



Journal of Pharmacy & Pharmacognosy
Research
E-ISSN: 0719-4250
editor@jppres.com
Asociación de Académicos de Ciencias
Farmacéuticas de Antofagasta
Chile

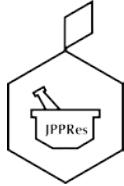
Granados-Guzmán, Graciela; Waksman de Torres, Noemí; Castro-Ríos, Rocío; Salazar-Aranda, Ricardo

Ensayos de alto rendimiento utilizados en farmacognosia: Selección, optimización y validación de métodos de inhibición enzimática por espectrofotometría UV-visible
Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, vol. 2, núm. 1, enero-febrero, 2014,
pp. 1-13

Asociación de Académicos de Ciencias Farmacéuticas de Antofagasta
Antofagasta, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496050266001>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org



Ensayos de alto rendimiento utilizados en farmacognosia: Selección, optimización y validación de métodos de inhibición enzimática por espectrofotometría UV-visible

[High-throughput screening assay used in pharmacognosy: Selection, optimization and validation of methods of enzymatic inhibition by UV-visible spectrophotometry]

Graciela Granados-Guzmán, Noemí Waksman de Torres, Rocío Castro-Ríos, Ricardo Salazar-Aranda*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química Analítica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Madero y Aguirre Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro. Monterrey, N. L., México.

* E-mail: ricardo.salazarar@uanl.edu.mx

Abstract

In research laboratories of both organic synthesis and extraction of natural products, every day a lot of products that can potentially introduce some biological activity are obtained. Therefore it is necessary to have *in vitro* assays, which provide reliable information for further evaluation in *in vivo* systems. From this point of view, in recent years has intensified the use of high-throughput screening assays. Such trials should be optimized and validated for accurate and precise results, i.e. reliable. The present review addresses the steps needed to develop and validate bioanalytical methods, emphasizing UV-Visible spectrophotometry as detection system. Particularly focuses on the selection of the method, the optimization to determine the best experimental conditions, validation, implementation of optimized and validated method to real samples, and finally maintenance and possible transfer it to a new laboratory.

Resumen

En los laboratorios de investigación, tanto de síntesis orgánica como de extracción de productos naturales, diariamente se obtienen una gran cantidad de productos que potencialmente pueden presentar alguna actividad biológica. Por esta razón es necesario contar con ensayos *in vitro* que proporcionen información confiable para continuar la evaluación en sistemas *in vivo*. Desde este punto de vista, durante los últimos años se ha intensificado el uso de ensayos de alto rendimiento. Dichos ensayos deben ser optimizados y validados para obtener resultados exactos y precisos, es decir confiables. En la presente revisión se abordan las etapas necesarias para desarrollar y validar métodos bioanalíticos, haciendo énfasis en la espectrofotometría Ultravioleta-Visible como sistema de detección. Particularmente se enfoca en la selección del método, la optimización para determinar las mejores condiciones experimentales, la validación, la aplicación del método optimizado y validado a muestras reales y, por último, el mantenimiento y posible transferencia de éste a un nuevo laboratorio.

Keywords: High-throughput screening assays; validation studies; *in vitro*.

Palabras Clave: Ensayos de rastreo de alto rendimiento; estudios de validación; *in vitro*.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: January 9, 2014.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: February 7, 2014

Accepted | Aceptado: February 10, 2014.

Available Online | Publicado en Línea: February 21, 2014.

Declaration of Interests | Declaración de Intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Funding | Financiación: no declarada.



This is an open access article distributed under the terms of a Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivative Works 3.0 Unported Licence. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>) which permits to copy, distribute and transmit the work, provided the original work is properly cited. You may not use this work for commercial purposes. You may not alter, transform, or build upon this work. Any of these conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.

Este es un artículo de Acceso Libre bajo los términos de una licencia "Creative Commons Atribución-No Comercial-No trabajos derivados 3.0 Internacional" (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es>). Usted es libre de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra bajo las condiciones siguientes: **Reconocimiento**. Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra). **No comercial**. No puede utilizar esta obra para fines comerciales. **Sin obras derivadas**. No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra. Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra. Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor. Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

INTRODUCCIÓN

Los ensayos de alto rendimiento surgieron hace dos décadas y se han convertido en una herramienta ampliamente utilizada en la búsqueda de nuevos fármacos. Debido a que se trata de métodos *in vitro*, han sido fuertemente promovidos por todos los sectores industriales con el propósito de poder generar datos confiables que sean más relevantes para humanos, además de disminuir el uso de animales de estudio (Szymański et al., 2012).

Los ensayos de alto rendimiento son básicamente procesos de rastreo y ensayo que se enfocan en un solo mecanismo. Son utilizados tanto por científicos industriales como por investigadores académicos. Su propósito principal es acelerar el descubrimiento de nuevos fármacos, mediante el rastreo de una gran cantidad de compuestos a una velocidad que puede exceder los varios cientos de compuestos por día o por semana, lo cual es de vital importancia ya que en síntesis química se genera un gran número de nuevos compuestos. Esta alta demanda de resultados hace necesario que los ensayos se lleven a cabo en placas de 96 o más pozos, siendo el sistema de detección UV-Vis el más ampliamente utilizado, aunque existen otros como, por ejemplo, la fluorescencia. Los ensayos de alto rendimiento son también utilizados para la caracterización metabólica y farmacocinética, así como para obtener datos toxicológicos sobre nuevos fármacos (Szymański et al., 2012; Martis et al., 2011; Schroeder et al., 2011). Uno de los puntos más interesantes de la tecnología de estos ensayos, es que puede reducir costos, lo cual ha hecho que se consideren como métodos alternativos a aquellos que utilizan equipos especializados como HPLC y su utilidad no se restringe sólo al desarrollo de nuevos fármacos, sino que se utilizan en el monitoreo de contaminantes en agua y suelos, en el estudio del metabolismo de plantas, evaluación de la actividad de extractos de plantas, estudios en la calidad de carnes y otros alimentos, estudio de la toxicidad de diversas sustancias, etcétera. Sin embargo, para considerar a los bioensayos como una alternativa real a procesos cuantitativos más costosos, es necesario llevar a cabo una validación analítica de éstos.

El objetivo general de llevar a cabo la validación analítica de cualquier procedimiento, es demostrar que el método es aceptable para los propósitos previstos, los cuales en el caso que nos ocupa pueden ser determinar la actividad biológica o farmacológica de una nueva entidad química. En general, la calidad de un ensayo está definida por la robustez y reproducibilidad de una señal detectable que permite que un proceso biológico sea cuantificado, ya sea en ausencia de cualquier compuesto de prueba o en la presencia de compuestos (Elli-Lilly, 2007). Sin embargo, como lo expresa Stevenson (2011) “*uno de los retos es obtener medidas absolutas de exactitud, lo cual es de suma importancia, ya que la falta de exactitud dificulta comparar los resultados de dos ensayos, así como su capacidad para ser reproducidos*”. Si bien se pueden realizar comparaciones de precisión, basadas en replicados, esto no es directamente transferible a la exactitud. Aun utilizando la mejor tecnología disponible, dos ensayos pueden mostrar diferencias en las medias y la precisión, incluso asumiendo que uno de los ensayos precede al segundo, por lo que no se puede elegir con confianza entre alguno de los dos resultados. Todo esto se vuelve sumamente relevante cuando se quiere transferir un método de un laboratorio a otro.

Esta problemática se exemplifica con el método cromogénico de inhibición de α -glucosidasa. Una síntesis de los resultados obtenidos de una búsqueda bibliográfica acerca de la aplicación de dicho método se puede ver en la Tabla 1. La evaluación de la inhibición enzimática (Fig. 1) se realiza midiendo la producción del p-nitrofenol liberado a partir del p-nitrofenil- α -D-glucopiranoso a 405 nm. En presencia de un inhibidor se aprecia una disminución en la absorbancia. Diversos trabajos de investigación incluyen el compuesto acarbosa como control positivo o compuesto de referencia.

A partir de los datos de la Tabla 1 se puede observar que los resultados de inhibición enzimática reportados por el control positivo, acarbosa son muy diferentes con un rango de valores de IC_{50} desde 0,00037 hasta 17 mg/mL. Incluso, los resultados son diferentes cuando se utilizó el mismo método con “pequeñas variaciones”, como

Tabla 1. Revisión del procedimiento de inhibición de α -glucosidasa, de levadura.

Cl ₅₀ acarbosa (mg/mL)	Autor	Enzima (U/mL)	PNPG (mM)	PNPG (mg)	Buffer fosfatos (M)	pH	Temp. (°C)	Incuba- ción (min)	λ (nm)	Vol. Total (mL)	Otros componentes	DMSO	Método utilizado
<0,010	Ren et al., 2011	0,040	0,5	0,003	N.I.	6,8	37	5/30	405	0,2	0,1 M Na ₂ CO ₃	no	Kim et al., 2004
0,00037	Apostolidis & Lee, 2010	1,000	5	0,075	0,1	6,9	25	10/5	405	0,2	N.I.	no	N.I.
0,029	Lee et al., 2008	3,000	20	0,063	N.I.	6,5	37	10/35	405	0,1	N.I.	no	Pistia-Brueggeman & Hollingsworth, 2001
0,15	Wang et al., 2012	1,000	5	0,075	0,1	6,9	25	10/5	405	0,2	N.I.	meOH	Apostolidis & Lee, 2010
0,27	Wu et al., 2011	0,500	N.I.	N.I.	0,1	6,9	37	10/60	400	2	N.I.	meOH	Chadelaine et al., 1978; Matsui et al., 1996
0,437	Chan et al., 2010	0,032	2	0,090	0,1	7	37	20	400	320	N.I.	si	Matsui et al., 1996
0,504	Choudhary et al., 2010	0,250	0,7	N.I.	0,05	6,9	37	N.I.	400	N.I.	N.I.	no	Matsui et al., 1996
0,678	Heo et al., 2009	0,700	5	0,075	0,1	7	T. amb	5/5	405	0,11	2 g/L AB+0,2 g/L NaN ₃	si	Watanabe et al., 1997
0,678	Lee et al., 2010	0,700	5	0,075	0,1	7	T. amb	5/5	405	0,11	2 g/L AB+0,2 g/L NaN ₃	si	Watanabe et al., 1997
0,894	Kang et al., 2011	0,200	2,5	0,015	N.I.	6,8	37	15/15	405	0,24	0,2 M Na ₂ CO ₃	si	Kang et al., 2009
1,081	Kang et al., 2012	0,200	2,5	0,015	N.I.	6,8	37	15/15	405	0,24	0,2 M Na ₂ CO ₃	si	Kang et al., 2011
6,2	Subramanian et al., 2008	0,100	N.I.	N.I.	0,1	7	T. amb	5/5	405	N.I.	2 g/L AB+0,2 g/L NaN ₃	si	Kim et al., 2000
10	Linwei et al., 2012	0,075	3	1,247	0,67	6,8	37	30	400	3,48	0,1 M Na ₂ CO ₃	no	Kim et al., 2004
17	Shai et al., 2010	0,600	2,9	N.I.	N.I.	6,9	25	5	405	N.I.	hervir 2 min	si	Matsui et al., 1996
N.I.	Hou et al., 2009	0,010	10	N.I.	N.I.	n. i.	37	30	400	0,5	0,1 M Na ₂ CO ₃	no	Matsui et al., 1996

AB: Albúmina bovina; Cl₅₀: Concentración inhibitoria 50; DMSO: Dimetilsulfóxido; meOH: Metanol; N.I.: Dato no indicado; PNPG: p-Nitrofenil- α -D-glucopiranósido; T. amb.: Temperatura ambiente.

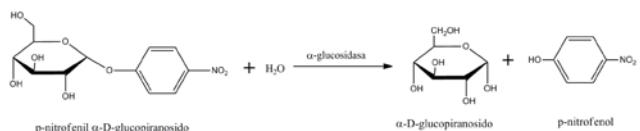


Figura 1. Reacción del sustrato p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido con α -glucosidasa.

en el caso de Chan et al. (2010), Choudhary et al. (2010), Shai et al. (2010) y Hou et al. (2009) quienes utilizaron como método base el propuesto por Matsui et al. (1996).

Los valores de CI_{50} que se presentan en la Tabla 1, se obtuvieron utilizando acarbosa, en una solución de reacción totalmente transparente. Sin embargo, en todos los trabajos que se listan en la Tabla 1, se evaluó la actividad de extractos naturales: de plantas, de hongos o de algas. En ninguno de esos trabajos se menciona si los extractos presentaban alguna coloración; sin embargo, se sabe que las plantas contienen una gran cantidad de compuestos polifenólicos como los flavonoides, que por sí mismos tienen color.

Los compuestos polifenólicos (puros o en extractos) reaccionan con Na_2CO_3 produciendo el ion fenóxido, que presenta una coloración amarilla. Si la medición se realiza a una longitud de onda entre 400-405 nm, la presencia del ion fenóxido constituye una interferencia importante, por lo que pudieran descartarse compuestos útiles por fallas en el manejo de la técnica instrumental. Esta interferencia de color, debe ser tomada en cuenta pues afecta la exactitud de la determinación. Una opción para lograrlo, es tomar la absorbancia de la muestra como blanco para eliminar la interferencia de la matriz.

Si bien no existe un consenso general acerca de cómo se debería llevar a cabo un proceso de validación para bioensayos, en la literatura se ofrecen diferentes guías prácticas. Por ejemplo, Ederveen (2010) en su reporte "*A practical approach to biological assay validation*" propone cuatro etapas a seguir para desarrollar y validar un ensayo biológico. Estas se presentan en la Fig. 2.

La presente revisión se enfoca en ensayos que utilizan la técnica espectrofotométrica UV-Vis, que además se caracteriza por ser sencilla, económica y versátil.

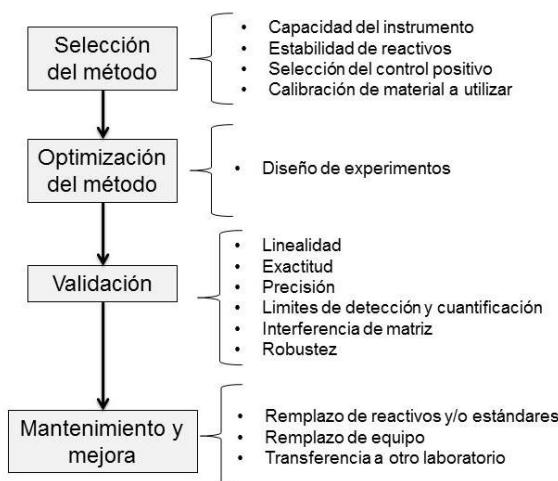


Figura 2. Etapas del proceso para el desarrollo y validación de un ensayo bioanalítico.

Selección del método

Es importante recordar que los ensayos *in vitro* se desarrollan en ambientes artificiales en los que los sistemas biológicos estudiados pueden ser inestables o bien exhibir actividad por debajo de su potencial. Además, existe un gran número de bioensayos en los cuales los métodos base se llevan a cabo en volúmenes superiores a 1 mL; sin embargo, para que puedan considerarse de alto rendimiento, tienen que llevarse a cabo la miniaturización en placas de 96 o más pozos, para poder cumplir así con el principal requisito de este tipo de ensayos, que es el poder analizar un gran número de muestras en corto tiempo.

En este tipo de ensayos, se utilizan soluciones diluidas almacenadas por largos períodos de tiempo y es necesario mantener una baja variabilidad y respuestas suficientemente altas.

Como una primera fase es recomendable seleccionar un método base. Dicha selección está relacionada con el propósito y resultados que se requieren del experimento, así como de otros factores logísticos y limitaciones en la operación como pueden ser costos, equipo y reactivos disponibles, tiempo y bioseguridad (Ederveen, 2010).

En lo relativo al equipo con el que se lleva a cabo el análisis, es necesario tomar en cuenta las condiciones en que se utiliza, sus características técnicas y limitaciones. En el caso de la espectrofotometría UV, se debe considerar la longitud de

onda de trabajo, además si el instrumento cuenta con un monocromador o filtros, el material de las celdas de lectura, la precisión y sensibilidad propia del instrumento, así como las limitaciones de la ley de Beer.

De acuerdo con Macarrón y Hertzberg (2011), la estabilidad de los reactivos debe ser evaluada utilizando las mismas condiciones previstas para el experimento, así mismo debe monitorearse si la señal va disminuyendo con el tiempo, ya que en los ensayos de alto rendimiento los requerimientos de estabilidad son mayores que en otras áreas de investigación. La guía para el desarrollo de ensayos y ensayos de alto rendimiento (Elli-Lilly, 2007) recomienda determinar la estabilidad de los reactivos tanto en condiciones de almacenamiento como de ensayo tomando en cuenta: las especificaciones del fabricante, las condiciones de almacenamiento y los resultados de un monitoreo de la señal del reactivo a través del tiempo.

La calidad de un ensayo está determinada por su capacidad para distinguir con exactitud una diana de otra que no lo es. Para este propósito es indispensable el uso de controles positivos y negativos o blancos. Un análisis cuidadoso de los controles permitirá identificar errores en la manipulación de reactivos o el procesamiento de muestras. Los problemas obvios deben resolverse antes de validar el ensayo. Aún después de solucionar estas fallas, se pueden esperar errores aleatorios debidos a fallas en el equipo o fallas usuales en el laboratorio. Estos errores deben ser tomados en cuenta cuando se realice la validación del ensayo (Macarrón & Hertzberg, 2011).

Optimización del método

Un ensayo de alto rendimiento debe realizarse bajo las condiciones óptimas. Establecer dichas condiciones se facilita con el uso de un diseño de experimentos. Es importante señalar que cuando se realiza una búsqueda bibliográfica de un ensayo particular, generalmente se encuentra que se hicieron "pequeñas modificaciones" a los métodos base, sin embargo no se menciona si se realizó una optimización o incluso si se evaluó algún parámetro de validación.

Un gran número de factores pueden ser evaluados en un proceso de optimización; sin embargo, el conocimiento previo de las variables involucradas es de mucha ayuda en la selección de los más apropiados. Los factores más comunes en los ensayos *in vitro* son los siguientes:

- Concentración de reactivos (sustrato, fuente de radicales libres, buffers, etc.).
- Tiempo y temperatura de incubación.
- Solvente utilizado.
- Longitud de onda de lectura.
- Sensibilidad a la luz.
- Forma en que se detiene la reacción.
- Origen de los reactivos (p. ej. fuente de enzimas, marca, grado de pureza).

Además, es necesario considerar las limitaciones propias de la técnica, como por ejemplo el cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer o el efecto del ruido instrumental. La ley de Lambert-Beer enuncia que para una radiación monocromática, la absorbancia es directamente proporcional al camino óptico a través del medio y la concentración de la especie absorbente (Skoog et al., 2008). Si esta ley no se cumple, se pierde la proporcionalidad y, por lo tanto, no se tiene la relación entre la absorbancia que se obtiene experimentalmente y la concentración del analito en cuestión.

Diseño de experimentos

Si bien la optimización clásica de los factores experimentales se lleva cabo variando un factor mientras el resto se mantienen constantes, en el proceso de optimización de ensayos bioanalíticos el número de variables a estudiar puede ser muy grande. Abordarlas de manera individual resulta poco conveniente, ya que puede ser un proceso largo por el gran número de pruebas necesarias. Además, las conclusiones obtenidas en el estudio de cada factor tendrán validez restringida, porque no es posible estudiar la interacción entre los mismos. Adicionalmente, en la mayoría de los casos es inviable debido al alto costo y el tiempo invertidos.

Los diseños de experimentos se definen como una secuencia completa de pasos que aseguran que se obtendrán los datos apropiados, de modo que permitan un análisis objetivo que conduzca a

deducciones válidas con respecto al problema establecido (Mercado Hernández y Santoyo Stephano, 2005).

El objetivo de un diseño de experimentos es estudiar si el cambio en un factor produce una mejora en el proceso, para lo cual es necesario realizar pruebas que lo demuestren. La metodología de los diseños de experimentos estudia como variar las condiciones (factores) habituales de realización de un proceso, para aumentar la probabilidad de detectar cambios significativos en la respuesta, de esta forma se obtiene un mayor conocimiento del comportamiento del proceso de interés.

En el diseño de experimentos clásico se elige cierto número de factores que se considera tienen efecto sobre la respuesta. Dependiendo del número de factores y de sus posibles rangos, se puede elegir entre diferentes diseños. Todos los factores se varían de manera simultánea y sistemática, lo cual permite que puedan ser medidas la significancia de un factor específico o bien la interacción entre ellos. Por lo general, los factores que se utilizan son los extremos de los rangos de operación y se puede utilizar una función lineal o polinomial para interpolar la región entre esos extremos (Lutz et al., 1996).

Entre los diseños de experimentos disponibles, la elección está determinada por el objetivo del experimento y el conocimiento que se tenga de las condiciones experimentales del ensayo. Entre estos diseños se pueden mencionar los de rastreo, los factoriales, ya sea fraccionados o completos, los de superficie de respuesta y los generados por computadora (Altekar et al., 2006).

Los diseños de rastreo son conocidos también como de Resolución III y se utilizan para explorar condiciones experimentales cuando se conoce poco del ensayo. Con este tipo de diseños es posible encontrar el efecto de cada factor, pero no se pueden interpretar las interacciones.

El diseño factorial completo es conceptualmente el más sencillo de establecer y de interpretar. Los datos que se obtienen para todas las combinaciones de factores, permiten el estudio de cada factor y de la interacción entre ellos. Por su parte, en el diseño factorial fraccionado se realiza una menor cantidad de experimentos y,

por lo tanto, no se obtiene información de todas las interacciones, mientras que en el factorial completo al haber una mayor cantidad de pruebas si puede conseguirse esta información.

El modelo de superficie de respuesta se utiliza para obtener información precisa sobre los efectos de un factor incluyendo su magnitud y dirección. Este tipo de diseño proporciona una predicción precisa de las respuestas dentro de la región experimental y es muy útil para identificar las condiciones óptimas. El diseño Box-Behnken, una variante del modelo de superficie de respuesta, permite la estimación de los efectos principales, interacción de dos factores y efectos cuadráticos. Es útil cuando un conjunto de factores puede ser considerado como las condiciones estándar después de algunos diseños de rastreo factorial.

El diseño D-óptimo es un diseño generado por computadora en el que el usuario elige un número aceptable de corridas, identifica los efectos principales y las interacciones de interés y permite a la computadora generar un diseño.

Actualmente se cuenta con una gran variedad de programas para realizar el diseño de experimentos, entre los cuales se encuentran: STATGRAPHICS, MODDE, STATA, etc. en sus diferentes versiones.

Optimización del parámetro con mayor influencia

Una vez realizada la valoración de los parámetros más influyentes se procede a encontrar las condiciones óptimas para cada factor. El camino a seguir depende de los resultados del diseño de experimentos. Si más de un factor o la interacción de éstos tienen efecto significativo sobre el ensayo, se puede realizar un método simplex o un diseño de superficie de respuesta para encontrar las condiciones óptimas. Pero si sólo un factor tiene efecto relevante sobre el ensayo, se deben realizar pruebas variando la concentración de éste, hasta encontrar las mejores condiciones experimentales.

Validación de ensayos de alto rendimiento

Los ensayos de alto rendimiento requieren de experimentos basados en principios científicos aceptados, en los que se utilicen controles apro-

piados que puedan demostrar que el trabajo experimental se lleva a cabo de manera adecuada; por lo que, además de optimizar las condiciones experimentales para lograr el mejor desempeño, es muy importante asegurar que los resultados de los experimentos sean exactos, confiables y reproducibles. Con este propósito se utiliza la validación analítica de cualquier ensayo, la cual además puede establecer las limitaciones de dicho ensayo.

Los parámetros que deben evaluarse durante una validación analítica de los ensayos de alto rendimiento aparecen en diversos reportes y artículos de revisión como los de Ederveen (2010), Tuomela et al. (2005) y Rozet et al. (2011) en los cuales se hace referencia a guías Internacionales como las de la ICH, la IUPAC, la AOAC y la EURACHEM. Además, recientemente han surgido guías específicas para bioensayos o ensayos bioanalíticos tales como: la guía para la industria relacionada con validación de métodos bioanalíticos emitida por el Departamento de Salud de Estados Unidos y la FDA (US DHHS & FDA, 2001); la Guía de validación específica para ensayos de alto rendimiento realizada por la compañía Eli Lilly (2007), el reporte para ensayos biológicos realizado por Ederveen (2010); y el capítulo 1033 de la USP dedicado a la validación de ensayos biológicos (USP, 2010).

Uniformidad de placa y evaluación de la variabilidad de la señal

Un ensayo de alto rendimiento debe realizarse en placas de 96 o más pozos. La evaluación de la uniformidad de placa es básicamente la evaluación de la precisión dentro de una misma placa y entre ellas.

Para realizar esta determinación se utilizan tres niveles de señal, que se traducen en tres niveles de concentración:

- Señal máxima: es la medida de la señal máxima que puede presentarse.

- Señal mínima: mide el ruido de fondo de la señal. En ensayos de inhibición se trata de una reacción sin estímulo.
- Señal media: estima la variabilidad de la señal en un punto entre la señal máxima y mínima. Para ensayos de inhibición es la CI_{50} del control positivo.

Las pruebas deben realizarse con reactivos preparados de forma independiente y preferentemente debe repetirse la prueba en diferentes días. Para cada señal debe calcularse el coeficiente de variación en cada placa, el cual deberá ser menor al 20% (Elli-Lilly, 2007).

Factor Z

Este parámetro, descrito por Zhang et al., (1999), es un coeficiente adimensional que proporciona una medida de separación entre los controles positivos (máxima señal) y negativos (señal mínima) en un ensayo, es decir, representa la variabilidad y el rango dinámico entre este conjunto de controles.

La Tabla 2 presenta el significado de los valores para este factor. El factor Z es por tanto, un dato que califica la calidad del ensayo y que toma en cuenta, además, la variación asociada con la medida de controles de referencia. Se calcula utilizando la fórmula siguiente:

$$Z = 1 - \frac{3DE \text{ de muestra} + 3DE \text{ del control}^*}{|\text{media de la muestra} - \text{media del control}|^*}$$

Donde:

DE: Desviación estándar

*Nota: si se trata de un ensayo de activación/agonista, se tomarán los datos del control positivo (que proporciona la señal máxima); si se trata de un ensayo de inhibición/antagonista, se tomarán los datos del control negativo (que proporciona la señal mínima).

Tabla 2. Valores y significado del factor Z (Zhang et al., 1999).

Valor del Factor Z	Estructura del ensayo	Ensayo
1	DE=0 no hay variación o el rango dinámico tiende al infinito.	Ideal
$1 > Z \geq 0,5$	Ventana de detección grande.	Excelente
$0,5 > Z > 0$	Ventana de detección pequeña.	Pobre
0	No hay ventana de detección, la variación de la señal de la muestra y la variación de la señal del control son muy cercanas.	Poco confiable
<0	No hay ventana de detección, la variación de las señales de muestra y control se superponen.	Imposible

Linealidad

Ya que en los artículos de revisión para validar métodos bioanalíticos se hace referencia a la guía de la ICH (2005), se toma en cuenta la siguiente definición: la linealidad de un proceso analítico se define como la capacidad (en un rango dado) de obtener un resultado que sea directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra. Si existe una relación lineal, la prueba puede evaluarse utilizando un método estadístico apropiado, como el cálculo de una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Para establecer la linealidad se necesita un mínimo de cinco concentraciones y se recomienda llevar a cabo triplicados. Además, como se menciona en la Guía para la Validación de Métodos Bioanalíticos (US DHHS & FDA, 2001), para este tipo de ensayos se debe generar una curva para cada analito que se desee estudiar y ésta deberá ser preparada en la misma matriz en la que se supone estará el analito.

Para el caso de los ensayos de alto rendimiento es sumamente importante establecer la linealidad, ya que permite calcular de manera confiable la concentración efectiva media (inhibitoria, letal, tóxica, etc.) para las diferentes pruebas. Dicha concentración media se utiliza para comparar la efectividad de los compuestos evaluados, ya sean nuevos o controles positivos.

Rango lineal

El rango de un procedimiento analítico se define, según la ICH (2005) como el intervalo entre

la mayor y menor concentración del analito en la muestra para la cual el procedimiento ha demostrado ser preciso, exacto y lineal. Normalmente, el rango lineal deriva de estudios de linealidad y depende de la aplicación que tendrá el procedimiento.

En los ensayos de alto rendimiento es importante que las concentraciones efectivas del 80, 50 y 20% se encuentren dentro del rango lineal. Cuando se utiliza la técnica de espectrofotometría UV es necesario que el rango lineal se encuentre en el rango de mayor exactitud espectrofotométrica. El rango de exactitud fotométrica ha sido calculado por diversos autores: Ayres estableció que cuando se trabajaba con valores de absorbancia entre 0,22 y 0,7 se logra la mayor exactitud (Ayres, 1949); Rothman et al. (1975) indicaron que el rango con mayor precisión relativa es entre 0,2 y 0,8 (Skoog et al., 2008). Estos valores dependen del error espectrofotométrico del instrumento.

Precisión

Las guías de la ICH (2005) y la OMS (1997), definen que la precisión de un procedimiento analítico expresa la concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea, bajo condiciones prescritas.

La precisión, por lo general, se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (CV) de, al menos, nueve determinaciones que cubran un rango específico para el procedimiento; por ejemplo, tres niveles de

Tabla 3. Formas de evaluar la precisión en ensayos bioanalíticos.

Precisión	Fuente	Referencia
Realizar un ANOVA para cada nivel de concentración	<i>Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods</i>	Rozet et al., 2011
El valor promedio no debe variar más de 15%, excepto cuando este cerca del LC puede ser de 20%	<i>Guidance for industry, bioanalytical method validation</i>	US DHHS & FDA, 2001
%DSR <10	<i>Validation overview of bio-analytical methods</i>	Tuomela et al., 2005
El CV no debe variar más de 15%, excepto cuando este cerca del LC puede ser de 20%	<i>Guideline on bionalytical method validation</i>	EMEA/CHMP/EWP, 2011

LC: Límite de cuantificación; %DSR: Desviación estándar relativa; CV: Coeficiente de variación.

concentración (alto, medio y bajo) por triplicado. En la Tabla 3, se listan los valores con los que se puede considerar un método preciso. La precisión se puede considerar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad:

- **Repetibilidad:** Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto. También se conoce con el término de precisión intra-ensayo.
- **Precisión intermedia:** Expresa la precisión intra-laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etcétera.
- **Reproducibilidad:** Expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos,

aplicados por lo general para estandarizar una metodología).

Exactitud

La exactitud expresa la cercanía entre un valor encontrado experimentalmente y un valor convencional, aceptado como verdadero o un estándar de referencia (US DHHS & FDA, 2001). La exactitud se determina replicando el análisis de muestras que contengan cantidades conocidas del analito y deben realizarse al menos cinco determinaciones por concentración. Se recomienda utilizar al menos tres concentraciones a niveles alto, medio y bajo. En la Tabla 4, se refieren los valores para considerar a un método exacto.

Tabla 4. Evaluación de la exactitud para ensayos bioanalíticos.

Exactitud	Fuente	Referencia
El valor promedio no debe variar más de 15%, excepto cuando este cerca del LC puede ser de 20%	<i>Guidance for industry, bioanalytical method validation</i>	US DHHS & FDA, 2001
Cercana a 100%, además de consistente y repetible.	<i>Validation overview of bio-analytical methods</i>	Tuomela et al., 2005
El CV no debe variar más de 15%, excepto cuando este cerca del LC puede ser de 20%	<i>Guideline on bionalytical method validation</i>	EMEA/CHMP/EWP, 2011

LC: Límite de cuantificación; CV: Coeficiente de variación.

En el caso de los ensayos de alto rendimiento, la exactitud es el parámetro que causa la mayor problemática. Como mencionan Tuomela et al. (2005), “*la determinación de la exactitud por lo general requiere de un estándar de oro o bien, de un método aceptado con el cual pueda ser comparado el ensayo de interés*”. La dificultad reside en que no siempre se cuenta con un estándar de referencia o de un método aceptado para hacer una comparación. Cuando se presenta este caso, una estrategia a seguir es adicionar muestras reales con cantidades conocidas de un analito (Ederveen, 2010; USP, 2010; Cendejas-Bueno et al., 2012).

Por ejemplo, Cendejas-Bueno et al. (2012) validaron un método por HPLC y un bioensayo para cuantificar posaconazol en muestras de suero humano. El bioensayo fue un método microbiológico descrito anteriormente para monitorear el posaconazol. La exactitud se determinó experimentalmente utilizando muestras de suero adicionadas con posaconazol a cinco niveles de concentración (se estableció previamente una curva de calibración) y se calculó la exactitud como porcentaje de error relativo. También se realizó una comparación entre los métodos calculando el coeficiente de correlación intra clase y por una regresión lineal por el método de cuadrados perfectos y se consideró el método de HPLC como el de referencia.

Por otro lado, Serra et al. (2005) realizaron la validación de un ensayo colorimétrico para hacer un rastreo *in vitro* de extractos de plantas con potencial acción de inhibición sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA). El método se basó en la escisión del sustrato hipuril-glicil-glicina por la enzima convertidora de angiotensina y su subseciente reacción (de la glicil-glicina) con el ácido trinitro-bencen-sulfónico para formar la 2,4,6-trinitrofenil-glicil-glicina cuya absorbancia se determina a 415 nm. En este ensayo, no se utilizó un control positivo, sino que se adicionó a diferentes muestras glicil-glicina a tres niveles de concentración; es decir, se adicionó directamente el compuesto que se formaría, si la ECA reaccionara con el sustrato y

que forma el compuesto colorido con el ácido trinitrobencensulfónico. La exactitud se calculó como porcentaje de recuperación.

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) se define como la menor cantidad o concentración de un analito en una muestra que puede distinguirse confiablemente de cero (IUPAC, 2002; AOAC, 2002). Existen diversas formas de determinarlo y se utiliza la que se ajuste a las necesidades del ensayo. La ICH en su guía de validación para procedimientos analíticos, menciona que se hace la evaluación visual por medio del análisis de muestras con una concentración conocida del analito (ICH, 2005). La guía de la AOAC (2002) indica que el límite de detección puede calcularse en base a la variabilidad del blanco.

El límite de cuantificación (LC) es la menor cantidad o concentración de analito en una muestra que puede ser cuantificado con exactitud y precisión aceptables (ICH, 2005). Básicamente, se determina de la misma forma que el LD, de hecho pueden calcularse de manera simultánea.

Especificidad o Interferencia de matriz

La validación, tal como lo establecen las guías de Elli Lily (2007), USP (2010) e ICH (2005) se lleva a cabo con controles positivos en solución; sin embargo, las muestras reales, como los productos naturales que son mezclas complejas de un gran número de componentes, pueden causar interferencias durante la determinación, ya que algunos pueden presentar color.

La especificidad de un método es la capacidad de medir exacta y específicamente un analito en presencia de componentes esperados en una mezcla compleja. Puede ser expresada como el error que se obtiene cuando el procedimiento experimental se aplica al analito en presencia de la matriz, comparado con el resultado que se obtiene del analito sin ninguna sustancia añadida (en solución); el error no tiene que ser del 0%, pero deberá ser preciso y reproducible (EMEA/CHMP/EWP, 2011). Otra forma de investigar los efectos de matriz, es analizando por lo menos seis replicados adicionados al máximo y mínimo

nivel de concentración (de acuerdo al rango lineal). Se evalúa con el coeficiente de variación para la concentración y este no debe exceder el 15% (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

Robustez

La OMS define la robustez como el grado de reproducibilidad de un ensayo utilizando las mismas muestras (o controles), pero con pequeñas modificaciones a las condiciones estándares (o condiciones validadas), como son: diferentes temperaturas, tiempos de incubación, longitudes de onda, etc. (Skoog et al., 2008). La robustez evalúa las variables operacionales y ambientales del método. Puede evaluarse ya sea mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) o bien, si las variables que quieren estudiarse son muchas, puede utilizarse un diseño de experimentos como el factorial fraccionado.

Mantenimiento y mejora

Es altamente recomendable realizar el monitoreo periódico del ensayo de alto rendimiento, utilizando controles tanto positivos como negativos. Cuando se obtengan resultados erróneos es importante comprobarlos y aplicar acciones correctivas y preventivas, para garantizar el buen desempeño del ensayo (Ederveen, 2010).

Para mantener en buen funcionamiento un ensayo de alto rendimiento es recomendable:

- Utilizar el mismo equipo de la validación, siempre que se mantenga calibrado y en buenas condiciones.
- Especificar el material que se utiliza, para mantener las mismas condiciones.

La fuente y/o características de los reactivos deben mantenerse para utilizar reactivos de la misma calidad.

Es importante llevar a cabo nuevamente las pruebas de validación con controles en los casos siguientes:

- Si se utiliza un nuevo estándar de referencia, se debe probar junto con el estándar anterior.
- Si se utiliza un nuevo equipo o software. Ya que cada equipo cuenta con diferentes

características de precisión, exactitud y sensibilidad propias.

- Si el ensayo lo llevará a cabo un nuevo analista, en este caso se llevará a cabo un panel con muestras problema para evaluar si el entrenamiento fue exitoso.
- Si el ensayo se transferirá a un nuevo laboratorio, se deben llevar a cabo las pruebas de validación para asegurar que el ensayo es reproducible con exactitud y precisión, utilizando los controles establecidos.

CONCLUSIONES

Si bien los ensayos de alto rendimiento se han utilizado ampliamente durante un largo período de tiempo y han demostrado ser de utilidad en diferentes campos de la ciencia, sobre todo en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad farmacológica, no se encuentran con frecuencia trabajos donde se realicen la optimización y la validación de los métodos biológicos. Además, a pesar de que existen diversas guías que hacen referencia a la validación de ensayos bioanalíticos, parece no haber un consenso respecto a los parámetros que deben ser validados. Por este motivo se debieran atender las recomendaciones de las diferentes guías y artículos de revisión. Con el propósito de garantizar la confiabilidad y calidad de los resultados obtenidos, particularmente la necesidad de utilizar controles positivos y negativos reproducibles que permitan comparar, de manera fidedigna, los resultados inter-laboratorio.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Altekar M, Homon C, Kashem M, Mason SW, Nelson RM, Patnaude LA, Yingling J, Taylor B (2006) Assay optimization: A statistical design of experiments approach. *J Lab Autom* 11: 33-41.
- AOAC (2002) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. pp.1-38. http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf [Consultado Diciembre 20, 2013].

- Apostolidis E, Lee CJ (2010) *In vitro* potential of *Ascophyllum nodosum* phenolic antioxidant-mediated α -glucosidase and α -amylase inhibition. *Food Sci* 75: H97-H102.
- Ayres GH (1949) Evaluation of accuracy in photometric analysis. *Anal Chem* 21: 652-657.
- Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela J Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A (2012) HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol Infec* 18: 1229-1235.
- Chan HH, Sun HD, Reddy M, Wu TS (2010) Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. *major*. *Phytochemistry* 71: 1360-1364.
- Chapdelaine P, Tremblay R, Dube J (1978) P-Nitrophenol-alpha-D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen. *Clin Chem* 24: 208-211.
- Choudhary M, Shah S, Atta-ur-Rahman, Khan N, Khan M (2010) Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from fungal hydroxylation of tibolone and hydroxytibolones. *Steroids* 75: 956-966.
- Ederveen J (2010) A practical approach to biological assay validation, Hoofddorp: Dutch Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment. Reporte 08090, Hoofddorp, Holanda.
- Elli-Lilly (2007) Guidance for Assay Development & HTS Version 5 Section I: Introduction March 2007. http://htc.wustl.edu/Aids/NCGC_Assay_Guidance_Manual.pdf [Consultado Diciembre 15, 2013].
- EMEA/CHMP/EWP (2011) Guideline on bioanalytical method validation. Guideline on bioanalytical method validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf> [Consultado Noviembre 12, 2014].
- Heo SJ, Hwang JY, Choi JI, Han JS, Kim HJ, Jeon YJ (2009) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 615: 252-256.
- Hou W, Li Y, Zhang Q, Wei X, Peng A, Chen L, Wei Y (2009) Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as α -glucosidase inhibitors. *Phytother Res* 23: 614-618.
- ICH (2005) ICH - Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: 1994 (November 1996). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf [Consultado Noviembre 10, 2013].
- IUPAC (2002) harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report) Harmonized guidelines for single-laboratory (IUPAC Technical Report). 74(5): 835-855. http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2002/pdf/740_5x0835.pdf [Consultado Diciembre 10, 2013].
- Kang W, Song Y, Gu X (2012) α -glucosidase inhibitory *in vitro* and antidiabetic activity *in vivo* of *Osmannthus fragrans*. *J Med Plants Res* 6: 2850-2856.
- Kang W, Zhang L, Song Y (2009) α -Glucosidase Inhibitory Activity of *Luculia pinceana*. *China J Chin Mater Med* 34: 406-409.
- Kang WY, Song YL, Zhang L (2011) α -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L. *Med Chem Res* 20: 809-816.
- Kim JS, Kwon CS, Son K (2000) Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2458-2461.
- Kim, YM, Wang MH, Rhee HI (2004) A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Res* 339(3): 715-717.
- Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, Ko SC, Han JS, Jeon YJ (2010) Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase *in vitro* and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chem Toxicol* 48: 2633-2637.
- Lee SS, Lin,HC, Chen CK (2008) Acylated flavonol monoharmonides, α -glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis*. *Phytochemistry* 69: 2347-2353.
- Linwei D, Peibo L, San L, Wa C, Dingzhou X, Kwok-Pui F, Weiwei S (2012) Mechanistic studies on the antidiabetic activity of a polysaccharide-rich extract of *Radix Ophiopogonis*. *Phytother Res* 26: 101-105.
- Lutz M, Menius J, Choi T, Gooding Laskody RG, Domanico PL, Goetz AS, Saussy DL (1996) Experimental design for high throughput screening. *Drug Discov Today* 1: 277-286.
- Macarrón R, Hertzberg RP (2011) Design and implementation of high throughput screening assays. *Mol Biotechnol* 47: 270-285.
- Martis EA, Radhakrishnan R, Badve RRJ (2011) High-Throughput screening: The hits and leads of drug discovery-An overview. *App Pharm Sci* 01: 02-10.
- Matsui T, Yoshimoto C, Osajima K, Oki T, Osajima Y (1996) *In vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Biosci Biotech Bioch* 60: 2019-2022.
- Mercado Hernández R, Santoyo Stephano M (2005) Manual de Diseño Experimental Estadístico. San Nicolás de los Garza. UANL-Facultad de Ciencias Biológicas. México.
- OMS (1997) A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Ginebra: World Health Organization.
- Pistia-Brueggeman G, Hollingsworth R (2001) A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. *Tetrahedron* 57: 8773-8778.
- Ren S, Xu D, Pan Z, Gao Y, Jiang Z, Gao Q (2011) Two flavanone compounds from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds, one previously unreported, and appraisal of their α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chem* 127: 1760-1763.
- Rothman LD, Crouch SR, Ingle JD (1975) Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry. *Anal Chem* 47(8): 1226-1233.
- Rozet E, Marini RD, Ziemons E, BoulangerB, Hubert (2011) Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 55: 848-858.

- Schroeder K, Bremm KD, Alepee N, Bessems JGM, Blaauboer B, Boehn SN, Burek C, Coecke S, Gombau L, Hewitt NJ, et. al. (2011) Report from de EPAA workshop: *In vitro* ADME in safety testing used by EPAA industry sectors. *Toxicol In Vitro* 25: 589-604.
- Serra C, Cortes S, Lombardi J, Braga de Oliveira A, Braga F (2005) Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine* 12: 424-432.
- Shai L, Masoko P, Mokgomo M, Magano S, Mogale A, Boaduo, N, Eloff JNS (2010) Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *Afr J Bot* 76: 465-470.
- Skoog D, Holler F, Crouch S (2008) Principios de Análisis Instrumental, 6ta. ed. México: 343-346.
- Stevenson RL. (2011) Bioassay 2011. Junio 23, 2011. San Francisco: American Laboratory sitio. <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/19109-Bioassays-2011/> [Consultado Noviembre 25, 2013].
- Subramanian R, Asmawi M, Sadikun A (2008) *In vitro* a-glucosidase and a-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochim Pol* 55: 391-398.
- Szymanski P, Markowicz, M Mikiciuk-Olasik E (2012) Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discover-Toxicological Screening Tests. *Int. J Mol Sci* 13: 427-452.
- Tuomela M, Stanescu I, Krohn K (2005) Validation overview of bio-analytical methods. *Gene Ther* 12: 131-138.
- US DHHS & FDA (2001) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research; Center for Veterinary Medicine. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> [Consultado Noviembre 13, 2013].
- USP (2010) Biological Assay Validation. The United States Pharmacopeial Convention. 1-25. http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1033.pdf [Consultado Noviembre 21, 2013].
- Wang Y, Huang S, Shao S, Qian L, Xu P (2012) Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α -amylase *in vitro*. *Ind Crop Prod* 37: 520-526.
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R (1997) Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotech Bioch* 61: 177-178.
- Wu T, Zhou X, Deng Y, Jing Q, Li M, Yuan L (2011) *In vitro* studies of *Gynura divaricata* (L.)DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *J Ethnopharmacol* 136: 305-308.
- Zhang JH, Chung T, Oldenburg K (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4: 67-73.