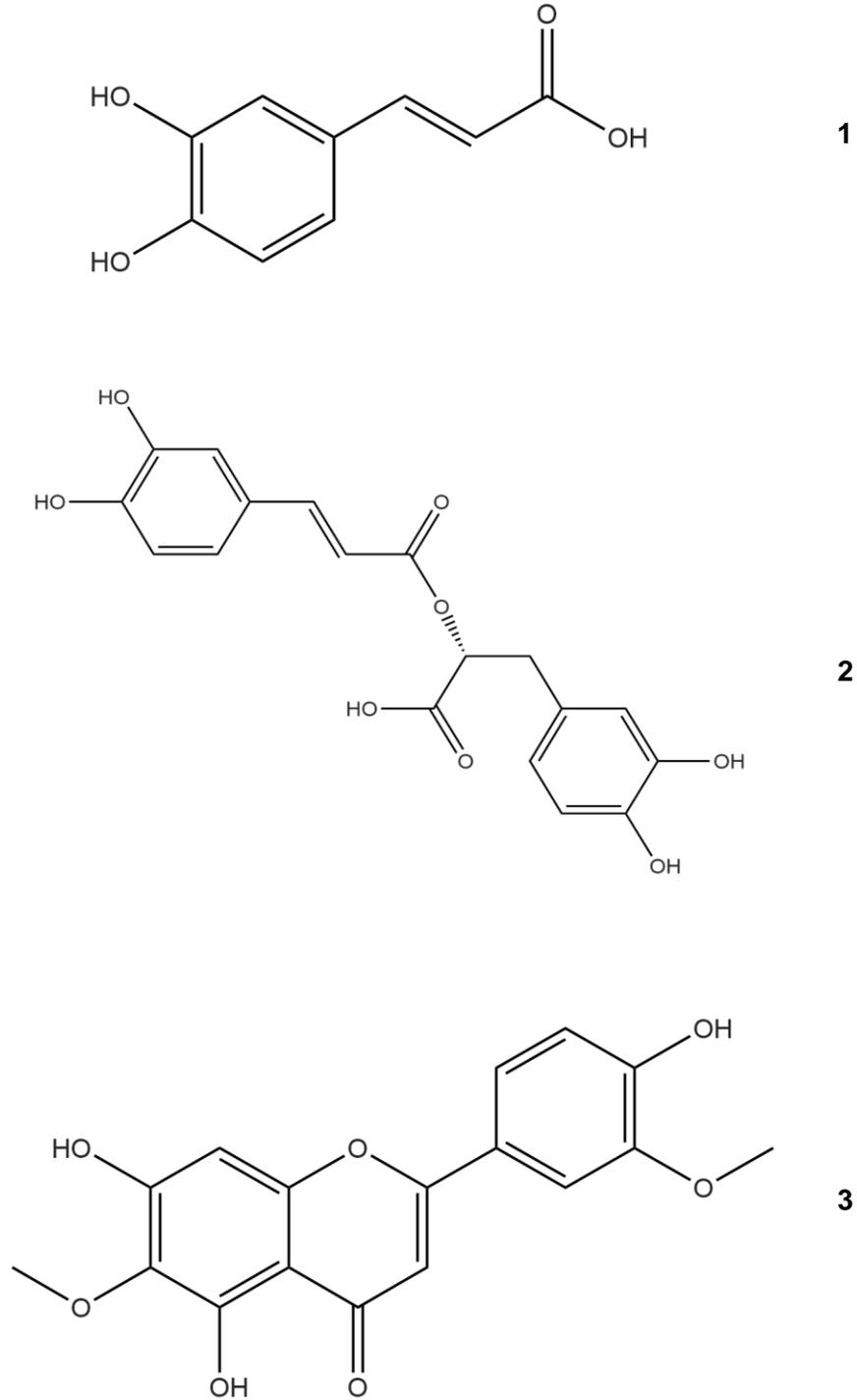


Figura 10. Estructura química de (1) ácido cafeico (AC), (2) ácido rosmarínico (AR) y (3) jaceosidina (JC); compuestos activos y mayoritarios de una fracción de *Salvia elegans* como posible tratamiento contra Enfermedad Cerebrovascular.

El tratamiento de ECV con base en el extracto estandarizado de *S. elegans* por administración oral, se sustenta en la biodisponibilidad de los fitofármacos en el sitio blanco. Por lo que se expuso anteriormente, los compuestos activos a los que se le daría seguimiento son: ácido cafeico (AC), ácido rosmarínico (AR), y jaceosidina (JC). El efecto farmacológico dependerá de la biodisponibilidad de los compuestos activos en el blanco farmacológico; es decir, que se alcance una concentración determinada en la vasculatura sistémica y SNC.

### 2.7.1. ÁCIDO CAFEICO

El ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico; AC), es uno de los metabolitos de hidroxycinamato o fenilpropanoide ampliamente distribuido en tejidos vegetales (Magnani *et al.*, 2014). Este ácido fenólico está presente en muchas fuentes de alimentos; frecuentemente en frutas, granos y suplementos dietéticos para el consumo humano (Hao *et al.*, 2015). Además de los alimentos, el ácido cafeico está presente en varios medicamentos de uso popular, basado principalmente en propóleos (Magnani *et al.*, 2014; Lustosa, *et al.*, 2008).

Se sabe que actúa como un inhibidor carcinogénico (Huang & Ferraro, 1992; Greenwald, 2004), tiene actividad antibacteriana *in vitro*; además de actividad antioxidante, y fuerte actividad como agente antihipertensivo tanto en modelos *in vitro* (Actis-Goretta *et al.*, 2006) como *in vivo* (Li *et al.*, 2005), se demostró la posibilidad de utilizar el AC y sus derivados en el tratamiento de la hipertensión a través de la modulación del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) (Bhullar *et al.*, 2014); con lo que puede contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Magnani *et al.*, 2014; Sánchez-Moreno, 2000).

Por lo cual, la biodisponibilidad de este potencial fitofármaco ha sido ampliamente estudiada, observando que gran parte del compuesto se metaboliza rápidamente (De Ferrass *et al.*, 2014), por lo que sus concentraciones de forma intacta son significativamente bajas respecto a sus conjugados metilo, glucoronilo y sulfato (Nardini *et al.*, 2016), siguiendo patrones cinéticos bifásicos en plasma, que generalmente resultan del metabolismo que ocurre en múltiples tejidos y a diferentes sitios dentro del tracto gastrointestinal (Azzini *et al.*, 2007).

### 2.7.2. ÁCIDO ROSMARÍNICO

El ácido rosmarínico (AR), es un compuesto polifenólico derivado del AC y del ácido 3,4-dihidroxifenilacético, comúnmente encontrado en varias familias de plantas (Pereira *et al.*, 2005). Diversos estudios han reportado el papel del AR en la actividad biológica de estas plantas, así como, sus aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas (Amoah *et al.*, 2016).

Dichas actividades farmacológicas, han recibido una considerable atención, llevando a cabo evaluaciones *in vitro* e *in vivo*. Entre ellas se encuentran efectos como antimutagénico, antígenotóxico, citotóxico, antitumoral, antihemorrágico, antitrombótico, inmunomodulatorio, antiinflamatorio, antioxidante, entre otros (Aung *et al.*, 2010; Boonyarikpunchai *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2005; Youn *et al.*, 2003); otorgando su posicionamiento como un potencial fitofármaco. Dentro de las múltiples actividades del AR, cabe resaltar los estudios realizados para su evaluación en la disminución de la presión arterial, así como neuroprotector, los cuales son de interés esencial al desarrollar un fármaco para el tratamiento de ECV.

Ferreira *et al.* (2018), evaluaron el efecto inhibitorio de la ECA y la presión arterial en un modelo de hipertensión inducido en ratas, observando un decremento efectivo de la presión arterial de forma selectiva, únicamente en animales hipertensos; la actividad de la ECA, se redujo hasta un 98.86% con una concentración de 173  $\mu\text{M}$  en el estudio *in vitro* en el tejido de pulmón de rata. Por otro lado, Luan *et al.* (2013), determinó el efecto del AR en un sistema experimental de accidente cerebrovascular diabético isquémico, reportando que a dosis mayores a 50 mg/kg, el AR produjo un potencial neuroprotector significativo, con una ventana de tiempo terapéutica favorable a esta dosis incluso después de una administración retardada de hasta 5 horas.

Se han comparado tanto la permeabilidad como la biotransformación del AR, como un compuesto puro, y en extractos herbales usando monocapas de células Caco-2 epiteliales intestinales humanas, donde se reportó que la mayoría del AR que se encontraba en el lado apical de las células no se transportó, y que la permeación ocurrió principalmente vía difusión paracelular (Konishi & Kobayashi, 2005). Baba *et al.* (2004), demostró que el AR es rápidamente absorbido, y que una gran cantidad del compuesto absorbido es degradado y metabolizado en formas conjugadas de los ácidos cafeico, ferúlico y *m*-coumárico.

### 2.7.3. JACEOSIDINA

La jaceosidina (4',5,7-trihidroxi-3',6-dimetoxiflavona) es una flavona, reportada como farmacológicamente activa, está presente como un constituyente principal en las plantas medicinales del género *Artemisia* (Ji *et al.*, 2010), también ha sido descubierta en *Eupaeorium lindleyanum*, *Paronychia argentea*, *Lantana balansae*, así como en *Salvia elegans* (Maldonado *et al.*, 2016; Sadhu *et al.*, 2006; Sait *et al.*, 2015; Sánchez-Sánchez, 2017).

Se ha reportado una variedad de actividades biológicas en diversos escenarios experimentales, con efecto antioxidante y antiinflamatorio (Clavin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Moscatelli *et al.*, 2006), además, juega un papel en la supresión inmune (Yin *et al.*, 2008). La JC ha mostrado un efecto positivo en la promoción de la angiogénesis (Lee *et al.*, 2014), y ha probado su efectividad contra células tumorales, a través del arresto del ciclo celular y la inducción de apoptosis (Khan *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2005).

Finalmente, Nam *et al.* (2012), evaluó el papel de esta flavona en el SNC, con la determinación del efecto de la JC en la microglía y la neuroinflamación. La microglía es un tipo de células inmunes innatas en el sistema nervioso central, y juegan un papel central en el inicio y mantenimiento de la neuroinflamación. En el estudio, se reportó que la jaceosidina inhibe la activación inflamatoria de la microglía, reduciendo la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de citocinas pro inflamatorias. La neuroinflamación crónica impulsada por la microglía ha sido considerada como un culpable de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple (Gao *et al.*, 2003; McGeer & McGeer, 2007; Ock *et al.*, 2010).

El metabolismo y absorción de las flavonas, ha sido sujeto de diversos estudios, mostrando que algunos compuestos y sus glucósidos simples se absorben rápidamente (Shimoi *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2008). Aunque se ha mostrado que las flavonas se absorben sistémicamente, pueden encontrarse típicamente en plasma u orina como glucurónidos o metabolitos sulfatados, en lugar de la flavona original (Cova *et al.*, 1992; Wittemer *et al.*, 2005). Por lo que, la rápida absorción y eliminación, así como, la eficiencia de absorción deficiente se considera consistentes con este tipo de flavonoides, mostrado concentraciones muy bajas de las flavonas comparadas con su consumo (Manach *et al.*, 2005).

## 2.8. VALIDACIÓN

Un aspecto crítico que se debe considerar en la cuantificación de los compuestos activos presentes en el sistema, es el método analítico y su validación. Considerando que el primero de ellos, se refiere a la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben de cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra. Un analito, se define como un componente específico de una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico de una muestra, y como todo proceso de medición, este debe de ser confiable para ser utilizado con un propósito definido (USP, 2008).

Por lo anterior, la validación del método analítico, asegura la calidad debido a la demostración apropiada de que cumplen con todos los requerimientos que aseguren la confiabilidad de los resultados obtenidos. La validación del método analítico se realiza mediante estudios experimentales rigurosamente documentados, por lo que se han descrito requisitos regulatorios de validación (FDA, 2006). Tanto la *Food and Drugs Administration* (FDA), como la *United States Pharmacopea* (USP), y la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (FEUM), tienen vital interés en la validación de los métodos analíticos (Synder *et al.*, 1997). Ya que, permite asegurar la calidad de los medicamentos que se fabrican, reducir la posibilidad de rechazos y/o reproceso, optimizar los procesos, incrementar la competitividad y productividad de la organización, y cumplir con un requerimiento oficial.

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 define el término validación como “la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado” (NOM, 1998).

La FDA (2018), presenta, en su guía de validación para métodos bioanalíticos, el desarrollo de un método analítico que incluye la optimización de los siguientes parámetros bioanalíticos, para garantizar que el método es adecuado para la validación: selectividad, recobro, linealidad, límite de detección (LDD), límite de cuantificación (LDC), precisión, exactitud, y estabilidad.

### 2.8.1. SELECTIVIDAD

Durante el desarrollo del método, la FDA (2018) indica que el analista, debe verificar que la sustancia que se está midiendo sea el analito deseado para minimizar o evitar la interferencia. La selectividad del método se demuestra analizando muestras en blanco de la matriz biológica apropiada de al menos seis fuentes individuales. Los estándares internos, también deben evaluarse para evitar interferencias con el o los analitos. Las posibles sustancias interferentes en una matriz biológica incluyen componentes de la matriz endógena, como metabolitos, productos de descomposición, medicamentos concomitantes y otros xenobióticos. El analista debe confirmar que los blancos deben estar libres de interferencias en los tiempos de retención del analito(s) y el estándar interno (EI).

### 2.8.2. RECOBRO

El porcentaje de recuperación o porcentaje de recobro (%R) es un parámetro que se basa en la eficiencia del método de extracción para cada analito de una muestra fortificada intencionalmente, es decir, permite ver el rendimiento del método en cuanto al proceso de extracción y la cantidad de analito existente en la muestra original. Para su determinación, se debe extraer cada muestra blanco de matriz, posteriormente se adiciona el analito y el estándar interno (EI) en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente. Se comparan las respuestas analíticas obtenidas respecto a las respuestas del analito y el EI en solución (FDA, 2018). Finalmente, es calculado conforme a la siguiente fórmula:

$$\%R = \left( \frac{R_{AM}/R_{EM}}{R_{AS}/R_{ES}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

$R_{AM}$  = Respuesta del analito extraído

$R_{EM}$  = Respuesta del EI extraído

$R_{AS}$  = Respuesta del analito en solución

$R_{ES}$  = Respuesta del EI en solución

### **2.8.3. LINEALIDAD**

Se conoce como linealidad a la capacidad de un método de análisis, de mostrar una respuesta del instrumento que sea proporcional a la concentración del material de referencia de estudio. La linealidad del método se determina en: un blanco (sin analito, sin EI), un calibrador cero (blanco más EI) y al menos seis niveles de calibrador distintos de cero que cubran el rango de cuantificación, incluido el límite de cuantificación (LDC) en cada ejecución. Las concentraciones fortificadas de preferencia deben estar espaciadas uniformemente para su evaluación (SAGARPA, 2017).

Una vez que se grafica la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x), se examina visualmente la curva de calibración para ver si es lineal e identificar si existe alguna meseta de saturación. Enseguida se realiza una regresión lineal, así como análisis de residuales para confirmar la relación lineal de la variable dependiente con la independiente. El intervalo lineal debe considerar el nivel de calibración más bajo, el cual es menor al LDC pero mayor al límite de detección (LDD) (ICH, 2005).

Los criterios de aceptación para la linealidad en matriz El coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0.98 y 1.00 ( $0.98 < r < 1.00$ ), el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor de 0.995 ( $r^2 > 0.995$ ), los residuales de las concentraciones distintas de cero deben ser de  $\pm 15\%$  de las concentraciones nominales (teóricas), excepto en LDC, donde el residual debe ser de  $\pm 20\%$  de las concentraciones nominales en cada ejecución de validación (FDA, 2018; SAGARPA, 2017).

### **2.8.4. LÍMITE DE DETECCIÓN**

El límite de detección (LDD) es la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada por un método analítico, pero no necesariamente cuantificada bajo condiciones experimentales establecidas. Para determinar el LDD se recomienda al menos seis mediciones de blanco matriz, así como muestras extraídas a diferentes concentraciones por debajo del límite de cuantificación del analito.

Se puede determinar el límite de detección teórico a través de la cuantificación de blancos de matriz por medio de una curva de calibración del analito; esta determinación sirve como referencia de partida para conocer la concentración candidata del límite de detección. Dicha concentración candidata debe ser comprobada experimentalmente con métodos instrumentales (ICH, 2005; SAGARPA, 2017).

La determinación del LDD basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, puede ser expresada como:

$$LDD = \frac{3.3 \cdot Sb_o}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

$Sb_o$  = Error típico de la ordenada al origen

m = Pendiente de curva de calibración

### **2.8.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

El límite de cuantificación (LDC) es la concentración mínima de la sustancia de interés que puede ser cuantificada de manera confiable, es decir que sea exacta y precisa. El límite de cuantificación es un parámetro de los ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra, y se usa particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación (SAGARPA, 2017).

Por lo que el desarrollo experimental para el límite de cuantificación se realiza fortificando la concentración candidata, con un mínimo de seis repeticiones, y se evalúa con el promedio y la desviación estándar del porcentaje de recobro o concentraciones medidas, en el nivel candidato de LDC (SAGARPA, 2017).

La evaluación del límite de cuantificación debe cumplir con los criterios de aceptación de exactitud y precisión que se evalúan con un coeficiente de variación menor al 20%. La determinación del LDC basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, puede ser expresada como (ICH, 2005):

$$LDD = \frac{10 \cdot Sb_o}{m} \quad \text{Ecuación 3}$$

Dónde:

$Sb_o$  = Error típico de la ordenada al origen

$m$  = Pendiente de curva de calibración

### **2.8.6. PRECISIÓN**

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como el porcentaje del coeficiente de variación (CV%) de los resultados (ISPCh, 2010).

#### **2.8.6.1. Repetibilidad**

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. Se puede determinar analizando en un mismo día al menos por triplicado las siguientes muestras control: LDQ y puntos de control con concentraciones baja, media y alta (ISPCh, 2010; NOM, 1998).

Para su evaluación, se procede a calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración, calculando el promedio de la concentración ( $\bar{x}$ ) de los diferentes niveles, la desviación estándar (DE) y el porcentaje del coeficiente de variación (CV%). El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% para métodos cromatográficos (ISPCh, 2010; NOM, 1998).

### **2.8.6.2. Reproducibilidad**

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. Los factores que influyen en la evaluación de la reproducibilidad pueden ser diferente analista, diferente instrumento y/o en diferentes periodos de tiempo (ISPCh, 2010).

La repetibilidad se evalúa con el promedio y la desviación estándar del porcentaje de recobro de al menos dos pruebas de repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad (Castillo & González, 1996).

La evaluación de la reproducibilidad debe de cumplir con los criterios de aceptación para el promedio global del porcentaje de recobro, el cual debe estar en el intervalo de 70-120% y el coeficiente de variación global menor al 20%. Por lo tanto al cumplirse los criterios de aceptación se concluye no existe influencia alguna y por lo tanto el método es reproducible (Castillo & González, 1996; ISPCh, 2010).

### **2.8.7. EXACTITUD**

Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él (Castillo & González, 1996). La exactitud se refiere a una estimación del valor verdadero que determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado y se puede determinar por la recuperación de las pruebas de repetibilidad como de reproducibilidad. De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (CV%). El valor promedio del CV% no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% (NOM, 1998; SAGARPA, 2017).

### **2.8.8. ESTABILIDAD**

Durante el desarrollo del método, el analista debe determinar la estabilidad química del analito en una matriz determinada, incluidos los efectos de la recolección de muestras, la manipulación y el almacenamiento del analito, por lo cual, se deben llevar a cabo las pruebas necesarias que abarquen todas las condiciones a las que se sometió la muestra a lo largo del análisis. Entre las evaluaciones de estabilidad que se deben realizar, se encuentran (FDA, 2018):

- Estabilidad a corto plazo. El analista debe demostrar la estabilidad del (os) analito(s) en la matriz biológica a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra.
- Estabilidad a largo plazo. El analista debe determinar la estabilidad del (os) analito(s) en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo de tiempo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.
- Estabilidad ciclos de congelación-descongelación. El analista debe evaluar la estabilidad del(os) analito(s) en la matriz biológica, almacenadas a la temperatura de congelación en que estarán las muestras reales por al menos 12 h, descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación debe ser al menos de 3 ciclos.

Los experimentos de estabilidad relacionados con la matriz deben comparar la respuesta del analito en los puntos de control establecidos (alto, medio y bajo) con las curvas de calibración recién preparadas y contra los puntos de control recién preparados, dicha evaluación se realiza por triplicado. Las muestras control son interpoladas en una curva de calibración y las concentraciones obtenidas son comparadas contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal (FDA, 2018; NOM, 1998).

## 2.9. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO

La farmacocinética, puede definirse como el estudio del comportamiento de la disponibilidad de los fármacos dependiente de la temporalidad y sus metabolitos en el organismo. A través del análisis cinético de las curvas concentración/tiempo o cantidad/tiempo, las cuales son obtenidas a partir de muestras de fluidos orgánicos (Doménech *et al.*, 2001). Estableciendo la cuantificación de concentración plasmática contra tiempo de los compuestos activos, para definir los parámetros asociados con absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de dichos compuestos.

Tomando como ejemplo un fármaco administrado por vía oral, sufre el proceso de absorción en el tracto gastrointestinal, el cual transfiere el fármaco desde el sitio de administración a la circulación general o sistémica. Una vez que alcanza la circulación sistémica tiene lugar su distribución por el organismo, a medida que aumentan las concentraciones en la sangre, el fármaco se transfiere de manera reversible desde la circulación general a los tejidos. Posteriormente, retorna de los tejidos hacia la sangre, cuando las concentraciones en sangre disminuyen, se llega a un estado de equilibrio en la distribución. Desde el momento de la llegada del fármaco a circulación sanguínea, al mismo tiempo que se establece el equilibrio en la distribución, tiene lugar la eliminación. Esta involucra al metabolismo, mediante el cual la molécula del fármaco se transforma en una molécula diferente, y se excreta. En la excreción, la molécula del fármaco se expulsa en los "desechos" líquidos, sólidos o gaseosos del cuerpo (Doménech *et al.*, 2010; Waller & Sampson, 2018).

Para establecer una adecuada descripción de la evolución temporal de los niveles del fármaco, se recurre a modelos en los que se expresan de forma matemática las velocidades de los procesos ADME. Para ello, se desarrollan ecuaciones que permiten describir y predecir las cantidades o concentraciones del fármaco en el cuerpo en función del tiempo. Los modelos compartimentales son ampliamente usados en farmacocinética, en los que se describe al compartimiento como un concepto meramente cinético y no necesariamente fisiológico, y se define como la representación de una fracción de material biológico en el que el fármaco se supone uniformemente distribuido, con propiedades cinéticas semejantes. De forma práctica, se recurre a la simplificación del organismo en el mínimo número posible de compartimientos (de uno a tres), siempre que pueda lograrse una descripción farmacocinética adecuada (Doménech *et al.*, 2010).

### 2.9.1. MODELO MONOCOMPARTIMENTAL

El modelo monocompartimental, o de solo un compartimiento, es el modelo compartimental más sencillo. En donde el modelo considera al organismo como un compartimiento único de carácter fundamentalmente acuoso. Existen dos fases en el perfil del modelo monocompartimental: absorción y eliminación. Sin embargo, el perfil indica claramente la presencia de una sola fase en el período posterior a la absorción. Por lo que la distribución es la única propiedad que determina el modelo de compartimiento.

Al administrar vía extravascular los compuestos activos, existe una transferencia de masa desde el sitio de absorción, hacia la circulación sanguínea que tiene asociado un proceso que se establece por cambio de concentración del analito en función del tiempo. Ello definirá la velocidad de intercambio de masa y se caracteriza por el orden de reacción, que puede ser de orden 1 u orden 0. El paso del fármaco desde el sitio de absorción hacia circulación sanguínea generalmente sigue un proceso de orden 1, está representado en el siguiente esquema (Figura 11) en donde la dosis (D) del fármaco absorbida ( $Q_a$ ) se localiza en el sitio desde donde ingresa al organismo representado por la constante de absorción ( $k_a$ ), considerando al organismo como un único compartimiento donde la cantidad de fármaco presente (Q) se elimina por un proceso de orden 1 representado por la constante de eliminación ( $k_{el}$ ). (Doménech *et al*, 2010; Jambhekar & Breen, 2009).

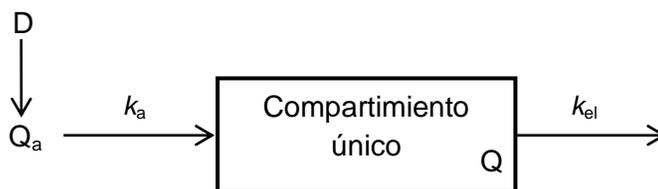


Figura 11. Representación del modelo monocompartimental de administración extravascular (Modificada de: Doménech *et al*, 2010).

La ecuación que rige la variación de la cantidad de fármaco en el organismo es, en este caso, la siguiente:

$$\frac{dQ}{dt} = k_a \cdot Q_a - k_{el} \cdot Q \quad \text{Ecuación 4}$$

En la expresión,  $k_a \cdot Q_a$  representa la velocidad de absorción del fármaco, y  $k_{el} \cdot Q$ , su velocidad de eliminación.

Es posible determinar una correlación constante entre la concentración del fármaco (C) y la cantidad de fármaco en el organismo (Q), la cual se define como:

$$Q = V_d \cdot C \quad \text{Ecuación 5}$$

La constante de proporcionalidad  $V_d$ , es conocida como volumen aparente de distribución, esta constante no se refiere a un volumen real, por lo que no tiene relación con un aspecto fisiológico. Por lo anterior, se puede determinar la variación de la concentración de fármaco por unidad de tiempo:

$$\frac{dC}{dt} = k_a \cdot A - k_{el} \cdot C \quad \text{Ecuación 6}$$

La expresión anterior, indica que la variación de la concentración de fármaco en función del tiempo, proviene de la ganancia instantánea de fármaco por absorción ( $k_a \cdot A$ ) y de la pérdida instantánea de fármaco por eliminación ( $k_{el} \cdot C$ ). A través de la integración de la ecuación 6, es posible estimar el valor de la concentración del fármaco en el organismo a cualquier tiempo considerado:

$$C = C^0 \cdot e^{-k_{el}t} - A^0 \cdot e^{-k_a t} \quad \text{Ecuación 7}$$

Se trata de un proceso biexponencial,  $C^0$  y  $A^0$  son las ordenadas al origen correspondiente a cada exponencial, formado por la diferencia entre la exponencial correspondiente al proceso de eliminación y la del proceso de absorción, respectivamente, sin embargo, en la fase terminal de la curva de los niveles plasmáticos, el valor del proceso representativo de la absorción tiende rápidamente a cero. Como resultado, la ecuación 7 se simplifica en la siguiente:

$$C = C^0 \cdot e^{-k_{el}t} \quad \text{Ecuación 8}$$

La ecuación 8 es representativa del proceso de eliminación del fármaco, dicha ecuación puede transformarse en una recta representativa de la concentración en función del tiempo, al tomar logaritmos neperianos:

$$\ln C = -k_{el} \cdot t + \ln C^0 \quad \text{Ecuación 9}$$

De acuerdo a lo anterior la pendiente representa el valor negativo de la  $k_{el}$  y la intersección corresponde a la  $C^0$ , dicha ecuación explica el modelo del tipo monocompartimental, como se muestra en la figura 12.

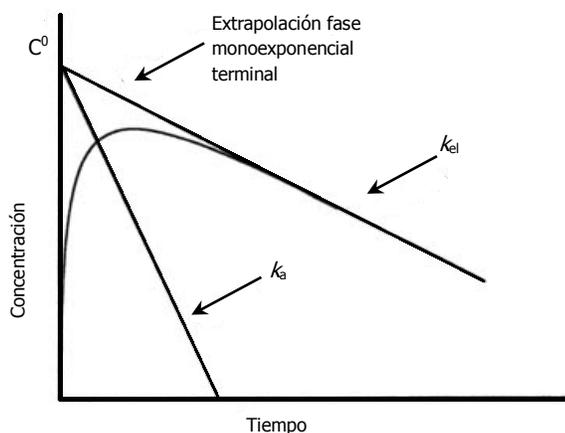


Figura 12. Representación gráfica de la curva semilogarítmica de niveles plasmáticos posterior a la administración extravasal, acompañada de las rectas representativas de los procesos de eliminación y de absorción.  $k_{el}$ : constante de velocidad de eliminación;  $k_a$ : constante de velocidad de absorción (Modificada de: Doménech *et al*, 2010).

Teniendo presente que la cinética de absorción se asume primer orden, cabe considerar el parámetro correspondiente a la semivida de absorción ( $t_{a1/2}$ ), este representa el tiempo necesario para que la cantidad disuelta o la concentración del fármaco en el lugar absorción se reduzca a la mitad. La semivida de absorción se obtiene de la siguiente expresión:

$$t_{a1/2} = \frac{\ln 2}{k_a} = \frac{0.693}{k_a} \quad \text{Ecuación 10}$$

Para la obtención del valor de  $k_a$ , podemos partir de la exponencial correspondiente al proceso de absorción, es decir:

$$A = A^0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad \text{Ecuación 11}$$

Tomando logaritmos neperianos en la ecuación 11 se obtiene la ecuación de la recta correspondiente:

$$\ln A = -k_a \cdot t + \ln A^0 \quad \text{Ecuación 12}$$

Para el cálculo del área bajo la curva (ABC) de niveles plasmáticos se trata del mismo concepto que en un modelo intravenoso: si se considera que entre dos tomas de muestra consecutivas ha transcurrido un periodo de tiempo infinitamente pequeño,  $\Delta t$ , y que la concentración plasmática promedio es  $C$ , el valor de área bajo la curva, similar a la de un rectángulo puede determinarse si se contabilizan todos los intervalos de tiempo considerados desde tiempo 0 hasta un tiempo determinado,  $t$ , y puede escribirse:

$$ABC_0^t = \sum_0^t \Delta t \cdot C \quad \text{Ecuación 13}$$

De acuerdo con la teoría de los límites, la ecuación anterior puede expresarse de la siguiente forma:

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \sum_0^t \Delta t \cdot C = ABC_0^t = \int_0^t C \cdot dt \quad \text{Ecuación 14}$$

Desde un punto de vista estrictamente matemático, el valor del área parcial bajo la curva de niveles plasmáticos,  $ABC_0^t$ , se calcula a partir de la ecuación 6, multiplicando por  $dt$ , ambos miembros e integrando entre tiempo 0 y tiempo  $t$ :

$$ABC_0^t = \frac{C^0}{k_{el}} \cdot (1 - e^{-k_{el}t}) - \frac{A^0}{k_a} \cdot (1 - e^{-k_a t}) \quad \text{Ecuación 15}$$

El valor del área total  $ABC_0^\infty$ , se obtiene sencillamente sustituyendo el valor de  $t$  en la ecuación anterior por  $\infty$ , dado que  $e^{-\infty}=0$ , dicha ecuación se transforma en:

$$ABC_0^\infty = \frac{C^0}{k_{el}} - \frac{A^0}{k_a} \quad \text{Ecuación 16}$$

Para el cálculo de  $C_{max}$  y de  $t_{max}$ , se asume que en el máximo de la curva de niveles plasmáticos la velocidad instantánea de absorción del fármaco es igual a la velocidad instantánea de eliminación (en este preciso instante, y únicamente en este instante, la ganancia y la pérdida de fármaco se equilibra, de este modo  $t_{max}$  corresponde a:

$$T_{max} = \frac{\ln\left(\frac{k_a \cdot A^0}{k_{el} \cdot C^0}\right)}{k_a - k_{el}} \quad \text{Ecuación 17}$$

A partir de la ecuación general de la curva de concentraciones, si se considera  $t=t_{max}$ , se obtiene el valor de  $C_{max}$ :

$$C_{max} = C^0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t_{max}} - A^0 \cdot e^{-k_a \cdot t_{max}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Finalmente, se ha estipulado la variación de la concentración del fármaco en el organismo en función del tiempo, que viene expresada por la ecuación 6, a partir de dicha ecuación y mediante el uso de transformadas de Laplace, se obtiene la ecuación integrada, que corresponde a la concentración del fármaco en cualquier tiempo considerado:

$$C = C_0 \cdot \frac{k_a}{k_a - k_{el}} \cdot (e^{-k_{el} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad \text{Ecuación 19}$$

Esta expresión es la denominada *función de Bateman*, en la cual  $C_0$  representa la concentración de fármaco a tiempo cero tras la administración intravenosa. La función relaciona el nivel plasmático de un fármaco administrado por vía extravasal con el valor de  $C_0$ , ya definido y con las constantes de absorción y eliminación. Si se tiene presente que  $C_0=D/V_d$ , la ecuación 19 se puede escribir:

$$C = \frac{F \cdot D}{V_d} \cdot \frac{k_a}{k_a - k_{el}} \cdot (e^{-k_{el} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde  $F$  representa la fracción de dosis absorbida ( $F=1$  si la absorción es completa). Así, aplicando el método de los residuales, a estas ecuaciones (19 y 20), se obtiene la recta semilogarítmica representativa del proceso de eliminación:

$$\ln C = -k_{el} \cdot t + \ln \left( \frac{F \cdot D}{V_d} \cdot \frac{k_a}{k_a - k_{el}} \right) \quad \text{Ecuación 21}$$

Si se conoce el  $V_d$  del fármaco, así como los valores de niveles plasmáticos, puede describirse su tránsito en el organismo. En el caso del proceso de eliminación, suponemos que  $F \cdot D=Q_e$ , correspondiente a la cantidad eliminada, por lo que se obtiene:

$$F \cdot D = Q_e = k_{el} \cdot V_d \cdot ABC_0^\infty \quad \text{Ecuación 22}$$

Por consiguiente, determinando los valores de las áreas parciales y multiplicándolos por  $k_{el} \cdot V_d$  se obtienen los valores de las cantidades eliminadas en cada tiempo considerado. A tiempo infinito, este valor coincidirá con el de la dosis, o fracción de la misma,  $F \cdot D$ , susceptible de absorberse (Doménech *et al*, 2010; Jambhekar & Breen, 2009).

## 2.9.2. MODELO BICOMPARTIMENTAL

El modelo de dos compartimientos (bicompartamental), se basa en que el fármaco ingresa a un primer compartimiento (central) siguiendo las condiciones de transferencia de masa anteriormente expuesto. Sin embargo, existe una segunda transferencia de masa hacia un segundo compartimiento (periférico), siguiendo un una cinética distinta. La transferencia del fármaco del compartimiento central al periférico sigue un comportamiento de orden 0 o de orden 1, con una constante de distribución ( $k_{12}$ ), mientras que la constante de transferencia o de redistribución ( $k_{21}$ ) es la velocidad en la que el fármaco va desde compartimiento periférico al central (Gibaldi, 1982). Cuando se administra un fármaco por vía extravasal, el modelo bicompartimental puede esquematizarse como se indica en la siguiente figura:

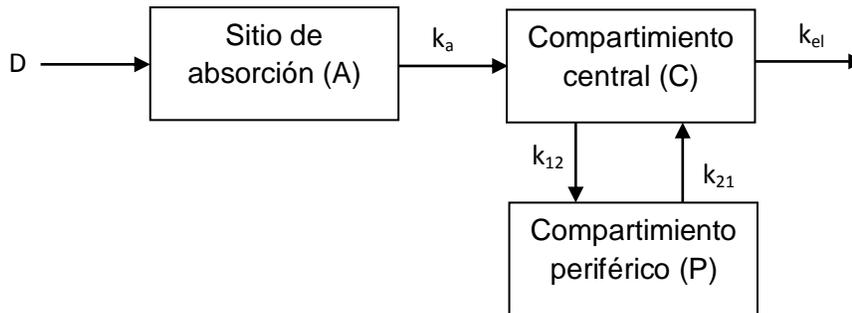


Figura 13. Representación del modelo bicompartimental de administración extravasal (Modificada de: Doménech *et al*, 2010).

Las variaciones de concentración en cada unidad de tiempo, en cada uno de los compartimientos corresponden matemáticamente a la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dC}{dt} = (k_a \cdot A) - (k_{12} \cdot C) - (k_{el} \cdot C) + (k_{21} \cdot P) \quad \text{Ecuación 23}$$

Que representa lo señalado en la figura 14:

$$\frac{dC}{dt} = \boxed{\text{Ganancia por absorción}} + \boxed{\text{Pérdida por distribución a P}} - \boxed{\text{Pérdida por eliminación (M+E)}} + \boxed{\text{Ganancia por retorno del P al C}}$$

Figura 14. Planteamiento diferencial de la variación de la concentración de fármaco por unidad de tiempo en el compartimiento central (Modificada de: Doménech *et al*, 2010).

Tratando matemáticamente la expresión anterior mediante el método de transformadas de Laplace, se obtiene la ecuación general del proceso:

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} + P_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad \text{Ecuación 24}$$

La ecuación 24 es una ecuación triexponencial, representativa cada una de los procesos que sufre el fármaco. Por definición, se debe cumplir que  $\alpha \gg \beta$ , por lo tanto, la expresión  $Ae^{-\alpha t} \rightarrow 0$ , por el signo negativo que afecta  $\alpha$ , mientras que  $Be^{-\beta t}$  tiene un valor finito. Donde A y B son las concentraciones iniciales del fármaco,  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes de velocidad del decaimiento de concentración empíricas, en los compartimientos central y periférico respectivamente.

Al aplicar el método de residuales en la administración por vía oral se pueden obtener los valores tanto de  $k_a$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  considerando la pendiente de los segmentos lineales y paralelos de las curvas semilogarítmicas de concentración-tiempo:

$$\ln C = -\beta \cdot t + \ln \left[ \frac{F \cdot D \cdot k_a \cdot (k_{21} - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} \right] \quad \text{Ecuación 25}$$

En el modelo bicompartimental, para el cálculo de  $C_{max}$ , y consecuentemente de  $t_{max}$ , se parte de la ecuación 24, con la premisa de que, en el máximo de la curva, que corresponde a  $t_{max}$ , la cantidad de fármaco que entra en el organismo es igual a la que sale del mismo (Figura 15).

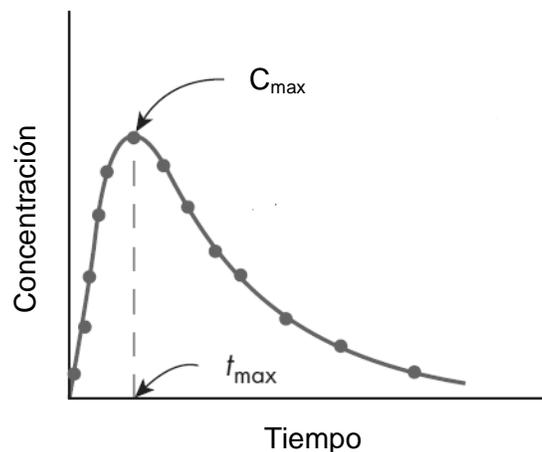


Figura 15. Curva representativa de una administración extravasal en la que se exponen los parámetros  $C_{max}$  y  $t_{max}$  (Modificada de: Jambhekar & Breen, 2009).

El cálculo de  $t_{max}$ , se realiza por iteración, partiendo de la primera derivada de la ecuación 24, variando el valor de  $t$  hasta conseguir que  $dC/dt=0$ , en cuyo momento  $t=t_{max}$ :

$$\frac{dC}{dt} = -\alpha \cdot A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} - \beta \cdot B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - k_a \cdot P_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad \text{Ecuación 26}$$

Una vez estimado el valor de  $t_{max}$ , se estima el correspondiente a  $C_{max}$ , sustituyendo su valor en la ecuación 24:

$$C_{max} = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t_{max}} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t_{max}} + P_0 \cdot e^{-k_a \cdot t_{max}} \quad \text{Ecuación 27}$$

Para el cálculo del área bajo la curva en el modelo bicompartimental extravasal, se multiplica ambos miembros de la ecuación 24 por  $dt$  y se integra entre cero teniendo presente que  $\int_0^t C \cdot dt = ABC_0^t$ , por lo cual se obtiene:

$$ABC_0^t = \frac{A_0}{\alpha} \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t}) + \frac{B_0}{\beta} \cdot (1 - e^{-\beta \cdot t}) + \frac{P_0}{k_a} \cdot (1 - e^{-k_a \cdot t}) \quad \text{Ecuación 28}$$

El valor del área total de área bajo la curva,  $ABC_0^\infty$ , se obtiene de la expresión anterior, haciendo  $t=\infty$ . En esta situación, las exponenciales valen cero y la ecuación anterior se transforma en la siguiente:

$$ABC_0^\infty = \frac{A_0}{\alpha} + \frac{B_0}{\beta} + \frac{P_0}{k_a} \quad \text{Ecuación 29}$$

Para la estimación de las constantes de distribución, retorno y absorción, se parte de una modificación en la ecuación general del modelo (Ecuación 24), donde se cumplen las siguientes ecuaciones, de las cuales es posible extraer su ecuación semilogarítmica:

$$B = B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} \rightarrow \ln B = -\beta \cdot t + \ln B_0 \quad \text{Ecuación 31}$$

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} \rightarrow \ln A = -\alpha \cdot t + \ln A_0 \quad \text{Ecuación 32}$$

$$P = P_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \rightarrow \ln P = -k_a \cdot t + \ln P_0 \quad \text{Ecuación 32}$$

A partir de Cualquiera de los modelos farmacocinéticos, se pueden definir los parámetros de ADME; con ello se pueden establecer criterios sobre la dosis, la vía de administración y la forma farmacéutica (Gibaldi, 1982).

### 2.9.3. DIAGNÓSTICOS PARA LA EVALUACIÓN DE MODELOS FARMACOCINÉTICOS

En farmacocinética el análisis de datos es frecuentemente necesario para seleccionar el número de términos exponenciales en una expresión poli exponencial usada para describir la relación concentración-tiempo, por lo que comúnmente se emplean diagnósticos para evaluar y elegir entre dos o más posibles descripciones de un modelo. Por lo anterior se han empleado herramientas de análisis capaces de asistir en la elección del modelo de análisis farmacocinético correcto, que permita la estimación de parámetros farmacocinéticos con sesgos pequeños y buena precisión, y que permita realizar predicciones precisas de la concentración (Ludden, *et al.*, 1994). Entre dichas herramientas se encuentra el Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Criterio de Schwarz (SC).

El criterio de Akaike se fundamenta en la obtención de un estadístico que representa una calificación o puntuación dada a un modelo, considerando la no correlación residual que produce sobre la serie y la cantidad de parámetros empleada en la especificación del modelo. El AIC proporciona un método simple y objetivo que selecciona el modelo más adecuado para caracterizar los datos experimentales (Armando, 1994). Se define como:

$$AIC = -2 \ln(L) + 2 \cdot k \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde  $L$  es el valor máximo de verosimilitud, que permite determinar los valores de los parámetros libres de un modelo estadístico, y  $k$  es el número de parámetros libres del modelo (Martínez *et al.*, 2009).

Para dos modelos igualmente adecuados, la puntuación de Akaike será menor para el modelo que haya empleado menor cantidad de parámetros. Dicho en otras palabras, este criterio es una valoración cuantitativa de la parsimonia. Por lo tanto, un valor individual de AIC no es interpretable por sí solo, y los valores de AIC sólo tienen sentido cuando se realizan comparaciones utilizando los mismos datos experimentales (Armando, 1994; Martínez *et al.*, 2009).

El Criterio de Schwarz es un índice para ayudar a cuantificar y elegir el modelo de probabilidad menos complejo entre las múltiples opciones. También llamado el Criterio de Información Bayesiano (BIC), este enfoque ignora la probabilidad previa y, en cambio, compara las eficiencias de diferentes modelos para predecir resultados.

Esa eficiencia se mide creando un índice de los parámetros de cada modelo usando una función de probabilidad y luego aplicando una función de penalización para modelos con más parámetros. El criterio de información de Schwarz se denomina bayesiano por basarse en argumentos de la llamada estadística bayesiana. Los métodos bayesianos constituyen una alternativa a la estadística tradicional, que se basa en el contraste de hipótesis. Estos métodos se diferencian en que incorporan información externa al estudio. Con esta información y con los datos observados se estima una distribución de probabilidad para la magnitud efecto que se está investigando (Díaz & Batanero 2008).

El criterio de Schwarz (SC) compara modelos desde la perspectiva de la teoría de la decisión, medida por la pérdida esperada. El SC para un modelo dado es:

$$SC = k \cdot \log(n) - 2 \log L(\theta) \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde  $n$ , corresponde al tamaño de la muestra, mientras que el número de parámetros a ser estimados son representados por  $k$ , con la ecuación se evalúa la probabilidad de que el modelo devuelva los datos que tiene, cuando se prueba con los valores de máxima verosimilitud de  $\theta$ , correspondiente al conjunto de todos los valores de los parámetros, dado por  $L(\theta)$ . Al igual que el AIC, cuando comparamos los valores de SC para múltiples modelos, los valores más pequeños son mejores (Schwarz, 1978).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de la hipertensión arterial (Santana, 2001), los accidentes cerebrovasculares se encuentran entre los diez primeros lugares de causa de mortalidad en México (OMS, 2017). No existe un tratamiento dirigido a tratar la ECV como tal; el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas, como las que pueden derivarse de productos naturales, requiere de las caracterizaciones farmacocinéticas que consoliden el desarrollo de fitomedicamentos dirigidos a tratar ECV.

El grupo de investigación del Centro de Investigación Biomédica del Sur ha demostrado que *S. elegans*, tiene la capacidad de disminuir las alteraciones neurológicas derivadas de las alteraciones vasculares que resultan de la hipertensión arterial crónica. Además, los reportes que se han generado en el laboratorio asocian estos efectos farmacológicos con compuestos específicos, por lo que resultan importante describir el comportamiento farmacocinético que siguen estos fitofármacos (Herrera-Ruíz *et al.*, 2006; Martínez-Hernández, 2015).

#### 4. HIPÓTESIS

Los compuestos activos de *S. elegans* mostrarán parámetros farmacocinéticos que garanticen sus propiedades antihipertensivas experimentales, al determinar su presencia en el blanco farmacológico a una concentración y en un tiempo definido, para disminuir el riesgo de sufrir ECV.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Describir el comportamiento farmacocinético de los compuestos con probada actividad neuroprotectora: ácido cafeico, ácido rosmarínico y jaceosidina; presentes en la fracción de acetato de etilo de *Salvia elegans*, para el diseño de un potencial fitomedicamento útil en Enfermedad Cerebrovascular (ECV).

### 5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1.1. Definir la composición de un extracto activo útil en contrarrestar el daño neurológico asociado a ECV.
- 5.1.2. Determinar las constantes analíticas: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, porcentaje de recobro y estabilidad de las muestras en almacenamiento; para la validación del método de cuantificación por CLAR de ácido cafeico, ácido rosmarínico y jaceosidina, compuestos presentes en la fracción activa de *S. elegans*.
- 5.1.3. Caracterización de la variación de la concentración plasmática en ratones, cepa ICR, de los componentes de la fracción activa de *S. elegans* a lo largo del tiempo, posterior a la administración por vía oral.
- 5.1.4. Realizar la cuantificación de los componentes de la fracción activa de *S. elegans* en las muestras de plasma.
- 5.1.5. Determinar las constantes farmacocinéticas en modo preclínico (ratón cepa ICR) de los fitofármacos presentes en la fracción activa de *S. elegans* contra ECV, determinando si el comportamiento de los compuestos activos obedece a un modelo monocompartimental o bicompartimental.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

Se colectaron las partes aéreas (6 Kg) de la especie *Salvia elegans* en Ozumba, Estado de México (19°02'20.58" latitud norte y 98°47'42.38" longitud oeste). Un ejemplar se depositó en el Jardín Botánico y Museo de Medicina Tradicional y Herbolaria del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos, y se identificó por la bióloga Margarita Avilés y Macrina Fuentes Mata, con número de folio 2056.

La planta se secó a la sombra en camas de malla de alambre a temperatura ambiente (25°C). El material vegetal seco, se pulverizó para obtener un tamaño de partícula de 4-6 mm en un molino PULVEX-PLASTIC®.

### 6.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO DE *Salvia elegans*

El material vegetal (2.6 Kg) de *Salvia elegans* se sometió a un proceso de maceración utilizando un solución alcohólica (12 L) al 60% (Etanol:Agua, MERCK) dicho sistema se dejó reposar por 24 h; posteriormente se filtró con papel Whatman No. 4., este proceso se realizó por triplicado.

El extracto hidroalcohólico (HA) se concentró mediante un proceso de destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio (Heidolp Laborota G3, Alemania) a 45-50°C y el extracto semisólido se sometió a un sistema de liofilización (Liofilizadora LABCONCO ®) para su sequedad total.

El extracto HA (700 g) obtenido se solubilizó en agua (1 L) y se le adicionó acetato de etilo (1L, J.T. BAKER) formándose dos fases y por medio de un embudo de separación se obtuvo una fracción orgánica (FSeAS) y acuosa (FSeAq). Estas fracciones se sometieron al procedimiento de destilación a presión reducida para eliminar el disolvente utilizado; el procedimiento descrito se realizó por duplicado obteniendo las fracciones correspondientes. La fracción orgánica FSeAS se sometió a un sistema de alto vacío y se almacenó a temperatura ambiente, obteniendo 248.6 g.

### 6.3. SEPARACIÓN QUÍMICA DE LA FRACCIÓN ACTIVA DE *Salvia elegans*

La fracción FSeAS (40 g) se sometió a separación química por medio de cromatografía en columna abierta de vidrio (600 x 35 mm), esta fracción se adsorbió en 36 g de sílica gel (60 0.063-0.200 mm, fase normal, Merck) (Figura 16). La columna se empacó con 220 g de sílica gel (70-230 mesh, Merck) y se utilizó un sistema de gradientes de *n*-hexano (Merck) y acetato de etilo (J.T. BAKER) con aumento de polaridad como se muestra en la Tabla 2. Se colectaron muestras de 2.5 L y se obtuvieron 4 fracciones que fueron concentradas en rotaevaporador.

Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico de SeAS

Fracción	Sistema de elución (Hex:AcOEt)
SeASC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	100:0
SeASC <sub>1</sub> F <sub>2</sub>	70:30
SeASC <sub>1</sub> F <sub>3</sub>	50:50
SeASC <sub>1</sub> F <sub>4</sub>	0:100

La separación de las fracciones se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (fase normal, Merck) y gel de sílice RP-18 F<sub>254</sub> (fase reversa, Merck). El análisis de las placas se realizó a través del revelado con lámpara de luz ultravioleta (UVGL-58, UVP, 254-365 nm, Cambridge, UK).



Figura 16. Cromatografía en columna abierta (CCA)

Los reactivos de sulfato sérico y NP-PEG (siglas en inglés *Natural products-polyethylenglycol*) se usaron para la detección física de terpenos y flavonoides. Los disolventes empleados en mezclas para la fase móvil fueron, diclorometano (TECSIQUIM), metanol GR (CH<sub>3</sub>OH, J.T. BAKER) y acetonitrilo-CLAR (CH<sub>3</sub>CN-CLAR, TECSIQUIM), agua-HPLC (H<sub>2</sub>O-CLAR, Merck). De acuerdo a lo reportado las fracciones activas de interés con alto contenido de compuestos fenólicos (SeASC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> y SeASC<sub>1</sub>F<sub>4</sub>), se reunieron (SeASC<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) para el posterior aislamiento y caracterización de los compuestos presentes (Sánchez-Sánchez, 2017).

### 6.3.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS AC, AR Y JC

La fracción SeASC<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (13.1 g) se adsorbió en 16 g de sílica gel (POLYGOPREP® 60-50 C<sub>18</sub>, fase reversa, MACHEREY-NAGEL); se colocaron en una columna de vidrio (120 mm x 107 mm) que se empacó con 150 g de sílica gel fase reversa. Se utilizaron tres sistemas isocráticos de elución con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (Tabla 3). Se colectaron volúmenes de 1 L y de acuerdo a CCF se reunieron las fracciones activas (SeASC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> y SeASC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>) y se denominó SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>.

Tabla 3. Separación química de SeASC<sub>1</sub>R<sub>1</sub>

Fracción	Sistema de elución (H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN)
SeASC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	50:50
SeASC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	30:70
SeASC <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	0:100

En la fracción SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>, se identificaron a los compuestos: ácido cafeico (AC), ácido rosmarínico (AR) y jaceosidina (JC), por su comparación con estándares. Para la determinación de los compuestos presentes en la fracción, se inyectaron 20 µL a una concentración de 1 mg/mL en un método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), descrito posteriormente.

#### **6.4. ANIMALES**

Se utilizaron ratones hembra cepa ICR (Envigo, Ciudad de México) entre 32-38 g de peso. Los animales se colocaron en grupos de 10 animales por jaula y se mantuvieron en condiciones de bioterio a 25°C, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h, con acceso al agua y alimento (pellets de Dieta de Laboratorio de Roedores Harlan) *ad libitum*. Se permitió que los ratones se adaptaran al ambiente del laboratorio durante tres semanas previo a los experimentos. Todos los estudios se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). El proyecto se aprobó por el Comité Local de Investigación en Salud y Ética 1702 del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo el número de registro (R-2018-1702-005). Se usaron el número mínimo de animales y tiempos de observación, necesarios para obtener datos consistentes.

#### **6.5. OBTENCIÓN DE MATRIZ DE TRABAJO**

Se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular, anestesiando a los animales previamente con cloroformo. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL heparinizados, para posteriormente ser sometidos a centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm. Se procedió a la separación del plasma en tubos nuevos y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### **6.6. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y SOLUCIÓN DE TRABAJO**

Se pesaron 20 mg de los compuestos: AC (Sigma-Aldrich, México), AR (Sigma-Aldrich, México) y JC en CH<sub>3</sub>OH, y se aforaron por separado a un volumen de 20mL del mismo disolvente. A partir de las soluciones stock de los compuestos, se tomaron 1.7 mL de AC, 4 mL de AR y 14 mL de JC y se aforaron a 100 mL con CH<sub>3</sub>OH para obtener una mezcla con las diferentes concentraciones de los compuestos, simulando las proporciones encontradas en la fracción activa, para obtener la solución de trabajo (ST).

Se preparó una solución patrón del estándar interno (EI) disolviendo 0.2 mg de Meloxicam (Flexiver® 15 mg, Maver) en 100 mL de CH<sub>3</sub>OH, añadidos a la mezcla de analitos, para obtener una concentración de 2 µg/mL. Todas las soluciones se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

## 6.7. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE AC, AR Y JC DE LA FRACCIÓN ACTIVA DE *Salvia elegans*

Para la evaluación de la concentración de cada uno de los compuestos presentes en las muestras, se diseñó la curva de calibración con las proporciones para cada punto (Tabla 4). Se realizaron diluciones seriadas a partir de 2 mL la ST (Punto A), para obtener los puntos subsecuentes. Para cada una de las curvas de calibración se adicionaron 20  $\mu$ L de la solución correspondiente al EI.

Tabla 4. Concentraciones de AC, AR y JC en la curva de calibración

Punto	AC	AR	JC
	$\mu$ g/mL		
A	17.00	40.00	140.00
B	8.50	20.00	70.00
C	4.25	10.00	35.00
D	2.12	5.00	17.50
E	1.06	2.50	8.75
F	0.53	1.25	4.38

## 6.8. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS EN PLASMA

Se utilizó un método de extracción líquido-líquido para el análisis de muestras en plasma. Se colocaron 200  $\mu$ L de plasma, se le agregaron 100  $\mu$ L de EI, y posteriormente se añadieron 200  $\mu$ L de CH<sub>3</sub>OH con ácido trifluoroacético (TFA) al 20%, se mezcló en vórtex por 30 segundos. La mezcla se precipitó con 500  $\mu$ L de AcOEt, y se mezcló en vórtex 30 segundos más; se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se evaporó a sequedad a temperatura ambiente. Para su evaluación, las muestras se reconstituyeron en 150  $\mu$ L de CH<sub>3</sub>OH agitando en vórtex por un minuto. La solución se filtró a través de membranas de Teflón (0.45  $\mu$ m x 13 mm, Millex®-LCR) para transferirlos a microviales de muestreo y se inyectaron 10  $\mu$ L al sistema CLAR.

## 6.9. CONDICIONES DE ANÁLISIS POR CLAR

Se empleó un método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) que consta de un módulo de separación (Waters 2695) y un detector de serie de fotodiodos (Waters 2996) y los datos fueron procesados con el software Empower Pro 3.0. Se utilizó una columna SUPELCO Discovery® (C-18, 250 x 4.6 mm, 5 µm), para la cuantificación de AC, AR y JC.

El tiempo de duración del método es de 30 minutos con una inyección de la muestra de 10 µL y un flujo de 0.9 mL por minuto, con un gradiente de elución de H<sub>2</sub>O-TFA al 0.5% (solvente A) y CH<sub>3</sub>CN (solvente B), mostrado en la Tabla 5. Las lecturas fueron realizadas a una longitud de onda (λ) de 340 nm.

Tabla 5. Parámetros del método analítico por CLAR.

<b>Tiempo</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
<b>0.00</b>	100	0.00
<b>1.00</b>	100	0.00
<b>2.00</b>	95.00	5.00
<b>3.00</b>	95.00	5.00
<b>4.00</b>	70.00	30.00
<b>20.00</b>	70.00	30.00
<b>21.00</b>	50.00	50.00
<b>23.00</b>	50.00	50.00
<b>24.00</b>	20.00	80.00
<b>25.00</b>	20.00	80.00
<b>26.00</b>	0.00	100
<b>27.00</b>	0.00	100
<b>28.00</b>	100	0.00
<b>30.00</b>	100	0.00

## 6.10. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS

La validación del método de cuantificación de los compuestos de interés se realizó conforme a lo descrito por la Guía de validación de métodos bioanálíticos de la FDA (2018).

### 6.10.1. PUNTOS DE CONTROL PARA VALIDACIÓN DE MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE AC, AR Y JC

Se seleccionaron tres puntos de control para la evaluación de los parámetros de desempeño con concentraciones bajas, medias y altas dentro del rango de trabajo designado para las curvas de calibración, obteniendo los valores de concentración observados a continuación (Tabla 6). Se adicionó el mismo volumen de solución del EI (20  $\mu$ L) para cada uno de los parámetros de validación evaluados.

Tabla 6. Puntos de control para validación del método de cuantificación de AC, AR y JC

Punto de control	AC	AR	JC
	$\mu\text{g/mL}$		
Alto	12.75	30.00	105.00
Medio	6.80	16.00	56.00
Bajo	0.85	2.00	7.00

### 6.10.2. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS AC, AR Y JC EN PLASMA

Se prepararon por triplicado, muestras extraídas de plasma adicionado con las concentraciones de los puntos de control, como se indica en el punto 6.8. Simultáneamente se analizaron los puntos de control en solución de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , que contenían el mismo volumen de EI.

El porcentaje de recobro (%R) se calculó por la comparación de la proporción del ABC de cada uno de los analitos, respecto al ABC del EI de las muestras extraídas y las muestras en solución, a partir de la modificación de la respuesta en la Ecuación 1. El porcentaje de recuperación debe ser del  $100 \pm 20\%$ .

$$\% R = \left( \frac{ABC_{AM}/ABC_{EM}}{ABC_{AS}/ABC_{ES}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1 modificada}$$

Siendo:

$ABC_{AM}$  = ABC del analito extraído

$ABC_{EM}$  = ABC del EI extraído

$ABC_{AS}$  = ABC del analito en solución

$ABC_{ES}$  = ABC del EI en solución

### 6.10.3. SELECTIVIDAD

Se inyectaron individualmente por sextuplicado, muestras de blanco de reactivos ( $CH_3OH$ ), muestras de blancos de matriz, puntos de concentración media y muestras adicionadas con estándar interno; para asegurar que los compuestos endógenos de la matriz biológica no interfirieran con la evaluación de los compuestos. Se confirmó que la respuesta analítica de las interferencias próximas al TR de los compuestos fuera menor al 20% para el límite inferior de cuantificación de los analitos y menor al 5% para el EI.

### 6.10.4. LINEALIDAD

Para la determinación de la linealidad del sistema, se procedió a preparar cuatro curvas de calibración como se indica en el apartado 6.7, con los seis niveles de concentración indicados. Además, se incluyó un blanco de reactivo, y un blanco adicionado con EI, para cada una de las curvas.

El mismo procedimiento fue repetido con el plasma adicionado con los compuestos para la evaluación de la linealidad del método. Se abarcaron los seis niveles de concentración, el blanco de matriz y el blanco adicionado con estándar interno.

Ambos procedimientos se realizaron en forma independiente por 4 días, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método. Con los datos obtenidos en ambos casos, se graficó la proporción del área bajo la curva (ABC) entre los analitos y el EI, contra la concentración del analito. Se aceptó un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) mayor a 0.995 como parámetro de la linealidad.

### 6.10.5. LÍMITE DE DETECCIÓN (LDD)

Se estimó el LDD a través de seis muestras de matriz blanco los cuales fueron evaluados por la comparación la señal y el ruido, determinando su valor con la Ecuación 2.

$$LDD = \frac{3.3 \cdot Sb_o}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

$Sb_o$  = Error típico de la ordenada al origen

$m$  = Pendiente de curva de calibración

### 6.10.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LDC)

Para la determinación del LDC, se emplearon los datos de las muestras del apartado 6.10.4, aplicando la Ecuación 3, para el cálculo del valor.

$$LDC = \frac{10 \cdot Sb_o}{m} \quad \text{Ecuación 3}$$

### 6.10.7. PRECISIÓN

#### 6.10.7.1. Repetibilidad

Se prepararon muestras por triplicado de los tres puntos de control, se evaluó el promedio de la concentración ( $\bar{x}$ ) de los diferentes niveles, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV%), empleando la Ecuación 35. Para el criterio de aceptación se consideró que  $CV\% < 15\%$ . El procedimiento se realizó en dos días diferentes.

$$CV\% = \frac{DE}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 35}$$

### 6.10.7.2. Reproducibilidad (Precisión intermedia)

Para la determinación de la reproducibilidad se analizaron un total de tres corridas analíticas de los puntos de control por triplicado, en las que se incluyeron las corridas realizadas para la repetibilidad, cumpliendo con un tercer día. Se reportó el promedio de la concentración, la DE y el CV%. Se consideró reproducible si  $CV\% < 15\%$ .

### 6.10.8. EXACTITUD

Para determinar la exactitud se midieron por sextuplicado, muestras adicionadas con las concentraciones de los puntos de control y se determinó el valor del %Bias, calculado con la siguiente ecuación:

$$\% Bias = \frac{C_{obs} - C_{nom}}{C_{nom}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 36}$$

Dónde:

$C_{obs}$  = Concentración observada

$C_{nom}$  = Concentración nominal

Se considera un método exacto si los valores evaluados tienen un %Bias dentro del  $\pm 15\%$ .

### 6.10.9. ESTABILIDAD

Se evaluaron por triplicado las respuestas de los analitos a las concentraciones designadas en los puntos de control. Los estudios de estabilidad abarcaron las condiciones de temperatura y tiempo, de almacenamiento y procesamiento de las muestras. En todos los casos, las concentraciones obtenidas de los estudios de estabilidad fueron comparadas con muestras recién preparadas con los puntos de control, y el porcentaje de la desviación de la concentración fue calculado. Los analitos fueron considerados estables en el plasma de ratón cuando la diferencia de concentración entre las muestras frescas y las muestras de estabilidad fuera menor al 15%.

#### **6.10.9.1. Estabilidad de congelación y descongelación**

Se determinó la estabilidad de los analitos después de tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. Se almacenaron las muestras con las diferentes concentraciones a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h, posteriormente se procedió a descongelarlas a temperatura ambiente; una vez descongeladas se congelaron nuevamente bajo las mismas condiciones. El ciclo de congelamiento-descongelamiento se repitió hasta completar el tercer ciclo donde se analizaron las muestras.

#### **6.10.9.2. Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente (24 horas)**

Para la estabilidad a corto plazo se evaluaron los puntos de control en la matriz biológica a temperatura ambiente en el automuestreador del cromatógrafo por 24 horas, las muestras control se interpolaron en una curva de calibración recién preparada, y las concentraciones obtenidas fueron comparadas contra la concentración nominal.

#### **6.10.9.3. Estabilidad a temperatura de congelamiento ( $-70^{\circ}\text{C}$ )**

Se prepararon muestras para ser evaluadas a tres diferentes plazos: 0, 15 y 30 días. Las muestras fueron almacenadas  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su evaluación en el plazo establecido. Los valores obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración preparada el mismo día en que se llevó a cabo el análisis y se evaluaron los criterios de aceptación de la validación.

### **6.11. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO**

#### **6.11.1. ADMINISTRACIÓN DE LA FRACCIÓN ACTIVA $\text{SeASC}_2\text{R}_1$ Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Se dividió un lote de 88 ratones al azar en grupos de 8 ratones cada uno. Los animales fueron administrados vía oral mediante una cánula metálica conectada a una jeringa de insulina, con una dosis de 500 mg/kg de  $\text{SeASC}_2\text{R}_1$ , disuelta en una solución TWEEN 20 al 5% V/V. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas como se detalla en el apartado 1.5 a los siguientes tiempos: 0, 2, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 120 y 240 minutos posteriores a la administración de la fracción.

Posteriormente los animales se perfundieron con solución salina isotónica (SSI), a través de punción cardiaca, hasta obtener el líquido de perfusión claro, para proceder a la remoción del cerebro. Se pesaron los órganos en fresco, seguidamente se liofilizaron y se pesaron para determinar la cantidad de agua contenida. Finalmente, fueron pulverizados en mortero y se les realizó el proceso de extracción de los compuestos.

Las muestras obtenidas fueron inyectadas en el cromatógrafo como se determinó previamente.

### **6.11.2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO**

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el complemento de Microsoft Excel PKSolver (Zhang *et al.*, 2010). Se empleó el modelo adecuado para calcular los siguientes parámetros farmacocinéticos para cada uno de los compuestos: área bajo la curva de la concentración plasmática de cero al último tiempo de muestreo ( $ABC_{0 \rightarrow 240\text{min}}$ ) y al infinito ( $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ ), la concentración máxima en plasma ( $C_{\text{máx}}$ ), el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), el tiempo en alcanzar la concentración máxima ( $t_{\text{máx}}$ ), la constante de eliminación ( $k$ ) y el tiempo medio de residencia de cero al último tiempo de muestreo ( $MRT_{0 \rightarrow 240\text{min}}$ ). La selección del modelo se determinó de acuerdo al criterio de información de Akaike (AIC) y al criterio de Schwarz (SC).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

A partir de 2.6 Kg de material vegetal seco, se realizó la maceración con el sistema hidroalcohólico. El extracto HA (561.6 g) se resuspendió en agua y acetato de etilo, y se recuperó la fase orgánica, la cual se secó y se pesó, obteniéndose 248.6 g de la fracción FSeAS, que correspondió a un rendimiento de extracción del 9.56% respecto al material vegetal seco.

Se realizó una separación química de 40 g de la fracción FSeAS por CCA. Se reunieron las fracciones que contenían un perfil cromatográfico similar y los compuestos de interés por análisis en CCF, obteniendo 13.1 g de la reunión SeASC<sub>1</sub>R<sub>1</sub>.

Para la obtención de la fracción activa, la reunión SeASC<sub>1</sub>R<sub>1</sub>, se fraccionó por CCA en FR, monitoreando el fraccionamiento por CCF, contra los estándares de los compuestos de interés, eliminando los interferentes que pudieran no ser detectados o cuantificados por el método analítico de CLAR. Del fraccionamiento se obtuvo la fracción SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>, determinada como la fracción activa, con un peso de 6.50 g, que representa un rendimiento de extracción del 1.55% del material vegetal empleado.

### 7.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FRACCIÓN ACTIVA SEASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>

A través del análisis por CCF de la fracción SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub> se observó la presencia de AC (RF: 0.65), AR (RF: 0.7) y JC (RF: 0.3) comparado con muestras de los compuestos (Figura 17).

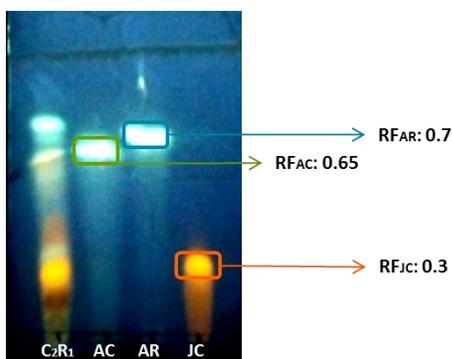


Figura 17. Cromatoplaqueta de composición química de la fracción SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>. Fase: Reversa / Sistema de elución: 6:4 H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN / Revelador: NP/PEG. C<sub>2</sub>R<sub>1</sub>: SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>, AC: Ácido caféico, AR: Ácido rosmarínico y JC: Jaceosidina.

La fracción SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub> se analizó a una  $\lambda=340$  nm por CLAR contra estándares comerciales de los compuestos (Figura 18), donde se obtuvieron concentraciones de 8.5  $\mu\text{g/mL}$  de AC, 20  $\mu\text{g/mL}$  de AR y 70  $\mu\text{g/mL}$  de JC. Además, se evaluaron los TR y los valores máximos de absorbancia ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), mostrados a continuación (Tabla 7).

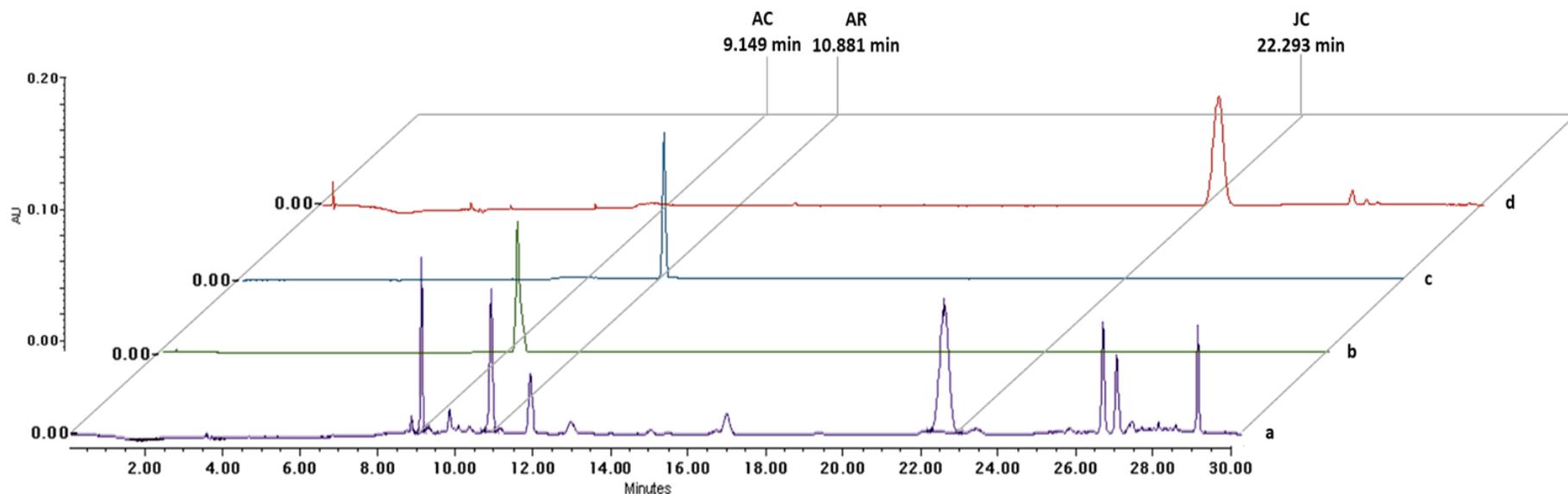


Figura 18. Comparación de los cromatogramas a  $\lambda=340$  nm. a) Fracción SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub> b) Estándar AC (TR=9.149 min) c) Estándar AR (TR=10.881 min) y d) Estándar JC (TR=22.293 min).

Tabla 7. Parámetros de análisis de datos por CLAR.

Compuesto	TR (min)	$\lambda_{\text{máx1}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx2}}$ (nm)
AC	9.149	218.1	325.5
AR	10.881	207.5	330.3
JC	22.293	213.4	344.6

### 7.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN SEASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>

Se realizó la validación del método utilizado para la cuantificación de los compuestos activos presentes en la fracción activa SeASC<sub>2</sub>R<sub>1</sub>, evaluando los parámetros de: selectividad, linealidad, LDD, LDC, precisión, exactitud y estabilidad. A continuación, se muestra el cumplimiento de los criterios establecidos en los lineamientos de la Guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (2001).

#### 7.3.1. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS EN PLASMA

En la tabla subsecuente, se muestra el porcentaje de recobro de los compuestos AC (Tabla 8a), AR (Tabla 8b) y JC (Tabla 8c), con valores promedio de 94.54%, 95.14% y 98.15% respectivamente. Los porcentajes de recobro obtenidos para el rendimiento de la extracción se encuentran dentro del rango de aceptación.

Tabla 8a. Evaluación del porcentaje de recobro de AC en plasma.

<b>Rendimiento de extracción de ácido cafeico en plasma</b>			
<b>Concentración nominal (µg/mL)</b>	<b>Relación de ABC (Método)</b>	<b>Relación de ABC (Sistema)</b>	<b>% Recobro</b>
<b>0.85</b>	0.1098	0.1153	95.16
<b>0.85</b>	0.1041	0.1115	93.31
<b>0.85</b>	0.1177	0.1168	100.81
<b>Promedio</b>	<b>0.1105</b>	<b>0.1145</b>	<b>96.43</b>
<b>6.80</b>	0.8250	0.9279	88.91
<b>6.80</b>	0.8228	0.8853	92.94
<b>6.80</b>	0.8221	0.8935	92.01
<b>Promedio</b>	<b>0.8233</b>	<b>0.9022</b>	<b>91.29</b>
<b>12.75</b>	1.5324	1.6069	95.36
<b>12.75</b>	1.5665	1.5822	99.00
<b>12.75</b>	1.5288	1.6378	93.35
<b>Promedio</b>	<b>1.5426</b>	<b>1.6090</b>	<b>95.90</b>
<b>% Recobro Total</b>			<b>94.54</b>

Tabla 8b. Evaluación del porcentaje de recobro de AR en plasma.

<b>Rendimiento de extracción de ácido rosmarínico en plasma</b>			
<b>Concentración nominal (µg/mL)</b>	<b>Relación de ABC (Método)</b>	<b>Relación de ABC (Sistema)</b>	<b>% Recobro</b>
2.00	0.1220	0.1377	88.57
2.00	0.1225	0.1377	88.94
2.00	0.1238	0.1377	89.90
<b>Promedio</b>	<b>0.1228</b>	<b>0.1377</b>	<b>89.14</b>
16.00	1.1721	1.1556	101.43
16.00	1.0773	1.1556	93.23
16.00	1.1750	1.1556	101.68
<b>Promedio</b>	<b>1.1415</b>	<b>1.1556</b>	<b>98.78</b>
30.00	2.1332	2.2000	96.96
30.00	2.1283	2.2000	96.74
30.00	2.1728	2.2000	98.76
<b>Promedio</b>	<b>2.1448</b>	<b>2.2000</b>	<b>97.49</b>
<b>% Recobro Total</b>			<b>95.14</b>

Tabla 8c. Evaluación del porcentaje de recobro de JC en plasma.

<b>Rendimiento de extracción de jaceosidina en plasma</b>			
<b>Concentración nominal (µg/mL)</b>	<b>Relación de ABC (Método)</b>	<b>Relación de ABC (Sistema)</b>	<b>% Recobro</b>
7.00	0.3773	0.4036	93.50
7.00	0.3858	0.3906	98.79
7.00	0.3971	0.4094	97.00
<b>Promedio</b>	<b>0.3867</b>	<b>0.4012</b>	<b>96.43</b>
56.00	2.6392	2.7130	97.28
56.00	2.7080	2.6684	101.48
56.00	2.6910	2.7724	97.06
<b>Promedio</b>	<b>2.6794</b>	<b>2.7180</b>	<b>98.61</b>
105.00	4.8181	4.8041	100.29
105.00	4.8357	4.9227	98.23
105.00	4.7105	4.7226	99.74
<b>Promedio</b>	<b>4.7881</b>	<b>4.8164</b>	<b>99.42</b>
<b>% Recobro Total</b>			<b>98.15</b>

### 7.3.2. SELECTIVIDAD

En la Figura 19, se observan los cromatogramas correspondientes al blanco de la matriz de trabajo en CH<sub>3</sub>OH, los compuestos AC, AR y JC, así como estándar interno MX. Se puede apreciar la ausencia de interferencias endógenas del plasma y la separación adecuada de los compuestos evaluados para su análisis óptimo. Los tiempos de retención fueron de 9.149 min para AC, 10.881 min para AR, 22.293 min para JC y 26.857 min para MX, sin que exista una superposición entre ellos.

### 7.3.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Los cromatogramas de los puntos planteados para la evaluación de las concentraciones de los compuestos se muestran en la Figura 20. Los intervalos de trabajo utilizados fueron seis diluciones seriadas correspondientes a: 0.53-17.00 µg/mL para AC, 1.25-40.00 µg/mL para AR, y 4.38-140.00 µg/mL para JC.

### 7.3.4. LINEALIDAD

La Figura 21 muestra las gráficas correspondientes a la linealidad del método para la cuantificación de los compuestos, así como las ecuaciones ajustadas a regresión lineal que describen el comportamiento de la concentración respecto a la relación de áreas (ABC Compuesto/ABC MX) de los mismos. Se empleó como criterio de aceptación un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) mayor a 0.99.

### 7.3.5. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos por las ecuaciones 2 y 3, para evaluar los LDD y LDC de cada uno de los compuestos.

Tabla 9. Límites de detección y de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma

Compuesto	Error típico	Pendiente	LDD (µg/mL)	LDC (µg/mL)
AC	0.0047	0.1243	<b>0.1238</b>	<b>0.3751</b>
AR	0.0096	0.0725	<b>0.4366</b>	<b>1.3229</b>
JC	0.0122	0.0462	<b>0.8679</b>	<b>2.6299</b>

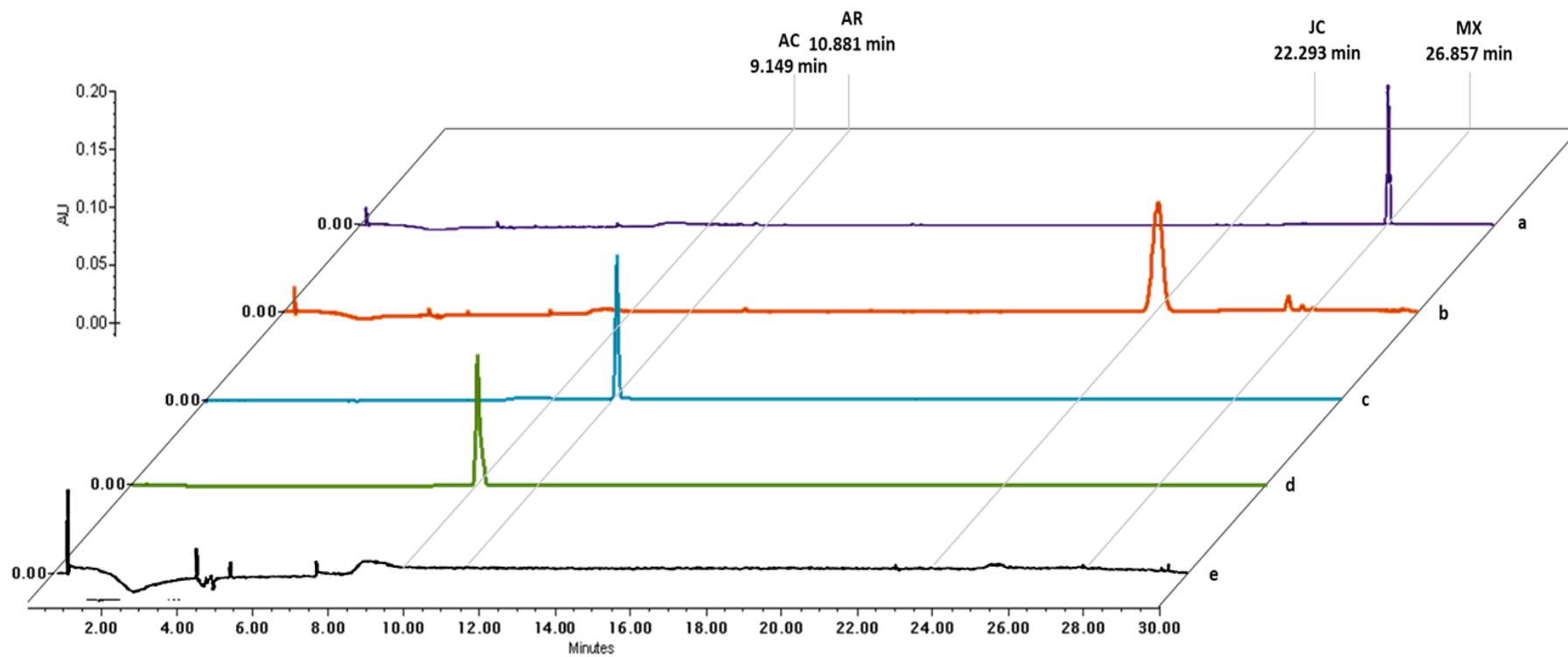


Figura 19. Cromatogramas típicos de compuestos en plasma de ratón: estándar interno(a), jaceosidina (b), ácido rosmarínico (c), ácido cafeico (d) y blanco de matriz (e).

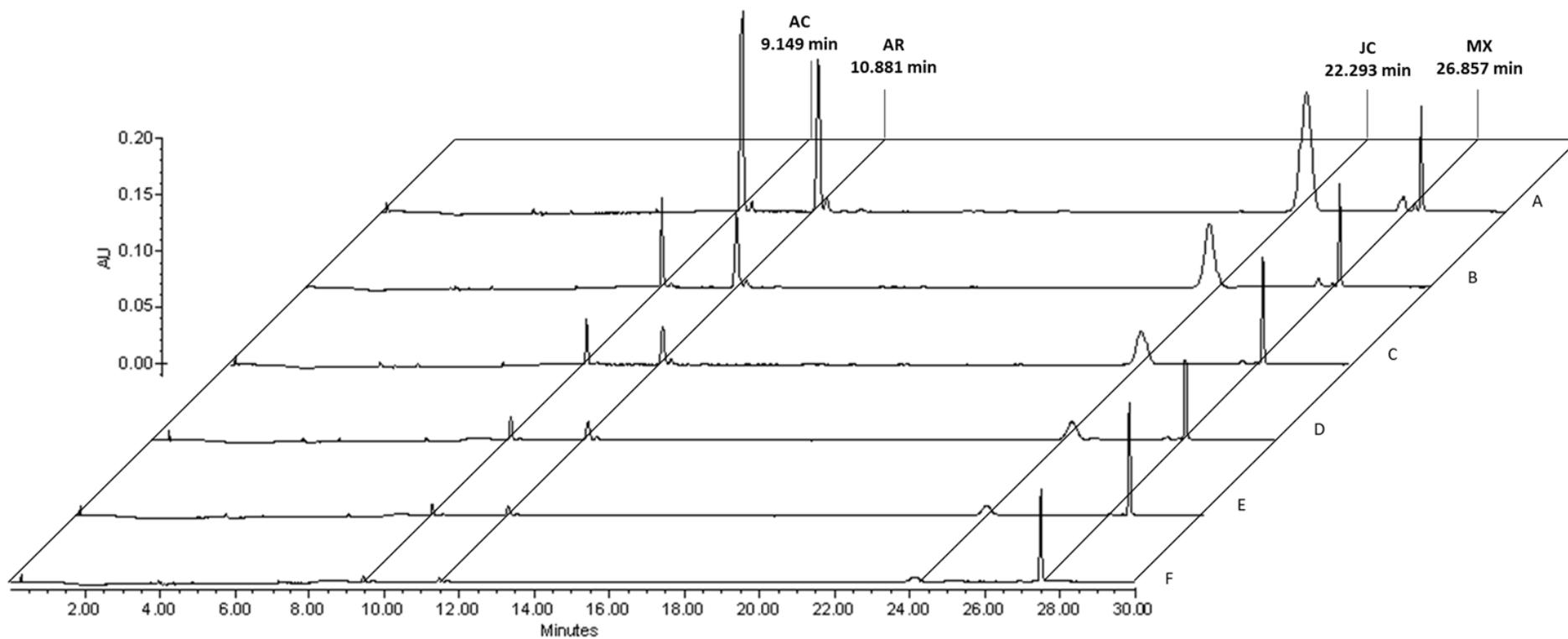


Figura 20. Cromatogramas típicos de la curva de calibración a distintos puntos de concentración (A-F) con estándar interno (MX) a 20  $\mu\text{g/mL}$ . Concentraciones de AC, AR y JC respectivamente: 17.00, 40.00 y 140.00  $\mu\text{g/mL}$  (A); 8.50, 20.00 y 70.00  $\mu\text{g/mL}$  (B); 4.25, 10.00 y 35.00  $\mu\text{g/mL}$  (C); 2.12, 5.00 y 17.50  $\mu\text{g/mL}$  (D); 1.06, 2.50 y 8.75  $\mu\text{g/mL}$  (E); 0.53, 1.25 y 4.38  $\mu\text{g/mL}$  (F).

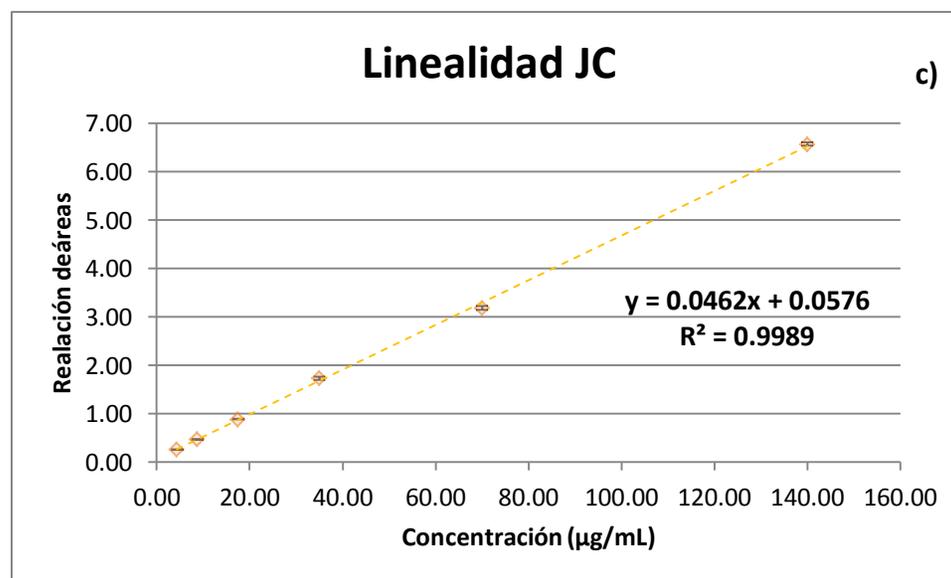
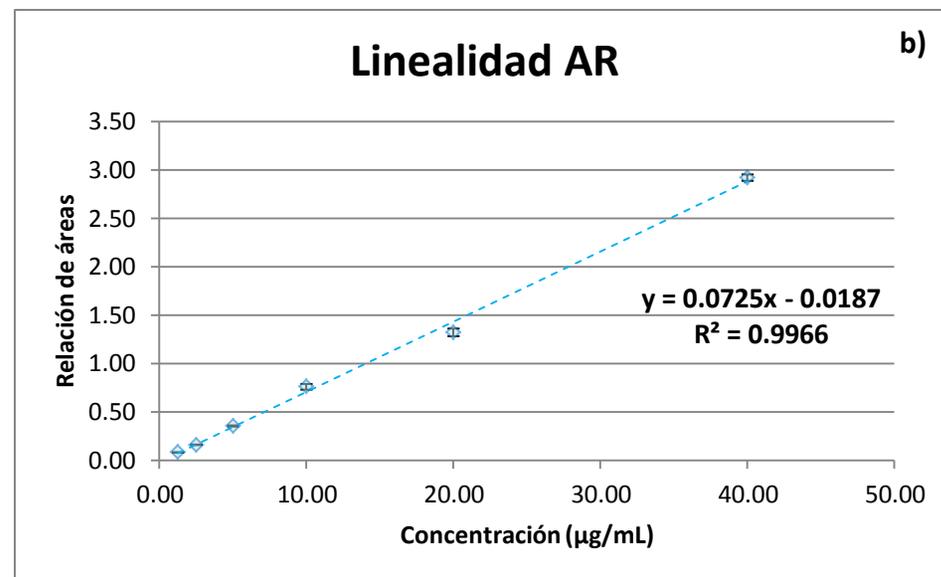
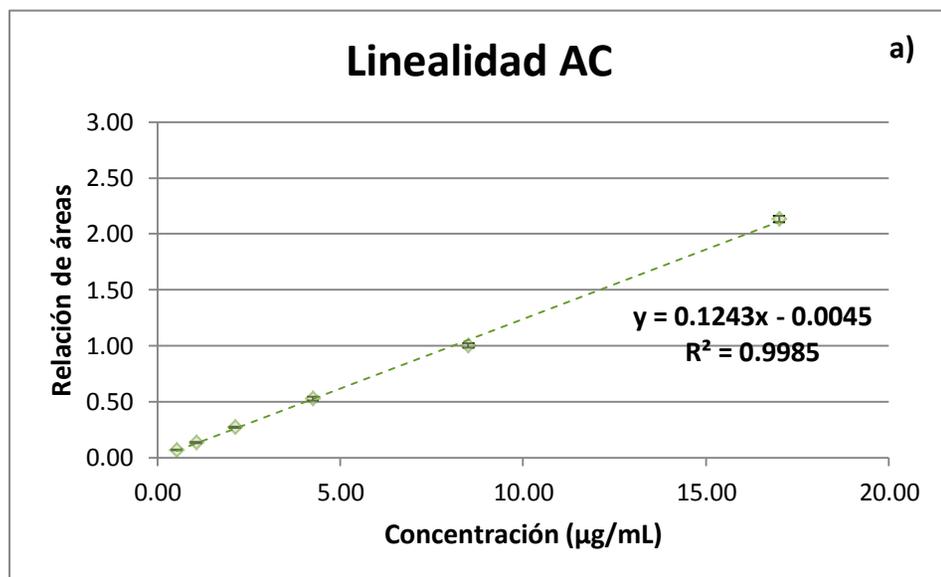


Figura 21. Linealidad del método de cuantificación para los compuestos AC (a), AR (b) y JC (c)

### 7.3.6. PRECISIÓN

El método demostró ser preciso de acuerdo a los valores del coeficiente de variación porcentual (CV%) tanto en la repetibilidad como en la reproducibilidad.

#### 7.3.6.1. Repetibilidad

Los valores promedio de muestras por sextuplicado (3 muestras por día en dos días distintos) para la evaluación de la repetibilidad de los compuestos AC, AR y JC se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Repetibilidad del método de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma. Coeficiente de variación porcentual (CV%) respecto al promedio y desviación estándar de la concentración observada (n=6).

Compuesto	Concentración nominal (µg/mL)	Concentración observada (µg/mL)	DE	CV%
AC	0.85	0.90	0.04	<b>4.05</b>
	6.80	6.85	0.15	<b>2.21</b>
	12.75	12.62	0.34	<b>2.68</b>
AR	2.00	2.03	0.08	<b>3.98</b>
	16.00	16.53	0.62	<b>3.75</b>
	30.00	29.92	0.85	<b>2.85</b>
JC	7.00	7.43	0.22	<b>3.02</b>
	56.00	59.10	1.55	<b>2.62</b>
	105.00	102.98	3.04	<b>2.95</b>

#### 7.3.6.2. Reproducibilidad

Tabla 11. Reproducibilidad del método de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma. Coeficiente de variación porcentual (CV%) respecto al promedio y desviación estándar de la concentración observada (n=6).

Compuesto	Concentración nominal (µg/mL)	Concentración observada (µg/mL)	DE	CV%
AC	0.85	0.91	0.04	<b>4.36</b>
	6.80	6.80	0.33	<b>4.89</b>
	12.75	12.52	0.32	<b>2.54</b>
AR	2.00	2.04	0.08	<b>3.85</b>
	16.00	16.47	0.58	<b>3.55</b>
	30.00	29.36	0.62	<b>2.10</b>
JC	7.00	7.46	0.24	<b>3.28</b>
	56.00	58.05	2.17	<b>3.74</b>
	105.00	102.16	2.94	<b>2.87</b>

La Tabla 11 incluye los CV% correspondientes a tres días de evaluación de las muestras, para confirmar que su valor es menor al 15%, en todos los casos, por lo que se dice que el método es reproducible.

### 7.3.7. EXACTITUD

El método se considera exacto de acuerdo al valor Bias de  $\pm 15$ , los valores obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Exactitud del método de cuantificación de los compuestos AC, AR y JC en plasma. Bias del recobro relativo respecto a la concentración nominal (n=6).

Compuesto	Concentración nom ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recobro relativo (%)						Promedio	Bias
AC	0.85	99.95	105.77	103.87	111.68	110.45	106.08	106.30	<b>6.30</b>
	6.80	102.04	102.61	103.22	99.23	97.56	99.67	100.72	<b>0.72</b>
	12.75	96.13	102.29	98.42	101.23	99.85	95.80	98.96	<b>-1.04</b>
AR	2.00	96.73	99.26	101.14	99.31	107.66	104.80	101.48	<b>1.48</b>
	16.00	101.50	102.45	107.95	97.20	106.66	104.22	103.33	<b>3.33</b>
	30.00	95.91	100.91	97.84	102.28	103.23	98.32	99.75	<b>-0.25</b>
JC	7.00	102.74	103.10	108.51	104.87	110.88	107.18	106.21	<b>6.21</b>
	56.00	108.34	106.02	105.18	103.52	101.48	108.64	105.53	<b>5.53</b>
	105.00	93.95	101.33	98.11	99.82	99.95	95.30	98.08	<b>-1.92</b>

### 7.3.8. ESTABILIDAD

Las muestras sometidas a las diferentes condiciones de exposición fueron comparadas contra muestras frescas preparadas el mismo día. Se obtuvo el porcentaje de desviación de la concentración entre las muestras.

A continuación, se representan gráficamente los valores promedio con su desviación estándar de los puntos de control (bajo, medio y alto) de cada compuesto en las pruebas de estabilidad para ciclos de congelamiento/descongelamiento (Figura 22 a-c), en automuestreador por 24 h (Figura 23 a-c) y en almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 8 horas, 15 días y 1 mes (Figura 24 a-c).

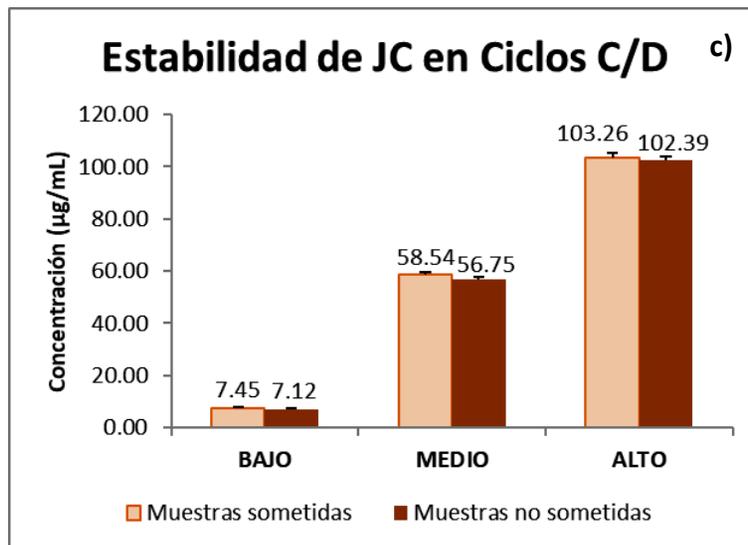
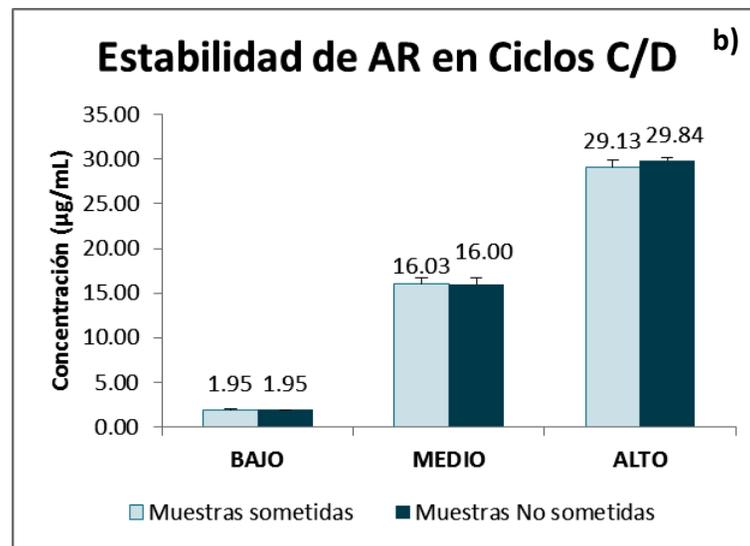
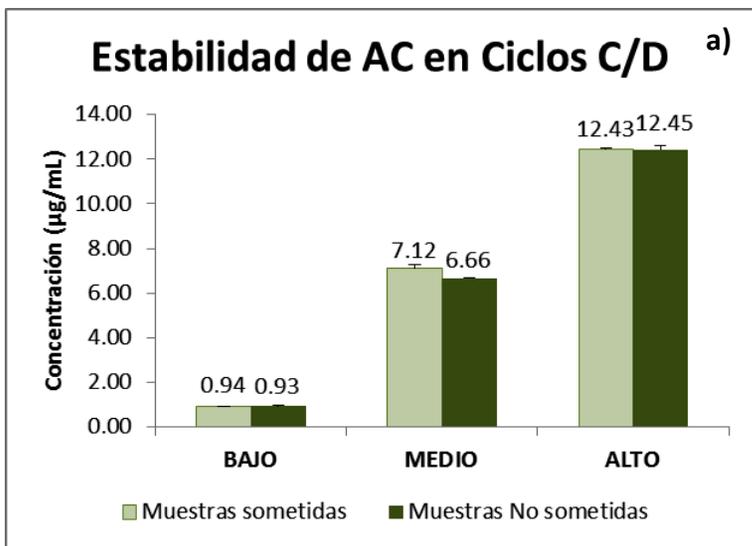


Figura 22. Promedio de concentración de AC (a), AR (b) y JC (c), posterior a los tres ciclos de congelamiento y descongelamiento (n=3).

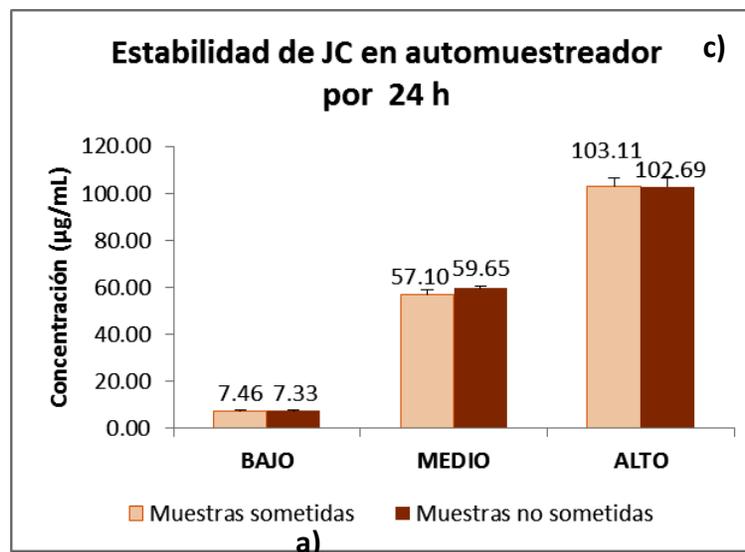
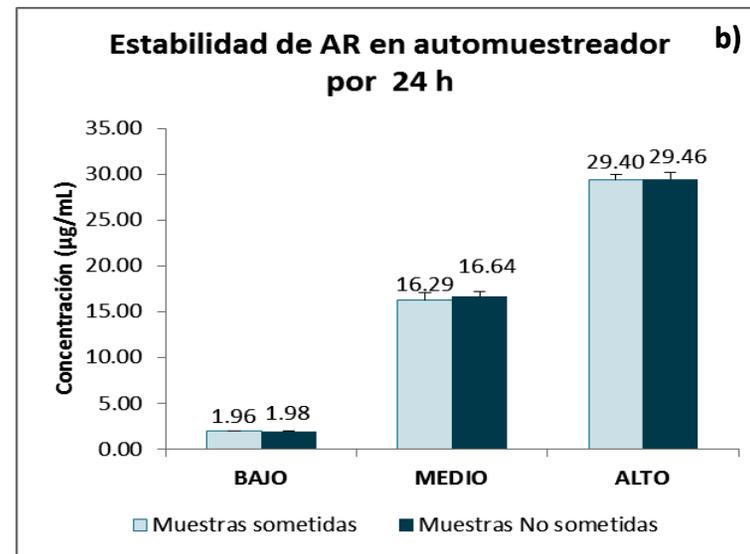
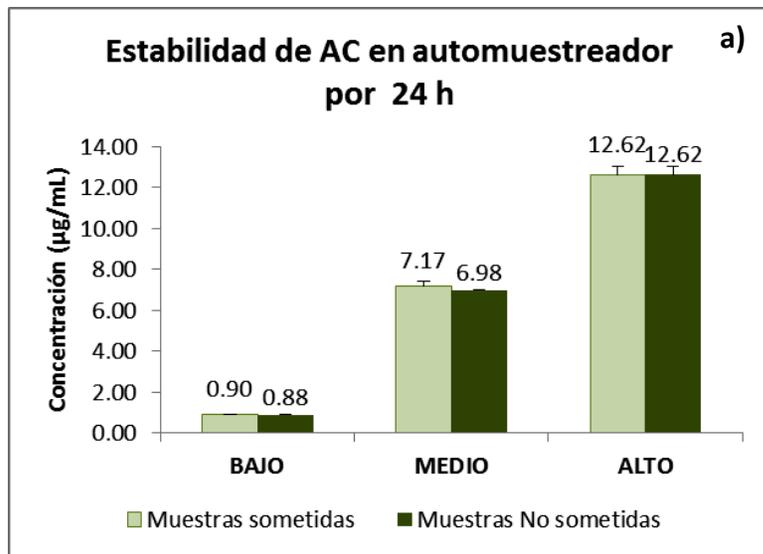


Figura 23. Promedio de concentración de AC (a), AR (b) y JC (c) posterior a 24 h en el automuestreador a T = 25°C (n=3).

b)

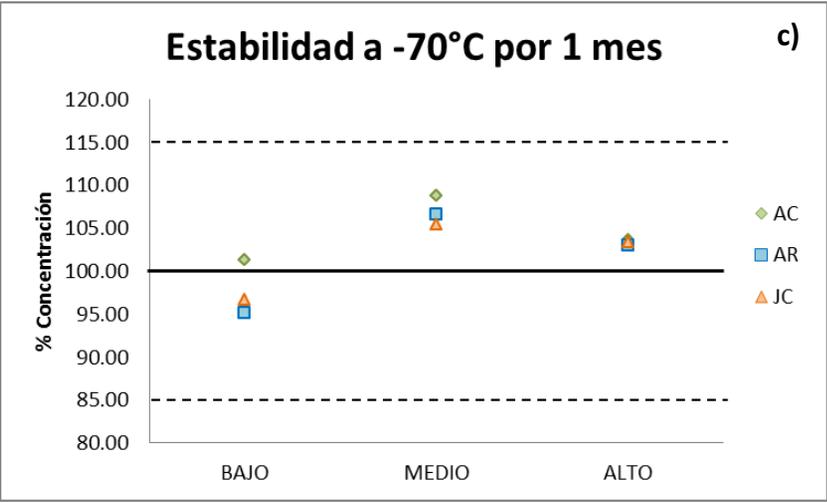
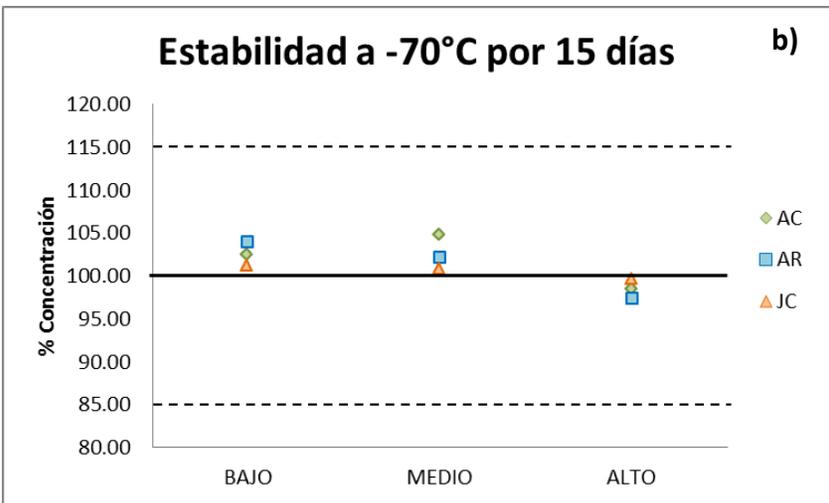
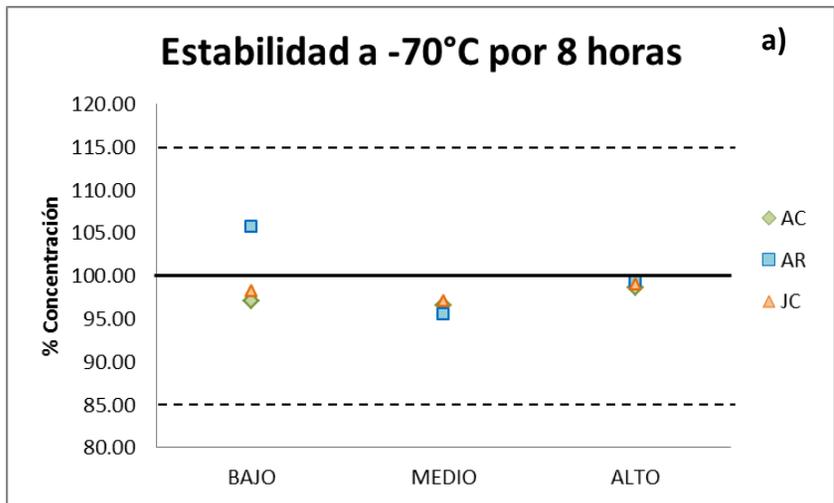


Figura 24. Promedio del porcentaje de desviación de la concentración respecto a las muestras frescas de puntos de control (n = 3) en evaluación de estabilidad en almacenamiento a -70°C por 8 horas (a), 15 días (b) y 1 mes (c).

#### 7.4. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO PRELIMINAR

Posterior a la validación del método analítico se analizaron las muestras plasmáticas de tres ratones ICR evaluados a los diferentes tiempos preestablecidos, posteriores a la administración de una dosis de 500 mg/kg de la fracción activa de *Salvia elegans*, la cual contenía: 8.5 mg/kg de AC, 20 mg/kg de AR y 70 mg/kg de JC. En las tablas 13 a 15, se presentan de manera tabular y gráfica (Figura 25-27) las concentraciones plasmáticas de los diferentes compuestos, analizados por el complemento de Excel PKSolver.

Tabla 13. Concentraciones plasmáticas de ácido cafeico de 0 a 240 minutos.

TIEMPO (min)	Concentración plasmática de ácido cafeico (µg/mL)									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	PROM	DE
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---	---
2	0.45	0.57	2.19	0.65	0.69	1.58	0.69	1.82	<b>1.08</b>	<b>0.67</b>
5	2.76	3.35	3.45	4.27	2.19	5.94	1.46	1.51	<b>3.12</b>	<b>1.50</b>
7	2.90	3.95	4.44	2.26	4.52	2.45	3.64	4.23	<b>3.55</b>	<b>0.90</b>
10	1.06	2.53	2.56	3.02	3.21	4.32	1.51	2.54	<b>2.59</b>	<b>1.00</b>
15	2.47	1.65	2.91	3.81	2.50	1.67	2.65	1.36	<b>2.38</b>	<b>0.80</b>
30	0.38	2.21	3.27	2.01	1.28	2.97	2.28	2.96	<b>2.17</b>	<b>0.96</b>
45	ND	1.17	1.02	0.38	2.08	0.63	2.86	0.39	<b>1.22</b>	<b>0.93</b>
60	3.05	2.14	1.31	0.89	0.63	1.59	1.68	0.57	<b>1.48</b>	<b>0.84</b>
120	0.81	1.02	1.86	0.73	0.82	1.68	1.72	1.01	<b>1.21</b>	<b>0.47</b>
240	0.16	0.14	0.15	ND	0.20	0.15	ND	0.20	<b>0.12</b>	<b>0.02</b>

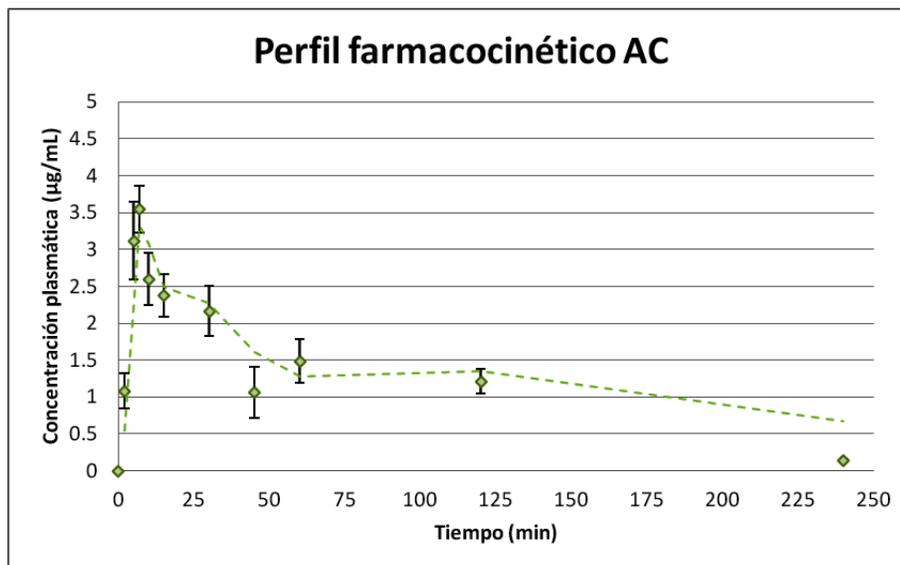


Figura 25. Perfil farmacocinético preliminar de ácido cafeico. Promedio de concentración plasmática de ácido cafeico  $\pm$  error estándar (n=3).

Tabla 14. Concentraciones plasmáticas de ácido rosmarínico de 0 a 240 minutos.

TIEMPO (min)	Concentración plasmática de ácido rosmarínico (µg/mL)								PROM	DE
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---	---
2	ND	ND	3.97	5.92	7.89	6.59	6.48	4.35	<b>5.87</b>	<b>1.48</b>
5	6.38	5.37	6.84	11.27	7.20	14.13	4.69	5.03	<b>7.61</b>	<b>3.34</b>
7	9.85	6.92	10.40	5.17	10.51	4.64	5.53	10.01	<b>7.88</b>	<b>2.56</b>
10	ND	1.62	3.50	3.41	ND	8.43	1.02	4.35	<b>3.72</b>	<b>2.62</b>
15	3.34	2.32	2.03	1.53	1.32	0.92	1.02	2.66	<b>1.89</b>	<b>0.85</b>
30	ND	1.41	1.95	2.50	0.80	3.04	2.16	3.27	<b>1.89</b>	<b>1.11</b>
45	ND	1.64	ND	ND	3.94	0.77	4.63	0.63	<b>1.45</b>	<b>1.84</b>
60	ND	0.75	1.18	1.04	1.17	3.13	ND	1.64	<b>1.12</b>	<b>1.00</b>
120	ND	1.21	1.70	ND	ND	2.84	ND	ND	<b>0.72</b>	<b>1.09</b>
240	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---	---

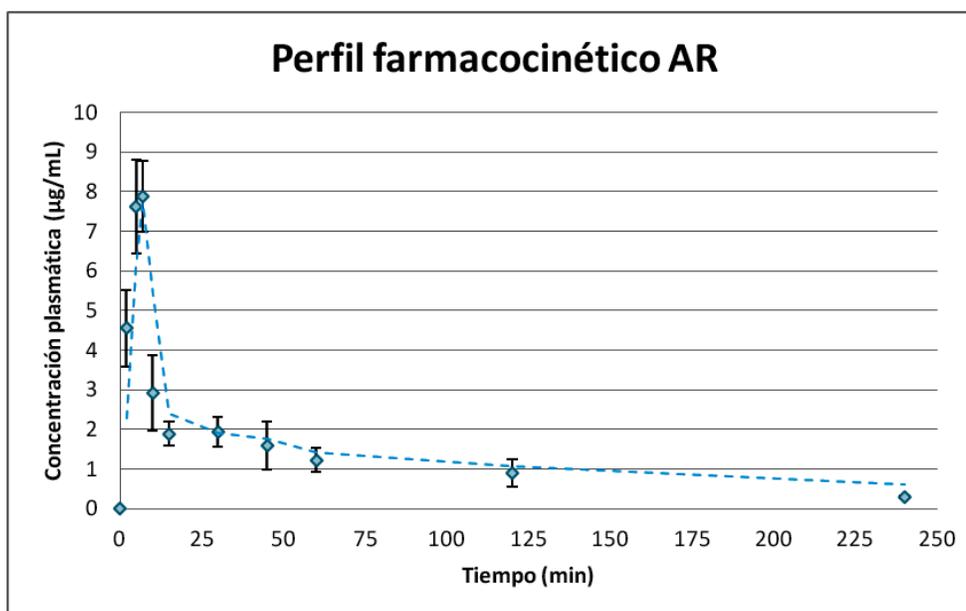


Figura 26. Perfil farmacocinético preliminar de ácido rosmarínico. Promedio de concentración plasmática de ácido rosmarínico  $\pm$  error estándar (n=3).

Tabla 15. Concentraciones plasmáticas de jaceosidina de 0 a 240 minutos.

TIEMPO (min)	Concentración plasmática de jaceosidina (µg/mL)								PROM	DE
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---	---
2	2.04	0.96	1.64	ND	0.98	2.00	2.42	2.69	<b>1.59</b>	<b>0.67</b>
5	14.72	18.18	13.60	11.30	14.03	17.08	13.24	7.16	<b>13.66</b>	<b>3.41</b>
7	9.99	9.64	7.97	7.26	6.92	7.92	9.05	7.51	<b>8.28</b>	<b>1.14</b>
10	3.35	1.74	3.00	2.41	1.45	2.58	2.29	2.97	<b>2.47</b>	<b>0.65</b>
15	8.13	1.18	2.19	1.01	1.63	0.77	0.72	0.67	<b>2.04</b>	<b>2.51</b>
30	0.46	1.98	1.38	2.33	0.84	2.87	1.30	1.95	<b>1.64</b>	<b>0.79</b>
45	ND	1.57	0.47	ND	3.88	ND	5.06	0.66	<b>1.51</b>	<b>2.04</b>
60	2.24	2.37	1.85	ND	0.69	2.83	ND	1.66	<b>1.45</b>	<b>0.74</b>
120	ND	0.88	1.24	ND	0.55	2.84	ND	ND	<b>0.69</b>	<b>1.02</b>
240	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---	---

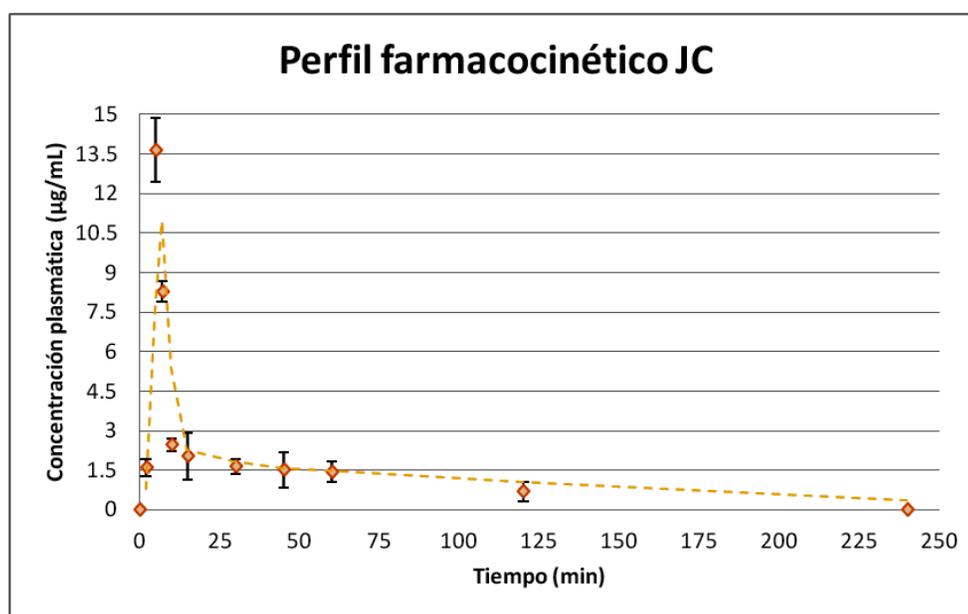


Figura 27. Perfil farmacocinético preliminar de jaceosidina. Promedio de concentración plasmática de jaceosidina  $\pm$  error estándar (n=3).

## 7.5. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE ÁCIDO CAFEICO EN UN MODELO MONOCOMPARTIMENTAL Y BICOMPARTIMENTAL

La administración de la fracción activa de *Salvia elegans* en ocho ratones de forma oral, demostró que se absorbe rápidamente, ya que, es posible cuantificar la concentración presente en plasma del compuesto AC desde los dos minutos posteriores a la administración, alcanzando un pico promedio de concentración de 3.63 µg/mL a los siete minutos.

La evolución de la concentración plasmática del compuesto ácido cafeico posterior a la administración oral de 500 mg/kg de la fracción activa (Tabla 16), permitió establecer los principales parámetros farmacocinéticos ajustados a dos modelos: monocompartimental y bicompartimental, con las ecuaciones descritas posteriormente.

Tabla 16. Variaciones de concentración de AC en plasma de ratón en las primeras cuatro horas posteriores a la administración de una dosis de 500 mg/kg de fracción activa respecto al peso del ratón. Media ± DE (n=8). NC = No cuantificable.

Tiempo (min)	Concentración plasmática AC (µg/mL)
2	0.73 ± 0.09
5	3.21 ± 0.27
7	3.63 ± 0.30
10	2.77 ± 0.32
15	2.60 ± 0.19
30	2.33 ± 0.11
60	1.72 ± 0.31
120	1.27 ± 0.45
240	NC

$$C_p = C_1 e^{-k_{el} \cdot t} + C_2 e^{-k_a \cdot t} \quad \text{Modelo monocompartimental}$$

$$C_p = C_1 e^{-\alpha \cdot t} + C_2 e^{-\beta \cdot t} + C_3 e^{-k_{el} \cdot t} \quad \text{Modelo bicompartimental}$$

La tabla 17 muestra los parámetros farmacocinéticos asociados al comportamiento plasmático del ácido cafeico en ratones, ajustados a los modelos previamente mencionados.

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos de ácido cafeico en plasma de ratón. Media  $\pm$  DE (n=8).

Parámetro	Monocompartimental	Bicompartimental	Unidad
A	3.49 $\pm$ 0.10	56.37 $\pm$ 10.30	$\mu\text{g/mL}$
B	---	2.37 $\pm$ 0.16	1/min
$\alpha$	---	0.15 $\pm$ 0.01	$\mu\text{g/mL}$
$\beta$	---	0.01	1/min
$k_a$	0.33 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.01	1/min
$k_{10}$	0.01	0.02	1/min
$k_{12}$	---	0.09 $\pm$ 0.01	1/min
$k_{21}$	---	0.06 $\pm$ 0.01	1/min
$t_{1/2k\alpha}$	---	4.52 $\pm$ 0.33	min
$t_{1/2k\beta}$	---	127.95 $\pm$ 44.33	min
$t_{1/2k_a}$	2.10 $\pm$ 0.20	4.20 $\pm$ 0.29	min
$t_{1/2k_{10}}$	68.09 $\pm$ 18.88	---	min
V/F	2.52 $\pm$ 0.09	1.37 $\pm$ 0.15	$\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$
CL/F	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
$V_2/F$	---	2.00 $\pm$ 0.46	mL
$CL_2/F$	---	0.12 $\pm$ 0.01	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$
$T_{\text{max}}$	10.74 $\pm$ 0.40	9.31 $\pm$ 0.53	min
$C_{\text{máx}}$	3.01 $\pm$ 0.20	3.14 $\pm$ 0.26	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
$AUC_{0-240}$	227.12 $\pm$ 39.02	222.25 $\pm$ 33.68	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$
$AUC_{0-\infty}$	333.91 $\pm$ 105.23	422.42 $\pm$ 138.34	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$
MRT	101.26 $\pm$ 27.01	129.59 $\pm$ 17.95	min
<b>Diagnóstico</b>	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>	
SS	1.9740	1.5439	
R <sup>2</sup>	0.9593	0.9681	
AIC	11.4404	13.4744	
SC	11.6787	13.8716	

Donde A y B representan la concentración plasmática del AC en el compartimento central y periférico, respectivamente;  $\alpha$  y  $\beta$  son las constantes de disposición empíricas de orden uno correspondientes a los coeficientes de los exponentes de los valores de A y B;  $k_a$  y  $k_{10}$ , siguiendo el orden, son las constantes de velocidad de absorción y eliminación aparentes de primer orden;  $k_{12}$  y  $k_{21}$ : constantes de velocidad de transferencia desde el compartimento central al compartimento periférico (constante de distribución) y de transferencia del compartimento periférico al compartimento central (constante de retorno), correspondientemente;  $t_{1/2k\alpha}$ ,  $t_{1/2k\beta}$ ,  $t_{1/2k_a}$  y  $t_{1/2k_{10}}$ : tiempo medio de distribución, retorno, absorción y eliminación, en cada caso.

El volumen de distribución aparente está representado por  $V/F$ , mientras que el aclaramiento plasmático aparente, es  $Cl/F$ ;  $C_{m\acute{a}x}$ , es la concentración máxima, y  $t_{m\acute{a}x}$ , el tiempo que tarda en alcanzarse dicha concentración;  $AUC_{0\rightarrow 240}$  y  $AUC_{0\rightarrow \infty}$ , es el área bajo la curva desde 0 hasta los 240 min y desde 0 hasta infinito, respectivamente; MRT: tiempo medio de residencia.

La bondad de ajuste de cada modelo se evaluó respecto a los valores de cuatro diagnósticos, la suma de cuadrados (SS), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de Schwarz (SC). Además, las figuras 13 y 14 muestran las gráficas con escalas aritméticas y semilogarítmicas, pertenecientes al comportamiento del ácido cafeico en los modelos evaluados, las cuales permiten realizar una determinación cualitativa acerca del mejor ajuste al modelo.

Se alcanzó una  $C_{m\acute{a}x}$  de 3.01  $\mu\text{g/mL}$  a un  $t_{m\acute{a}x}$  de 10.74 min para el modelo monocompartimental, mientras que para el modelo bicompartmental se obtuvieron  $C_{m\acute{a}x}$  de 3.14  $\mu\text{g/mL}$ , a los 9.31 min. Para el  $AUC_{0\rightarrow 240\text{min}}$  se observaron valores promedio de 227.12 y 222.25  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$  respectivamente. De acuerdo a los valores de los diagnósticos del AIC y SC, el modelo que mejor describe el comportamiento farmacocinético del AC, es el modelo monocompartimental, al tener los valores más bajos en ambos casos. Sin embargo, el valor de  $R^2$ , y el comportamiento de los datos en las figuras 28 y 29, sugiere que el modelo bicompartmental también puede ser considerado.

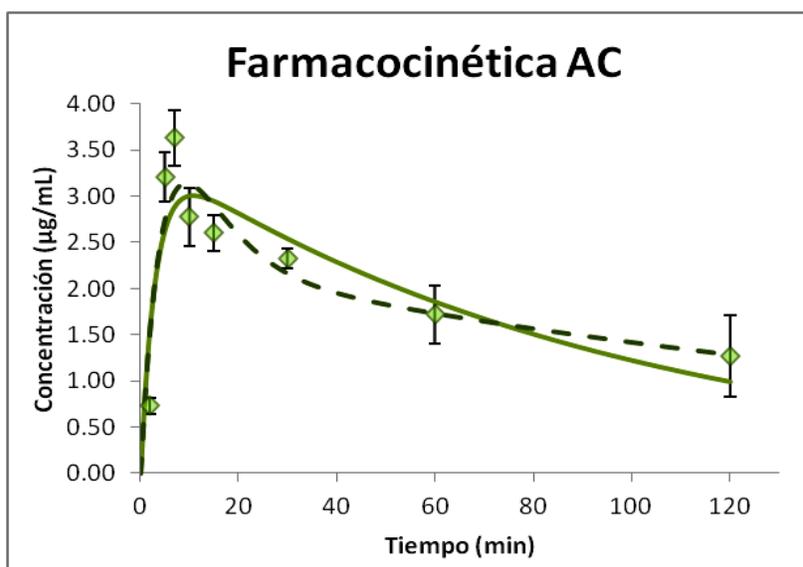


Figura 28. Curva aritmética concentración-tiempo de ácido cafeico en plasma. Datos experimentales ( $\blacklozenge$ ), y estimados por PKSolver del modelo monocompartimental (—) y bicompartmental (-----). Media  $\pm$  DE (n=8).

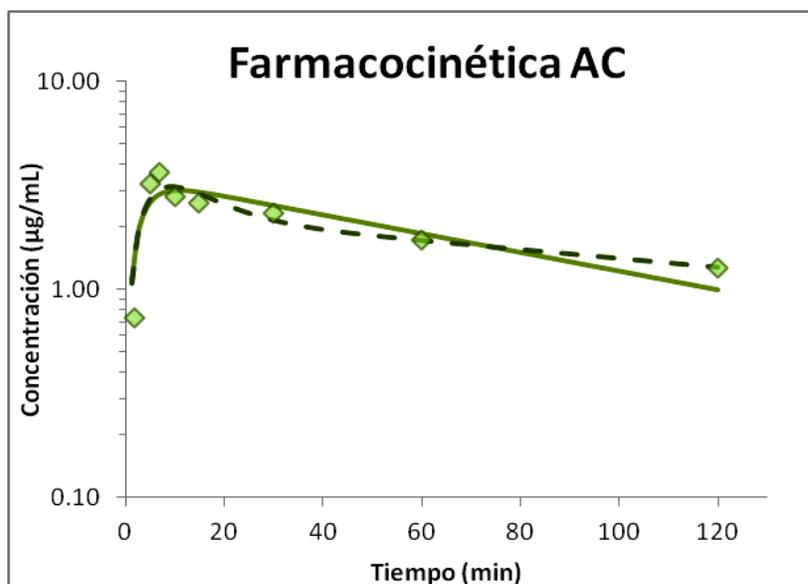


Figura 29. Curva semilogarítmica concentración-tiempo de ácido cafeico en plasma. Datos experimentales ( $\blacklozenge$ ), y estimados por PKSolver del modelo monocompartimental (—) y bicompartimental (-----). Media  $\pm$  DE (n=8).

#### 7.6. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EN UN MODELO MONOCOMPARTIMENTAL Y BICOMPARTIMENTAL

El ácido rosmarínico se detectó desde los dos min posteriores a la administración de una dosis oral de 40 mg/kg de AR contenidos en la dosis de la fracción activa, alcanzando el pico a los siete minutos con una concentración plasmática promedio del compuesto de 9.92  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabla 18. Variaciones de concentración de AR en plasma de ratón en las primeras cuatro horas posteriores a la administración de una dosis de 500 mg/kg de fracción activa respecto al peso del ratón. Media  $\pm$  DE (n=8). NC = No cuantificable.

Tiempo (min)	Concentración plasmática AR ( $\mu\text{g/mL}$ )
2	6.26 $\pm$ 0.30
5	7.56 $\pm$ 0.46
7	9.92 $\pm$ 0.08
10	3.64 $\pm$ 0.41
15	2.48 $\pm$ 0.13
30	2.11 $\pm$ 0.23
60	1.56 $\pm$ 0.13
120	NC
240	NC

A partir de la evolución de la concentración plasmática del AR, mostrada en la tabla 18, se pudo realizar la evaluación farmacocinética en modelos de uno y dos compartimientos, para obtener los parámetros asociados a dichos sistemas, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 19. Parámetros farmacocinéticos de ácido rosmarínico en plasma de ratón. Media  $\pm$  DE (n=8).

Parámetro	Monocompartimental	Bicompartimental	Unidad
<b>A</b>	40.73 $\pm$ 8.11	343.35 $\pm$ 48.36	$\mu\text{g/mL}$
<b>B</b>	---	1.29 $\pm$ 0.27	1/min
<b><math>\alpha</math></b>	---	0.25 $\pm$ 0.01	$\mu\text{g/mL}$
<b><math>\beta</math></b>	---	0.01	1/min
<b><math>k_a</math></b>	0.31 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.02	1/min
<b><math>k_{10}</math></b>	0.17 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	1/min
<b><math>k_{12}</math></b>	---	0.23 $\pm$ 0.01	1/min
<b><math>k_{21}</math></b>	---	0.03 $\pm$ 0.01	1/min
<b><math>t_{1/2k\alpha}</math></b>	---	2.81 $\pm$ 0.09	min
<b><math>t_{1/2k\beta}</math></b>	---	70.68 $\pm$ 2.96	min
<b><math>t_{1/2k_a}</math></b>	2.26 $\pm$ 0.15	2.61 $\pm$ 0.17	min
<b><math>t_{1/2k_{10}}</math></b>	4.17 $\pm$ 0.50	---	min
<b>V/F</b>	1.19 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.05	$\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$
<b>CL/F</b>	0.20 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
<b><math>V_2/F</math></b>	---	15.10 $\pm$ 3.56	mL
<b><math>CL_2/F</math></b>	---	0.23 $\pm$ 0.01	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$
<b><math>t_{\text{max}}</math></b>	4.35 $\pm$ 0.24	4.16 $\pm$ 0.21	min
<b><math>C_{\text{máx}}</math></b>	8.10 $\pm$ 0.27	8.12 $\pm$ 0.28	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
<b>AUC<sub>0-240</sub></b>	100.69 $\pm$ 9.25	149.57 $\pm$ 17.83	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$
<b>AUC<sub>0-\infty</sub></b>	100.70 $\pm$ 9.26	151.42 $\pm$ 23.69	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$
<b>MRT</b>	9.28 $\pm$ 0.69	102.33 $\pm$ 5.22	min
<b>Diagnóstico</b>	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>	
<b>SS</b>	11.5406	8.0510	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9428	0.9601	
<b>AIC</b>	23.1211	24.6006	
<b>SC</b>	22.9588	24.3301	

Para el ácido rosmarínico se obtuvo un AUC<sub>0-240min</sub> con valores promedio de 100.69 y 149.57  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$  en cada modelo. La  $C_{\text{máx}}$  observada en el modelo monocompartimental es de 8.10  $\mu\text{g/mL}$ , la cual se alcanzó rápidamente un  $t_{\text{max}}$  de 4.35 min, con una  $k_a$  de 0.31  $\text{min}^{-1}$ ; los valores para los mismos parámetros en el modelo bicompartimental son: 8.12  $\mu\text{g/mL}$  de  $C_{\text{máx}}$ , a los 4.16 min, con una  $k_a$  de 0.27  $\text{min}^{-1}$ .

En el caso del ácido rosmarínico, los diagnósticos muestran valores menores para el modelo monocompartimental, los cuales sugieren una mejor bondad de ajuste de acuerdo al valor del AIC de 23.1211 en el modelo monocompartimental, contra 24.6006 en el modelo bicompartimental; y de 22.9588 contra 24.3301 del criterio de Schwarz correspondiente a cada modelo.

No obstante, el coeficiente de determinación, tiene un valor mayor en el ajuste bicompartimental, de 0.9601, mostrando la fiabilidad del modelo estimado a los datos. Además, lo anterior, se sustenta en las Figuras 30 y 31, que permiten visualizar un mejor ajuste del modelo bicompartimental contra los datos obtenidos experimentalmente, tanto en la gráfica de progresión aritmética como en la semilogarítmica de las concentraciones plasmáticas del compuesto ácido rosmarínico.

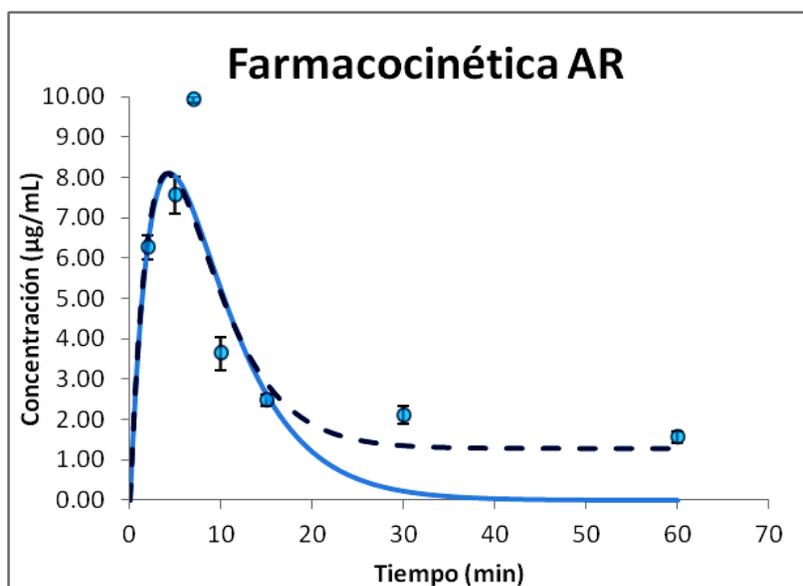


Figura 30. Curva aritmética concentración-tiempo de ácido rosmarínico en plasma. Datos experimentales (●), y estimados por PKSolver del modelo monocompartimental (—) y bicompartimental (-----). Media  $\pm$  DE (n=8).

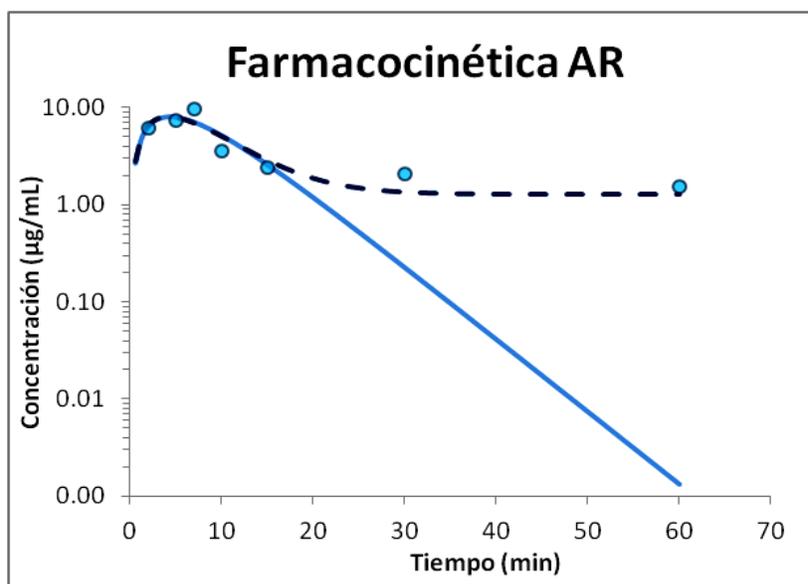


Figura 31. Curva semilogarítmica concentración-tiempo de ácido rosmarínico en plasma. Datos experimentales (●), y estimados por PKSolver del modelo monocompartimental (—) y bicompartmental (-----). Media ± DE (n=8).

### 7.7. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE JACEOSIDINA EN UN MODELO MONOCOMPARTIMENTAL Y BICOMPARTIMENTAL

Posterior a la administración correspondiente de 70 mg/Kg de la trihidroxiflavona, se observó su pico máximo de concentración, así como la cuantificación del mismo a los cinco minutos, dicha concentración, corresponde a un promedio de 13.71µg/mL.

Tabla 20. Variaciones de concentración de JC en plasma de ratón en las primeras cuatro horas posteriores a la administración de una dosis de 500 mg/kg de fracción activa respecto al peso del ratón. Media ± DE (n=8). ND = No detectable.

Tiempo (min)	Concentración plasmática JC (µg/mL)
2	NC
5	13.71 ± 0.33
7	8.15 ± 0.57
10	3.86 ± 0.62
15	2.88 ± 0.39
30	2.14 ± 0.56
60	NC
120	NC
240	NC

La rápida disminución de este compuesto, es notable, pues a partir de los 60 minutos el compuesto está por debajo de los límites de cuantificación (Tabla 20). Con lo anterior, se evalúan los cambios de la concentración de la jaceosidina en plasma, que se ajustaron a los modelos estudiados. Los parámetros farmacocinéticos (Tabla 21), se compararon posteriormente para determinar el mejor modelo de acuerdo a su evolución.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos de jaceosidina en plasma de ratón. Media  $\pm$  DE (n=8).

<b>Parámetro</b>	<b>Monocompartimental</b>	<b>Bicompartimental</b>	<b>Unidad</b>
<b>A</b>	39.72 $\pm$ 5.08	555.16 $\pm$ 81.54	$\mu\text{g/mL}$
<b>B</b>	---	3.26 $\pm$ 0.45	<b>1/min</b>
<b><math>\alpha</math></b>	---	0.52 $\pm$ 0.02	$\mu\text{g/mL}$
<b><math>\beta</math></b>	---	0.02	<b>1/min</b>
<b><math>k_a</math></b>	4.10 $\pm$ 0.31	0.59 $\pm$ 0.03	<b>1/min</b>
<b><math>k_{10}</math></b>	0.22 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.05	<b>1/min</b>
<b><math>k_{12}</math></b>	---	0.30 $\pm$ 0.03	<b>1/min</b>
<b><math>k_{21}</math></b>	---	0.04	<b>1/min</b>
<b><math>t_{1/2k\alpha}</math></b>	---	1.34 $\pm$ 0.06	<b>min</b>
<b><math>t_{1/2k\beta}</math></b>	---	45.67 $\pm$ 10.01	<b>min</b>
<b><math>t_{1/2k_a}</math></b>	0.17 $\pm$ 0.01	1.18 $\pm$ 0.06	<b>min</b>
<b><math>t_{1/2k_{10}}</math></b>	3.24 $\pm$ 0.46	---	<b>min</b>
<b>V/F</b>	1.89 $\pm$ 0.24	1.13 $\pm$ 0.08	$\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$
<b>CL/F</b>	0.40 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.05	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
<b><math>V_2/F</math></b>	---	8.04 $\pm$ 1.19	<b>mL</b>
<b><math>CL_2/F</math></b>	---	0.33 $\pm$ 0.05	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$
<b><math>t_{\text{max}}</math></b>	0.76 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.10	<b>min</b>
<b><math>C_{\text{máx}}</math></b>	31.81 $\pm$ 3.19	25.16 $\pm$ 1.63	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
<b>AUC<sub>0-240</sub></b>	173.157 $\pm$ 2.96	235.99 $\pm$ 23.48	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$
<b>AUC<sub>0-\infty</sub></b>	173.158 $\pm$ 2.97	326.87 $\pm$ 69.56	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$
<b>MRT</b>	4.92 $\pm$ 0.65	45.40 $\pm$ 14.71	<b>min</b>
<b>Diagnóstico</b>	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>	
<b>SS</b>	8.2446	0.1951	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9709	0.9993	
<b>AIC</b>	18.6574	0.1948	
<b>SC</b>	18.0327	-0.8464	

Los diagnósticos y las figuras 32-33, muestran en todos los casos que la mejor bondad de ajuste es para el modelo de dos compartimientos, con valores de 0.1948 y -0.8464, comparados con 18.6574 y 18.0327 en los criterios de Akaike y Schwartz, respectivamente. En cuanto al coeficiente de determinación, R<sup>2</sup>, claramente se observa un valor mayor para el mismo modelo (BC: 0.9993 > MC: 0.9709).

Los parámetros farmacocinéticos más relevantes para la flavona, en el modelo bicompartimental son los volúmenes de distribución aparentes en el compartimiento central y periférico de: 1.13 y de 8.04 mL. Lo mismo con el tiempo de residencia media con un valor promedio de 45.4 min, así como la  $C_{m\acute{a}x}$  de 25.16  $\mu\text{g/mL}$ , a un acelerado  $t_{m\acute{a}x}$  de 1.90 min.

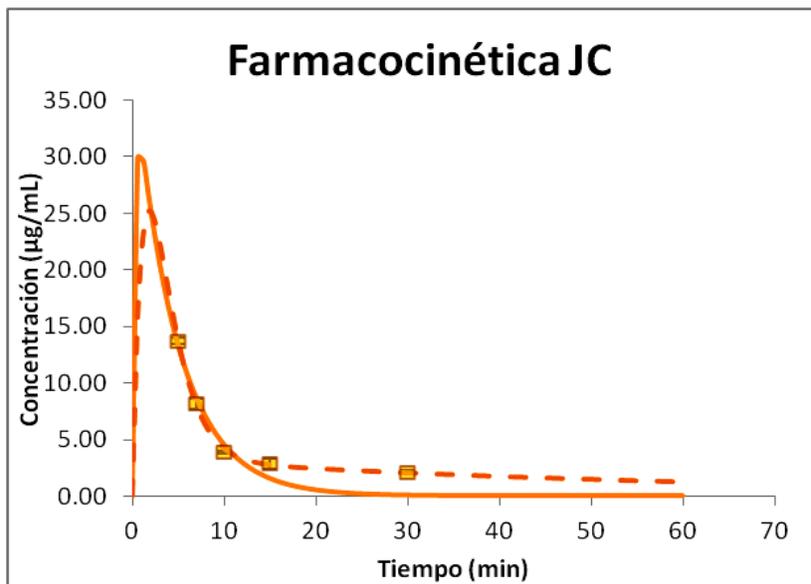


Figura 32. Curva aritmética concentración-tiempo de jaceosidina en plasma. Datos experimentales (■), y estimados por PKSolver del modelo monocompartimental (—) y bicompartimental (-----). Media  $\pm$  DE (n=8).

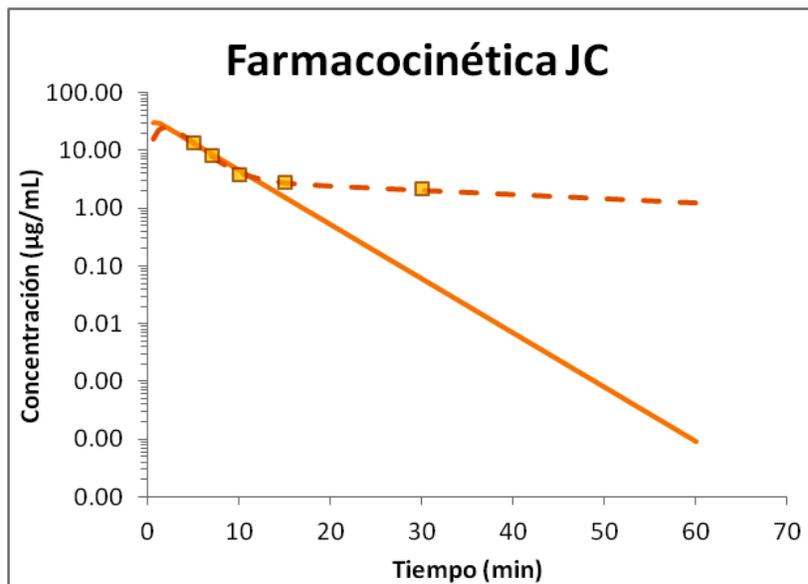


Figura 33. Curva semilogarítmica concentración-tiempo de jaceosidina en plasma. Datos experimentales (■), y estimados por PKSolver del modelo monocompartimental (—) y bicompartimental (-----). Media  $\pm$  DE (n=8).

## 8. DISCUSIÓN

Los compuestos fenilpropanoides conocidos como ácido cafeico (AC) y ácido rosmarínico (AR), así como el flavonoide denominado jaceosidina (JC) se aislaron y compararon contra estándares por CCF y CLAR. Estos compuestos se habían identificado previamente en *Salvia elegans* (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2017); así como en el género (Pereira *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2012). Dentro de las actividades farmacológicas, se les ha demostrado a estos compuestos como antioxidantes, antihipertensivos, antiinflamatorios, neuroprotectores, entre otras (Jiang *et al.*, 2005; Amoah *et al.*, 2016; Jiménez-Ferrer *et al.*, 2010; Nam *et al.*, 2012).

Debido a las actividades que presentan dichos compuestos, en este trabajo se enfocó en la determinación y evaluación de los parámetros farmacocinéticos de la fracción estandarizada de *Salvia elegans* que contenía los compuestos; para llevar a cabo el presente trabajo, se desarrolló y validó el método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación simultánea de los compuestos activos presentes en plasma de ratones ICR.

El método, cumplió con los parámetros dictados por la guía de validación consultada (FDA, 2011). Para la evaluación de la selectividad (Figura 19), se verificó que los picos de los compuestos estaban debidamente aislados y definidos y se observó que tenían un comportamiento lineal en el rango de concentraciones estudiadas (Figura 21). Del mismo modo, la precisión en términos de repetibilidad (Tabla 10) y de reproducibilidad (Tabla 11), la exactitud (Tabla 12) y la estabilidad (Figuras 22-24), tuvieron un coeficiente de variación porcentual menor al 15%, establecido para el análisis de muestras biológicas. Finalmente, se determinó que el método de extracción de los compuestos en plasma era adecuado, teniendo un porcentaje de recobro mayor al 94%, en todos los compuestos.

En un estudio preliminar, con el plasma de tres ratones, se analizaron los comportamientos de las concentraciones obtenidas de los compuestos intactos (Tablas 13-15) y se construyeron perfiles farmacocinéticos preliminares de los mismos (Figuras 25-27), lo que permitió visualizar su posible comportamiento y tratamiento de los datos. A partir de ellos, se pudo realizar un análisis más detallado de las concentraciones en plasma de los compuestos en ocho ratones ICR.

En el caso del AC, es necesario resaltar que este compuesto se absorbe escasamente en el tracto digestivo (Azuma *et al.*, 2000), por lo cual su presencia en plasma como un compuesto intacto se ve disminuida, además se ha reportado que la absorción que llega a ocurrir y su biotransformación ocurre en gran medida en el intestino delgado (Lafay *et al.*, 2006; Azzini *et al.*, 2007), siendo visible únicamente durante un corto periodo de tiempo. Por lo anterior, se esperaba que la  $C_{m\acute{a}x}$  de 3.01  $\mu\text{g/mL}$  obtenida en un modelo monocompartimental se alcanzara a un tiempo súbito de 10.74 (0.40) min; la evaluación farmacocinética realizada por Konishi *et al.* (2005) en un modelo no compartimental administrando una dosis, de aproximadamente el doble, en ratas muestra una concentración y tiempo semejante a los valores calculados [ $C_{m\acute{a}x}=11.24 \mu\text{mol/L}$  (2.02  $\mu\text{g/mL}$ );  $t_{m\acute{a}x}=10$  min].

Recientemente Wang (2017), señala que las propiedades farmacocinéticas del AR, están caracterizadas por su rápida absorción, eliminación de velocidad media y una baja biodisponibilidad. Estos aspectos ya han sido evaluados *in vivo* e *in vitro*, en ambos casos se sugiere que la mayoría del AR se absorbe rápidamente en el tracto digestivo, donde es metabolizado por la microflora intestinal en sus formas metiladas y conjugadas, las cuales son absorbidas y distribuidas eficientemente por el transportador de ácido carboxílico en el cuerpo; y la parte de AR libre se degrada antes de ser excretado gradualmente en la orina (Baba *et al.*, 2004; Konishi & Kobayashi, 2005).

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en este estudio simulan las características de la descripción otorgada, sin embargo, los valores no coinciden con lo reportado. La discrepancia de los valores ya se había registrado anteriormente, y se indica que puede ser debido a la influencia de las interacciones del AR con otros compuestos si se administraron en forma conjunta o aislada, así como de las concentraciones del compuesto en cada estudio (Liu *et al.*, 2014).

Por otro lado, en diferentes estudios, los tiempos hasta los que logró detectarse el AR libre estaban por debajo de los 180 min (Jia *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2011; Konishi *et al.*, 2005), eliminándose más rápido que otros compuestos que pudieran estar presentes en los extractos administrados. En nuestro caso, el último registro sobre el LDD, se encontró a los 120 min, mientras que para el LDC fue a los 60 min, dando valores promedio del  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  de 151.42 y con un tiempo de retención de 102 min, los cuales aparentemente coinciden con dosis similares del AR (Lai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Respecto a la flavona, se encontraron los parámetros farmacocinéticos obtenidos dos estudios ambos, con una administración intravenosa a una dosis de 2 mg/kg de JC en ratas, basados en un análisis de un modelo no compartimental (Song *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2018). En nuestro estudio, para la dosis de 70 mg/kg por vía oral, se encontró que el compuesto se elimina rápidamente, coincidente con lo reportado para la administración intravenosa (IV), con un MRT promedio de 45.4 min alcanzado en el modelo bicompartimental.

Se registró un  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  aproximadamente 10 veces mayor con la administración oral del compuesto que de forma IV. La literatura menciona que la biodisponibilidad de los compuestos tipo flavonoides es menor que en los ácidos fenólicos (Konishi *et al.*, 2005; Lafay & Gil-Izquierdo, 2007), esta puede ser la razón por la cual, muestra una pérdida súbita de la concentración de JC a partir de los 5 min y logra cuantificarse hasta los 30 min.

El conocimiento y evaluación de las características farmacocinéticas permite determinar el manejo farmacológico más adecuado para el fármaco, proporcionando el mejor escenario para que el fármaco pueda producir sus máximos efectos terapéuticos (Nicola & Casella, 2012). Los cálculos y gráficos resultantes del estudio farmacocinético preclínico, tienen un valor trascendental en aplicaciones en el diseño de una forma farmacéutica, dosis, posología y administración que posibiliten alcanzar las concentraciones plasmáticas y tisulares para la optimización del tratamiento (De Miguel *et al.*, 2012).

## 9. CONCLUSIONES

La fracción activa de *Salvia elegans* se caracterizó con base en sus compuestos activos y mayoritarios: ácido caféico, ácido rosmarínico y jaceosidina.

Se determinó que los parámetros de validación: selectividad, recobro, linealidad, límite de detección (LDD), límite de cuantificación (LDC), precisión, exactitud, y estabilidad; cumplían con los criterios de aceptación establecidos.

A partir de las muestras biológicas obtenidas, y su análisis farmacocinético, se demostró que el ácido cafeico presenta un ajuste al modelo monocompartimental, mientras que el ácido rosmarínico y la jaceosidina se ajustan a modelos bicompartimentales.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., & Fraga, C. G. (2006). *Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Activity by Flavanol-Rich Foods*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 229–234.

Alcalá, J. & González, R. (2007). *Enfermedad cerebrovascular: epidemiología y prevención*. *Rev Fac Med UNAM*, 50(1): 36-39.

Amoah, S., Sandjo, L., Kratz, J., & Biavatti, M. (2016). *Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects*. *Planta Medica*, 82(05), 388–406.

Arauz, A., & Ruíz-Franco, A. (2012). *Enfermedad vascular cerebral*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(3): 11-21.

Armando, J. (1994). *Introducción al tratamiento de series temporales: Aplicación a las Ciencias de la Salud*. España: Díaz de Santos.

Aung, H. T., Nikai, T., Niwa, M., & Takaya, Y. (2010). *Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage*. *Journal of Natural Medicines*, 64(4), 482–486.

Ávila, M.N., Ordoñez, A.E., & Ramírez, H.J. (2012). *Enfermedad vascular cerebral: incidencia y factores de riesgo en el Hospital General La Perla*. *Medicina Interna de México*, 28(4): 342-344.

Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., & Terao, J. (2000). *Absorption of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Rats after Oral Administration*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5496–5500.

Azzini, E., Bugianesi, R., Romano, F., Di Venere, D., Miccadei, S., Durazzo, A., Foddai, M., Catasta, G., Linsalata, V., & Maiani, G. (2007). *Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar *Violetto di Provenza*) in human subjects: a pilot study*. *British Journal of Nutrition*, 97(05), 963.

Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., & Terao, J. (2004). *Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid*. *Life Sciences*, 75(2), 165–178.

- Baños-González, Manuel, Cantú-Brito, Carlos, Chiquete, Erwin, Arauz, Antonio, Ruiz-Sandoval, José Luís, Villarreal-Careaga, Jorge, Barinagarrementeria, Fernando, & Lozano, José Juan. (2011). *Presión arterial sistólica y pronóstico funcional en pacientes con enfermedad vascular cerebral aguda: Registro mexicano de enfermedad vascular cerebral*. Archivos de cardiología de México, 81(3), 169-175.
- Baumbach, G.L., Dobrin, P.B., Hart, M.N., & Heistad, D.D. (1988). *Mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats*. Circ Res. 62(1):56-64.
- Bejot Y, Caillier M, Ben Salem D, Couvreur G, Rouaud O, Osseby GV, Durier J, Marie C, Moreau T, Giroud M. (2008). *Ischemic stroke subtypes and associated risk factors: a French population-based study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 79: 1344-1348.
- Benjo, A., Thompson, R.E., Fine, D., Hogue, C.W., Alejo, D., Kaw, A., Gerstenblith, G., Shah, A., Berkowitz, D.E., Nyhan, D. (2007). *Pulse pressure is an age-independent predictor of stroke development after cardiac surgery*. Hypertension. 50(4):630-635.
- Bhullar, K. S., Lassalle-Claux, G., Touaibia, M., & Rupasinghe, H. P. V. (2014). *Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin-angiotensin-aldosterone system inhibition*. European Journal of Pharmacology, 730, 125-132.
- Bloch, M. J. (2016). *Worldwide prevalence of hypertension exceeds 1.3 billion*. Journal of the American Society of Hypertension, 10(10), 753-754.
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., & Towiwat, P. (2014). *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from Thunbergia laurifolia Lindl*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 124, 67-73.
- Bragulat, E., & Antonio, M.T. (2001). *Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial: fármacos antihipertensivos*. Med Integr. 37(5): 215-221.
- Brickman, A.M., Zahra, A., Muraskin, J., Steffener, J., Holland, C.M., Habeck, C., Borogovac, A., Ramos, M.A., Brown, T.R., Asllani, I., Stern, Y. (2009). *Reduction in cerebral blood flow in areas appearing as white matter hyperintensities on magnetic resonance imaging* Psychiatry Res. 172(2): 117-120.

Cabrera, A., Martínez, O., Laguna, G., Juárez, R., Rosas, V., Loria, J., Medellín, R., Cerón, R., Sánchez, F., Álvarez, L. & Rumbo, U. (2008). *Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico*. Medicina Interna de México; 24(2):98-103.

Castillo, B., & González, R. (1996). *Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos*. Revista Cubana de Farmacia, 30(1). Recuperado en 24 de febrero de 2019, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003475151996000100009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475151996000100009&lng=es&tlng=es).

Cázares, K. (2015). *La enfermedad vascular cerebral en México: un problema de salud en incremento*. Anales de Radiología México, 14: 243-244.

Chiquete, E., Ruíz, J., Murillo L., Araúz, A., Villarreal J., Barinagarrementeria, F., & Cantú, C. (2011). *Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción*. Rev Mex Neuroci; 12(5): 235-241

Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., & Martino, V. (2007). *Anti-inflammatory activity of flavonoids from Eupatorium amottianum*. Journal of Ethnopharmacology, 112(3), 585–589.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2009). *Catálogo taxonómico de especies de México*. CONABIO.

Córdoba, R. (1996). *Negative side-effects of antihypertensive drugs*. Aten Primaria. 17(6): 420-424.

Cova D, De Angelis L, Giavarini F, Palladini G, Perego R. (1992). *Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers*. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol;30:29–33.

De Ferrars, R. M., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N. P., Kroon, P. A., Cassidy, A., & Kay, C. D. (2014). *The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans*. British Journal of Pharmacology, 171(13), 3268–3282.

De Miguel, M., Gracia, C., Martín L., & Escribano, M. (2012) *Guía de desarrollos preclínicos*. Genoma España. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología

[https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2012\\_guia\\_de\\_desarrollos\\_preclinicos.pdf](https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2012_guia_de_desarrollos_preclinicos.pdf)

Díaz, C. & Batanero, C. (2008). *¿Cómo puede el método bayesiano contribuir a la investigación en Psicología y Educación?* Universidad de Granada. Paradigma 27:35

Doménech, J., Martínez, J., & Plá, J. (2001). *Biofarmacia y farmacocinética Volumen I: Farmacocinética*. España: Síntesis.

Food Drug Administration (FDA). (2006). *Guidance for Industry Quality Systems Approach to Pharmaceutical CGMP Regulations*. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM070337.pdf>

Food Drug Administration (FDA). (2018). *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>

Feigin, V. L., Norrving, B., George, M. G., Foltz, J. L., Roth, G. A., & Mensah, G. A. (2016). *Prevention of stroke a strategic global imperative*. Nature Reviews Neurology, 12(9), 501–512

Fernández-Travieso JC. (2014). *Enfermedad cerebrovascular: incidencia y tratamiento actual*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 45 (3): 152-178.

Ferreira, L. G., Evora, P. R. B., Capellini, V. K., Albuquerque, A. A., Carvalho, M. T. M., Gomes, R. A. da S., Parolini, M. T., & Celotto, A. C. (2018). *Effect of rosmarinic acid on the arterial blood pressure in normotensive and hypertensive rats: Role of ACE*. Phytomedicine, 38, 158–165.

Figueroa, J. (2009). "Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina". Revista Digital Universitaria. 10(9). Recuperado 11 de septiembre de 2017, <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art55/int55.htm>

Fuentes, B., Gállego, J., Gil-Nuñez, A., Morales, A., Purroy, F., Roquer, J., Segura, T., Tejada, J., Lago, A., Díez-Tejedor, E., Alonso de Leciñana, M., Álvarez-Sabin, J., Arenillas, J., Calleja, S., Casado, I., Castellanos, M., Castillo, J., Dávalos, A., Díaz-Otero, J., López-Fernández, J., Freijo, M., García, A., Gilo, F., Irimia, P., Maestre, J., Masjuan, J., Martí-Fábregas, J., Martínez-Sánchez, P., Martínez-Vila, E., Molina, C., Nombela, F., Ribó, M., Rodríguez-Yáñez, M., Rubio, F., Serena, J., Simal, P., & Vivancos, J. (2012).

*Guía para el tratamiento preventivo del ictus isquémico y AIT (I). Actuación sobre los factores de riesgo y estilo de vida. Neurología, 27(9), 560–574.*

Gao, H.-M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J.-S. (2003). *Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. Trends in Pharmacological Sciences, 24(8), 395–401.*

Gibaldi M, Terrier D. (1982). *Pharmacokinetics*. Marcel Dekker Incorporated.

Global Burden Disease 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, GBD. (2018). *Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. New England Journal of Medicine, 379(25), 2429–2437.*

González-Cortazar, M., Maldonado-Abarca, A., Jiménez-Ferrer, E., Marquina, S., Ventura-Zapata, E., Zamilpa, A., Herrera-Ruiz, M. (2013). *Isosakuranetin-5-O-rutinoside: A New Flavanone with Antidepressant Activity Isolated from Salvia elegans Vahl. Molecules, 18(11), 13260–13270.*

Greenwald, P. (2004). *Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future, J. Nutr. 134, 3507S–3512S.*

Gutiérrez-Román, A.S (2018). *Relación estructura actividad de los compuestos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina obtenidos de Salvia elegans Vahl. Tesis de Maestría CeProBi-IPN Enero 2018.*

Hao, D. C., Gu, X.-J., & Xiao, P. G. (2015). *Phytochemical and biological research of Salvia medicinal resources. Medicinal Plants, 587–639.*

Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G. S. B., Tortoriello, J., & Ramírez, G. (2006). *Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from Salvia elegans. Journal of Ethnopharmacology, 107(1), 53–58.*

Huang M. T., & Ferraro, T. (1992) *Phenolic-compounds in food and cancer prevention, ACS Symp. Ser. 507, 8–34.*

Instituto de Salud Pública de Chile, ISPCh. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.* [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia\\_tecnica\\_1\\_validacion\\_de\\_m etodos.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_m etodos.pdf)

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2015). *Enfermedad Vascular Cerebral*. Recuperado: 7 junio, 2017, desde <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/enfermedad-vascular-cerebral>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. (2016). *Estadísticas de Mortalidad*. Recuperado 7 de junio de 2017, <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

International Conference on Harmonisation, ICH. (2005). *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. ICH Harmonised Tripartite Guideline. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)

Jambhekar, S., & Breen, P. (2009). *Basic Pharmacokinetics*. UK: Pharmaceutical Press.

Ji, H. Y., Kim, S. Y., Kim, D. K., Jeong, J. H., & Lee, H. S. (2010). *Effects of Eupatilin and Jaceosidin on Cytochrome P450 Enzyme Activities in Human Liver Microsomes*. *Molecules*, 15(9), 6466–6475.

Jia, J.-Y., Lu, Y.-L., Li, X.-C., Liu, G.-Y., Li, S.-J., Liu, Y., Liu, Y.-M., Yu, C., & Wang, Y.-P. (2010). *Pharmacokinetics of deposite salts from Salvia miltiorrhiza in healthy Chinese volunteers: A randomized, open-label, single-dose study*. *Current Therapeutic Research*, 71(4), 260–271.

Jiang, R.-W., Lau, K.-M., Hon, P.-M., Mak, T., Woo, K.-S., & Fung, K.-P. (2005). *Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from Salvia miltiorrhiza*. *Current Medicinal Chemistry*, 12(2), 237–246.

Jiménez-Ferrer, E., Hernández Badillo, F., González-Cortazar, M., Tortoriello, J., & Herrera-Ruiz, M. (2010). *Antihypertensive activity of Salvia elegans Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism*. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 340–346.

Khan M, Rasul A, Yi F, Zhong L, Ma T. (2011). *Jaceosidin induces p53-dependent G2/M phase arrest in U87 glioblastoma cells*. *Asian Pac J Cancer Prev*; 12: 3235–8.

Kim, M.-J., Han, J.-M., Jin, Y.-Y., Baek, N.-I., Bang, M.-H., Chung, H.-G., Choi, M. S., Lee, K. T., Sok, D. E., Jeong, T.-S. (2008). *In Vitro antioxidant and anti-inflammatory activities*

of *Jaceosidin* from *Artemisia princeps Pampanini* cv. *Sajabal*. Archives of Pharmacal Research, 31(4), 429–437.

Kim, T., Richard-Jennings, J., & Kim, S.G. (2014). *Regional cerebral blood flow and arterial blood volume and their reactivity to hypercapnia in hypertensive and normotensive rats*. J Cereb Blood Flow Metab.34(3):408-14.

Konishi, Y., Hitomi, Y., Yoshida, M., & Yoshioka, E. (2005). *Pharmacokinetic Study of Caffeic and Rosmarinic Acids in Rats after Oral Administration*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(12), 4740–4746.

Konishi, Y., & Kobayashi, S. (2005). *Transepithelial Transport of Rosmarinic Acid in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69(3), 583–591.

Lai, X.-J., Zhang, L., Li, J.-S., Liu, H.-Q., Liu, X.-H., Di, L.-Q., Cai, B.-C., & Chen, L.-H. (2011). *Comparative pharmacokinetic and bioavailability studies of three salvianolic acids after the administration of Salviae miltiorrhizae alone or with synthetical borneol in rats*. Fitoterapia, 82(6), 883–888.

Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2007). *Bioavailability of phenolic acids*. Phytochemistry Reviews, 7(2), 301–311.

Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). *Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats*. British Journal of Nutrition, 96(1), 39-46.

Lawes, C.M., Vander-Hoorn, S., & Rodgers, A. (2008). International Society of Hypertension. *Global burden of blood-pressure-related disease*. Lancet, 371: 1513-1518.

Lee, H.-G., Yu, K.-A., Oh, W.-K., Baeg, T.-W., Oh, H.-C., Ahn, J.-S., Jang, W. C., Kim, J. W., Lim, J. S., Choe, Y. K., & Yoon, D.-Y. (2005). *Inhibitory effect of jaceosidin isolated from Artemisia argyi on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16*. Journal of Ethnopharmacology, 98(3), 339–343.

Lee, T. H., Jung, H., Park, K. H., Bang, M. H., Baek, N.-I., & Kim, J. (2014). *Jaceosidin, a natural flavone, promotes angiogenesis via activation of VEGFR2/FAK/PI3K/AKT/NF-κB*

*signaling pathways in endothelial cells*. *Experimental Biology and Medicine*, 239(10), 1325–1334.

Li, P.-G., Xu, J.-W., Ikeda, K., Kobayakawa, A., Kayano, Y., Mitani, T., Ikami, T., & Yamori, Y. (2005). *Caffeic Acid Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Angiotensin II in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats*. *Hypertension Research*, 28(4), 369–377.

Lim, T. K. (2014). *Salvia elegans*. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*, 202–206.

Liu, Y.-Q., Cai, Q., Liu, C., Bao, F.-W., & Zhang, Z.-Q. (2014). *Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Comparisons of Multi-Ingredients after Oral Administration of Radix Salviae Miltiorrhizae Extract, Hawthorn Extract, and a Combination of Both Extracts to Rats*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 1–9.

Luan, H., Kan, Z., Xu, Y., Lv, C., & Jiang, W. (2013). *Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response*. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1).

Ludden, T. M., Beal, S. L., & Sheiner, L. B. (1994). *Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection*. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 22(5), 431–445.

Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C. C., Randau, K. P., & Rolim Neto, P. J. (2008). *Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 447–454.

Magnani, C., Isaac, V. L. B., Correa, M. A., & Salgado, H. R. N. (2014). *Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics*. *Anal. Methods*, 6(10), 3203–3210.

Maldonado, E. M., Salamanca, E., Giménez, A., & Sterner, O. (2016). *Antileishmanial metabolites from Lantana balansae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(2), 180–183.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. (2005). *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. *Am J Clin Nutr*;81:230S–242S.

Martínez, D., Albín, J., Cabaleiro, J., Pena, T., Rivera, F., & Blanco, V. (2009). *El criterio de información de Akaike en la obtención de modelos estadísticos de Rendimiento*. España: Jornadas de Paralelismo.

Martínez-Hernández, G.B. (2015). *Efecto de Salvia elegans Vahl. sobre el daño asociado a hipertensión (estrés oxidante, inflamación y daño cognitivo) por la administración crónica de angiotensina II*. Tesis de Maestría en Medicina Molecular Facultad de Medicina-UAEM Noviembre 2015.

Márquez-Romero, J. M., Arauz, A., Góngora-Rivera, F., Barinagarrementeria, F., & Cantú, C. (2013). *The Burden of Stroke in México*. International Journal of Stroke, 10(2), 251–252.

Marquina, S., García, Y., Álvarez, L., & Tortoriello, J. (2008). *3-Acetoxy-7-methoxyflavone, a novel flavonoid from the extract of Salvia elegans (Lamiaceae)*. Natural Product Communications; 3: 184-188.

McGeer, E. G., McGeer, P.L. (2007). *The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease*. CNS Drugs 21: 789–797.

Missouri Botanical Garden. (2012). *Salvia elegans*. Recuperado 7 de junio de 2017 desde [www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/](http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/)

Moscatelli, V., Hnatyszyn, O., Acevedo, C., Megías, J., Alcaraz, M., & Ferraro, G. (2006). *Flavonoids from Artemisia copawith Anti-Inflammatory Activity*. Planta Medica, 72(01), 72–74.

Murray, C. J., Ezzati, M., Flaxman, A. D., Lim, S., Lozano, R., Michaud, C., Lopez, A. D. (2012). *GBD 2010: design, definitions, and metrics*. The Lancet, 380(9859), 2063–2066.

Nam, Y., Choi, M., Hwang, H., Lee, M.-G., Kwon, B.-M., Lee, W.-H., & Suk, K. (2012). *Natural Flavone Jaceosidin is a Neuroinflammation Inhibitor*. Phytotherapy Research, 27(3), 404–411.

Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C., & Ghiselli, A. (2006). *Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 17(1), 14–22.

Nicola, F., & Casella, J.M. (2012) ¿Cómo predecir el éxito o fracaso del tratamiento antibiótico? Qué es y para qué sirve la farmacocinética-farmacodinamia. *La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica Latinoamericana*. 2(2):32-9.

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 *Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.*

Ock, J., Kim, S., Yi, K.-Y., Kim, N.-J., Han, H. S., Cho, J.-Y., & Suk, K. (2010). *A novel anti-neuroinflammatory pyridylimidazole compound KR-31360*. *Biochemical Pharmacology*, 79(4), 596–609.

O'Donnell, M. J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Xiaohe Zhang, Pais, Pais, P., Agapay, S., López-Jaramillo., Damasceno, A., Langhorne, P., McQueen, M., Rosengres, A., Dehghan, M., Hankey, G., Dans, A., Elsayed, A., Avezum, A., Mondo, C., Diener, H.C., Ryglewicz, A., Pogosova, N, Weimar, C., Iqbal, R., Díaz, R., Yusoff, K., Yusufali, A., Oguz, A., Wang, X., Penaherrera, E., Lanans, F., Ogah, O., Ogunniyi, A., Iversen, H., Malaga, G., Rumboldt, Z., Oveisgharan, S., Hussain, F., Magazi, D., Nilanont, Y., Ferguson, J., Pare, G., & Yusuf, S. (2010). *Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study*. *The Lancet*, 376(9735), 112–123.

Organización Mundial de la Salud. (2017). *Las 10 principales causas de defunción*. Recuperado: 7 de junio de 2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>

Pedelty, L., & Gorelick, P.B. (2008). *Management of hypertension and cerebrovascular disease in the elderly*. *Am J Med*. 121(8): S23-S31.

Pereira, O., Catarino, M., Afonso, A., Silva, A., & Cardoso, S. (2018). *Salvia elegans, Salvia greggii and Salvia officinalis Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes*. *Molecules*, 23(12), 3169.

Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., Dasilvabrum, L., Picada, J., & Ardenghi, P. (2005). *Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid*. *Pharmacological Research*, 52(3), 199–203.

Pires, P.W., Dams-Ramos, C.M., Matin, N., & Dorrance, A.M. (2013). *The effects of hypertension on the cerebral circulation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 304(12):H1598-614.

Rodríguez, M. (2016) *Mortalidad intrahospitalaria por EVC en las principales instituciones públicas de salud de México*. *Boletín CONAMED-OPS*, 4(22).

Ruíz-Sandoval, J.L., León-Jiménez, C., Chiquete-Anaya, E., Sosa-Hernández, J.L., Espinosa-Casillas, C.A., Cantú C., Villarreal, J., Barinagarrementeria, F., Arauz, A., Leyva, A., Murillo, L., Alegría, M.A., Merino, J., Romano, J., & González-Vargas, O. (2010). *Lifestyle and primary and secondary prevention for cerebrovascular disease*. *Revista de Investigación Clínica*, 62(2): 181-191.

Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. (2013). *An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association*. *Stroke*; 44: 2064-2089.

Sadhu, S. K., Hirata, K., Li, X., Ohtsuki, T., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakom, T., & Ishibashi, M. (2006). *Flavonoids and sesquiterpenoids, constituents from Eupatorium capillifolium, found in a screening study guided by cell growth inhibitory activity*. *Journal of Natural Medicines*, 60(4), 325–328.

Sait, S., Hamri-Zeghichi, S., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K., Rigou, P., Brighenti, V., Prencipe, F. P., & Pellati, F. (2015). *HPLC-UV/DAD and ESI-MSn analysis of flavonoids and antioxidant activity of an Algerian medicinal plant: Paronychia argentea Lam*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 231–240.

Sánchez-Moreno, C., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. *Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenol*, *Nutr. Res.* 20, 941–953.

Sánchez-Sánchez, V. *Efecto de fracciones estandarizadas de Salvia elegans sobre la hipertension e inflamación crónica inducida por angiotensina II*. Tesis de Maestría en Medicina Molecular Facultad de Medicina-UAEM Diciembre 2017.

Santana, A. (2001). *Descontrol del paciente hipertenso e incumplimiento del tratamiento farmacológico*. Rev Med IMSS; 39(6):523-529.

Santos, H. (2011). *High Blood Pressure leading to cerebrovascular disease due to nonaccomplishment of the drug treatment plan*. MEDISAN, 15(2): 204-208.

Sadoshima, S., Busija, D.W., & Heistad, D.D. (1983). *Mechanisms of protection against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol, 244(3):H406-H412.

Schwarz, G. (1978). *Estimating the dimension of a model*, Annals of Statistics.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2017). *Guía de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en productos vegetales por espectrometría de masas/masas*. Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes del SENASICA. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/259346/Guia\\_Validaci\\_n\\_Plaguicidas\\_Version\\_01\\_\\_2\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/259346/Guia_Validaci_n_Plaguicidas_Version_01__2_.pdf)

Segura, J. (2006). *Suspensión del tratamiento antihipertensivo en pacientes hipertensos de diagnóstico reciente*. Hipertensión y Riesgo Vascular, 23(4), 135–136.

Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N. (1998). *Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans*. FEBS Lett;438:220–4.

Song, W. Y., Kim, N. J., Kim, S. Y., & Lee, H. S. (2009). *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of jaceosidin in rat plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49(2), 381–386.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. (2012). *Completing Method: Validation and Transfer*. En: Practical HPLC Methods Development. 2ª Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA.

Tabassum, N., & Ahmad, F. (2011). *Role of natural herbs in the treatment of hypertension*. Pharmacognosy Reviews, 5(9), 30.

USP. Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, I. (2008). USP 31. *Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 26. Formulario nacional.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville.

Waldstein, S.R., Rice S.C., Thayer, J.F., Najjar, S.S., Scuteri, A., Zonderman, A.B. (2008). *Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the Baltimore Longitudinal Study of Aging.* Hypertension. 51(1):99-104.

Waller, D. G., & Sampson, A. P. (2018). *Pharmacokinetics.* Medical Pharmacology and Therapeutics, 33–62.

Wang, J., Li, G., Rui, T., Kang, A., Li, G., Fu, T., Li, J., Di, L., & Cai, B. (2017). *Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC-MS/MS: absolute bioavailability and dose proportionality.* RSC Advances, 7(15), 9057–9063.

Wang, X., Ma, X., Li, W., Chu, Y., Guo, J., Li, S., Wang, J., Zhang, H., Zhou, S., & Zhu, Y. (2013). *Simultaneous determination of five phenolic components and paeoniflorin in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and pharmacokinetic study after oral administration of Cerebralcare granule®.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 86, 82–91.

Wittemer SM, Ploch M, Windeck T, Müller SC, Drewelow B, Derendorf H, Veit M. (2005) *Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans.* Phytomedicine;12:28–38.

Wu, Y.-B., Ni, Z.-Y., Shi, Q.-W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.-C., & Cong, B. (2012). *Constituents from Salvia Species and Their Biological Activities.* Chemical Reviews, 112(11), 5967–6026.

Yin, Y., Gong, F.-Y., Wu, X.-X., Sun, Y., Li, Y.-H., Chen, T., & Xu, Q. (2008). *Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from Artemisia vestita.* Journal of Ethnopharmacology, 120(1), 1–6.

Youn J, Lee KH, Won J, Huh SJ, Yun HS, Cho WG, Paik DJ. (2003). *Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis.* J Rheumatol; 30: 1203–1207

Zhou P, Li L-P, Luo S-Q, Jiang H-D, Zeng S. (2008). *Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin*. J Agric Food Chem;56:296–300.

Zhou, Y., Chen, B., Chen, J., Dong, Y., Wang, S., Wen, C., Wang, X., & Yu, X. (2018). *Determination and pharmacokinetic study of jaceosidin in rat plasma by UPLC–MS/MS*. Acta Chromatographica, 30(2), 131–135.

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Guadalupe Anislada Santibáñez García

Título de la tesis: "Estudio farmacocinético de los compuestos activos de *Salvia elegans*,  
útiles en el tratamiento de la Enfermedad Cerebro Vascular".

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

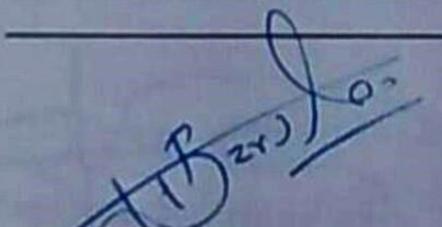
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

25/03/2019  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

**Nombre del alumno:** Guadalupe Anislada Santibáñez García

**Título de la tesis:** "Estudio farmacocinético de los compuestos activos de *Salvia elegans*,  
útiles en el tratamiento de la Enfermedad Cerebro Vascular".

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

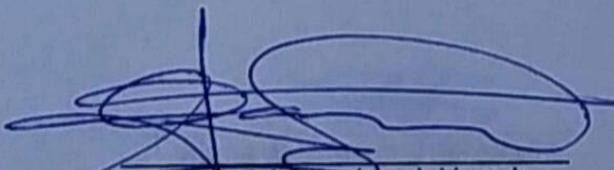
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

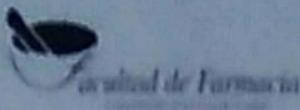
- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

1 / Mayo / 2014  
Fecha



VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Anislada Santibáñez García

Título de la tesis: "Estudio farmacocinético de los compuestos activos de *Salvia elegans*,  
útiles en el tratamiento de la Enfermedad Cerebro Vascular"

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del miembro del jurado

28/03/19

Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: \_\_\_\_\_

**Nombre del alumno:** Guadalupe Anislada Santibáñez García

Título de la tesis: \_\_\_\_\_

**Título de la tesis:** "Estudio farmacocinético de los compuestos activos de *Salvia elegans*,  
útiles en el tratamiento de la Enfermedad Cerebro Vascular".

Grado a obtener: \_\_\_\_\_

**Grado a obtener:** \_\_\_\_\_

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: \_\_\_\_\_

**Miembro del jurado:** Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis: \_\_\_\_\_

La tesis: \_\_\_\_\_

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Firma del miembro del jurado

20/03/2019

Fecha

VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Guadalupe Anislada Santibáñez García

Título de la tesis: "Estudio farmacocinético de los compuestos activos de *Salvia elegans*,  
útiles en el tratamiento de la Enfermedad Cerebro Vascular".

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

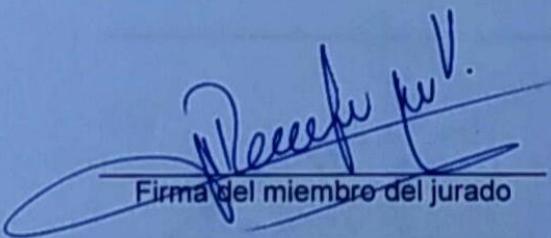
Miembro del jurado: Dr. Rodolfo Abarca Vargas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

29/ABRIL/19  
Fecha