

Método para la cuantificación de cumarina en extracto seco a partir de extractos de *Justicia pectoralis* Jacq.

Method for coumarin quantification in dry extracts from *Justicia pectoralis* Jacq.

Jorge E. Rodríguez Chanfrau^I; Orestes D. López Hernández^{II}; José M. Gil Apan^{III}

^I Maestro en Ciencias. Investigador Auxiliar. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Maestro en Ciencias. Investigador Agregado. CIDEM. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Técnico Medio. CIDEM. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

Fundamentos: *Justicia pectoralis* Jacq., especie de la familia Acantaceae, es una planta herbácea que se emplea como sedante tradicionalmente por la población cubana.

Objetivos: desarrollar y validar un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de cumarina en el extracto seco obtenido a partir de extractos de *J. pectoralis*.

Métodos: se desarrolla y valida un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de cumarina.

Resultados: el método desarrollado es específico, preciso, exacto y lineal.

Conclusiones: el método puede ser empleado para cuantificar cumarina, en muestras de polvo seco obtenidas mediante secado por aspersion a partir de extractos de *J. pectoralis*.

Palabras clave: Cumarina, método de análisis, *Justicia pectoralis*, validación de métodos de análisis, HPLC, control de calidad.

ABSTRACT

Rationale: *Justicia pectoralis* Jacq., an Acantaceae family species, is an herbaceous plant that is used as a traditional sedative by the Cuban population.

Objectives: to develop and to validate a high performance liquid chromatography

to determine coumarin in dry extract from *J. pectoralis* extracts.

Methods: A high performance liquid chromatography method to determine coumarin was developed and validated.

Results: The method was specific, accurate, precise and linear.

Conclusions: This method may be used to quantify coumarin in dry power samples obtained through spraying drying from *J. pectoralis* extracts.

Key words: Coumarin, analysis methods, *Justicia pectoralis*, validation of analysis methods, HPLC, quality control.

INTRODUCCIÓN

Justicia pectoralis Jacq. es una especie vegetal de la familia Acanthaceae. Nativa de los trópicos de América, se encuentra tanto en las Antillas, como en la zona continental.¹ Comúnmente recibe diversas denominaciones como son curia (Puerto Rico), sana herida (Jamaica), anador (Brasil), entre otras. En Cuba es conocida como tilo o tila, carpintero o té criollo¹⁻⁵ y se emplea en general como neurosedante en forma de decocción de las hojas frescas o secas,¹ acción esta que ha sido demostrada por diversos autores a lo largo de los últimos 20 años.⁶⁻¹¹

Como parte de un proyecto ramal del Ministerio de Salud Pública, desde hace algunos años se viene trabajando en el desarrollo de diversas tecnologías para la obtención de materias primas de calidad farmacéutica, a partir de extractos hidroalcohólicos y acuosos, elaborados con *Justicia pectoralis* Jacq. variedad *pectoralis*, cuyo objetivo final es su empleo como principio activo en el desarrollo de formas terminadas para su uso como neurosedante.

Se ha comprobado que entre los elementos mayoritarios que aparecen en los extractos obtenidos a partir de esta planta, se encuentra la cumarina simple, componente al que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, analgésicas y sedantes, entre otras.^{3,12} Estudios recientes, no publicados, han demostrado que después de realizarse diversos fraccionamientos, la acción sedante se mantiene de manera significativa, en las fracciones donde se encuentra presente la cumarina. Por tal razón se ha decidido usar este componente como marcador analítico para el control de la calidad y estudio de estabilidad de la materia prima y las formas terminadas.

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual fue validado según las exigencias actuales de la literatura.¹³

MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon muestras de extracto seco correspondiente al lote PB01001, obtenido a escala de banco según procedimiento elaborado en el centro.

Para la determinación de cumarina en la muestra, se desarrolló un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que se basa en una modificación realizada al método propuesto por *Macrae* y otros.¹⁴

Se emplearon para ello las condiciones experimentales siguientes: precolumna Aluspher® 100 (RP-select B 5 mm) con columna Lichrospher® 100, RP 18 (25 cm de longitud y 4 mm de diámetro y 5 micras), utilizándose como fase móvil una mezcla de metanolagua (40:60) y detector UV a una longitud de onda de 274 nm. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 mL.

La preparación de las muestras se realizó de la manera siguiente: se pesaron con exactitud alrededor de 25 mg de extracto seco y se trasvasaron a un matraz aforado de 25 mL de capacidad. Se adicionaron 15 mL de fase móvil y se agitaron en forma circular hasta disolución de la muestra. Posteriormente se llevó a volumen con fase móvil y se mezcló.

La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración de un estándar de referencia de cumarina simple (*Aldrich Chemical Co.*) que abarcó un rango entre 4,0 y 20,0 mg/mL a partir de una solución madre de 0,22 mg/mL.

Para la validación del método, primeramente se evaluó la especificidad, donde se estudió la influencia de un medio básico sobre el polvo seco, para lo que se colocaron 25 mg del polvo seco en otro tubo para ensayo con tapa de rosca y se adicionó 1 mL de solución de hidróxido de sodio 1 mol/L, se mezcló y se mantuvo por 5 min en estufa a 45 °C.

Por otro lado, se sometieron muestras del polvo a condiciones extremas de oxidación con peróxido de hidrógeno 30 %. El experimento consistió en colocar 25 mg del polvo en un tubo para ensayo con tapa de rosca, adicionarle 2 mL de peróxido de hidrógeno 30 % y colocarlo en una estufa a 45 °C durante 60 min.

La precisión se llevó a cabo mediante la prueba de repetibilidad y la precisión intermedia. Para ello se realizaron 10 determinaciones por parte del primer analista y 10 determinaciones por parte del segundo analista en diferentes días, siguiendo el método de análisis propuesto con anterioridad. Se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada analista.

Los resultados obtenidos se compararon estadísticamente mediante la prueba de *Fisher* y la prueba de *Student*, con vista a establecer si existían diferencias significativas entre los resultados.

Para comprobar la linealidad del sistema cromatográfico se elaboró a partir de una solución madre de concentración conocida de cumarina (0,22 mg/mL), soluciones de 5,10; 5,74; 6,38; 7,02 y 7,66 mg/mL, que abarcan el rango entre 60 y 120 % de la cantidad de cumarinas totales presentes en la muestra. Se determinó el coeficiente de variación de los factores respuestas para comprobar si el método cumplía con la prueba de linealidad.

Para determinar la exactitud y linealidad del método se realizó un análisis repetido de muestras de diferentes concentraciones que abarcan entre 80 y 120 % de la concentración real de cumarinas totales presentes en la muestra. Se determinó en cada punto el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro. Mediante la prueba t de *Student*, se determinó si existían diferencias significativas entre la recuperación media y 100 % de recuperación. También, se determinó la G de *Cochran* para conocer si las varianzas de las concentraciones eran equivalentes.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se procesaron estadísticamente mediante los programas *Statgraphics Plus* (Versión 5.0) para Windows y las tablas estadísticas de las pruebas de *Fisher* y *Student*.¹⁵

RESULTADOS

El estudio realizado para comprobar la especificidad del método de análisis de cumarinas propuesto dio como resultado, que tanto en el medio oxidante como en el medio básico, ocurre una disminución significativa de la cumarina presente en la muestra, la cual es detectada por este método.

La precisión del método dio los resultados que se muestran en la [tabla 1](#), donde se observa que los coeficientes de variación están dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos ($\leq 2\%$). Al aplicar la prueba de *Fisher* se obtuvo un valor de $F_{exp} = 0,974$ y una $F_{tab} = 3,18$ para $F_{9/9}$, mientras que la prueba de *Student* aplicada para comparar las medias de cada analista demostró que la $t_{exp} = 1,29$, y la $t_{tab} = 2,10$ para $gl = 18$.

En la evaluación de la linealidad del sistema se obtuvo una curva del tipo $Y = 6806X + 30,9$ para un coeficiente de correlación de 0,999 para $n = 15$. Al aplicar la prueba de *Student* se obtuvo un valor de t experimental para el intercepto de 0,503; el valor de t tabulada resultó de 2,16 para $p = 0,05$ y $gl = 13$. Se obtuvo un valor medio del coeficiente de respuesta F de 6763,66 que se encuentra cercano al valor de la pendiente de la recta.

Por otro lado, el coeficiente de variación de los factores respuesta fue de 1,04 %, el cual es menor que el límite establecido de 5 %.

Los resultados de la exactitud se muestran en la [tabla 2](#). La ecuación de la curva de recobro fue de $Y = 0,978X + 0,992$ con un coeficiente de correlación igual a 0,998 para $n = 15$, obteniéndose al aplicar la prueba de *Student* los resultados de la t experimental del intercepto ($t_{exp} = 1,31$) y la t experimental de la pendiente ($t_{exp} = 1,42$) menor que la t tabulada de 2,14 para $p = 0,05$ y $gl = 13$.

Al compararse mediante una prueba de *Student* la recuperación media y 100 % de recuperación se obtuvo que la t experimental ($t_{exp} = 0,43$) es menor que la t tabulada ($t_{tab} = 2,16$ para $p = 0,05$ y $gl = 13$). Por otro lado, al aplicarse la prueba de la G de *Cochran* se obtuvo un valor de la G experimental ($G_{exp} = 0,6113$) menor que la G tabulada ($G_{tab} = 0,6838$ para $p = 0,05$; $K = 5$ y $n = 3$).

DISCUSIÓN

La muestra tratada con hidróxido de sodio 1 mol/L provoca una marcada disminución de la cumarina, lo cual evidencia una degradación del compuesto en este medio, aspecto que era de esperar pues se conoce que las cumarinas presentan en su estructura un agrupamiento lactónico, los cuales en medio básico sufren rompimiento del anillo y forman sales de cadenas abiertas.¹⁶ Por otro lado, la muestra tratada en un medio oxidante también muestra disminución significativa de la cumarina; no se observa otro pico que interfiera en la determinación, por lo tanto se puede afirmar que el método propuesto es específico.

El estudio de la precisión demostró que en ambos casos los resultados analíticos cumplen con el límite establecido para el coeficiente de variación de métodos cromatográficos, el cual debe ser menor e igual que 2 %, esto demuestra que el método es repetible. Mientras que, al cumplirse los criterios de aceptación necesarios se comprueba que no existen diferencias significativas entre las dispersiones, ni entre las medias de ambos analistas, por lo tanto puede asumirse que existe homogeneidad en los datos obtenidos y de esta forma se demuestra que el método es reproducible.

El análisis de la linealidad del sistema indicó que al aplicarse el criterio de *Student*, los valores experimentales obtenidos cumplen con el criterio de aceptación para el intercepto. El valor medio del coeficiente de respuesta obtenido demuestra que está cercano al valor de la pendiente de la recta y el valor del coeficiente de variación de los factores de respuesta resultó ser menor que 5 %, esto demuestra que el método establecido cumple con los parámetros de linealidad.

En el caso del estudio de la exactitud es de resaltar que en todos los casos se obtuvo un coeficiente de variación menor que 2 %, los porcentajes de recuperación entre 98 y 102 %, que cumple lo establecido en la literatura.¹³ Se comprobó además, que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y 100 % de recobro, también que las varianzas de las concentraciones son equivalentes, se obtuvieron valores de G de *Cochran* experimental menor que la tabulada; por lo tanto puede asumirse que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Por todo lo anterior, se puede afirmar que el método desarrollado es específico, preciso, exacto y lineal, por lo que puede ser empleado para la cuantificación de cumarina en muestras de polvo seco obtenidas mediante secado por aspersion, a partir de extractos de *J. pectoralis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig JT. Plantas Medicinales Aromáticas o Venenosas de Cuba. T III. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 1988. p. 743.
2. ----- . Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. T II. 3ra ed. La Habana: Editora del Consejo Nacional de Universidades; 1965. p. 165, 659, 661, 897.
3. Mills J, Pascoe KD, Chambers J, Melville GN. Preliminary Investigations of the wound-healing properties of a Jamaican folk medicinal plant (*Justicia pectoralis*). West Indian Med J. 1986; 35(3): 190-3.
4. Schwartz TE, Campos VR. Study contribution of *Justicia pectoralis* Jacq - Anador». Rev Brasileria Farm. 1995; 76: 63-6.
5. Leite M, De Souza CL, Da Silva MA, Moreira LK, Viana GS, et al. Pharmacological effects of *Mikania glomerata* Spreng (Guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (Anador) and *Torresea cearensis* Fr. All. (Cumaru). Rev Brasileria Farm. 1993; 74: 12-5.
6. Fernández L, Pérez H, Más R. Evaluación preliminar de los efectos neurofarmacológicos de la *Justicia pectoralis* Jacq. Rev Cubana Farm. 1989; 23(1-2): 161-6.

7. Fernández L. Efecto de la *Justicia pectoralis* sobre la conducta exploratoria en los ratones. En Estudios avanzados de Neurociencias. (A. Alvarez y M. Valdés eds). Ed. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Ciudad Habana. 1987. págs. 257-64. Fernández L, Menéndez R, Fernández J, Más RM. *Justicia pectoralis*: Efectos sobre una tarea de evitación pasiva de una sola prueba en ratones. Rev. CNIC Ciencias Biol. 1991;22:1-2.
8. Rodríguez EC, Virvés AT, Alemán SCL. Estudio preliminar del efecto de la *Justicia pectoralis* sobre el EEG de adultos normales. Rev Cubana Farm. 1989;23(3):302-8.
9. Más R, Menéndez R, Fernández L, Pérez H, Rodríguez L, Kammerer E. ¿Posee la *Justicia pectoralis* las características farmacológicas de los neurolépticos clásicos? En: A. Alvarez y M. Valdés. Estudios avanzados de Neurociencias. Ciudad de La Habana: Editorial del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC); 1987. p. 273-83.
10. Más RM, Menéndez R, Garateix A, Fernández L. Acción de *Justicia pectoralis* sobre los receptores glutaminérgicos, en neuronas de *Zachrysia guanensis* y en langostinos. Rev. CNIC Ciencias Biol. 1990;4:39.
11. Lino CS, Traveira ML, Viana GSB, Matos JJ. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. Phytoter Res. 1997;11(3):211-5.
12. Vries JX, Tauscher B, Wurzel G. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq 2. GC/MS of Simple Coumarins, 3 phenyl propionic acid and their hydroxy and methoxy derivatives. Rev Biomed Environ Mass Spectrum. 1988;15(8):413-7.
13. Castro Cels M, Gascón Fora S, Pujol Forn M, Sans Roca J, Vicente Pla L. «Validación de métodos analíticos». Madrid: Monografía AEFI. Hewlett Packard; 1989.
14. Mac Rae WD, Towers GH. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as a hallucinogenic snuff ingredient. J Ethnopharmacol. 1984;12:93-111.
15. Hoel PG. Elementary Statistics. 2da ed. La Habana: Ed. Revolucionaria; 1969. p. 329-39.
16. Keating G, O'Kennedy R. The Chemistry and Occurrence of Coumarins. En O'Kennedy R, Douglas R, editors. Coumarins. Biology, Applications and Mode of Action. Cap. 2. England: Ed. John Wiley and Sons Ltd; 1997. p. 22-66.

Recibido: 15 de enero de 2008.

Aprobado: 10 de agosto de 2008.

M. C. *Jorge E. Rodríguez*. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos.
 Ave 26 No. 1605. Nuevo Vedado. Ciudad de La Habana, Cuba CP 10600. Correo
 electrónico: jorge.rodriguez@infomed.sld.cu

Tabla 1. Resultados del estudio de precisión del método

Analistas	n	Resultados	Media + DE	Coefficiente de variación
1	10	0,638 0,638 0,650 0,638 0,646 0,630 0,620 0,646 0,653 0,638	0,639 ± 0,0070	1,10 %
2	10	0,638 0,638 0,626 0,642 0,630 0,630 0,619 0,638 0,642 0,626	0,638 ± 0,0071	1,12 %

* Los valores están dados en mg/100 mg.

Tabla 2. Resultados del estudio de exactitud del método

%	Teórico*	Resultados	Media*	Recobrado (%)	DE	Coefficiente de variación
80	0,510	0,512 0,514 0,515	0,514	100,8	0,0140	1,06 %
90	0,574	0,575 0,574 0,574	0,574	100,0	0,0042	0,28 %
100	0,638	0,638 0,638 0,638	0,638	100,0	0,0077	0,47 %
110	0,702	0,694 0,692 0,695	0,694	98,9	0,0120	0,67 %
120	0,766	0,766 0,765 0,768	0,766	100,0	0,0058	0,29 %

* Los valores están dados en mg/100 mg.