



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EFICACIA COMO AGENTE ANTINOCICEPTIVO Y DESARROLLO DE LAS PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD PARA LA DROGA CRUDA DE *DYSPHANIA GRAVEOLENS* (WILLD.) MOSYAKIN & CLEMANTS (AMARANTHACEAE)

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. HARRY ALVAREZ OSPINA

TUTORA:

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
VOCAL	Dra. Martha Patricia García Camacho
VOCAL	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
SECRETARIO	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

LUGAR DONDE SE REALIZO EL TRABAJO DE TESIS:

LABORATORIO 124, EDIFICIO E.

FACULTAD DE QUÍMICA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Congresos

52ND Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. **Chemical composition of *Dysphania graveolens* and *Dysphania ambrosioides* essential oils.** Julio 30 – Agosto 3, 2011. San Diego, California, EUA.

53ND Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. **Quality control procedures for *Dysphania graveolens*: HPLC determination of the major flavonoids.** Julio 28 – Agosto 1, 2012. New York, New York, EUA.

QUIMIUNAM. **Desarrollo de las pruebas de control de calidad para la droga cruda de *Dysphania graveolens* (willd.) mosyakin & clematis (amaranthaceae).** 14 AL 16 de Noviembre, 2012. Ciudad Universitaria, México D.F, México.

2013 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. **Antinociceptive effect of some preparations and isolates from *Dysphania graveolens*.** Julio 13 – Julio 17, 2013. St. Louis, Misuri, EUA.

Articulo

Álvarez-Ospina H., Rivero I., Duarte G., Bye R., Mata R. 2013. HPLC Determination of the Major Active Flavonoids and GC-MS Analysis of Volatile Components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae). *Phytochemical Analysis*, 24, 248-254.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de ampliar mi formación académica, así como al Posgrado en Ciencias Químicas y a DGAPA (IN212913) y CONACyT (99395) por el apoyo económico recibido a través de los proyectos.

Al CONACyT por la beca otorgada (becario 229527) para la realización de mis estudios de doctorado.

A la *Dra. Rachel Mata* por haber confiado en mí y por el compromiso en el desarrollo de este trabajo

Al Dr. Ricardo Chilpa Reyes y la Dra. Martha Patricia García Camacho, por sus valiosos comentarios y observaciones a lo largo del desarrollo del presente proyecto de investigación.

A los Doctores Robert Bye y Edelmira Linares por proporcionar el material vegetal para este proyecto.

Al personal técnico de la USAI (Facultad de Química) por el registro de los espectros de masas, IR, UV y RMN.

A los miembros del jurado designado por sus valiosos comentarios y observaciones durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez y la M. en C. Isabel Rivero por el gran apoyo técnico y conocimientos brindado durante el desarrollo de este trabajo y por su valiosa amistad.

A mis madres Ana Leticia Ospina y Gladis Omaira Ortiz por darme todo el amor y ser el punto de apoyo necesario para alcanzar este logro.

A mi madre Mexicana María Priscila Lugo por su amistad, amor, confianza y apoyo tanto en los buenos como en los malos momentos que tuve en el desarrollo de este doctorado.

A todos mis amigos del Laboratorio 124 del Conjunto E, Facultad de Química, por su apoyo y amistad.

Dedicatoria

Índice

	Pag.
Lista de Figuras	i
Lista de Cuadros y de Tablas	ii
Lista de Esquemas y de Gráficas	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumen	vi
Abstract	ix
1. Antecedentes	1
1.1 Control de calidad de plantas medicinales	1
1.1.1 Las monografías como marco de referencia para el control de calidad de las plantas medicinales	1
1.1.2 Parámetros de calidad de las drogas vegetales	3
1.1.2.1 Ensayos de identidad	4
1.1.2.2 Pruebas de composición	7
1.1.2.3 Pruebas de pureza	8
1.2 Generalidades sobre <i>Dysphania graveolens</i>	9
1.2.1 Aspectos botánicos	9
1.2.2 Distribución geográfica	9
1.2.3 Nombres comunes	10
1.2.4 Usos medicinales	10
1.2.5 Antecedentes químicos y farmacológicos	12
1.3 Generalidades sobre el dolor	14
1.3.1 Nocicepción	15
1.3.1.1 Transducción	16
1.3.1.2 Transmisión	17
1.3.1.3 Modulación	17
1.3.1.4 Percepción	18
1.4 Modelos para el estudio del dolor	18
2. Hipótesis y Objetivos	21
2.1 Hipótesis	21
2.2 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Parte experimental	23
3.1 Evaluación de la inocuidad y eficacia preclínica	23
3.1.1 Ensayos de inocuidad: Toxicidad aguda en ratones	23
3.1.2 Ensayos de eficacia: Evaluación del potencial antinociceptivo	24
3.1.2.1 Prueba de la placa caliente	24
3.1.2.2 Prueba de estiramiento abdominal	25
3.1.2.3 Análisis estadístico	25
3.2 Estudio fitoquímico	25
3.2.1 Análisis cromatográficos	25
3.2.2 Caracterización de los productos naturales	27
3.2.3 Material vegetal	27

	Pag.
3.2.4 Preparación de los extractos (orgánico y acuoso) y aceite esencial	28
3.2.5 Estudio químico de <i>Dysphania graveolens</i>	29
3.2.5.1 Fraccionamiento del extracto orgánico	29
3.2.5.2 Fraccionamiento del extracto acuoso	31
3.2.6 Perfiles cromatográficos y ensayos de composición del extracto acuoso de <i>D. graveolens</i>	31
3.2.6.1 Preparación de la matriz de trabajo	32
3.2.6.2 Linealidad del sistema	33
3.2.6.3 Linealidad del método	33
3.2.6.4 Exactitud	33
3.2.6.5 Precisión	34
3.2.6.6 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)	34
3.2.6.7 Cuantificación de la pinostrobrina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3)	34
4. Resultados y discusión	34
4.1 Establecimiento de las pruebas de inocuidad y eficacia preclínica	35
4.1.1 Evaluación de la inocuidad	35
4.1.2 Potencial antinociceptivo	37
4.2 Obtención y caracterización de los principios activos presentes en la infusión y extracto orgánico para su utilización como estándares para el desarrollo de las pruebas de control de calidad de <i>D. graveolens</i>	42
4.2.1 Obtención de la pinostrobrina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3) a partir del extracto orgánico de la planta	42
4.2.2 Estudio químico de la infusión	48
4.3 Establecimiento de las pruebas de identidad química y de composición de <i>D. graveolens</i> y <i>D. ambrosioides</i>	48
4.3.1 Composición química del aceite esencial	49
4.3.2 Análisis de los componentes volátiles	53
4.3.3 Desarrollo de un método analítico por CLAE para la cuantificación simultánea de los flavonoides mayoritarios	54
4.3.3.1 Linealidad del sistema	58
4.3.3.2 Límites de detección y cuantificación	61
4.3.3.3 Linealidad del método y exactitud	61
4.3.3.4 Precisión	66
4.3.3.5 Cuantificación de los compuestos mayoritarios	66
4.4 Efecto antinociceptivo de los constituyentes identificados en la infusión y aceite del epazote de zorrillo	67
5. Conclusiones	72
6. Perspectivas	74
7. Bibliografía	75
8. Anexos	

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 1. Ejemplos selectos de farmacopeas herbolarias en el mundo.	3
Figura 2. <i>Dysphania graveolens</i> (Willd.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae).	10
Figura 3. Distribución geográfica de <i>D. graveolens</i> en México.	11
Figura 4. Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie <i>D. graveolens</i> .	13
Figura 5. Proceso neurofisiológico de la nocicepción.	17
Figura 6. Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto orgánico de <i>D. graveolens</i> en los modelos de a) placa caliente y b) estiramiento abdominal.	38
Figura 7. Evaluación del potencial antinociceptivo de la infusión de <i>D. graveolens</i> en los modelos de a) placa caliente y b) estiramiento abdominal.	39
Figura 8. Evaluación del potencial antinociceptivo del aceite esencial de <i>D. graveolens</i> en los modelos de a) placa caliente y b) estiramiento abdominal.	40
Figura 9. Espectro de ¹ H-RMN de la pinostrobrina (1) (400 MHz, CDCl ₃).	45
Figura 10. Espectro de ¹³ C-RMN de la pinostrobrina (1) (100 MHz, CDCl ₃).	45
Figura 11. Espectro de ¹ H-RMN de la pinocembrina (2) (400 MHz, CDCl ₃).	46
Figura 12. Espectro de ¹³ C-RMN de la pinocembrina (2) (100 MHz, CDCl ₃).	46
Figura 13. Espectro de ¹ H-RMN de la crisina (3) (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄).	47
Figura 14. Espectro de ¹³ C-RMN de la crisina (3) (100 MHz, metanol- <i>d</i> ₄).	47
Figura 15. Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>D. graveolens</i> .	50
Figura 16. Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>D. ambrosioides</i> .	50
Figura 17. Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en (a) <i>D. graveolens</i> y (b) <i>D. ambrosioides</i> analizados por HS-SPME.	55
Figura 18. Cromatograma de líquidos obtenido a partir de la infusión de <i>D. graveolens</i> .	57
Figura 19. Evaluación del potencial antinociceptivo de la pinocembrina (2) en los modelos de a) placa caliente y b) estiramiento abdominal.	68
Figura 20. Evaluación del potencial antinociceptivo de la pinostrobrina (1) en los modelos de a) placa caliente y b) estiramiento abdominal.	69

Lista de Cuadros y de Tablas

	Pag.
Cuadro 1. Clasificación del dolor de acurdo a su patogenia.	16
Cuadro 2. Modelos experimentales para el estudio de la nocicepción.	19
Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN de los compuestos 1 , 2 y 3 (400 y 100 MHz).	44
Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por CG-EM y HS-SPME en <i>D. graveolens</i> y <i>D. ambrosioides</i> .	51
Tabla 3. Resultados experimentales de las curvas de calibración para la pinostrobina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3).	58
Tabla 4. Resumen del análisis de regresión lineal simple para la evaluación de la linealidad del sistema para la pinostrobina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3).	60
Tabla 5. Resultados experimentales para establecer la linealidad y exactitud del método para la pinostrobina (1).	62
Tabla 6. Resultados experimentales para establecer la linealidad y exactitud del método para la pinocembrina (2).	63
Tabla 7. Resultados experimentales para establecer la linealidad y exactitud del método para la crisina (3).	64
Tabla 8. Resumen de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método.	65
Tabla 11. Datos experimentales para la evaluación de la precisión.	66

Lista de Esquemas y de Gráficas

	Pag.
Esquema 1. Extracción y fraccionamiento preliminar de las partes aéreas de <i>D. graveolens</i> .	30
Esquema 2. Aislamiento de los principales metabolitos secundarios presentes en la fracción de diclorometano de la infusión de <i>D. graveolens</i> .	32
Gráfica 1. Evaluación de la linealidad del sistema de la pinostrobina (1).	59
Gráfica 2. Evaluación de la linealidad del sistema de la pinocembrina (2).	59
Gráfica 3. Evaluación de la linealidad del sistema de la crisina (3).	60
Gráfica 4. Evaluación de la linealidad del método de la pinostrobina (1).	62
Gráfica 5. Evaluación de la linealidad del método de la pinocembrina (2).	63
Gráfica 6. Evaluación de la linealidad del método de la crisina (3).	64

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
OMS	Organización Mundial de la Salud
AHP	Farmacopea Herbolaria Americana
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
MEXU	Herbario Nacional
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
DG	<i>Dysphania graveolens</i>
DA	<i>Dysphania ambrosioides</i>
AcOEt	Acetato de Etilo
ACN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
TMS	Tetrametilsilano
MeOH	Metanol
Hex	Hexano
NaCl	Cloruro de Sodio
EtOH	Etanol
NaOH	Hidróxido de sodio
HCOOH	Ácido Fórmico
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCFP	Cromatografía en Capa Fina Preparativa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MHz	MegaHertz

Abreviatura	Significado
δ	Desplazamiento Químico
CG	Cromatografía de Gases
EM	Espectrometría de masas
IR	Infrarrojo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en modo headspace
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
EM-IE	Espectrometría de Masas modalidad Impacto Electrónico
m/z	Relación masa-carga
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CL ₅₀	Concentración Letal 50
DL ₅₀	Dosis Letal 50
g	Gramo
kg	Kilogramos
μ g	Microgramo
μ m	Micrómetro
mg	Miligramos
mL	Mililitro
p.f.	Punto de Fusión
ppm	Partes por Millón
ABC	Área Bajo la Curva
DER	Desviación Estándar Relativa
LD	Límite de Detección
LC	Límite de Cuantificación
SD	Desviación Estándar
PDMS	polidimetilsiloxano
CAR/PDMS	carboxeno/polidimetilsiloxano
CAR/DVB/PDMS	carboxeno/divinilbenceno/polidimetilsiloxano

Resumen

El presente trabajo describe la investigación realizada de la especie medicinal *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae) con la finalidad de establecer sus parámetros de inocuidad, eficacia preclínica y calidad, de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Todo ello con el propósito de establecer sus monografías tipo OMS y farmacopéica y así contribuir al uso racional de la droga cruda del epazote de zorrillo ampliamente comercializada en México para el tratamiento de parasitosis por helmintos y padecimientos dolorosos.

Los estudios de seguridad evaluando la toxicidad aguda del extracto orgánico, infusión y aceite esencial de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke, permitieron establecer que el extracto orgánico ($DL_{50} > 5000$ mg/kg) y la infusión y la esencia ($DL_{50} = 3807$ mg/kg), no presentan efectos tóxicos agudos importantes en ratones, por lo tanto, se pueden considerar seguros.

Mediante la experimentación farmacológica apropiada se estableció la eficacia preclínica como agente antinociceptivo de diferentes preparados de *D. graveolens*. Para realizar esta serie de experimentos se emplearon los modelos de la placa caliente y de estiramiento abdominal, encontrándose que el preparado que presentó la mejor actividad en el modelo de la placa caliente fue el extracto orgánico a la dosis de 100 mg/kg. Por otra parte, en el modelo de estiramiento abdominal, el extracto orgánico provocó un efecto analgésico importante a la dosis de 31.6 mg/kg mientras que el aceite esencial presentó un efecto antinociceptivo importante a todas las dosis ensayadas (31.6, 100 y 316 mg/kg).

De igual manera, utilizando los mismos modelos se comprobó que los principios activos responsables del efecto antinociceptivo son la pinocembrina, la pinostrobina, la crisina y la cumarina en el caso de la infusión, mientras que los componentes activos principales de la esencia son el eucaliptol, el *p*-cimeno y el α -terpineol. La evaluación del efecto antinociceptivo de los preparados del epazote de zorrillo, en particular contra el dolor inflamatorio, proporciona una base científica que apoya la eficacia preclínica de la

planta para el tratamiento de afecciones dolorosas documentadas en diferentes estudios etnofarmacológicos o etnobotánicos.

El estudio químico del extracto orgánico de la especie *D. graveolens* condujo al aislamiento y la caracterización de la pinostrobinina (**1**), la pinocembrina (**2**) y la crisina (**3**) como los compuestos mayoritarios y activos presentes en el extracto. Enseguida, el estudio realizado a partir de la infusión permitió el aislamiento y la caracterización de cuatro flavonoides [**1**, **2**, **3** y la negleteína (**20**)], así como tres sesquiterpenos [(+)-8 α -hidroxielemol (**10**), del acetato del (+)-8 α -criptomeridiol (**11**) y criptomeridiol (**12**)] y la cumarina (**19**). La elucidación de todos los compuestos se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas y por comparación de las constantes físicas y espectroscópicas de los productos aislados con aquellas reportadas en la literatura.

El análisis de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial mediante CG-EM de las especies *D. graveolens* y *D. ambrosioides* permitió establecer que los constituyentes mayoritarios presentes en las esencias obtenidas mediante hidrodestilación son el eucaliptol (42.9%), el *p*-cimeno (16.5%) y el α -terpineol (7.4%) para *D. graveolens*; en el caso del aceite de *D. ambrosioides* los constituyentes más relevantes fueron el fitol (36.7%), el carvacrol (15.7%), el *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (10.3%), la carvona (6.9%), la piperitona (6.05%) y el ascaridol (6.05%). Con la finalidad de complementar la información obtenida a partir de los análisis directos de las esencias por CG-EM, se realizó una microextracción en fase sólida utilizando diferentes tipos de soportes en modo headspace (HS-SPME) y el análisis de los componentes extraídos se llevó a cabo por CG-EM. Los principales componentes volátiles identificados en ambas especies fueron de tipo monoterpenoide (> 90%). El *p*-cimeno (84.8%) y el eucaliptol (11.3%) constituyen los metabolitos mayoritarios en *D. graveolens*, y el α -terpineno (25.1%), el *p*-cimeno (27.9%), el (+)-limoneno (17.3%) y el ascaridol (21.6%) en la especie *D. ambrosioides*.

Finalmente, se desarrolló y se validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar a los principales compuestos presentes en la infusión. El método resultó ser lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones evaluadas. Una vez validado el método de análisis se cuantificó cada uno

de los tres compuestos mayoritarios (**1–3**) en dos diferentes muestras de material vegetal: DG, recolectada en el municipio de Ozumba, Estado de México y DG–2, adquirida en el local “El Abuelito”, Mercado Reforma, en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua. En el lote DG las concentraciones calculadas para los analitos **1**, **2** y **3** fueron de 30, 166 y 45 mg/g, respectivamente, mientras que para la muestra DG–2 fueron 24, 142 y 21 mg/g para **1**, **2** y **3**, respectivamente.

Abstract

The main goal of this work was to establish some quality control, efficacy and toxicological parameters to *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae), a Mexican medicinal herb widely used in Mexico for the treatment of intestinal parasites (specially worms) and pain. Altogether, the information generated will be suitable for the integration of a pharmacopeic monograph of *D. graveolens*.

According to Lorke's procedure, the organic extract, infusion and essential oil of *D. graveolens* were not toxic to mice; the lethal medium dose was higher than 5000 mg/kg in the case of organic extract, while the infusion and essence were 3807 mg/kg.

Preclinical analgesic efficacy of *D. graveolens* was accomplished using the conventional hot plate and acetic acid-induced writhing test. The three preparations assayed (infusion and organic as well as the essential oil) showed an important antinociceptive activity when tested in both models. The essential oil was the most active. The major components of the plants namely, pinostrobin (**1**) and pinocembrine (**2**) were also evaluated. Compound **1** induced a dose-dependent (10-31.6 mg/kg) antinociceptive action in the writhing model, while **2** displayed an important effect in the hot plate assay (10-31.6 mg/kg). These results are consistent with the use of the plant for treating different sort of pains in folk medicine.

The chemical study of the organic extract of *D. graveolens* led to isolation and characterization of the pinostrobin (**1**), the pinocembrin (**2**) and chrysin (**3**) as major and active compounds present in the extract. On the other hand, the study of the infusion allowed the isolation and characterization of four flavonoids [**1**, **2**, **3** and negletein (**20**)], and three sesquiterpenes [(+)-8 α -hydroxyelemol (**10**), (+)-8 α -acetoxycryptomeridiol (**11**) and cryptomeridiol (**12**)] and coumarin (**19**). The structures of the compounds were established by spectroscopic and spectrometric techniques and by comparison of physical constants with those reported in literature.

The analysis of volatile component by GC-MS of *D. graveolens* and *D. ambrosioides* established that the major constituents in the essences, obtained by

hydrodistillation, were eucalyptol (42.9%), *p*-cymene (16.5%) and α -terpineol (7.4%) for *D. graveolens*, in the case of oil *D. ambrosioides* the most relevant components were phytol (36.7%), carvacrol (15.7%), *trans*-*p*-mentha-1 (7) ,8-dien-2-ol (10.3%), carvone (6.9%) the piperitone (6.05%) and ascaridol (6.05%). In order to complement the information obtained from the analysis of essences by GC-EM, was performed a headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and analysis of the extracted components are carried out by GC-MS. The major volatile components identified in both species were monoterpenoids (> 90%). The *p*-cymene (84.8%) and eucalyptol (11.3%) are the major metabolites in *D. graveolens*, and α -terpinene (25.1%), *p*-cymene (27.9%), the (+)-limonene (17.3%) and ascaridol (21.6%) in *D. ambrosioides*. These variations will be useful for differentiating DG from DAG, and for quality control purposes.

Finally, an HPLC method was developed and validated to quantify the major compounds present in the infusion. The method was precise, accurate and linear in the range of concentrations tested. Once validated the analytical method was successively applied for the quantification of the three major compounds (**1–3**) in two different geographical batches: the first one (DG) was harvested in Ozumba, Estado de Mexico and the second batch (DG-2) was purchased at the store El Abuelito, Mercado Reforma, in Chihuahua City, Chihuahua. In DG the amounts of pinostrobin (**1**), pinocembrin (**2**) and chrysin (**3**) were 30, 166 and 45mg/g, respectively; while in DG-2 they were 24, 142 and 21 mg/g, respectively.

1. Antecedentes

1.1 Control de calidad de plantas medicinales

1.1.1 Las monografías como marco de referencia para el control de calidad de las plantas medicinales

El uso de las plantas medicinales en el cuidado primario de la salud, para el tratamiento de diversos padecimientos en las prácticas médicas alopáticas y/o tradicionales, o como fuentes potenciales para la búsqueda de medicamentos novedosos, es un hecho bien documentado (Olliario *et al.*, 2001; Plotkin, 2001; Kumar y Shukia, 2003; Phillipson, 2011). De acuerdo, con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el auge en el consumo de estos recursos, por parte de grandes sectores de la población a nivel mundial se ha incrementado notablemente debido, entre otras causas, a su fácil acceso.

Sin embargo, el comercio de las plantas medicinales y sus preparados ha dado paso al incremento de un mercado carente de regulación, y la mayoría de los productos que se expenden en distintos lugares, no cuentan con un registro para su venta, fabricación, o comercialización, y mucho menos de los criterios que garanticen su calidad. Aún más frecuentemente la eficacia y la seguridad de esos productos se desconoce (Thimothy *et al.*, 2004).

Por tal motivo, la OMS a partir del año 1991 inició la publicación de una serie de normas con la finalidad de facilitar el trabajo de los organismos regulatorios y científicos de cada país miembro, y así lograr el reconocimiento de la medicina a base de plantas y con ello promover su uso racional, bajo la premisa de que la calidad es la base de la eficacia y seguridad. Para ello, fue necesario establecer buenas prácticas de manufactura y los criterios de calidad, eficacia y seguridad tanto de las materias primas vegetales como de sus productos (WHA, 2003; WHA, 2005).

Es así, como después de un arduo trabajo realizado por la misma OMS, basándose en estas normas, se documentó parte de la información científica disponible sobre la

inocuidad, la eficacia y el control de calidad de plantas medicinales de amplio uso a nivel global, y se publicaron 28 monografías de plantas. Cada monografía consta de dos partes, la primera incluye la información sobre la definición de la droga cruda, la distribución geográfica y los análisis tanto químicos como botánicos conducentes a establecer los criterios de identidad, de pureza y de composición de cada especie. La segunda, describe los usos tradicionales, así como, datos de farmacología, clínicos, toxicológicos, efectos secundarios y posología de cada droga cruda. Posteriormente, en el año 2002, siguiendo con este tipo de trabajos monográficos se publicó un segundo volumen con 30 monografías adicionales. A la fecha, se cuentan con cuatro volúmenes, y, evidentemente, este tipo de trabajos han sido de gran utilidad para los usuarios de estos recursos terapéuticos y en general, han servido como modelos para la generación de la información científica necesaria sobre plantas medicinales en las distintas regiones del mundo.

Así por ejemplo, los países europeos tomando las recomendaciones de la OMS en junio de 1989, crearon la European Scientific Cooperative for Phytotherapy (ESCOP, por sus siglas en inglés, **Figura 1**), que tiene como objetivo general promover el avance del conocimiento científico de los medicamentos de origen vegetal y el establecimiento de los criterios armonizados para la regulación de las plantas medicinales y contribuir a la aceptación de la fitoterapia en estos países. La ESCOP, por otra parte, también ha contribuido de manera importante con la generación de trabajos monográficos, publicando a la fecha alrededor de un ciento de monografías que han permitido el establecimiento de los estándares de calidad adecuados de las plantas medicinales y de sus preparados fitoterapéuticos.

En los Estados Unidos de Norteamérica, por su parte, la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP, **Figura 1**), con el objetivo de promover el uso responsable de los medicamentos herbolarios, también ha publicado monografías cuyo contenido abarca la seguridad, la preparación y el almacenamiento de plantas medicinales. Esta labor es muy representativa considerando que en este país el mercado de los productos herbolarios alcanza ventas anuales mayores a los tres mil millones de dólares y se estima que el número de consumidores es mayor de los 60 millones de usuarios (Mahady, 2001).

En México, las autoridades sanitarias considerando las recomendaciones realizadas por la OMS, en el año 2001, publicaron la primera Farmacopea Herbolaria de los Estados

Unidos Mexicanos (FHEUM, **Figura 1**), la cual consta de 82 monografías de plantas medicinales y de algunas esencias, la mayoría de ellas de especies introducidas. Estas monografías describen de manera general, las características de identidad, de pureza y de composición de las drogas crudas (FHEUM, 2001). Sin embargo, en esta primera edición las monografías de plantas autóctonas son escasas debido a que no se cuenta con la información científica indispensable para su integración. Por este motivo, es primordial realizar la investigación científica de aquellas especies de mayor uso en la medicina tradicional de nuestro país para establecer los lineamientos para su regulación y proporcionar la información más importante acerca de la identidad, la eficacia y la pureza de estas especies. En este contexto, es importante mencionar que México, cuenta con una gran riqueza herbolaria, que consta de alrededor de 30,000 especies de plantas, de las cuales entre un 10–15% presentan un potencial terapéutico importante y sólo menos del 1% de éstas ha cursado por los estudios químicos, farmacológicos y toxicológicos correspondientes, que permitan validar científicamente sus propiedades medicinales (Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994; Linares *et al.*, 1994; Lozoya, 1994; Aguilar, 1999).

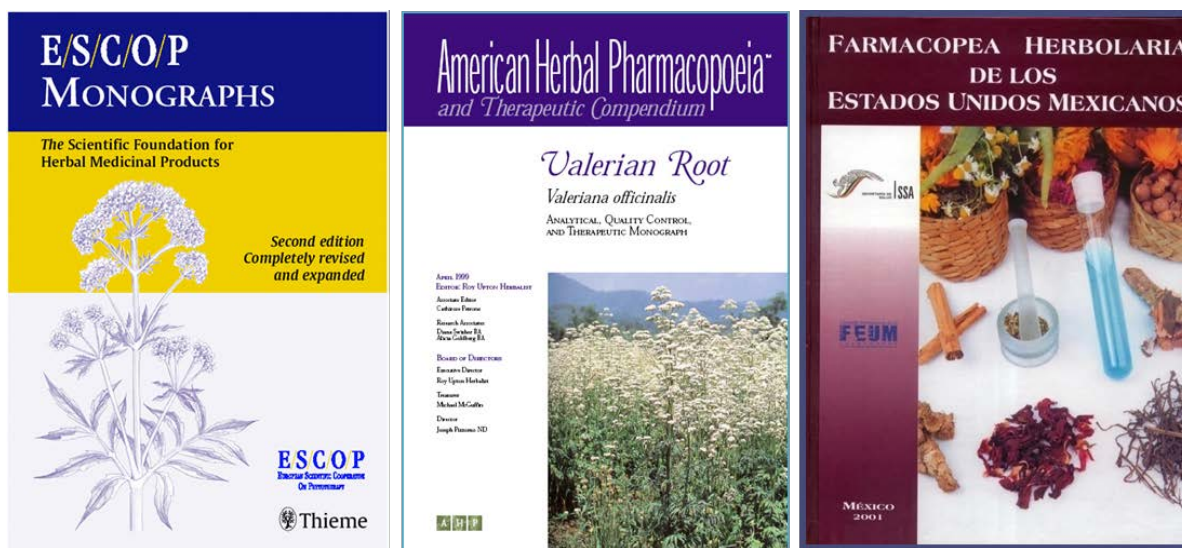


Figura 1. Ejemplos selectos de farmacopeas herbolarias en el mundo.

1.1.2 Parámetros de calidad de las drogas vegetales

La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significado intrínseco, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia (Bauer y Tittel, 1996; Bauer, 1998; Busse, 2000; Franz y Vlietinck, 2001). Este aspecto resulta aún más importante en los medicamentos a base de plantas medicinales en los que la problemática es mucho más compleja que en los fármacos de síntesis. Algunos aspectos, que no se dan en éstos últimos, pueden influenciar la calidad de los fitofármacos (Bauer, 1998; De Diego, 1992). Los fitofármacos generalmente son sistemas complejos, mucho más difíciles de caracterizar que un compuesto puro, sea sintético o natural. La implantación de diversos métodos analíticos, particularmente por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y cromatografía de gases (CG), ha contribuido decisivamente a fomentar el manejo de esa complejidad, no sólo para la valoración de constituyentes sino también para la obtención de su “huella dactilar” (perfil cromatográfico) (Lazarowich y Pecos, 1998).

El control de calidad de las drogas vegetales y derivados pretenden garantizar su identidad, pureza y contenido en principios activos o marcadores. Las exigencias concernientes al control de calidad de las drogas vegetales, así como los métodos a utilizar, se recopilan principalmente en las farmacopeas. Además, existen regulaciones sobre el tema tanto a nivel nacional como europeo.

1.1.2.1 Ensayos de identidad

Las pruebas de identidad ayudan a descartar posibles falsificaciones y se realizan fundamentalmente mediante el reconocimiento botánico o bien por métodos fisicoquímicos que a través de una serie de ensayos de tipo cualitativo, nos permiten verificar, sobre la droga entera o pulverizada o incluso sobre extractos (obtenidos por los diferentes procedimientos de extracción y con diferentes solventes), la identidad de la misma.

Desde el punto de vista botánico, se puede confirmar la identidad de la droga detectando posibles falsificaciones y estableciendo, en muchos casos, incluso el grado de calidad de ésta. Estos análisis comprenden un examen de las características organolépticas

que se complementa con un reconocimiento de las características morfológicas o macroscópicas y con el análisis microscópico. El examen botánico es siempre indispensable y sirve de punto de partida para ensayos posteriores. Este es suficiente en el caso de muchas drogas no tóxicas, cuando los principios activos están en pequeñas cantidades o bien son difíciles de valorar.

Las características organolépticas supone una evaluación preliminar de la droga y se basa en la valoración de la misma por medio de los órganos de los sentidos, es decir, se determina el olor (aromático, aliáceo, alcanforáceo, nauseabundo, desagradable, a especia), color (uniforme o si presenta fragmentos de distinto color), sabor (dulce, amargo, ácido, salino, astringente, punzante, nauseabundo, aromático) y la sensación que la droga produce al tacto.

Las características morfológicas de una droga se determinan mediante un examen de sus características típicas, en esta evaluación se tiene en cuenta una serie de caracteres generales que le son propias como los tallos (tipo leñoso o herbáceo, erecto o rastrero), hojas (forma del limbo, tipo de nerviación, presencia o no de pelos, textura, superficie), inflorescencias (disposición de las flores, presencia o ausencia de brácteas), flores (número de piezas del cáliz y de la corola, disposición de los estambres, número de los carpelos, disposición del ovario), frutos (tipos, forma, dimensiones, características del pericarpio, dehiscencia) y semillas (tamaño, color, forma, presencia o no de pelos en el tegumento, albúmina) (Villar del Fresno, 1999).

Las características microscópicas ayudan a confirmar la identidad de las drogas enteras o pulverizadas cuando los datos morfológicos han sido insuficientes y se desea descartar la presencia de posibles adulteraciones, esta identificación se lleva a cabo por medio de técnicas histológicas con las cuales se realiza la identificación microscópica de los elementos celulares característicos, así como de sus contenidos celulares. Los estudios histológicos se llevan a cabo mediante cortes transversales o longitudinales mediante micrótopo con la ayuda de técnicas de aclarado y coloración (Villar del Fresno, 1999).

La identificación química se realiza a través de ensayos fisicoquímicos cualitativos sobre la misma droga, entera o pulverizada, o, más frecuentemente, sobre extractos obtenidos por diferentes procedimientos de extracción a partir de la planta y con diferentes disolventes. Son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación de drogas y el

reconocimiento de falsificaciones, caracterizando, por lo general, la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de una planta, ya que éstos son más concluyentes y útiles para comparar los perfiles químicos y diferenciar entre especies vegetales. Estos métodos comprenden reacciones químicas (reacciones de coloración, de precipitación, fluorescencia, etc.) que permiten detectar determinados constituyentes o sustancias químicas características de una planta. Por otro lado, también se puede realizar la identificación mediante un análisis cromatográfico (cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, etc.) que permite separar a los diferentes componentes químicos de una especie determinada (Villar del Fresno, 1999).

Las reacciones químicas son muy útiles para la identificación debido a su sencillez y rapidez, además de que se realizan directamente sobre el extracto orgánico de la planta permitiendo la identificación específica de algún compuesto característico de la planta o sus principios activos. Esta identificación por reacciones químicas a veces presenta la dificultad o limitación de que no son aplicables a todas las drogas debido a la interferencia que pueden ser observadas con sustancias químicas parecidas a aquellas que se pretenden identificar. Por lo tanto, estos resultados se deben de interpretar con prudencia y complementar con los análisis cromatográficos que son más precisos.

Los análisis cromatográficos se basan en un mismo principio: la separación de las sustancias presentes en una mezcla dada, entre dos fases; una permanece fija, llamada fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida, mientras que la otra eluye a través de la primera, llamada fase móvil y que puede ser un líquido o un gas o la combinación de ambos.

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica de bajo costo ampliamente utilizada en el control de calidad de toda clase de productos naturales y se ha establecido como un método analítico muy importante en las farmacopeas modernas, permitiendo identificar de forma rápida el número de componentes presentes en un material vegetal. En la CCF la separación de las sustancias viene determinada por un conjunto complejo de propiedades físicas como la velocidad de difusión, la solubilidad del soluto y la naturaleza del solvente. El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema característico puede ser un dato valioso en la identificación. Esta característica se conoce con el nombre

de factor de retención (Rf) y representa la distancia recorrida por el compuesto en relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilan entre 0 y 1 (FEUM, 2001).

Sin embargo, no todas las sustancias pueden observarse a simple vista, por lo que en muchas ocasiones es necesario observar la placa cromatográfica después de haberla sometido a procesos de desarrollo de coloración, la selección de éstos dependerá de las características químicas del compuesto por analizar o bien observar dichas placas bajo lámpara de luz ultravioleta (254 ó 365 nm) cuando se trate de compuestos con grupos cromóforos.

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica utilizada principalmente para la separación de los componentes volátiles presentes en una muestra, debido a esta característica esta técnica es utilizada para la identificación de los componentes de los aceites esenciales junto con los detectores de espectrometría de masas acoplados. En la actualidad esta técnica se está utilizando en conjunto con la microextracción en fase sólida, permitiendo de esta manera complementar el análisis de los componentes volátiles presentes en las plantas medicinales.

Otra de las técnicas más utilizadas en los análisis de identidad química es la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Esta técnica cromatográfica es muy sencilla y rápida, además de permitir la separación de una amplia gama de compuestos no volátiles muy similares, incluso isómeros, por lo tanto puede ser utilizada para la separación de compuestos de interés presentes en extractos orgánicos y/o acuosos.

En años recientes, las técnicas de biología molecular han tomado importancia en la identificación de las drogas crudas. Básicamente estos procedimientos consisten en establecer códigos de barras de zonas específicas del genoma de las plantas (Sucher y Carles, 2008).

1.1.2.2 Pruebas de composición

Las pruebas de composición tienen como finalidad cuantificar la presencia de los componentes químicos en una planta, esta cuantificación se logra mediante la validación de métodos analíticos apropiados. La validación de un método analítico puede definirse como

el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende (Martín-Smith y Rudd, 1998). Las características o parámetros de calidad que integran un método analítico validado han recibido una atención considerable por parte de las agencias reguladoras. De tal manera que, la agencia oficial “Food and Drug Administration” (FDA, por sus siglas en inglés) ha publicado una guía para la validación de métodos analíticos bajo el título de “Validation of analytical Procedures: Methodology” (ICH, 2005).

La cuantificación se puede realizar con base en los compuestos marcadores o el principio activo. Por definición un principio activo es una sustancia pura, principal responsable de las acciones y efectos farmacológicos que posee la droga y, por lo tanto, de uso terapéutico, pudiendo servir para la elaboración de medicamentos. Los principios activos son en general metabolitos secundarios, relativamente estables y por lo que la mayor parte de ellos se pueden encontrar tanto en la planta fresca como en la planta desecada. En tanto que los compuestos marcadores se definen como sustancias químicamente definidas y seleccionadas con fines analíticos. En una planta puede existir uno o más marcadores.

1.1.2.3 Pruebas de pureza

Las pruebas de pureza están relacionadas directamente con la determinación de la presencia de algún material ajeno o contaminante presente en el material vegetal (contaminantes químicos, biológicos y físicos). Este análisis de pureza comienza con una inspección visual en la cual se detectan defectos en la desecación, transporte, almacenaje o recolección, como pueden ser la presencia de sustancias extrañas a la planta (adulteraciones con otras plantas, mohos por una mala desecación, insectos, etc.) y continua con una serie de ensayos fisicoquímicos cuantitativos, aplicables a todas las especies (humedad, cenizas, material extraíble, metales pesados, residuos de pesticidas, contaminación microbiológica, contaminación radioactiva, etc.).

Aunque el análisis químico es la parte más importante en el proceso de control de calidad, también forman parte los siguientes aspectos:

1. En el caso de las materias primas o de las drogas es importante registrar la información sobre el lugar y periodo de cosecha, periodo de vegetación, tratamiento durante la cosecha (pesticidas), proceso de secado y condiciones de almacenamiento (Bonati, 1991).
2. En el caso de extractos se debe de registrar la información sobre el método de producción (tamaño de partícula, tipo de extracción, disolvente de extracción, método de extracción) y condiciones de almacenamiento (Bonati, 1991).

1.2 Generalidades sobre *Dysphania graveolens*

1.2.1 Aspectos botánicos

La especie medicinal *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae) [sinonimia: *Chenopodium ambrosioides* var. *graveolens* (Willd.) Speg.; *Teloxys graveolens* (Willd.) W.A. Weber] (**Figura 2**), es una hierba erguida, anual, que posee un aroma característico (fétido); mide entre 20 y 80 cm de alto. Sus tallos son simples o ramificados, a veces rojizos y presentan peciolo delgados; sus hojas son ovadas u oblongas, que miden entre 2–6 cm de largo y entre 1–3 cm de ancho, sinuadas-pinnatífidas, con los lóbulos oblongos o deltoideos, glabras o algo víscidas en el haz, cubiertas de glándulas amarillas en el envés; sus inflorescencias presentan numerosas cimas axilares, dispuestas en largas panículas, flores sésiles en la bifurcación y una sola terminal en el extremo de cada una de las ramas laterales; las flores pediceladas espiniformes son generalmente abortivas, caedizas con un perianto de menos de un mm de largo, corniculado en el ápice de los lóbulos, cubierto de glándulas, envolviendo el fruto; las semillas café oscuro miden 0.5 mm de diámetro y presentan un pericarpio adherente (Rzedowski y Rzedowski, 2010).

1.2.2 Distribución geográfica

Dysphania graveolens es originaria de América, crece desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Argentina y habita en climas cálido, semicálido, semiseco,

seco y templado. En México, la especie se distribuye ampliamente en algunos municipios del Valle de México (San Angel, Tlalnepantla, Tetilpa, Acuatla y Ozumba), en la Sierra de San Pedro Nolasco, el volcán de Orizaba y en los Estados de Oaxaca, Guanajuato, Morelos, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Chihuahua y Veracruz y su época de floración es entre los meses de julio a noviembre (**Figura 3**).

1.2.3 Nombres comunes

En México, la planta es conocida popularmente con el nombre de “epazote de zorrillo”, epazote de perro, epazote morado, hierba de perro, quelite apestoso, hediondillo, shimiyou, shúmiyou (Mazahua, Estado de México), coyotlyepazot (Estado de México), xan'ai (Otomí, Puebla), epazotl (hierba olorosa), sasanipatl (Puebla), Tlaxcale yapaclina (Náhuatl), entre otros.



Figura 2. *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae).

1.2.4 Usos medicinales

Desde épocas precolombinas, la infusión de las partes aéreas del epazote se emplea como agente vermífugo y antihelmíntico utilizado en el tratamiento contra diversos

parásitos (ascaris o lombrices, oncocercosis, amibas y solitaria) y otros trastornos del aparato digestivo, principalmente la diarrea, la disentería, la indigestión y bilis, el empacho y vómito, algunos casos de dolor y frío en el estómago o bien para los “corajes” o el “insulto”. También se ha consignado su uso para el tratamiento de algunas afecciones del tracto respiratorio (tos y dolor de aire, pulmonía, resfrío o gripe, dolor de pecho y de espalda, escalofríos) y como agente oxitócico para acelerar el parto (Martínez, 1959; Lozoya y Lozoya, 1982; Bye, 1986; Mendoza *et al.*, 1997; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Jiménez, 2011).

Para el tratamiento de las afecciones estomacales descritas se emplea una infusión de la planta sola o en combinación con otras hierbas como son: la hierba dulce (*Phylla scaberrima*), la gobernadora (*Lantana camara*), el estafiate (*Artemisia ludoviciana* var. mexicana), el saúco (*Sambucus mexicana*), el techomite (*Hamelia patens*), la ruda (*Ruta chalepensis*), el kahtibe (*Trichilia havanensis*), el tomate (*Physalis aequata*), el koni potei (*Tibouchina mexicana*) y la mano de tigre (*Geranium seemannii*), para ello se hierven la droga cruda desecada y se dejan reposar, para su posterior ingestión como agua de tiempo. También la infusión de la planta sola se utiliza para tratar los efectos secundarios después de un excesivo consumo de alcohol (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



Figura 3. Distribución geográfica de *D. graveolens* en México (Trópicos de Missouri Botanical Garden).

1.2.5 Antecedentes químicos y farmacológicos

Los diferentes estudios fitoquímicos realizados sobre la especie *D. graveolens* han permitido el aislamiento y la caracterización de diversos metabolitos secundarios (**Figura 4**) que pertenecen a las categorías de los flavonoides [pinostrobinina (**1**), pinocembrina (**2**), crisina (**3**), narcissina (**4**), rutina (**5**)], esteroides [estigmasterol (**6**), estigmast-22-en-3 β -ol (**7**), glucósido del 3 β -sitosterol (**8**), estigmast-7-en-3 β -ol (**9**)], terpenoides [(+)-8 α -hidroxielemol (**10**), del acetato del (+)-8 α -criptomeridiol (**11**), criptomeridiol (**12**), acetato de geranilo (**13**)], derivados de cetonas y ácidos carboxílicos [heptatetracontanoato de metilo (**14**), 1-hexaeicosanilheptaicosanol (**15**), 8-oxo-3-en-dotriacontano (**16**), ácido dotetracontanoico (**17**)], y un derivado del ácido cumarínico [melilotósido (**18**)] (Mata *et al.*, 1987; Camacho *et al.*, 1991; Meckes *et al.*, 1998; Ramírez, 1998; Calzada *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista biológico, los extractos de acetona y hexano de las partes aéreas de la planta presentaron una actividad tóxica importante contra el crustáceo *Artemia salina* Leach. El primer extracto mostró también una actividad antiprotozoaria significativa *in vitro* contra las especies *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Camacho *et al.*, 1991).

La evaluación farmacológica de los constituyentes químicos activos presentes en los extractos, permitieron establecer las propiedades larvicidas [*Estomoxys calcitrans* (CL₅₀ = 418.69 μ g/mL)], ovicidas [*Ascaridi galli* (CL₅₀ = 623.49 μ g/mL)] y fasciolicidas [*Fasciola hepática* (CL₅₀ = 10 μ g/mL)] de la pinocembrina (**2**). También, para los compuestos **2**, heptatetracontanoato de metilo (**14**) y melilotósido (**18**), se encuentra documentada la actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* (CI₅₀ = 80.76 μ g/mL, 54.10 μ g/mL y 12.5 μ g/mL, respectivamente) y *Giardia lamblia* (CI₅₀ = 57.39 μ g/mL, 42.15 μ g/mL y 16.8 μ g/mL, respectivamente). La narcissina (**4**) presentó una actividad antiprotozoaria selectiva contra *E. histolytica* (CI₅₀=17.2 μ g/mL) (Calzada *et al.*, 2003).

Finalmente, los flavonoides pinostrobinina (**1**) (CI₅₀ = 11.22 μ g/mL) y crisina (**3**) (CI₅₀ = 3.65 μ g/mL) demostraron importantes efectos relajantes sobre la musculatura lisa en una preparación de íleon aislado de cobayo (Meckes *et al.*, 1998).

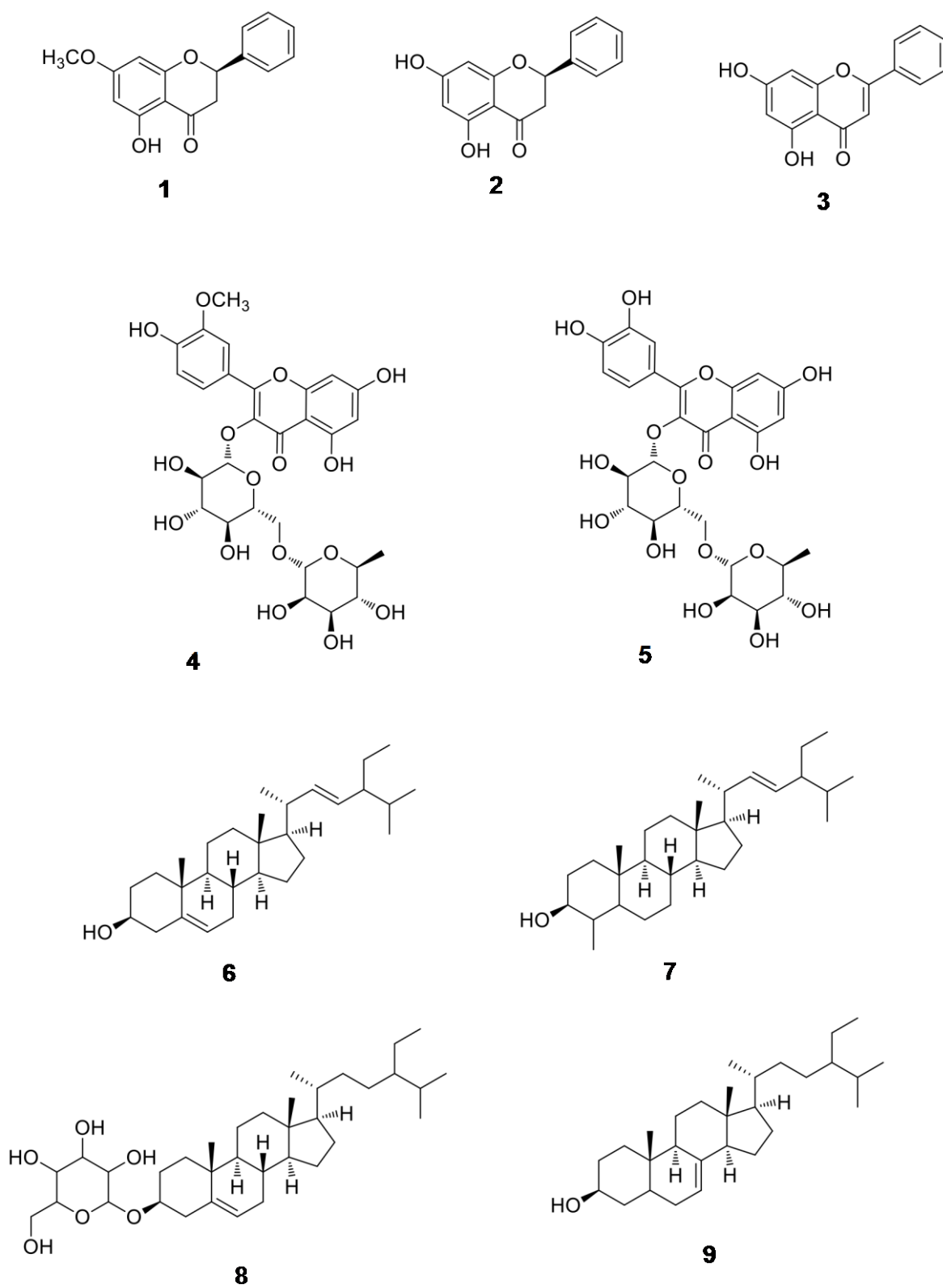


Figura 4. Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *D. graveolens*.

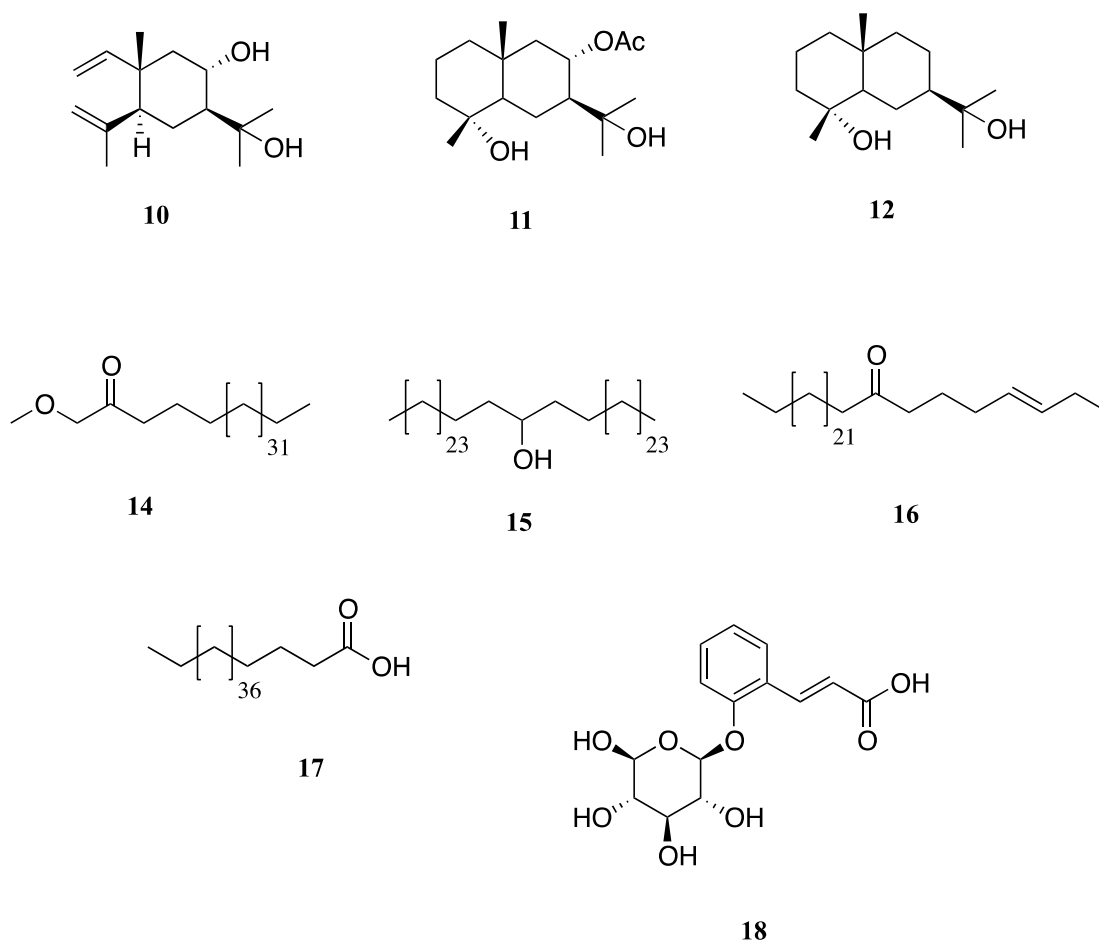


Figura 4. Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *D. graveolens* –continuación–

1.3 Generalidades sobre el dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daños reales o potenciales a los tejidos que pueden describirse en términos de la magnitud del daño” (Guevara *et al.*, 2004). Las sensaciones dolorosas que experimenta el ser humano a diferencia de los animales, pueden ser diagnosticadas con frecuencia, sin embargo, en el caso de los animales, éstas no se pueden conocer, debido a que no se pueden comunicar, y sólo son estudiadas mediante estímulos nocivos de diversa naturaleza como conductas de tipo nociceptivo (De la Gala, 1997). Así, la nonicepción se define como “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que genera una reacción motora progresiva y vegetativa, resultando en el aprendizaje de un comportamiento de evasión

(rechazo) y que puede modificar el comportamiento específico del animal” (Ortega *et al.*, 2002). Este último aspecto es importante de destacar debido a que el dolor en los humanos se interpreta como la integración del estímulo nociceptivo en combinación con aspectos psicológicos desencadenados por factores sociales, culturales, económicos y ambientales.

Existen diferentes clasificaciones del dolor entre las más comunes se encuentran según su duración, patogenia o localización. La primera clasificación tipifica al dolor como de tipo agudo o crónico. Un dolor agudo es el que se presenta por un tiempo determinado y carece de un componente psicológico, por ejemplo, la perforación de una víscera hueca o el dolor de músculo esquelético resultante de una fractura patológica. Por otra parte, el dolor crónico tiene una duración ilimitada y siempre se acompaña del componente psicológico, como en el caso de enfermedades como el cáncer y el SIDA.

La segunda clasificación derivada de la patogenia del dolor lo divide en cinco tipos específicos que incluyen los dolores de tipo neuropático, nociceptivo, psicógeno, inflamatorio y funcional (**Cuadro 1**). Finalmente, la última clasificación que involucra a la localización del dolor lo divide en somático y visceral. El primero se caracteriza por la excitación anormal de nociceptores somáticos superficiales o profundos localizados en la piel, el músculo esquelético y los vasos y estructuras superficiales, por mencionar a los más importantes. Este dolor se encuentra bien localizado, es punzante y agudo, y se irradia siguiendo trayectos nerviosos. Por otra parte, el dolor visceral, es aquel que se produce por la excitación anormal de nociceptores viscerales, este dolor no se encuentra bien localizado, además de ser constante y profundo y puede irradiarse a zonas alejadas al lugar donde se originó. Este tipo de dolor frecuentemente se acompaña de síntomas neurovegetativos, como por ejemplo, los cólicos y dolores metastásicos.

1.3.1 Nocicepción

Desde el punto de vista fisiológico, la percepción del dolor requiere de la participación tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico. El dolor desencadena una serie de reacciones en ambos sistemas que permite la percepción del mismo, con la finalidad de disminuir la causa y evitar los efectos secundarios (Romera *et al.*, 2000). Existen varias estructuras nerviosas que participan en la percepción de las

experiencias de dolor y de todo el complejo que las acompaña. Entre el sitio activo del tejido y la percepción del daño se produce una serie de eventos neurofisiológicos que se denominan nocicepción y que comprende cuatro procesos fisiológicos: la transducción, la transmisión, la modulación y la percepción (**Figura 5**).

Cuadro 1. Clasificación del dolor de acuerdo a su patogenia.

Tipo de dolor	Definición
Neuropático	Dolor producido por un estímulo directo en el sistema nervioso central (SNC) o por alguna lesión de las vías nerviosas periféricas, y se describe como punzante, quemante, acompañado de parestesias y disestesias, hiperalgesia, hiperestesia y alodinia
Nociceptivo	Tipo de dolor más frecuente y se divide en somático y visceral
Psicógeno	Dolor caracterizado por presentar una componente psicosocial importante, además de la necesidad de un incremento en las dosis de analgésicos con escasa eficacia
Inflamatorio	Dolor espontáneo que se presenta en respuesta a la inflamación y algún daño tisular, que permite la liberación de mediadores químicos que activan las terminales periféricas nociceptivas. Este dolor previene el contacto o el movimiento de la región afectada, al menos hasta que se restablece el tejido, favoreciendo así su recuperación y la disminución del daño ocasionado
Funcional	Este dolor se caracteriza por una hipersensibilidad que resulta de un proceso central alterado, sin daño aparente en los nervios y es debido a una sensibilidad o función anormal del SNC

1.3.1.1 Transducción.- Es el proceso mediante el cual los estímulos nocivos son convertidos en una actividad eléctrica a nivel de los receptores generando un potencial de acción denominado transducción. Esta etapa se lleva a cabo en el receptor del dolor, llamado nociceptor, formado por fibras nerviosas libres que se caracterizan por tener un umbral alto al estímulo, ya sea de calor, mecánico o de frío, debido a que estos receptores responden preferentemente a estímulos nocivos. Este tipo de receptores, no suelen adaptarse al estímulo; en cambio, tienden a sensibilizarse, es decir, disminuyen el umbral a medida que el estímulo nocivo persiste, lo que explica el fenómeno de hiperalgesia (Arbaiza, 2005).

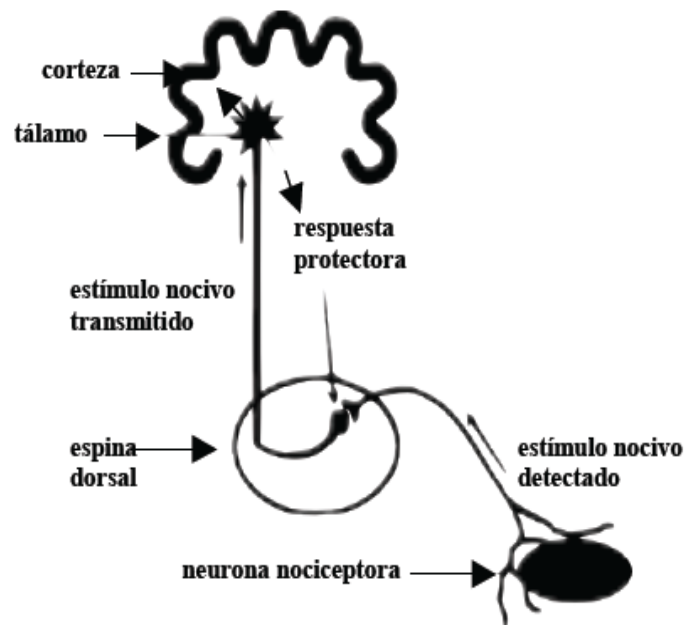


Figura 5. Proceso neurofisiológico de la nocicepción (Romera *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Transmisión.- Se define como la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas. A nivel de los nervios periféricos, las fibras no mielinizadas (fibras C) son tres veces más numerosas que las fibras de tipo mielinizadas (fibras A δ y A β) provenientes de las vísceras; las cuales ingresan por los ganglios de la asta dorsal de la médula espinal y terminan en la sustancia gris del asta dorsal; la cual está dividida en una serie de láminas que forman parte de una compleja red de circuitos que no sólo transmiten la información proveniente de la periferia, sino que esta señal también puede ser modulada durante y a lo largo de la médula espinal.

1.3.1.3 Modulación.- Para comprender la participación de las vías ascendentes y los mecanismos supraespinales en la modulación y experiencia del dolor, es importante distinguir dos componentes fundamentales:

a) Sensorial-discriminativo: que participa en la percepción y detección del estímulo nocivo *per se*, registrando la intensidad, localización, duración, patrón de temporalidad y calidad del mismo. En este componente están involucrados de manera importante los núcleos ventroposterior medial y lateral del tálamo.

b) Afectivo-cognoscitivo: que involucra a la relación entre el dolor y el estado de ánimo, la atención y memoria del dolor, la capacidad para soportarlo y su racionalización. En este componente participan de manera importante las cortezas insular, cingular y prefrontal, teniendo interconexiones con regiones límbicas como son la amígdala, sustancia gris periacueductal, núcleo parabraquial y núcleo lenticular (Walter, 2005).

Dependiendo del sitio del dolor, la duración, el tipo de estímulo nocivo y muchos otros factores, pueden existir canales múltiples de la información nociceptiva, los cuales convergen e interactúan a nivel supraespinal para dar una sensación global del dolor. La transmisión de impulso doloroso desde los nociceptores hasta los centros superiores no se realiza de forma pasiva, sino que va a ser modificada (modulada) en tres niveles distintos: periférico, medular y supramedular (Walter, 2005).

1.3.1.4 Percepción.- Es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor. Mediante el uso combinado de imágenes de tomografía por emisión de positrones y resonancia magnética en humanos se ha demostrado que la estimulación dolorosa ocasiona una activación significativa de las cortezas contralaterales del cíngulo en su porción anterior. Por todo lo anterior, se considera que las dos zonas de la corteza cerebral que están particularmente implicadas en el procesamiento de la información nociceptiva son: la corteza parietal somatosensorial, que estaría relacionada con el componente de discriminación sensorial del dolor, y la corteza del cíngulo, asociada al componente afectivo-emocional del dolor (Moreno y Prada, 2004).

1.4 Modelos para el estudio del dolor

La investigación básica y clínica con la finalidad de establecer los diferentes mecanismos de nocicepción utilizando modelos animales ha avanzado mucho en los últimos años (De la Gala, 1997; Ortega *et al.*, 2002; Cibeira, 2006). Básicamente, estos modelos deben de reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permitan el estudio de alternativas terapéuticas de uso en la clínica, o al menos, el mejor conocimiento de las mismas. Existe una gran variedad de modelos experimentales, los cuales difieren

principalmente en el tipo (mecánico, químico, eléctrico, térmico), duración (fásico o tónico) e intensidad (mediana o severa) del estímulo nocivo empleado, o bien, en el tipo de respuesta a cuantificar (reflejo o conducta organizada) para los diferentes tipos de estímulo (Benson, 1999). En la **Cuadro 2** se resumen los modelos animales más empleados para el estudio de dolor los cuales pueden dividirse en dos grupos principalmente. El primero implica la aplicación de estímulos nocivos de tipo mecánico y térmico en diferentes partes de la piel (dolor nociceptivo) (Bars *et al.*, 2001; Eaton, 2003). El segundo se basa en la administración local de agentes algésicos que causan nocicepción (por ejemplo, capsaicina, bradicinina, formalina, ácido acético, carragenina o ácido úrico) y que semejan el dolor de tipo inflamatorio.

Cuadro 2. Modelos experimentales para el estudio de la nocicepción.

Estímulo Mecánico	
Prueba	Descripción
Presión sobre la pata (Randall-Selito)	En este ensayo, una pieza cónica acabada en punta roma ejerce una presión que se va incrementando gradualmente sobre la región central de la pata posterior derecha del animal. El incremento de la presión se produce al incrementar el desplazamiento de un peso a través de una barra escalada en centímetros sobre la que realiza un efecto de palanca que se transmite a la extremidad del animal. El animal es sujetado durante toda la prueba de forma que puede mover libremente su extremidad. Cuando el animal experimenta dolor, como consecuencia del incremento de la presión, desarrolla una respuesta de retirada de la pata. Se cuantifica la presión máxima soportada por el animal antes de retirar la pata, expresándola en cm (1 cm = 30 g de fuerza)
Filamentos de Von Frey	Estos experimentos se realizan utilizando un anesthesiómetro electrónico que consiste en un transductor de presión conectado a un contador digital de fuerza en gramos. El contacto del transductor de presión con las extremidades inferiores de los animales se realiza por medio de una punta desechable de polipropileno adaptado a esta. Los animales (ratas o ratones) se colocan en cajas de acrílico cuya planta es una red de malla. El experimentador debe aplicar a través de las mallas una presión linealmente creciente en el centro de la planta del ratón o de la rata hasta que el animal de una respuesta que caracteriza por la sacudida de la extremidad

Cuadro 2. Modelos experimentales para el estudio de la nocicepción –*continuación*–

Estímulo Térmico	
Prueba	Descripción
Placa caliente (Hot Plate)	La prueba de la placa caliente, evalúa los reflejos motores en respuesta al contacto de las extremidades inferiores con una superficie caliente. Durante el experimento el animal está confinado en un cilindro de acrílico transparente desmontable y se miden los tiempos de latencia de repuesta de la primer lamida de pata, sacudida de las patas traseras y/o salto afuera del cilindro
Retiro de la cola (Tail Flick)	Esta prueba se realiza utilizando un analgasiómetro de tipo Tail-Flick, el cual consiste en un aparato que con una temperatura de 45°C y cuenta con cronómetro que se pone en marcha cuando se prende la fuente de calor y se apaga cuando se interrumpe la misma, provocado por el movimiento de la cola, dando el tiempo de duración que tarda el animal en retirar la cola del estímulo térmico
Estímulo Térmico	
Prueba	Descripción
Inmersión de la cola	El principio de esta prueba es el mismo que el de la prueba “Tail-Flick”, con la diferencia de que en esta se realiza la inmersión de la cola del animal en agua caliente a una determinada temperatura y midiendo el tiempo de reacción que presente el animal ante el estímulo
Estímulo Químico	
Prueba	Descripción
Estiramiento abdominal (writhing)	En estos experimentos los animales de estudio son sometidos a una administración intraperitoneal de un agente algésico que ocasiona una irritación en las membranas provocando un comportamiento muy específico en los animales que se caracteriza por contracciones abdominales, movimientos del cuerpo como un todo (particularmente de las patas traseras), torsión de los músculos dorso-abdominales y una reducción en la actividad motora e incoordinación motora. Por lo general, las medidas son la aparición por unidad de tiempo de cólicos abdominales, resultantes de la inyección del agente irritante
Administración intradérmica de Formalina	En este ensayo los animales se administran por vía subcutánea con una solución de formalina (1%) en el dorso de la pata derecha, posteriormente los animales son observados con la finalidad de cuantificar la conducta dolorosa, mediante el número de sacudidas de la pata administrada

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Aunque el presente trabajo se realizará de acuerdo a los lineamientos de la OMS, es factible formular la siguiente hipótesis de trabajo:

- El uso popular medicinal de la especie *Dysphania graveolens* para el tratamiento del dolor estomacal y de costado sugiere la presencia en la planta de principios analgésicos.

2.2 Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo consiste en establecer algunos parámetros de eficacia, inocuidad y calidad de la droga cruda de la especie *Dysphania graveolens*, con la finalidad de establecer su monografía tipo OMS y farmacopéica y así contribuir a su uso racional.

2.2.1 Objetivos Específicos

Para el cumplimiento del objetivo principal, se formularon los siguientes objetivos específicos:

- a) Determinar de manera preliminar la inocuidad de la especie *D. graveolens* mediante la evaluación de la toxicidad aguda, utilizando el método de Lorke.
- b) Establecer el potencial analgésico de las drogas crudas (extracto orgánico, infusión y aceite esencial) mediante las pruebas de nocicepción convencionales (placa caliente y estiramiento abdominal).

- c) Determinar la naturaleza y estructura molecular de los compuestos activos de *D. graveolens* presentes en los extractos activos y en el aceite esencial mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- d) Establecer los parámetros de identidad de las drogas crudas mediante el establecimiento de los compuestos marcadores y perfiles cromatográficos, así como de sus características anatómicas y morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas.
- e) Desarrollar y validar un método analítico apropiado para cuantificar los principios activos y/o compuestos marcadores presentes en el extracto acuoso de *D. graveolens* aplicando la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

3. Parte experimental

3.1 Evaluación de la inocuidad y eficacia preclínica

Todos los ensayos biológicos conducentes a establecer la eficacia preclínica de la especie medicinal *D. graveolens* se realizaron utilizando ratones machos de la cepa ICR (20–25 g) adaptados a las condiciones del bioterio con una temperatura de 21°C, humedad relativa entre 70–80%, ciclos de 12 h luz/oscuridad, y alimento/agua *ad libitum*. Previo a la realización de los experimentos, los animales tuvieron un periodo de adaptación y permanecieron con ocho o doce horas de ayuno dependiendo del ensayo farmacológico a realizar pero con libre acceso al agua.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) y a las recomendaciones realizadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para Pruebas Farmacológicas y Toxicológicas de la Facultad de Química, UNAM, coordinado por el Comité de Ética para el Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio, UNAM. Al término de los experimentos todos los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂.

Los diferentes tratamientos a evaluar (extractos orgánicos, esencias y/o compuestos puros) se suspendieron en una solución salina isotónica (NaCl, 0.9% p/v) que contenía Tween 80 (0.05%) como agente de suspensión.

3.1.1 Ensayos de inocuidad: Toxicidad aguda en ratones

La evaluación de la inocuidad del extracto orgánico, la infusión y el aceite esencial de *D. graveolens* se estableció de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke (1983). El experimento se desarrolló en dos fases independientes. En la primera, a doce animales divididos en grupos de tres ($n = 3$) se administraron vía oral con una dosis única de 10, 100 y 1000 mg/kg del preparado a evaluar y del vehículo. En la segunda fase, las dosis administradas fueron 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En cada fase experimental, los animales

se observaron durante 14 días. Al término del ensayo, todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical, para realizar una disección en el abdomen y así aislar a los órganos vitales (hígado, riñón, corazón y estómago). A continuación, se analizaron macroscópicamente los órganos aislados con la finalidad de poder observar algún daño o alteración morfológica. Los animales que fallecieron en el transcurso del experimento también fueron sujetos al mismo análisis *post-mortem*. La DL₅₀ (dosis que produce la mortalidad del 50% de los animales evaluados) se determinó mediante el cálculo de la media geométrica de las dosis ensayadas (Lorke, 1983).

3.1.2 Ensayos de eficacia: Evaluación del potencial antinociceptivo

El potencial antinociceptivo de la planta se estableció utilizando los modelos de placa caliente y de estiramiento abdominal, de acuerdo a la metodología descrita en la literatura utilizando como controles positivos a la morfina y a la dipirona (Ulku *et al.*, 2006; Déciga-Campos *et al.*, 2007).

3.1.2.1 Prueba de la placa caliente

La prueba se realizó sobre una placa caliente Panlab (Ugo Basile, Italia) con una temperatura constante de 55.5°C previa adaptación de los animales al entorno del experimento. Para ello, un día previo y momentos antes de iniciar el experimento, el conjunto animal-cilindro se colocó sobre la placa de calentamiento (apagada) durante 20 minutos. Posteriormente, se realizó la administración oral de tres dosis de los tratamientos a evaluar (31.6, 100 y 316 mg/kg), el vehículo y el control positivo (morfina 5 mg/kg, *i.p.*), a cinco grupos de ocho ratones ($n = 8$). Treinta minutos después de la administración de los tratamientos, se registró el periodo de latencia (tiempo transcurrido entre colocar el ratón en la placa y la aparición de la respuesta al estímulo térmico aplicado, *i.e.* lamida de las patas traseras, levantamiento de las patas traseras o salto fuera del cilindro), con un tiempo de corte de 30 segundos (Williamson *et al.*, 1996; Le Bars *et al.*, 2001).

3.1.2.2 Prueba de estiramiento abdominal

Para el experimento de estiramiento abdominal, 30 minutos previos a la realización del mismo, se administraron a cinco grupos de ratones ($n = 8$) por vía oral tres dosis de los diferentes tratamientos (31.6, 100 y 316 mg/kg), el vehículo y el control positivo (dipirona 100 mg/kg, *i.p.*). Una vez transcurrido el tiempo de absorción, todos los animales fueron administrados con una dosis única vía intraperitoneal de una solución agésica de ácido acético (0.6%, 0.1 mL/10 g de peso). Posteriormente, los animales se colocaron en cajas de plástico transparentes y se observaron durante 30 minutos, registrándose el número de contracciones abdominales, flexiones de las patas traseras y estiramientos acumulados en intervalos de cinco minutos (Le-Bars *et al.*, 2001).

3.1.2.3 Análisis estadístico

Los resultados experimentales de los ensayos farmacológicos de eficacia preclínica realizados en la presente investigación se encuentran expresados como el promedio de ocho determinaciones \pm error estándar (EEM) para cada tratamiento a las distintas dosis ensayadas. Los resultados de las evaluaciones del efecto antinociceptivo se expresan como: número de estiramientos *vs* tiempo (estiramiento abdominal) y/o área bajo la curva (ABC) *vs* tiempo (placa caliente). En todos los casos, los datos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANADEVA) con un valor de significancia de $*p < 0.05$, utilizando el programa estadístico Prisma Graph-Pad versión 4.0 seguido de una prueba *t* de Dunnett para encontrar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de prueba con respecto al grupo control ($*p < 0.05$).

3.2 Estudio fitoquímico

3.2.1 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de aluminio y/o de vidrio de 0.25 mm de

grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla de 3.5–7.0 mm ASTM), de diferentes dimensiones y empleando diversos sistemas de elución. Como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato de cerio amoniacal en H₂SO₄. Por otra parte, la cromatografía en columna abierta (CCA) se efectuó utilizando gel de sílice como adsorbente (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063–0.200 μm, malla de 70–230 mm ASTM) y diversas fases móviles (Ettre y Kalasz, 2001; Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Millipore Corp., Milford, MA) equipado con un detector UV-visible dual 2487; un inyector manual; una bomba cuaternaria 600 y un sistema de adquisición, procesamiento y manipulación de datos Empower versión 2 (Waters). La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC). Los análisis de identidad y de composición de *D. graveolens* se realizaron en una columna Hibar LiChrospher 100 RP C₁₈ (Merck), con un tamaño de partícula de 5 μm [250 mm de longitud × 4 mm de diámetro interno]. El volumen de inyección utilizado en todos los casos fue de 20 μL. La elución se realizó utilizando un gradiente y la fase móvil consistió en una mezcla binaria de H₂O (0.1% HCOOH; A) y CH₃CN (0.1% HCOOH; B). El gradiente de elución utilizado consistió en: 0 min, 87% B; 5 min, 60% B; 5–10min, 30% B; 10–45 min, 27% B (0.5 mL/min). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente y la longitud de onda (λ) empleada para de detección de los compuestos fue de 330 nm.

La cromatografía de gases (CG) se efectuó en un cromatógrafo marca Agilent 6890N (Agilent Technology, Palo Alto, California) acoplado a un detector de masas (LECO–TOF), utilizando una columna capilar DB–5 (5% difenil-95% dimetil polisiloxano), con un tamaño de partícula de 0.18 μm [10 m de longitud × 0.18 mm de diámetro interno]. Todos los análisis se realizaron utilizando un gradiente de temperatura desde 40°C hasta 260°C (4°C/min; 20 minutos) y finalmente hasta 340°C (4°C/min; 20 minutos). El helio (He) se utilizó como gas acarreador (1 mL/min). La identificación de los componentes presentes en las muestras analizadas se realizó mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología desarrollada por Kováts que describe el uso de una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₁₈) (Van Den Dool y Kratz, 1963). En algunos casos, se realizó la co-elución de las muestras con estándares disponibles comercialmente y se compararon los espectros

de masas generados con aquellos reportados en la base de datos especializada (NIST, Diciembre 2005).

Finalmente, la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) se efectuó con una fase sólida de poli-(dimetilsiloxano) (PDMS) con un tamaño de partícula de 100 μm (1 cm de longitud). Previo a cada análisis, la fase sólida se acondicionó en el CG a 250°C durante dos horas. El proceso de extracción en la fase gaseosa se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente, utilizando 500 mg del material vegetal (seco o fresco), 75 mg de NaCl y 5 mL de agua destilada. Transcurrido el período de extracción, la fase sólida se analizó mediante CG utilizando las mismas condiciones analíticas indicadas en el párrafo anterior. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.2.2 Caracterización de los productos naturales

La determinación de la estructura molecular de los productos naturales (activos y/o marcadores) se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN) y espectrometría de masas. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 MHz (^1H)/100 MHz (^{13}C) se registraron en un equipo Varian Unity Inova-500. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó CDCl_3 o metanol- d_4 como disolventes.

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EMIE) se adquirieron en un espectrómetro de masas JEOL JMSAX505HA por introducción directa a 70 eV y un barrido desde 33 a 700 unidades de masa-carga (m/z) por segundo. El registro de los espectros tanto de RMN como de EM se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

3.2.3 Material vegetal

Dysphania graveolens (Willd.) Mosyakin & Clemants (partes aéreas) se recolectó en el municipio de Ozumba, Estado de México, en el mes de agosto de 2010 (Lote DG; Bye & Linares 36470). Un segundo lote (DG-2) se adquirió en el local “El Abuelito”, mercado

Reforma, en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, en el mes de junio de 2011 (Bye & Linares 36704). Las muestras de referencia correspondientes se depositaron en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. Finalmente, la especie *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, utilizada en esta investigación con fines comparativos, se adquirió en el mercado de Xochimilco, Ciudad de México, en el mes de Abril de 2011, una muestra de herbario (FCME 131749) fue depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

3.2.4 Preparación de los extractos (orgánico y acuoso) y aceite esencial

El extracto orgánico de la planta se preparó a partir de las partes aéreas desecadas y molidas (3 kg) mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) a temperatura ambiente. Al cabo del proceso de extracción, el macerado se concentró *in vacuo* obteniéndose 145 g de un residuo verde oscuro.

La infusión de la especie se preparó utilizando 20 g de material vegetal seco y molido y 500 mL de agua destilada en ebullición. La infusión se dejó reposar durante 20 minutos, al cabo de este tiempo se filtró y se sometió a un proceso de reparto utilizando CH_2Cl_2 (3 × 250 mL). Las fases orgánicas resultantes se concentraron a presión reducida generando 60 mg de un residuo café oscuro. El proceso se repitió varias veces hasta obtener la cantidad necesaria para la evaluación farmacológica y el desarrollo y validación del método analítico.

Finalmente, los aceites esenciales de los epazotes se obtuvieron a partir de las partes aéreas (150 g) mediante un proceso de hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger durante 4 h. Al cabo de este tiempo, el hidrodestilado obtenido se sometió a un proceso de reparto con CH_2Cl_2 (3 × 500 mL). Después de evaporar el disolvente, se obtuvieron 0.16 ± 0.02 mg/g y 0.15 ± 0.01 mg/g de esencia de *D. graveolens* y *D. ambrosioides*, respectivamente. Las esencias se almacenaron a -4°C .

3.2.5 Estudio químico de *Dysphania graveolens*

3.2.5.1 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto orgánico íntegro (128 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (1.25 kg) y como fase móvil mezclas de hexano, CH₂Cl₂ y MeOH con incrementos de polaridad. Este proceso generó un conjunto de 17 fracciones primarias (**F**₁–**F**₁₇). La pinostrobrina (**1**, 2 g) cristalizó de manera espontánea como un sólido amarillo a partir de la fracción primaria **F**₆ [Hex–CH₂Cl₂ (6:4)]. La resolución de la fracción **F**₁₄ [Hex–CH₂Cl₂ (1:9)] mediante sucesivas CCFP [CH₂Cl₂–MeOH (9:1)] (**Esquema 1**) condujo al aislamiento de la pinocembrina (**2**, 4.5 mg). El compuesto **3** (27 mg) identificado como la crisina se aisló a partir de la fracción secundaria **F**_{15.2} obtenida del fraccionamiento de **F**₁₅ [CH₂Cl₂] utilizando una CCA sobre gel de sílice y mezclas de CH₂Cl₂–MeOH. Estos tres metabolitos fueron separados como los componentes activos y mayoritarios presentes en el extracto orgánico de *D. graveolens*.

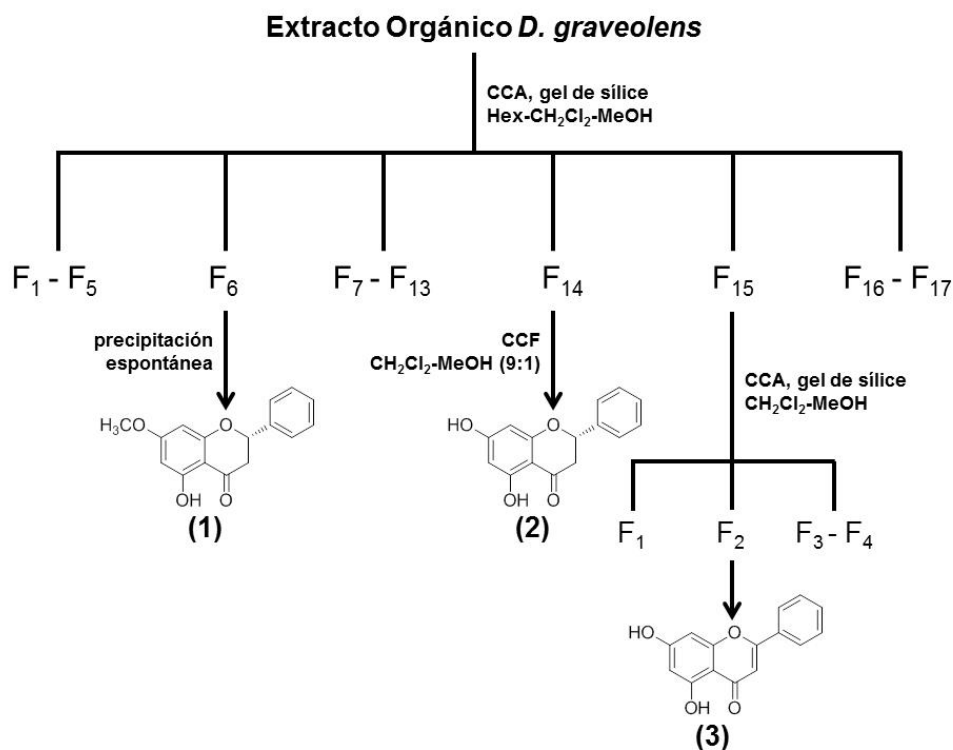
La caracterización de los compuestos **1–3** se realizó mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas (¹H-NMR y ¹³C-NMR) con aquellas de muestras auténticas previamente aisladas en nuestro laboratorio y las descritas en la literatura (Mata *et al.*, 1987; Ching *et al.*, 2007; Mouffok *et al.*, 2012).

pinostrobrina (1): C₁₆H₁₄O₄, p.f. 95–100°C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 12.02 (1H, *s*, OH–5), 7.54 (2H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H–2', H–6'), 7.42 (3H, *m*, H–3', H–4', H–5'), 6.07 (1H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H–6), 6.08 (1H, *d*, *J* = 5.1 Hz, H–8), 5.43 (1H, *dd*, *J* = 13.0, 3.0 Hz, H–2), 3.81 (3H, *s*, OCH₃–7), 3.09 (1H, *dd*, *J* = 17.0, 12.8 Hz, H–3), 2.79 (1H, *dd*, *J* = 17.2, 3.2 Hz, H–3). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): 195.8 (C–4), 168.0 (C–7), 164.1 (C–9), 162.8 (C–5), 138.4 (C–1'), 127.1 (C–2', C–6'), 129.1 (C–3', C–4', C–5'), 103.1 (C–10), 95.1 (C–6), 94.3 (C–8), 79.2 (C–2), 55.7 (OCH₃–7), 43.4 (C–3).

pinocembrina (2): C₁₅H₁₂O₄, p.f. 195–200°C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 12.04 (1H, *s*, 5-OH), 7.45 (2H, *d*, *J* = 7.8 Hz, H–2', H–6'), 7.41 (3H, *m*, H–3', H–4', H–5'), 6.00 (1H,

d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 5.99 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.44 (1H, *dd*, $J = 13.0, 3.1$ Hz, H-2), 3.09 (1H, *dd*, $J = 17.2, 12.8$ Hz, H-3), 2.85 (1H, *dd*, $J = 17.2, 2.8$ Hz, H-3). ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3): 195.8 (C-4), 168.5 (C-7), 164.4 (C-5), 163.1 (C-9), 138.2 (C-1'), 128.9 (C-3', C-4', C-5'), 126.1 (C-2', C-6'), 104.5 (C-10), 96.7 (C-8), 95.4 (C-6), 79.2 (C-2), 43.4 (C-3).

crisina (3): $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$; p.f. 280–282°C. ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 6.26 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-6), 6.52 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6.77 (1H, *s*, H-3), 7.59 (3H, *m*, H-3', H-4', H-5'), 8.01 (2H, *dd*, $J = 8.1; 1.8$ Hz, H-2', H-6'), 12.88 (1H, *s*, 5-OH); ^{13}C -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 95.2 (C-8), 100.3 (C-6), 105.6 (C-10), 106.1 (C-3), 127.5 (C-2', C-6'), 130.2 (C-3', C-4', C-5'), 132.6 (C-1'), 159.6 (C-9), 163.3 (C-5), 165.7 (C-2), 166.4 (C-7), 183.9 (C-4).



Esquema 1. Aislamiento de los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico total.

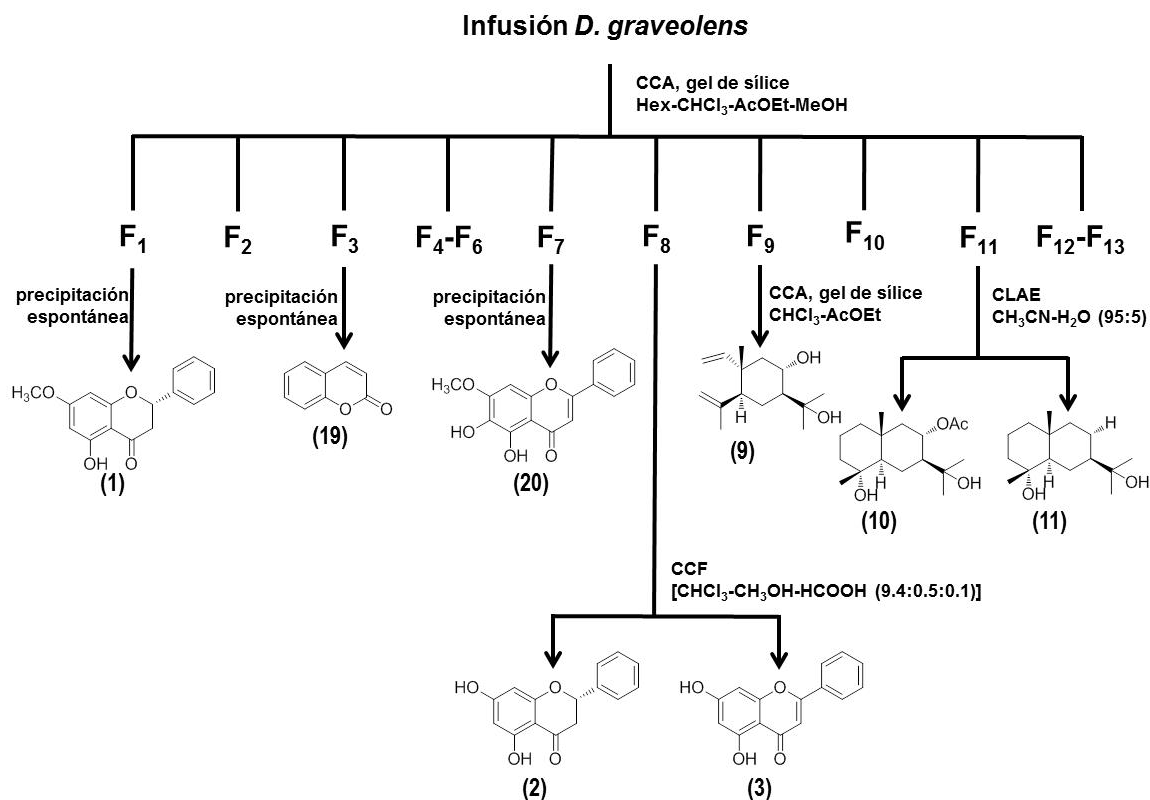
3.2.5.2 Fraccionamiento del extracto acuoso

Un gramo de la fracción de diclorometano obtenida mediante un proceso de reparto a partir de la infusión de la planta, se analizó utilizando una CCA sobre gel de sílice (50 g) y mezclas de polaridad creciente de hexano, hexano-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-AcOEt, AcOEt, y AcOEt-MeOH. Este proceso permitió la obtención de un conjunto de 13 fracciones secundarias (**F**₁-**F**₁₃; **Esquema 2**). A partir de la fracción primaria **F**₁ [hexano-CHCl₃ (6:4)], 56 mg de pinostrobin (**1**, p.f. 95–100°C) precipitaron de manera espontánea. La cumarina (**19**, 110 mg, p.f. 68–70°C) cristalizó a partir de la fracción **F**₃ [(hexano-CHCl₃ (5.5:4.5)]. La flavona negleteina (**20**, 8 mg) se obtuvo como un sólido cristalino con un p.f. de 232°C, a partir de la fracción primaria **F**₇. Sucesivas CCFP de **F**₈ [(CHCl₃-AcOEt (9.5:0.5)] utilizando como sistema de elución CHCl₃-MeOH-HCOOH (9.4:0.5:0.1) permitieron el aislamiento de 148 mg de la pinocembrina (**2**, F_R 0.52; p.f. 195–200°C) y 118 mg de la crisina (**3**, F_R 0.46; p.f. 280–282 °C). El fraccionamiento secundario de la fracción **F**₉, mediante una CCA y mezclas de CHCl₃ y AcOEt, condujo al aislamiento del (+)-8 α -hidroxielemol (**10**, 7 mg). La resolución de la fracción **F**₁₁ utilizando a la CLAE, en una columna Symmetry prep C₁₈ [7 μ m, 300 mm de longitud \times 7.8mm de diámetro interno] y un sistema isocrático de elución [CH₃CN-H₂O, 95:5] permitió el aislamiento y la caracterización del acetato del (+)-8 α - criptomeridiol (**11**, 8 mg) y del criptomeridiol (**12**, 8 mg).

3.2.6 Perfiles cromatográficos y ensayos de composición del extracto acuoso de *D. graveolens*

La infusión preparada conforme a lo descrito en el inciso **3.2.4** fue analizada mediante CLAE utilizando las condiciones de análisis establecidas (inciso **3.2.1**). Antes del análisis de la muestra se evaluó, en primer lugar, el ajuste del sistema cromatográfico para el método analítico. Para ello, se realizó el análisis de cinco réplicas de una solución de la matriz de trabajo con una concentración de 0.5 mg/mL. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos del coeficiente de variación (CV),

factor de capacidad (k'), resolución (R), factor de coleo (T) y número de platos teóricos (N).



Esquema 2. Aislamiento de los principales metabolitos secundarios presentes en la fracción de diclorometano de la infusión de *D. graveolens*.

3.2.6.1 Preparación de la matriz

La matriz de trabajo se preparó a partir de la fracción primaria de CH₂Cl₂ resultante del reparto de la infusión, disolviendo 10 mg de la fracción en un 1 mL de la mezcla binaria CH₂Cl₂-EtOH (2:8). Esta se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc (0.45 μm) de 13 mm de diámetro para su posterior análisis cromatográfico.

3.2.6.2 Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se preparó, por triplicado, una curva de calibración (concentración vs absorbancia) utilizando cinco niveles de concentración en un

intervalo entre 0.5–2.0 mg/mL para **1**, 0.25–1.25 mg/mL para **2** y 0.05–0.5 mg/mL para **3**. Para la cual, 5.0 mg de la referencia pinostrobin (1) se disolvieron en 1 mL de CH₂Cl₂–EtOH (2:8); 5.0 mg de la referencia pinocembrina (2) se disolvieron en 2.5 mL de CH₂Cl₂–EtOH (2:8) y 5.0 mg de la referencia crisina (3) se disolvieron en 5 mL de NaOH (0.1 N)–EtOH (1:4). Con los resultados obtenidos se graficó el área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico de la referencia a cuantificar (1–3) con respecto a la concentración en cada solución. El cálculo de la ordenada al origen (b), la pendiente de la recta (m), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b = 0$; $m \neq 0$; $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$.

3.2.6.3 Linealidad del método

La evaluación de la exactitud del método analítico se analizó, por triplicado, mediante la técnica de adición de una serie de soluciones de la referencia que contenían entre 0.75–1.5 mg/mL de **1**, 0.5–1.0 mg/mL de **2** y 0.125–0.375 mg/mL de **3** en un volumen constante de la matriz de trabajo. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal simple para determinar sus parámetros estadísticos ($b = 0$, $m \neq 0$, $r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$).

3.2.6.4 Exactitud

La exactitud del método para los compuestos **1–3** se evaluó utilizando la misma estrategia descrita en el inciso anterior. Los resultados obtenidos se expresaron en términos de la cantidad de analito recuperada (% de recobro). El método analítico es exacto si el porcentaje de recuperación se encuentra dentro del intervalo comprendido entre 98–102% y un valor de DER menor del 2%.

3.2.6.5 Precisión

La precisión del sistema o repetibilidad se estableció mediante el análisis de seis réplicas de una solución de referencia preparada como se describió en el inciso **4.3.7.2**. Los resultados obtenidos se expresan en términos de desviación estándar relativa (DER), este parámetro de calidad establece que el método es preciso si la DER calculada es menor del 2%.

Por otra parte, la reproducibilidad del método (precisión del método o precisión intermedia) se evaluó mediante el análisis por triplicado de seis réplicas de una solución de cada una de las referencias (**1–3**) adicionadas a la matriz de trabajo (0.2 mg/mL) preparadas en dos diferentes días. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante un ANADEVA utilizando el estadístico de Fischer (F) y se expresan en términos DER.

3.2.6.6 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima de analito, que puede ser detectada y cuantificada con precisión y exactitud aceptables. La evaluación de los límites de detección y de cuantificación se realizó mediante la construcción de una curva de calibración, por triplicado, de una serie de diferentes concentraciones de cada una de las referencias (**1–3**) y de la matriz de trabajo. Las diluciones contenían entre 0.5–2.0 mg/mL de **1**, 0.25–1.25 mg/mL de **2** y 0.05–0.5 mg/mL de **3**. Los parámetros estadísticos evaluados mediante un análisis de regresión lineal fueron: b , m , r y r^2 . Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

3.2.6.7 Cuantificación de la pinostrobrina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3)

Para la cuantificación de los principales marcadores presentes en el extracto acuoso de *D. graveolens*, se disolvieron 10 mg de la muestra a analizar en 1 mL de una mezcla binaria de CH₂Cl₂-EtOH (2:8). La pinostrobrina (**1**), la pinocembrina (**2**) y la crisina (**3**) presentes en cada muestra se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso **3.2.1**.

4. Resultados y discusión

La especie *Dysphania graveolens* fue seleccionada para la realización de este estudio con base en su extenso uso para tratar numerosas afecciones, en particular parasitosis por helmintos, en las prácticas médicas populares de México. La especie se comercializa ampliamente, fresca o seca, en los mercados tradicionales.

Los resultados que se generaron en la investigación se presentaran en tres secciones. En la primera, se abordará lo concerniente al estudio de algunos parámetros relacionados con la inocuidad y eficacia preclínica de la especie como agente antinociceptivo. En la segunda parte, se discutirán los resultados del estudio químico de la infusión. Por último, se describirán las pruebas de identidad y composición realizadas con la droga cruda.

4.1 Establecimiento de las pruebas de inocuidad y eficacia

4.1.1 Evaluación de la inocuidad

Las plantas son sin duda, los agentes promotores de toxicidad aguda más conocidos, y las mismas ocasionan un porcentaje importante de episodios tóxicos que son atendidos en centros sanitarios. Estos efectos adversos en muchos casos están relacionados con adulteraciones o asociados directamente a los componentes químicos de las plantas y sus interacciones con los alimentos (Mosihuzzaman y Choudhary, 2008). Por ello, es importante documentar y evaluar los posibles efectos tóxicos de las drogas con el fin de propiciar su uso adecuado (OMS, 2002).

Los estudios preliminares de toxicidad del epazote de zorrillo consistieron en la evaluación de la toxicidad aguda de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke (1983). La toxicidad aguda es la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos posterior a la administración de una dosis única; estos efectos pueden variar desde una mera irritación cutánea hasta la muerte. Por ser un parámetro muy evidente, se ha

considerado tradicionalmente la dosis letal media (DL_{50}) como el mejor indicativo de la capacidad tóxica de una sustancia (Repetto, 2009). La evaluación de la toxicidad por el método de Lorke ofrece una serie de ventajas, incluyendo el hecho de que se realiza en ratones y permite calcular de manera sencilla la dosis letal media (DL_{50}) utilizando un número pequeño de animales durante un período de tiempo relativamente corto; el tiempo que generalmente se espera para ver si se produce muerte por intoxicación aguda es de 24 horas, sin embargo, en ocasiones este efecto puede aparecer mucho más tarde, por lo que se debe de mantener la observación de los animales durante 14 días.

Los resultados de esta prueba indicaron que el extracto orgánico no presenta efectos tóxicos agudos para ratones ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), mientras que para la infusión y la esencia de la planta, que constituyen los preparados de mayor uso, la DL_{50} fue de 3807 mg/kg para ambos preparados y, por lo tanto, se pueden considerar seguros para roedores. Por otro lado, durante el periodo de evaluación de los preparados se realizaron observaciones conductuales durante 14 días, que permitieron descartar efectos neurotóxicos. De manera adicional, una vez terminado este periodo de experimentación, los animales fueron sacrificados con la finalidad de realizar un análisis macroscópico de los principales órganos (corazón, pulmón, riñón, bazo, hígado y estómago) y determinar si presentaban alguna anomalía en sus órganos. En todos los casos no se observó daño asociado a la administración de los preparados que sugirieran efectos tóxicos sistémicos. Estos resultados permiten concluir que la planta carece de efectos nocivos para ratones, los cuales sumados al uso de la planta por más de cien años permitirían inferir *a priori*, y de acuerdo a lo establecido por la OMS, que la planta no es tóxica (Lozoya y Lozoya, 1982). Sin embargo de ninguna manera estos resultados sustituyen a los estudios clínicos.

En la literatura científica el único reporte de toxicidad sobre esta especie fue descrito por Montoya-Cabrera y colaboradores (1996); de acuerdo a este informe, una niña de 2 años y 9 meses de edad, fue tratada con el aceite de epazote de zorrillo como vermífugo, en dos tomas de 20 mL cada una. La prescripción la realizó una curandera. Después de la segunda toma, la niña manifestó un coma profundo, convulsiones, midriasis, apnea, acidosis metabólica, choque neurogénico y, finalmente murió. El análisis por cromatografía en capa delgada del aceite administrado identificó al

ascaridol, principio activo de *Dysphania ambrosioides* altamente tóxico, como compuesto mayoritario en una concentración de 39 mg/mL (1.560 mg en los 40 mL ingeridos). Sin embargo, como se describirá en la sección **4.3.1**, el aceite esencial de *D. graveolens* no es rico en ascaridol (Owolabi *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2011; Álvarez-Ospina *et al.*, 2013), mientras que *D. ambrosioides* sí. Por lo tanto, al no indicarse la procedencia del aceite o de la planta que lo originó queda la duda si el producto utilizado fue realmente obtenido de *D. graveolens*.

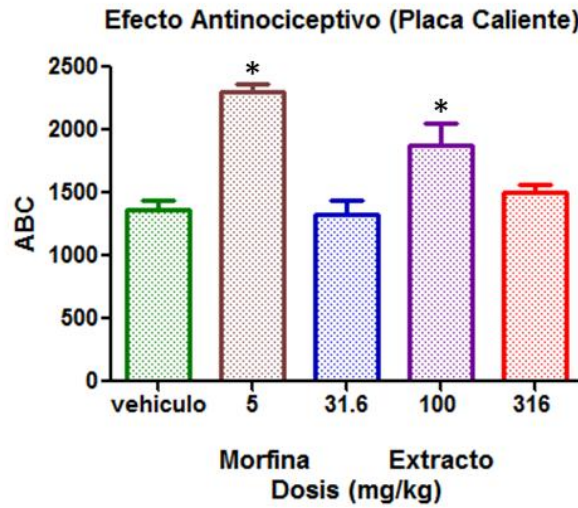
4.1.2 Potencial antinociceptivo

Como se indicó en la sección de antecedentes, no existen estudios que comprueben el uso de la planta para el tratamiento de padecimientos que incluyen dolor (dolor estomacal y de costado). Por lo tanto en la presente investigación se realizó la experimentación farmacológica básica para determinar el potencial antinociceptivo de la planta.

Para la realización del estudio se emplearon dos modelos farmacológicos bien documentados en ratones, el de la placa caliente y el de estiramiento abdominal. Ambos modelos son específicos (tanto del estímulo nociceptivo empleado como de la respuesta generada), sensibles para cuantificar la respuesta considerando rangos de intensidad, válidos, confiables (consistencia en los resultados obtenidos) y reproducibles (Le Bars *et al.*, 2001).

El ensayo de la placa caliente consiste en determinar la respuesta de origen supraespinal, es decir, este modelo es específico para sustancias con actividad sobre el sistema nervioso central. Como respuesta a la aplicación de un estímulo térmico a ratones se observa el levantamiento o lamedura de una o ambas patas traseras y/o un salto hacia afuera del sistema cilindro-placa caliente descrito en la parte experimental (Le Bars *et al.*, 2001; Déciga-Campos *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2008; Angeles-López *et al.*, 2010). El resultado de esta prueba indicó que la administración oral del extracto orgánico a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg no disminuyó de manera significativa el período de latencia al estímulo térmico y la mejor actividad se observó a la dosis de 100 mg/kg (**Figura 6a**).

a)



b)

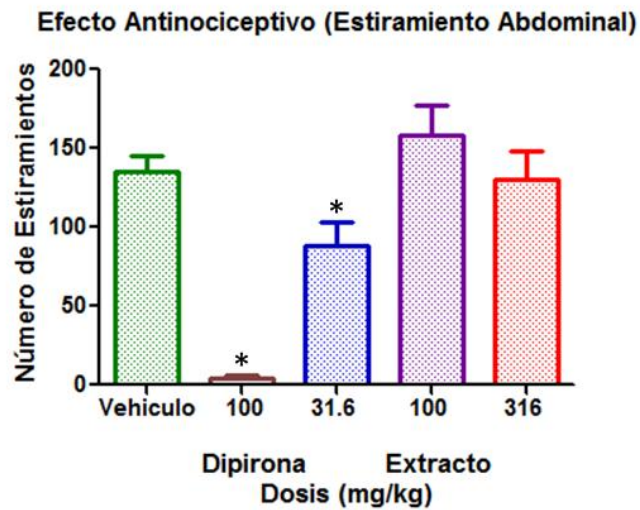
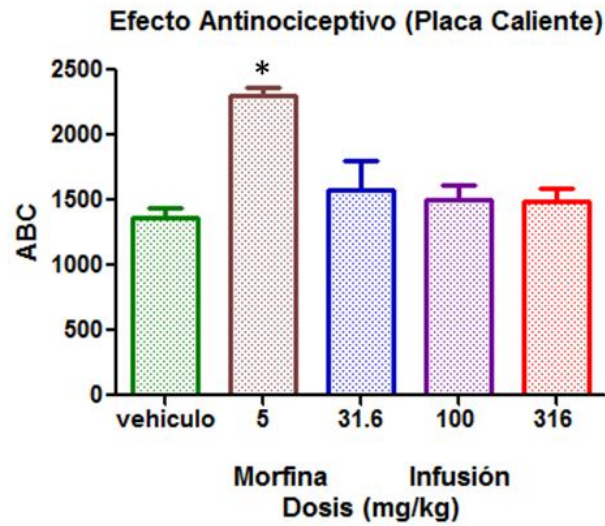


Figura 6. Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto orgánico de *D. graveolens* en los modelos de la **a)** placa caliente y **b)** del estiramiento abdominal. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVVA seguida de una prueba de *t*-Dunnet ($*p < 0.05$).

a)



b)

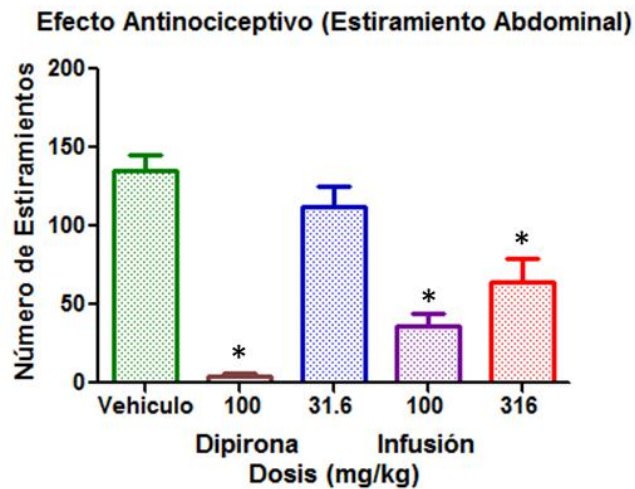
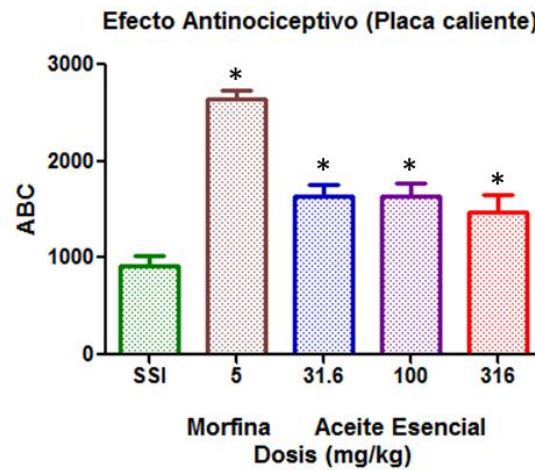


Figura 7. Evaluación del potencial antinociceptivo de la infusión de *D. graveolens* en los modelos de **a)** placa caliente y **b)** estiramiento abdominal. Cada barra representa el promedio \pm S.E.M. de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnet ($*p < 0.05$).

a)



b)

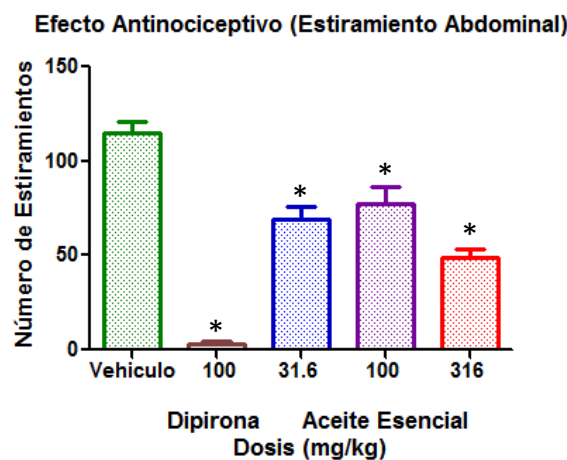


Figura 8. Evaluación del potencial antinociceptivo del aceite esencial de *D. graveolens* en los modelos de **a)** placa caliente y **b)** estiramiento abdominal. Cada barra representa el promedio \pm S.E.M. de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVVA seguida de una prueba de *t*-Dunnet ($*p < 0.05$).

La evaluación del extracto acuoso (**Figura 7a**) a las mismas dosis (*p.o.*) permitió establecer que ninguna de las dosis analizadas presentan un efecto importante con respecto al control ($*p < 0.05$). Por otra parte, el aceite esencial presentó un incremento de la latencia al estímulo térmico de manera no dependiente de la concentración en todas las dosis ensayadas (**Figura 8a**; 31.6–316 mg/kg). Este efecto no fue comparable con el de la morfina (5 mg/kg), conocido agente analgésico, utilizado como control positivo.

Con base en estos resultados se estableció que el aceite esencial genera una respuesta analgésica moderada mediada por receptores de nocicepción supraespinales. La acción no dosis dependiente de la esencia puede deberse a un fenómeno de hormesis, tan bien documentado en productos naturales o a una disminución en la absorción del aceite.

El ensayo de estiramiento abdominal es un modelo experimental, en el cual se simula un dolor de tipo visceral con estimulación lenta, progresiva y de más larga duración que la producida por estimulación térmica; presenta la ventaja de ser un método de sencilla implementación, tiempo de respuesta corto, económico y no requiere de un equipo especial o reactivos costosos. En esta prueba se evalúa el potencial de un preparado para compensar la irritación provocada por la administración de una solución de ácido acético (0.6% v/v) a los ratones de prueba. La solución algésica induce una reacción de tipo inflamatoria caracterizada por la presencia de contracciones de la musculatura abdominal, extensiones de las extremidades inferiores y el estiramiento del cuerpo (Le Bars *et al.*, 2001)

La administración oral del extracto orgánico del epazote en esta prueba provocó un efecto analgésico importante; el número estiramientos abdominales a la dosis de 31.6 mg/kg disminuyeron significativamente, sin embargo este efecto no fue dependiente de la dosis. Los resultados obtenidos de éstas evaluaciones se ilustran en la **Figura 6b**. En el caso de la infusión la mejor actividad antinociceptiva se observó con las dosis más altas evaluadas (**Figura 1b**). Con este preparado el mejor efecto se observó a la dosis de 100 mg/kg, siendo este menor que el desarrollado por la dipirona (100 mg/kg), utilizada como control positivo.

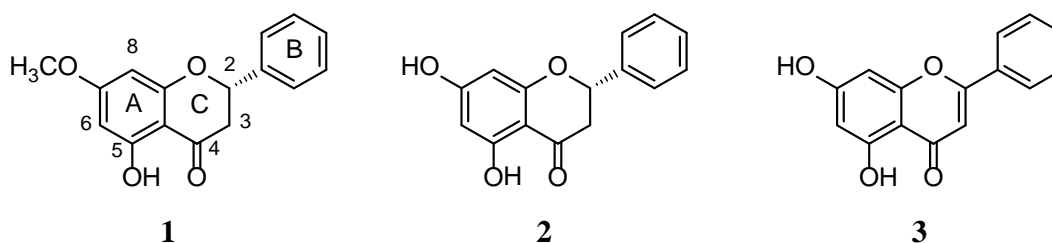
Finalmente, los resultados obtenidos para el aceite esencial indicaron que todas las dosis presentan un efecto antinociceptivo significativo ($*p < 0.05$) (**Figura 8b**). Este efecto no fue dependiente de la dosis.

La demostración del efecto antinociceptivo de los preparados del epazote de zorrillo, en particular contra el dolor inflamatorio, proporciona una base científica que apoya la eficacia de la planta para el tratamiento de afecciones dolorosas documentadas en diferentes estudios etnofarmacológicos o etnobotánicos (Martínez, 1959; Lozoya y Lozoya, 1982; Bye, 1986).

4.2 Obtención y caracterización de los principios activos presentes en la infusión y extracto orgánico para su uso como estándares para el desarrollo de las pruebas de control de calidad

4.2.1 Obtención de la pinostrobinina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3) a partir del extracto orgánico de la planta

La pinostrobinina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3), son los metabolitos mayoritarios y activos presentes en *D. graveolens*, estos productos han sido reportados como los principios antimicrobianos, espasmolíticos y vermífugos de la planta (Camacho *et al.*, 1991; Meckes *et al.*, 1998; Calzada *et al.*, 2003). En el presente estudio se obtuvieron en cantidades suficientes los tres flavonoides para su evaluación como agentes antinociceptivos potenciales y para su uso como referencias para el desarrollo y validación de un método analítico de utilidad para el control de calidad de la planta. De manera general, la elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas descritas en la literatura (Ching *et al.*, 2007; Mouffok *et al.*, 2012).



Los productos **1–3** se obtuvieron como sólidos amarillos, las fórmulas moleculares de los metabolitos se establecieron por EM modalidad de impacto electrónico (EMIE) como $C_{16}H_{14}O_4$, $C_{15}H_{12}O_4$ y $C_{15}H_{10}O_4$, respectivamente. Los patrones de fragmentación observados en los espectros registrados presentaron las rupturas diagnósticas que permitieron establecer que los metabolitos pertenecen a la categoría de las flavanonas (**1** y **2**) y flavonas (**3**). Los espectro de IR de los tres

compuestos presentan bandas asociadas a la presencia de anillos aromáticos (3000 y 1600 cm^{-1}), grupos fenólicos ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$) y grupos carbonilo de γ -pirona ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$).

Por otra parte, el análisis detallado de los espectros de RMN (**Figuras 9–14**) permitió establecer que los tres compuestos pertenecen a la categoría de los flavonoides (**Tabla 1**). Las características más importantes observadas en los espectros de ^1H -RMN para **1–3** se resumen a continuación:

1.- En la región aromática se aprecian un conjunto de señales para la presencia de dos anillos aromáticos asignables a siete protones en $\sim\delta_{\text{H}}$ 6.07–6.08 y $\sim\delta_{\text{H}}$ 7.42–7.54 que correlacionan en el espectro HSQC con las absorciones en $\sim\delta_{\text{C}}$ 95.1 (C-6), 94.3 (C-8), 127.1 (C-2', C-6') y 129.1 (C-3', C-4', C-5'). Además el espectro de ^{13}C -RMN presenta absorciones para seis carbonos cuaternarios [$\sim\delta_{\text{C}}$ 195.8 (C-4), 162.8 (C-5), 168.0 (C-7), 164.1 (C-9), 103.1 (C-10) y 138.4 (C-1')] en el caso de **3** se observan dos carbonos para una doble ligadura adicional, uno cuaternario en $\sim\delta_{\text{C}}$ 165.7 (C-2) y un metino en $\sim\delta_{\text{C}}$ 106.1 (C-3). Esta última señal correlaciona en el espectro HSQC con un metino en $\sim\delta_{\text{H}}$ 6.77. En el caso **1** y **2**, las señales para H-2 y H-3 se observan como un sistema ABX (**Tabla 1**). La parte AB del sistema se observa en $\sim\delta_{\text{H}}$ 2.85 (dd, $J=17.2$, 2.8 Hz) y 3.09 (dd, $J=17.2$, 12.8 Hz), en tanto que la porción X se aprecia en $\sim\delta_{\text{H}}$ 5.43 (dd, $J=13.0$, 3.1 Hz).

2.- Finalmente, se observan señales en el espectro de ^1H -RMN para un grupo hidroxilo quelatado ($\sim\delta_{\text{H}}$ 12.04), uno fenólico y en el caso de **1** se aprecia una señal para la presencia de un grupo metoxilo ($\sim\delta_{\text{H}}$ 3.81).

El análisis de los cuadros de conectividad en los espectros HMBC de los productos **1–3** permitieron corroborar las posiciones de los sustituyentes presentes en C-6 y C-8 aunado al valor de las constantes de acoplamiento ($J = 1.8 \text{ Hz}$) entre H-6 y H-8 congruente con su relación *meta* para los tres productos.

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN de los compuestos **1**, **2** y **3** (400 MHz y 100 MHz).

Posición	1		2		3	
	δ_C	δ_H (<i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (<i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (<i>J</i> en Hz)
2	79.2	5.43, dd (13.0, 3.0)	79.2	5.44, dd (13.0, 3.1)	165.7	
3	43.4	A 3.09, dd (17.0, 12.8) B 2.79, dd (17.2, 3.2)	43.4	A 3.09, dd (17.2, 12.8) B 2.85, dd (17.2, 2.8)	106.1	6.77, s
4	195.8		195.8		183.9	
5	162.8		164.4		163.3	
6	95.1	6.07, d (6.0)	95.4	5.99, d (1.8)	100.3	6.26, d (1,9)
7	168.0		168.5		166.4	
8	94.3	6.08, d (5.1)	96.7	6.00, d (1.8)	95.2	6.52, d (1,9)
9	164.1		163.1		159.6	
10	103.1		104.5		105.6	
1'	138.4		138.2		132.6	
2', 6'	127.1	7.54, d (8.8)	126.1	7.45, d (7.8)	127.5	8.01, dd (8.1; 1.8)
3', 4', 5'	129.1	7.42, m	128.9	7.41, m	130.2	7.59, m
OH-5		12.02, s		12.04, s		12.88, s
OH-7				5.49, s		
OMe-7	55.7	3.81, s				

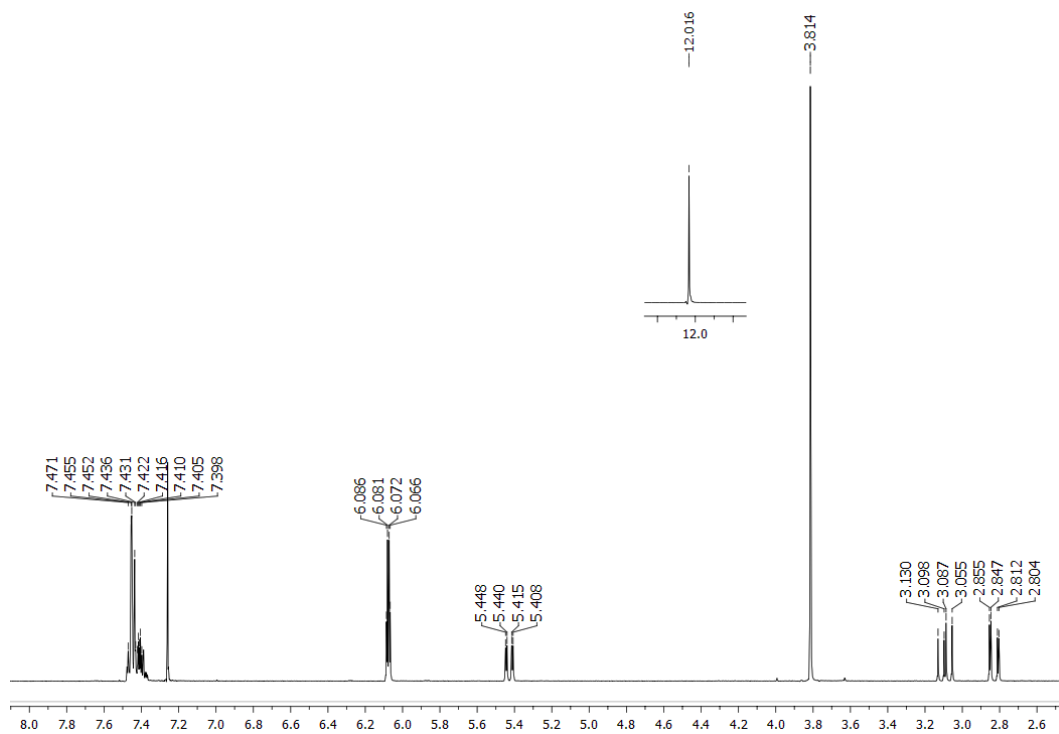


Figura 9. Espectro de ¹H-RMN de la pinostrobin (1) (400 MHz, CDCl₃).

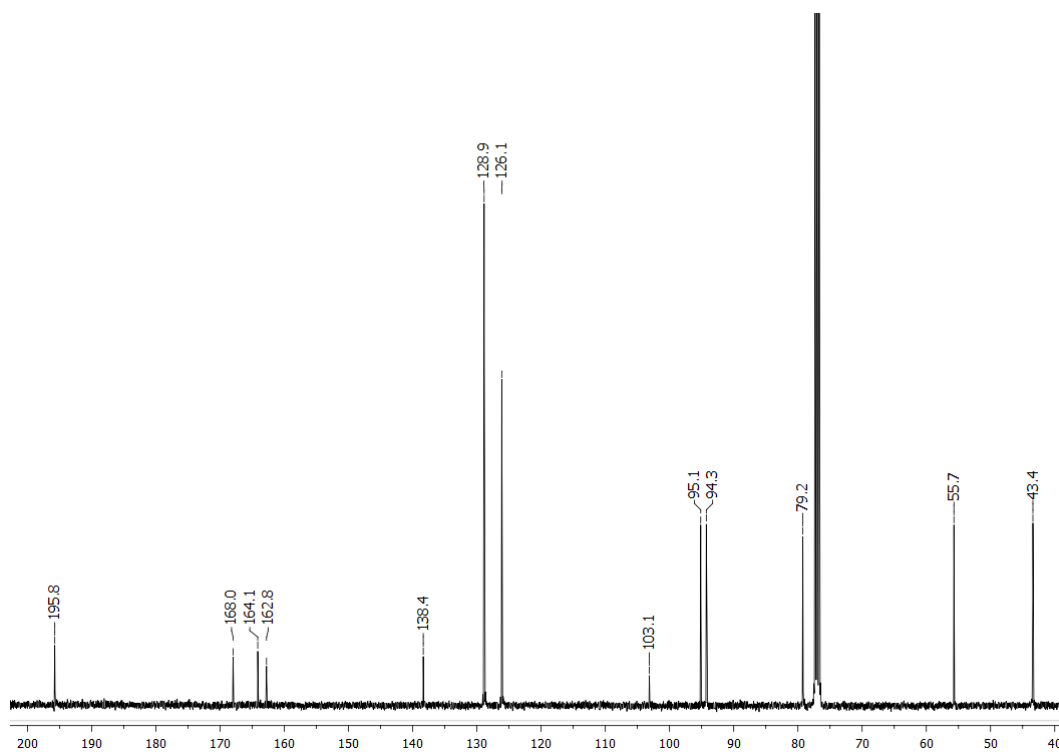


Figura 10. Espectro de ¹³C-RMN de la pinostrobin (1) (100 MHz, CDCl₃).

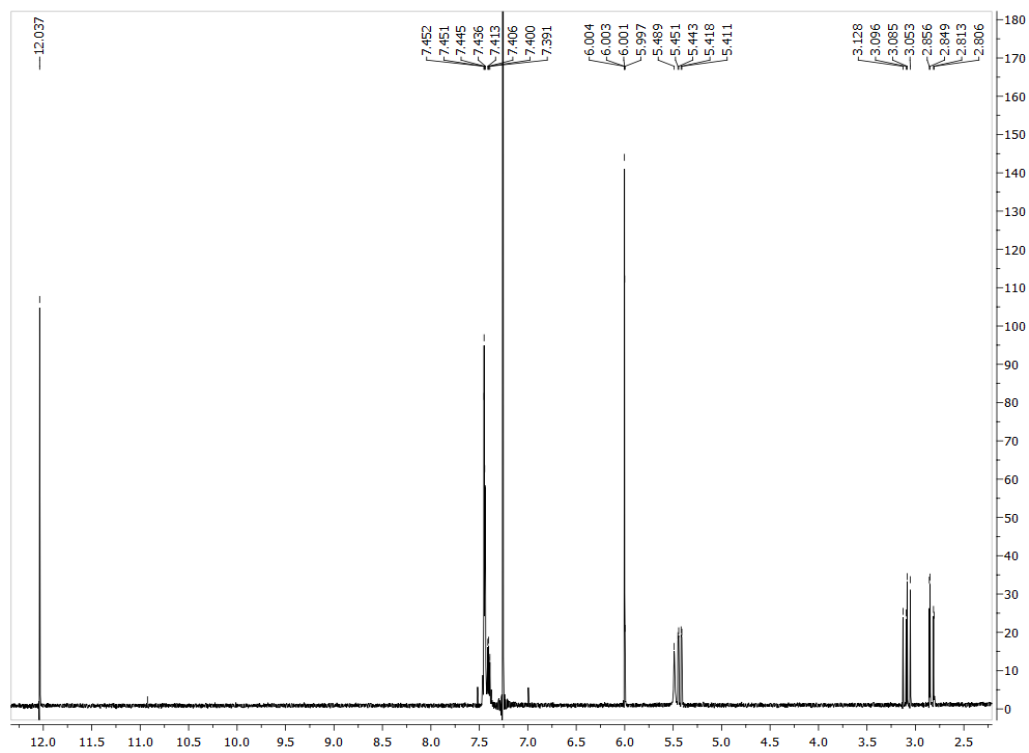


Figura 11. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de la pinocembrina (2) (400 MHz, CDCl_3).

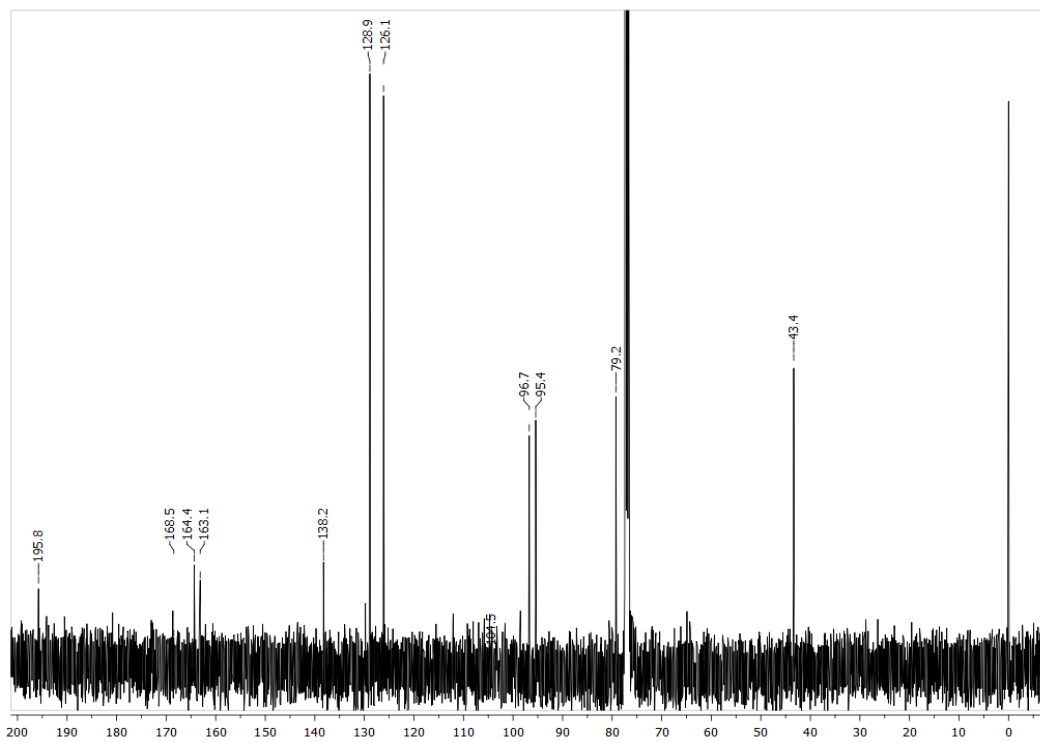


Figura 12. Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ de la pinocembrina (2) (100 MHz, CDCl_3).

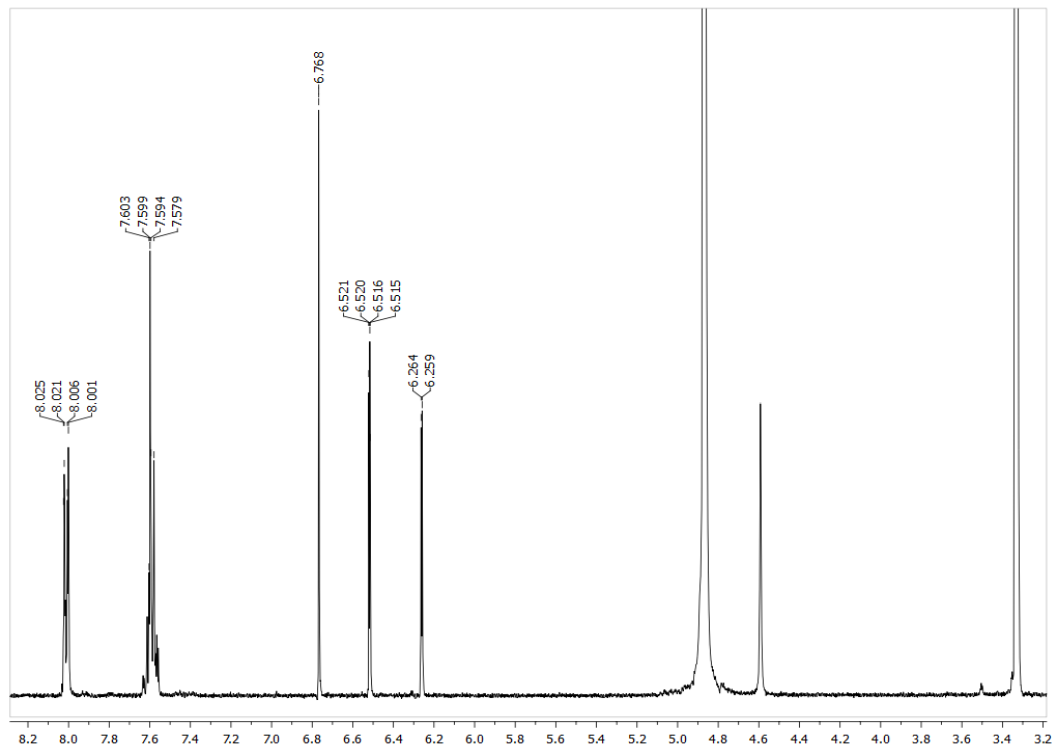


Figura 13. Espectro de ^1H -RMN de la crisina (**3**) (400 MHz, metanol- d_4).

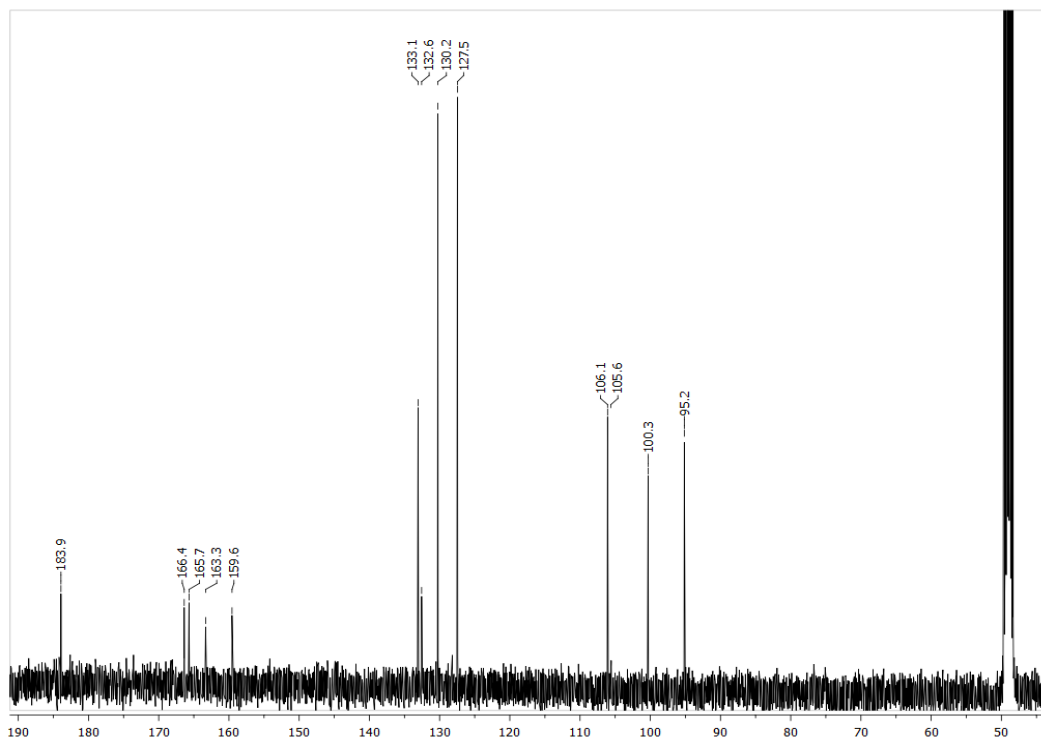


Figura 14. Espectro de ^{13}C -RMN de la crisina (**3**) (100 MHz, metanol- d_4).

4.2.2 Estudio químico de la infusión

La fracción de diclorometano obtenida a partir de la infusión de la planta (130 g) se sometió a una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió el aislamiento y la purificación de ocho metabolitos secundarios: cuatro flavonoides [pinostrobin (1), la pinocembrina (2), la crisina (3) y la negleteina (20)]; tres sesquiterpenoides [el (+)-8 α -hidroxielemol (10), del acetato del (+)-8 α -criptomeridiol (11) y el criptomeridiol (12)] y la cumarina (19). La elucidación estructural de los metabolitos se realizó mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las reportadas en la literatura (Mata *et al.*, 1987; Ching *et al.*, 2007; Mouffok *et al.*, 2012).

4.3 Establecimiento de las pruebas de identidad química y de composición de *D. graveolens* y *D. ambrosioides*

Para que una planta medicinal se considere eficaz y segura debe tener calidad, condición que se logra mediante los controles descritos en las farmacopeas, que son libros de referencia en cuanto a la descripción de los métodos analíticos. En ellas se asienta el concepto de calidad. Sin embargo, no todas las plantas están reconocidas en las farmacopeas; en tal situación es necesario desarrollar las monografías correspondientes. Este es el caso del epazote de zorrillo y que justificó la realización del presente proyecto de tesis.

En ese contexto, en el presente trabajo se desarrollaron los métodos analíticos necesarios para establecer la identidad química y la composición de la droga cruda objeto de estudio. Para ello se aplicaron las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y CLAE. Este conjunto de análisis se detallan en los siguientes párrafos.

Las pruebas de identidad, constituidas por los ensayos botánicos y químicos que permiten realizar la identificación del material vegetal y sus componentes, son de vital importancia y constituyen la herramienta adecuada para el control de calidad tanto de las drogas crudas como de las diferentes preparaciones elaboradas a partir de las mismas. Es

importante mencionar que el aseguramiento de la calidad de estas drogas es un proceso difícil y en la mayoría de los casos complejo.

4.3.1 Composición química del aceite esencial

Si bien existen numerosas definiciones, un aceite esencial o esencia, se define como una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles productos del metabolismo secundario de las plantas.

La composición de los aceites esenciales de las especies objeto de estudio se estableció mediante CG-EM, esta técnica analítica se eligió debido a sus características de resolución, tiempo de análisis cortos y sensibilidad, lo que la hace idónea para la separación y análisis de compuestos volátiles, permitiendo la obtención de los perfiles cromatográficos adecuados para establecer la composición y los adulterantes o productos de degradación de las esencias (Villar del Fresno, 1999).

La identificación de los componentes presentes en los aceites esenciales de *D. graveolens* y de *D. ambrosioides*, incluida en este estudio con fines comparativos, se realizó mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología descrita por Kováts, utilizando una serie homologa de *n*-alcanos (C₈-C₂₀), la comparación de sus espectros de masas con muestras de estándares disponibles comercialmente y los disponibles en la base de datos del equipo (National Institute of Standards and Technology; NIST).

Los resultados de las esencias de ambas especies se resumen en la **Tabla 2**. Para la especie *D. graveolens* (DG), se identificaron 21 compuestos, que representan el 99% del contenido total de la esencia, encontrándose que el eucaliptol (42.9%), el *p*-cimeno (16.5%) y el α -terpineol (7.4%) son los componentes mayoritarios, en tanto que, en *D. ambrosioides* (DA) se identificaron al fitol (36.7%), al carvacrol (15.7%), al *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (10.3%), a la carvona (6.9%), a la piperitona (6.05%) y al ascaridol (6.05%), como los principales constituyentes (**Figuras 15–16**).

Los resultados obtenidos para *D. graveolens* contrastan con los descritos por Montoya-cabrera y colaboradores (1996), quienes describieron que el aceite de esta planta es rico en ascaridol y, por lo tanto, altamente tóxico. Por otra parte, la

composición de *D. ambrosioides* encontrada en el presente trabajo está en concordancia, con los resultados reportados para ejemplares de Cuba, España, Togo, India, Nigeria, Brasil y China, las cuales contienen altas concentraciones de ascaridol (Owolabi *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2011).

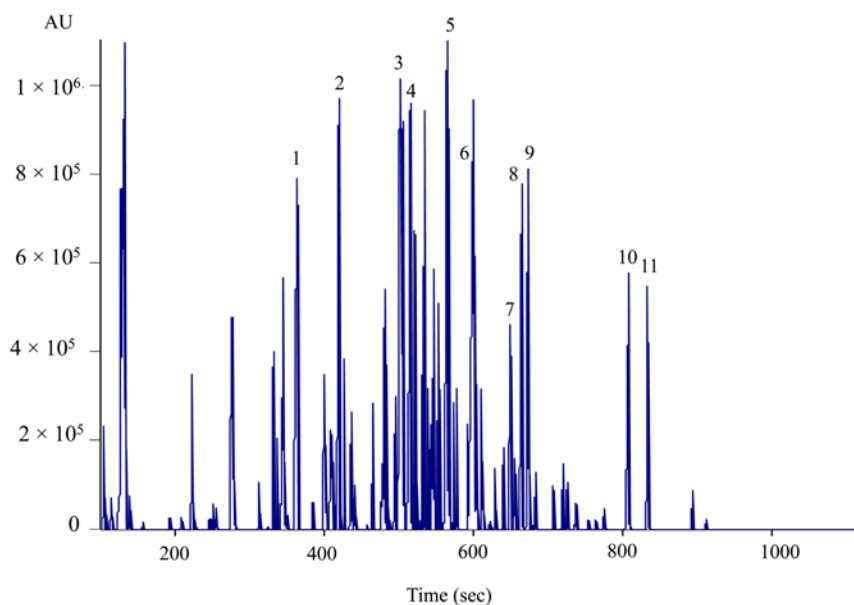


Figura 15. Cromatograma de gases del aceite esencial de *D. graveolens*. Picos: *p*-cimeno (1); eucaliptol (2); α -terpineol (3); 2- α -hidroxi-1,8-cineol (4); 6-oxocineol (5); carvacrol (6); cumarina (7); β -cariofileno (8); β -óxido de cariofileno (9); occidol (10); *n*-ácido hexadenoico (11).

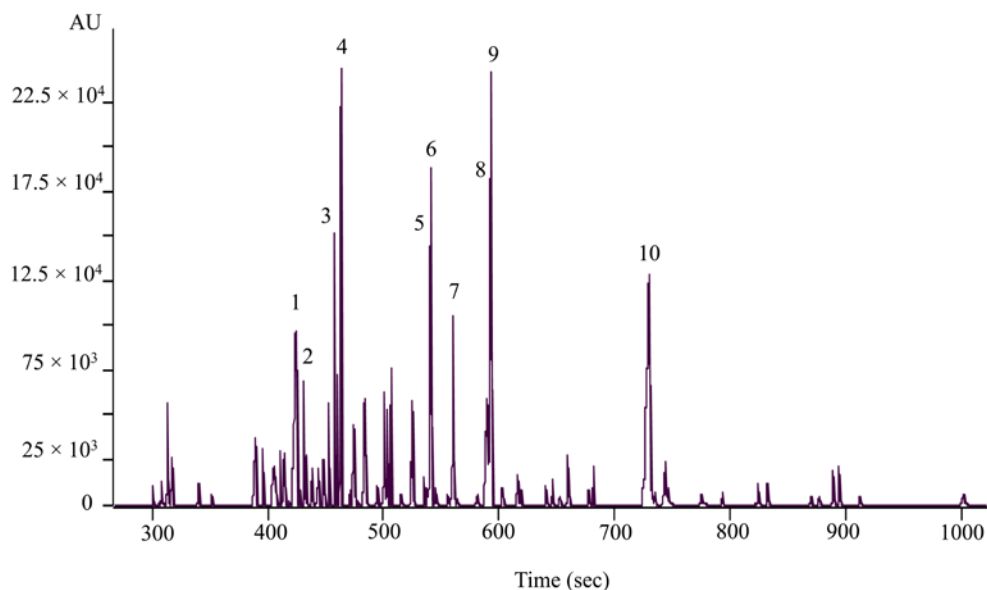


Figura 16. Cromatograma de gases del aceite esencial de *D. ambrosioides*. Picos: *p*-cimeno (1); eucaliptol (2); cimen-8-ol (3); *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (4); *cis*-ascaridol (5); carvona (6); carvacrol (7); *m*-menta-3(8)-ene (8); tiglato de geranilo (9); fitol (10).

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por CG–EM y HS–SPME en *D. graveolens* (DG) y *D. ambrosioides* (DA).

Compuesto ^a	Índice Kovats (I) ^b	HS-SPME		Aceite esencial		Método de identificación ^c
		(%)		(%)		
		DG ± SD	DA ± SD	DG ± SD	DA ± SD	
α -Tujeno	932	0.28 ± 0.01	-	0.24 ± 0.03	-	a,b,c
Camfeno	950	0.22 ± 0.01	-	-	-	a,b,c
<i>trans</i> -3-Caren-2-ol	976	-	-	-	0.30 ± 0.04	a,b,c
δ -3-Careno	1010	0.39 ± 0.01	-	0.93 ± 0.05	-	a,b,c
α -Terpineno	1013	0.38 ± 0.03	25.05 ± 1.02	-	0.57 ± 0.03	a,b,c
<i>p</i> -Cimeno	1015	84.85 ± 2.53	27.94 ± 1.52	16.51 ± 1.04	1.28 ± 0.03	a,b,c
Eucaliptol	1024	11.26 ± 0.64	-	42.89 ± 2.06	1.36 ± 0.03	a,b,c
(+)-Limoneno	1025	-	17.35 ± 0.70	-	-	a,b,c
γ -Terpineno	1051	0.86 ± 0.06	1.15 ± 0.08	-	-	a,b,c
<i>p</i> -Cimeneno	1075	-	-	-	0.08 ± 0.01	a,b,c
α -Terpinoleno	1082	0.01 ± 0.00	-	-	-	a,b,c
Crisantenona	1110	-	3.39 ± 0.45	-	-	a,b,c
<i>trans-p</i> -Menta-2-en-1-ol	1123	-	-	0.66 ± 0.05	-	a,b,c
<i>cis</i> - Óxido de limoneno	1126	-	1.00 ± 0.15	-	-	a,b,c
β -Terpineol	1137	-	-	1.51 ± 0.15	-	a,b,c
Terpinen-4-ol	1164	0.15 ± 0.01	-	3.35 ± 0.45	-	a,b,c
Cimen-8-ol	1169	-	-	-	1.87 ± 0.15	a,b,c
α -Terpineol	1176	0.72 ± 0.04	-	7.38 ± 0.40	-	a,b,c
<i>trans-p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	1176	-	-	-	10.31 ± 0.51	a,b,c
2- α -Hidroxi-1,8-cineol	1196	0.33 ± 0.04	-	4.58 ± 0.32	-	a,b,c
<i>cis</i> -Ascaridol	1206	-	21.60 ± 1.50	-	6.05 ± 0.31	a,b,c

(-): Compuesto no detectado. ^aCompuestos enlistados en orden de elución. ^bÍndice de retención determinados en una columna capilar DB-5.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por CG-EM y HS-SPME en *D. graveolens* (DG) y *D. ambrosioides* (DA).
-continuación-

Compuesto ^a	Índice Kovats (I) ^b	HS-SPME		Aceite esencial		Método de identificación ^c
		(%)		(%)		
		DG ± SD	DA ± SD	DG ± SD	DA ± SD	
<i>cis</i> -Carveol	1210	-	-	-	0.91 ± 0.06	a,b,c
Carvona	1214	-	-	-	6.92 ± 0.10	a,b,c
Timol metil éter	1215	0.23 ± 0.01	-	-	-	a,b,c
6-Oxocineol	1217	-	-	2.36 ± 0.20	-	a,b,c
Piperitona	1226	-	-	-	6.05 ± 0.31	a,b,c
Isoteaspirano	1263	-	-	0.10 ± 0.01	-	a,b,c
Timol	1267	-	-	-	0.39 ± 0.03	a,b,c
Limonen-10-ol	1272	-	-	-	2.90 ± 0.20	a,b,c
Carvacrol	1278	-	2.51 ± 0.40	1.65 ± 0.04	15.72 ± 0.46	a,b,c
Cumarina	1392	-	-	2.78 ± 0.25	-	a,b,c
Butirato de 2-feniletilo	1412	-	-	0.33 ± 0.05	-	a,b,c
β-Cariofileno	1421	0.32 ± 0.01	-	1.60 ± 0.26	-	a,b,c
γ-Elemeno	1429	-	-	0.39 ± 0.05	-	a,b,c
<i>m</i> -Menta-3(8)-ene	1445	-	-	-	1.20 ± 0.15	a,b,c
β-Epóxido de ionona	1460	-	-	-	0.95 ± 0.20	a,b,c
α-Cariofileno	1468	-	-	0.39 ± 0.05	-	a,b,c
β-Ionona	1468	-	-	-	0.75 ± 0.15	a,b,c
β-Óxido de Cariofileno	1546	-	-	4.78 ± 0.25	-	a,b,c
Tiglato de geranilo	1670	-	-	-	4.85 ± 0.43	a,b,c

(-): Compuesto no detectado. ^aCompuestos enlistados en orden de elución. ^bÍndice de retención determinados en una columna capilar DB-5.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por CG–EM y HS–SPME en *D. graveolens* (DG) y *D. ambrosioides* (DA).
-continuación-

Compuesto ^a	Índice Kovats (I) ^b	HS-SPME		Aceite esencial		Método de identificación ^c
		(%)		(%)		
		DG ± SD	DA ± SD	DG ± SD	DA ± SD	
6,10,14- Trimetilpentade- can-2-ona	1817	-	-	0.36 ± 0.08	0.87 ± 0.21	a,b,c
Occidol	1824	-	-	3.95 ± 0.37	-	a,b,c
<i>n</i> - Ácido hexadecanoico	1951	-	-	3.26 ± 0.22	-	a,b,c
Fitol	2114	-	-	-	36.66 ± 2.36	a,b,c

(-): Compuesto no detectado. ^aCompuestos enlistados en orden de elución. ^bÍndice de retención determinados en una columna capilar DB-5.

4.3.2 Análisis de los componentes volátiles

El estudio de los componentes volátiles presentes en ambas especies, se realizó también mediante un análisis de microextracción en fase sólida en una fase gaseosa (HS-SPME). La HS–SPME es una técnica analítica versátil introducida en los años 90, que no requiere de grandes cantidades de muestra y que no emplea disolventes orgánicos durante la extracción y permitiendo el análisis de los compuestos volátiles de menor polaridad presentes en las drogas crudas. El principio fisicoquímico de esta técnica se basa en la extracción de los analitos de la muestra utilizando una fase sólida compuesta por una fibra de sílice fundida recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos de naturaleza polimérica, seguida de la desorción de los analitos en el vaporizador de un CG. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla dentro de la aguja de una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y, al mismo tiempo, la protección de la microfibra. Los análisis por SPME se realizaron utilizando tres diferentes tipos de fases sólidas: carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), carboxeno/divinilbenceno/ polidimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS) y polidimetilsiloxano (PDMS).

Los mejores perfiles cromatográficos se obtuvieron con la fase sólida poco polar de PDMS, esta fibra tiene la particularidad de soportar altas temperaturas, así como extraer compuestos de mayor polaridad previa optimización de las condiciones de extracción. Este análisis (**Tabla 2, Figura 17**) permitió identificar trece compuestos para la especie *D. graveolens* y ocho para *D. ambrosioides*. Los principales componentes volátiles identificados en ambas especies fueron monoterpenos (> 90%). Siendo el *p*-cimeno (84.8%) y el eucaliptol (11.3%) los metabolitos mayoritarios en *D. graveolens*, mientras que *D. ambrosioides* contiene α -terpineno (25.1%), *p*-cimeno (27.9%), (+)-limoneno (17.3%) y ascaridol (21.6%).

Las diferencias observadas en la composición química en los análisis por CG-EM para el aceite esencial y aquellos encontrados por SPME para ambas especies de epazote, podrán ser de utilidad en el desarrollo de las pruebas de control de calidad de ambas drogas crudas. Sin embargo, se debe de realizar un estudio sobre la variación geográfica y ontogénica para determinar las diferencias en la composición química y completar los análisis descritos.

4.3.3 Desarrollo de un método analítico por CLAE para la cuantificación simultánea de los flavonoides mayoritarios

Con la finalidad de completar las pruebas de identidad química del epazote, se procedió al establecimiento de los perfiles cromatográficos por CLAE. Esta técnica es un método general utilizado en el análisis de diversas matrices biológicas debido a que es una técnica relativamente sencilla y versátil, que permite analizar compuestos de diversa naturaleza química utilizando diversos sistemas de detección (detector en el ultravioleta, índice de refracción y detectores de fluorescencia).

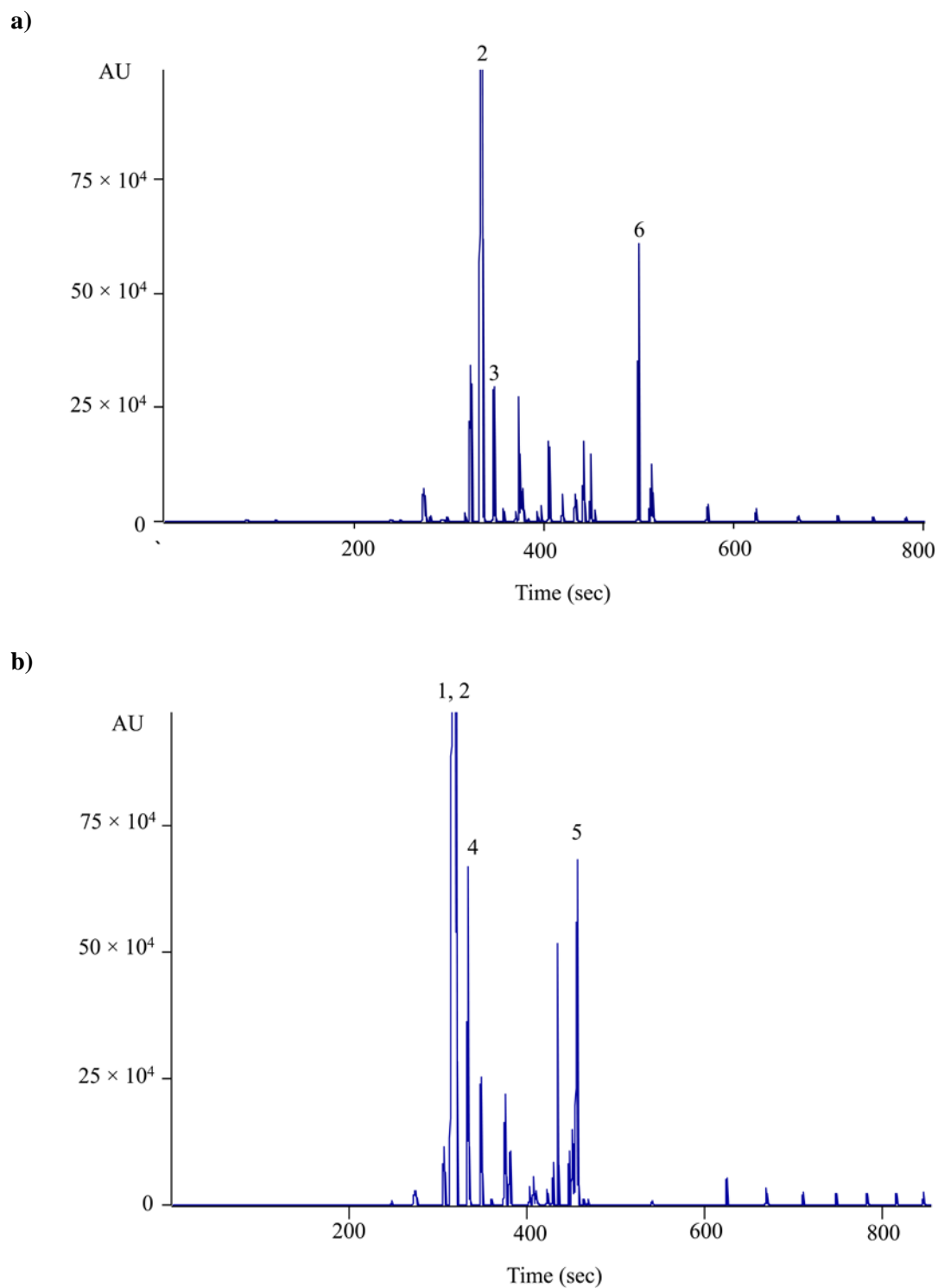


Figura 17. Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en (a) *D. graveolens* y (b) *D. ambrosioides* analizados por HS-SPME. Picos: α -terpineno (1); *p*-cimeno (2); eucaliptol (3); (+)-limoneno (4); *cis*-ascaridol (5); β -cariofileno (6).

El fundamento de la CLAE se basa en la separación gradual entre dos fases una estacionaria (generalmente columnas de acero empacadas con el adsorbente adecuado) y una fase móvil bombeada mediante un sistema de alta presión a través de la fase estacionaria. La muestra a analizar se introduce en pequeñas cantidades y sus componentes se separan diferencialmente en la fase estacionaria dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Existen dos tipos de cromatografía, la cromatografía en fase normal y la de fase reversa, la primera se caracteriza por presentar una fase estacionaria constituida por un soporte sólido adsorbente, generalmente gel de sílice o alúmina, aunque muchas veces se le pueden unir covalentemente a través de sus grupos silanoles, distintos grupos reactivos de alta polaridad como ciano, amino, dimetilamino, diamino, etc. que van a dar lugar a la separación de los componentes y la fase móvil está formada por mezclas de disolventes orgánicos poco polares (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, hexano), dando como resultado una separación en la cual los compuestos más polares de la muestra inyectada son más retenidos, por lo que menos polares se eluyen en primer lugar y salen antes de la columna (Morante *et al.*, 2007).

Por otra parte, la fase reversa se caracteriza por utilizar una fase móvil más polar que la fase estacionaria que es modificada químicamente mediante la eterificación de cadenas hidrocarbonadas de C₈–C₁₈. La fase móvil es comúnmente agua además de un componente de naturaleza poco polar miscible. En este sistema cromatográfico el tiempo de retención es mayor para las moléculas poco polar, mientras que las moléculas de carácter polar presentan tiempos de retención menores.

Los perfiles cromatográficos desarrollados para la fracción de diclorometano de la infusión se obtuvieron mediante ensayo y error, utilizando diversas fases estacionarias Synergi Hydro-RP (250 mm x 4.60 mm, 4 µm) y Hibar Licrospher100 RP18 (250 mm x 4 mm, 5 µm), así como, diferentes mezclas binarias de elución MeOH–H₂O, ACN–H₂O algunos casos acidificadas con diferentes ácidos (ácido fosfórico, ácido acético, ácido tricloroacético y ácido fórmico). Siguiendo esta estrategia metodológica fue posible establecer el perfil cromatográfico que se ilustra en la **Figura 18**. Las condiciones óptimas para la separación fueron obtenidas en una fase reversa Hibar LiChrospher 100 RP C₁₈ con un volumen de inyección de 20 µL, utilizando un gradiente de elución que consistió en una mezcla binaria de H₂O (0.1% HCOOH; A) y CH₃CN (0.1% HCOOH;

B): 0 min, 87% B; 5 min, 60% B; 5–10min, 30% B; 10–45 min, 27% B (0.5 mL/min). Este procedimiento permitió identificar la presencia de la pinostrobrina (**1**), la pinocembrina (**2**) y la crisina (**3**), como los picos de los componentes mayoritarios presentes que representan el 5, 20 y 26%, respectivamente, del total del área cuantificada en el cromatograma. También se identificaron a la cumarina (**19**) y a la flavona negleteina (**20**) presentes en un 6% y 24%, respectivamente.

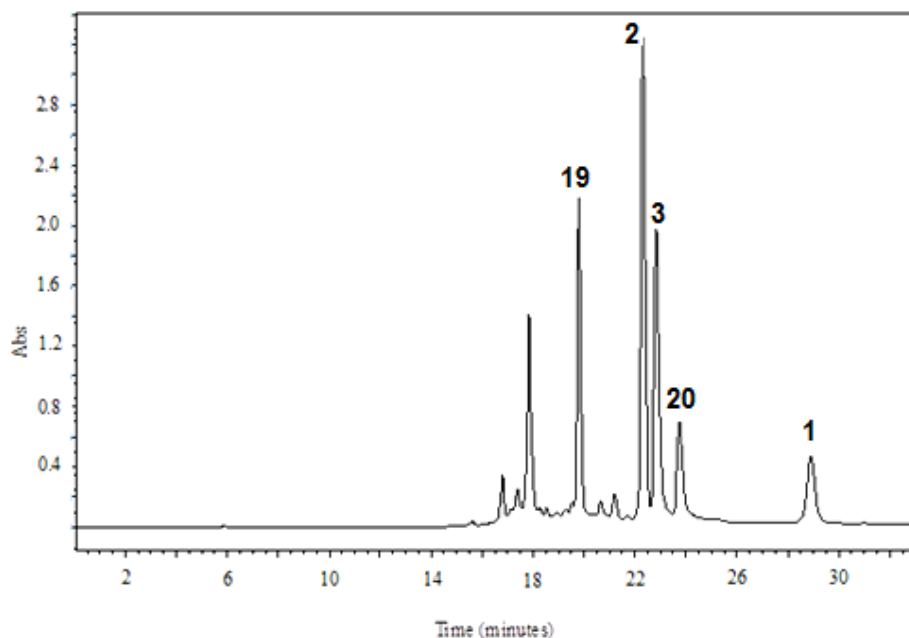


Figura 18. Cromatograma de líquidos obtenido a partir de la fracción de diclorometano de la infusión de *D. graveolens*. Fase móvil: gradiente ACN (A):H₂O (B) (0.1% HCOOH) [0 min, 87% B; 5-10 min, 30% B; 10-45 min, 27% B]; Flujo: 0.5 mL/min; Columna: Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm, 4.0 x 250 mm); Detección: 330 nm.

Una vez desarrollado el método cromatográfico, el siguiente paso fue realizar la validación del método. La validación de un método analítico se define como el conjunto de pasos para establecer la capacidad del mismo de cumplir con los parámetros que permitan garantizar la obtención de datos exactos, precisos y sobre todo confiables de un análisis.

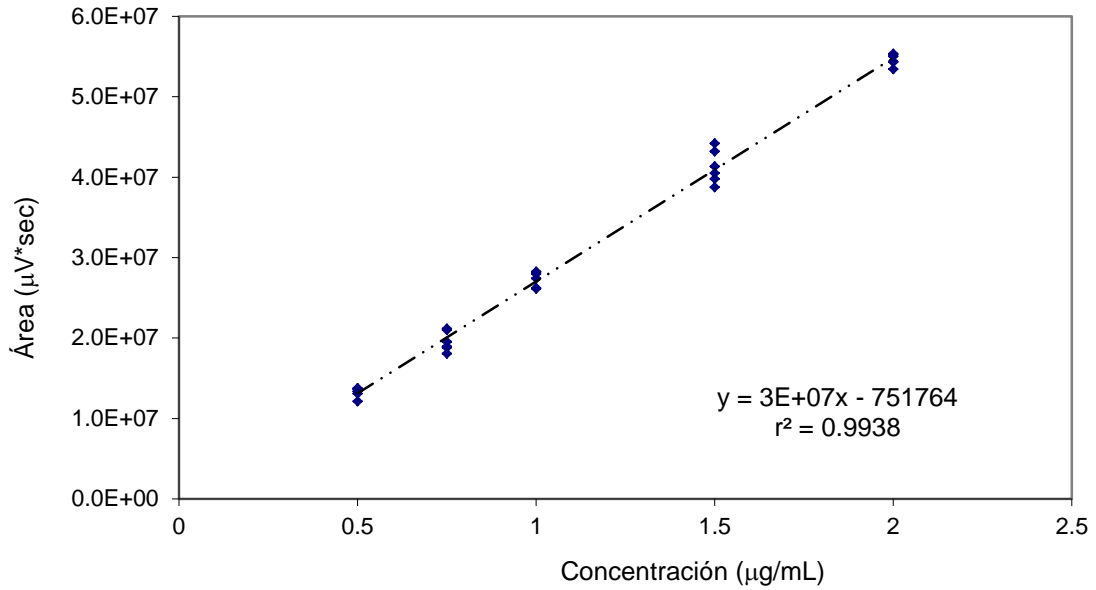
Los parámetros analíticos evaluados durante la validación del método analítico se realizaron con base en los criterios establecidos por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C (CNQFB, 2002) y las guías de la International Committee of Harmonization [ICH Q2(R1), 2005].

4.3.3.1 Linealidad del sistema

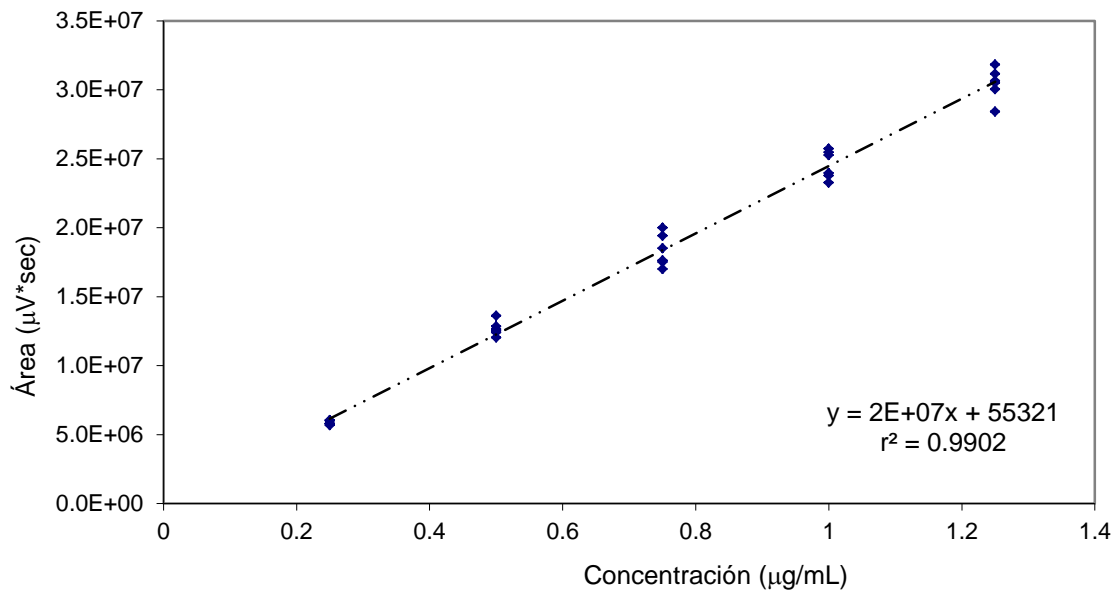
La linealidad del sistema se determinó construyendo diferentes curvas de calibración con un rango de concentraciones de trabajo entre 0.5–2.0 mg para **1**, 0.25–1.25 mg para **2** y 0.05–0.5 mg para **3** (**Gráficas 1–3**), realizando seis réplicas de cada concentración. Los resultados obtenidos de cada determinación se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resultados experimentales de las curvas de calibración para la pinostrobrina (**1**), la pinocembrina (**2**) y la crisina (**3**).

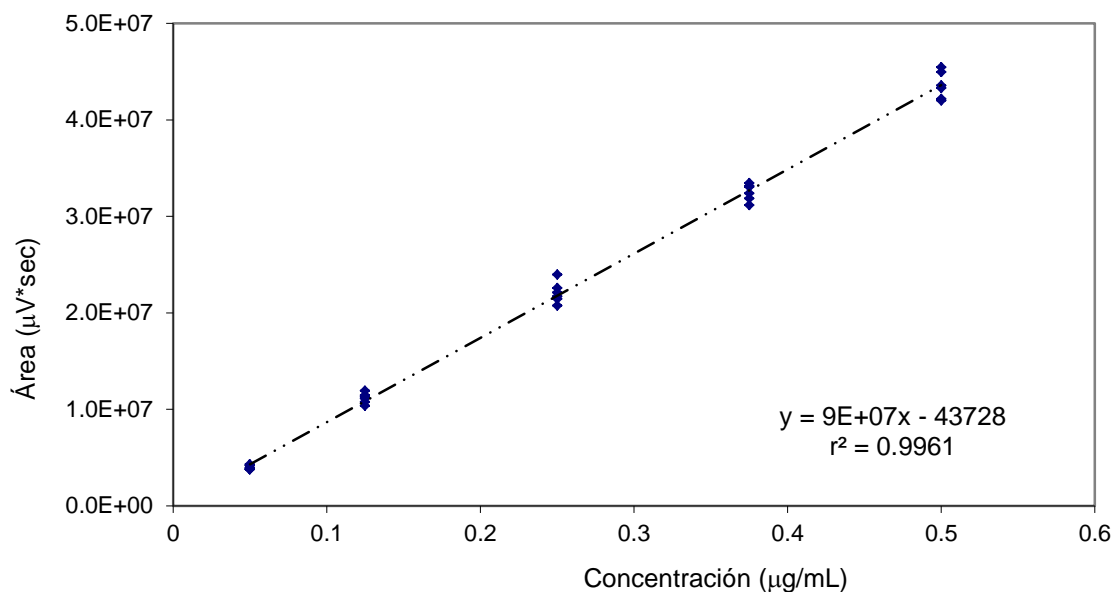
Réplica	1 (mg/mL)	ABC	2 (mg/mL)	ABC	3 (mg/mL)	ABC
1	2.00	53403487	1.25	31821722	0.50	42138431
2	2.00	55019568	1.25	30035705	0.50	45443040
3	2.00	55321633	1.25	30504256	0.50	43283694
4	2.00	55205933	1.25	28423125	0.50	44935776
5	2.00	54285029	1.25	30634148	0.50	41972596
6	2.00	54365960	1.25	31149068	0.50	43559516
1	1.50	38747990	1.00	25716136	0.375	31155878
2	1.50	41298343	1.00	23274776	0.375	33420137
3	1.50	44179395	1.00	25251574	0.375	33042412
4	1.50	43180815	1.00	23960608	0.375	33152091
5	1.50	39775125	1.00	23775813	0.375	31845714
6	1.50	40498264	1.00	25472222	0.375	32376978
1	1.00	26130957	0.75	19987586	0.25	21429864
2	1.00	27965730	0.75	16994126	0.25	22551263
3	1.00	28237016	0.75	19403098	0.25	23950156
4	1.00	28177847	0.75	18514768	0.25	22103275
5	1.00	26182493	0.75	17627479	0.25	21708907
6	1.00	27405313	0.75	17507946	0.25	20752755
1	0.75	21147464	0.50	13610757	0.125	10746853
2	0.75	18803797	0.50	12037897	0.125	11453868
3	0.75	18921284	0.50	12417366	0.125	11131830
4	0.75	18058980	0.50	12641443	0.125	11933751
5	0.75	19519058	0.50	12857334	0.125	11280449
6	0.75	20992913	0.50	12522020	0.125	10375548
1	0.50	13080428	0.25	6046751	0.05	4177257
2	0.50	12124703	0.25	5673899	0.05	3918381
3	0.50	13750922	0.25	5995034	0.05	3771888
4	0.50	13665122	0.25	5789890	0.05	4310110
5	0.50	13333151	0.25	5763455	0.05	3816628
6	0.50	13632351	0.25	5798267	0.05	3802138



Gráfica 1. Evaluación de la linealidad del sistema de la pinostrobrina (1).



Gráfica 2. Evaluación de la linealidad del sistema de la pinocembrina (2).



Gráfica 3. Evaluación de la linealidad del sistema de la crisina (3).

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados (m , b_0 y r^2) mediante el análisis estadístico permitieron estimar la ecuación de la curva de calibración para cada uno de los compuestos, así como los coeficientes de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resumen del análisis de la regresión lineal simple para la evaluación de la linealidad del sistema para la pinostrobrina (1), la pinocembrina (2) y la crisina (3).

Estadístico	1	2	3
Pendiente (b_1)	27796057.8	24424384.5	87288849.1
Ordenada al origen (b_0)	-751764.1	55320.6	-43727.9
Coefficiente de correlación (r)	0.9969	0.9951	0.9980
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9938	0.9902	0.9961
$IC(\beta_1)$	$2.7 \times 10^7 - 2.9 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7 - 2.5 \times 10^7$	$8.5 \times 10^7 - 8.9 \times 10^7$

De acuerdo con estos resultados se puede observar que las ecuaciones de la recta obtenidas para los tres compuestos cumplen los parámetros de armonización establecidos (ICH, 2005) y cumplen con los siguientes criterios estadísticos: $b_0 = 0$, $m \neq$

0, $r^2 \geq 0.98$ y el intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) no incluye el cero: con lo anterior se concluye que el modelo estadístico establecido mediante el análisis de regresión lineal, así como el intervalo de concentraciones elegido es adecuado.

4.3.3.2 Límites de detección y cuantificación

Las cantidades mínimas de los analitos **1–3** en las muestras analizadas que fueron detectadas por una única medición, con un nivel de confianza aceptable, fueron de 2.0, 1.2 y 0.4 μg , respectivamente, que se establecieron como los límites de detección (LD). Por otra parte, los límites de cuantificación (LC), definidos como la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables, fueron calculados como 6.4, 3.8 y 1.0 μg , respectivamente para **1–3**.

4.3.3.3 Linealidad del método y exactitud

Para evaluar la linealidad de un método se construyeron curvas de calibración para todos los analitos **1–3** con tres niveles de concentración correspondientes al 50, 100 y 150%, utilizando disoluciones de la matriz de trabajo enriquecidas con cada uno de los estándares. Los resultados obtenidos (**Tablas 5–7**) permitieron establecer que la capacidad del método para asegurar que la respuesta analítica (concentración recuperada) que se derivan del análisis es proporcional a la concentración del analito de interés dentro de un intervalo determinado.

Tabla 5. Resultados experimentales para establecer la linealidad y exactitud del método para la pinostrobinina (1).

Réplica	Nivel	Concentración Adicionada (mg/mL)	Área	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)
1	150	1.50	41961571	1.53	101.7
2	150	1.50	42229306	1.54	102.3
3	150	1.50	41845822	1.52	101.4
4	150	1.50	41159073	1.50	99.8
5	150	1.50	42000254	1.53	100.8
6	150	1.50	41886563	1.52	101.5
Promedio				1.51	100.57
Des. est.				0.01	0.99
CV				0.98	0.98
1	100	1.00	27408910	1.01	101.3
2	100	1.00	27044278	1.00	100.0
3	100	1.00	26940794	1.00	99.6
4	100	1.00	27534319	1.02	101.8
5	100	1.00	27067534	1.00	100.1
6	100	1.00	26853423	0.99	99.3
Promedio				1.00	100.35
DER				0.01	0.97
CV				0.97	0.97
1	50	0.75	19810787	0.74	98.6
2	50	0.75	20493415	0.76	101.9
3	50	0.75	19860521	0.74	98.9
4	50	0.75	20237247	0.76	100.7
5	50	0.75	20052881	0.75	99.8
6	50	0.75	20008585	0.75	99.6
Promedio				0.75	99.91
Des. Est.				0.01	1.22
CV				1.22	1.22

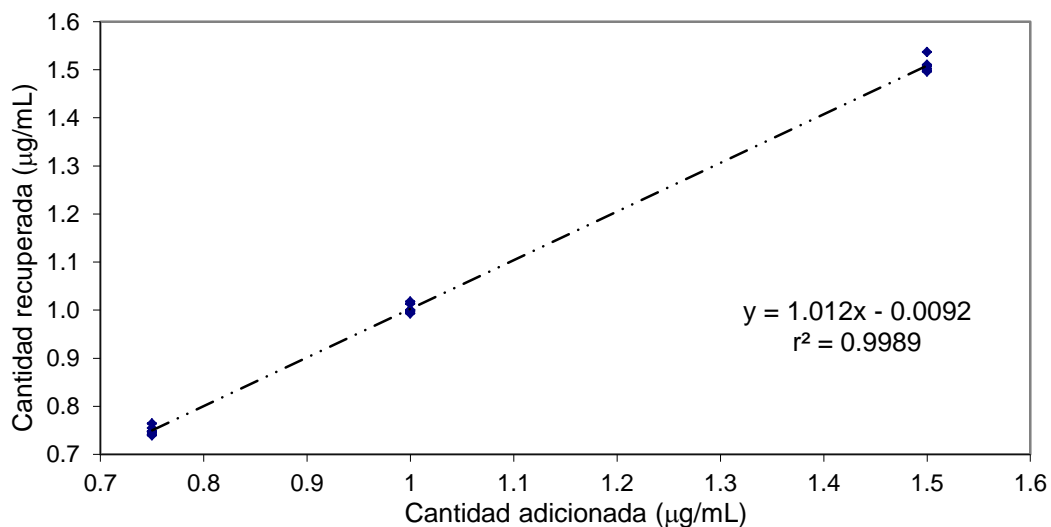
**Gráfica 4.** Evaluación de la linealidad del método de la pinostrobinina (1).

Tabla 6. Resultados experimentales para establecer la linealidad y exactitud del método para la pinocembrina (2).

Réplica	Nivel	Concentración Adicionada (mg/mL)	Área	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)
1	150	1.00	24552221	1.00	100.3
2	150	1.00	23791856	0.97	97.2
3	150	1.00	24260554	0.99	99.1
4	150	1.00	24402448	1.00	99.7
5	150	1.00	24062058	0.98	98.3
6	150	1.00	24378772	1.00	99.6
Promedio				0.99	99.02
Des. est.				0.01	1.12
CV				1.13	1.13
1	100	0.75	18111790	0.74	98.6
2	100	0.75	18347985	0.75	99.9
3	100	0.75	18389709	0.75	100.1
4	100	0.75	18142666	0.74	98.7
5	100	0.75	17982417	0.73	97.9
6	100	0.75	18227690	0.74	99.2
Promedio				0.74	99.05
DER				0.01	0.84
CV				0.84	0.84
1	50	0.50	18111790	0.50	99.8
2	50	0.50	18347985	0.50	100.2
3	50	0.50	18389709	0.50	100.0
4	50	0.50	18142666	0.50	99.6
5	50	0.50	17982417	0.50	99.4
6	50	0.50	18227690	0.49	98.1
Promedio				0.50	99.52
Des. Est.				0.00	0.76
CV				0.76	0.76

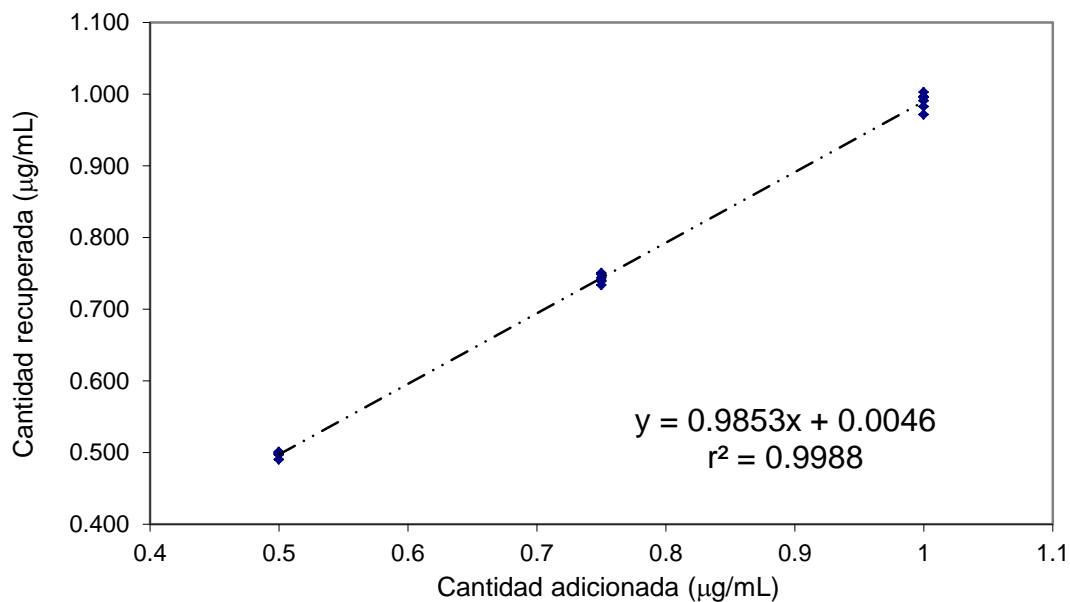
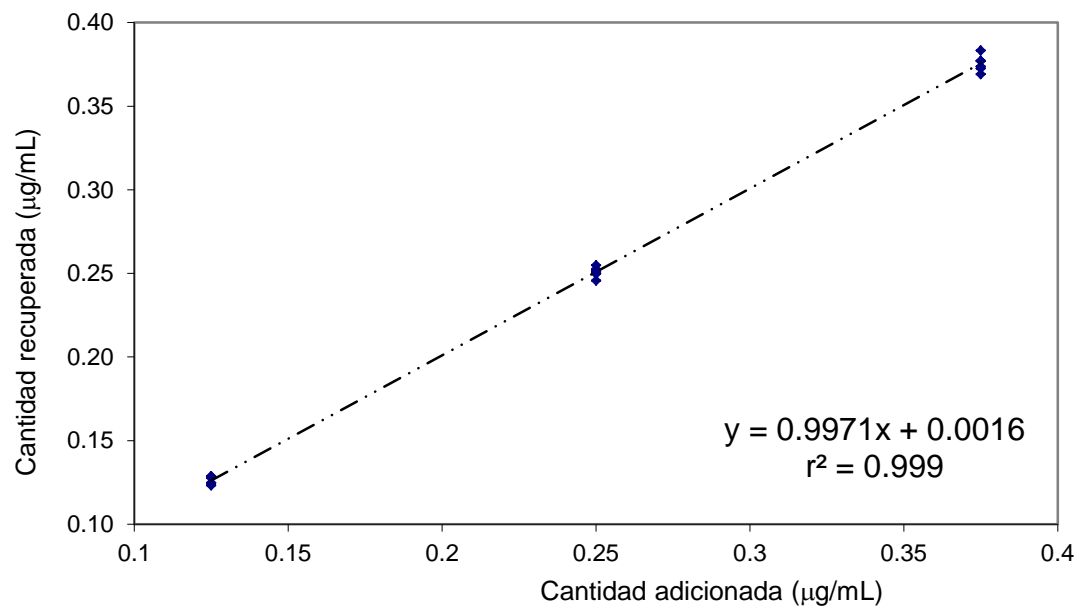
**Gráfica 5.** Evaluación de la linealidad del método de la pinocembrina (2).

Tabla 7. Resultados experimentales para establecer la linealidad y exactitud del método para la crisina (3).

Réplica	Nivel	Concentración Adicionada (mg/mL)	Área	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)
1	150	0.375	33420506	0.383	102.2
2	150	0.375	32188202	0.369	98.5
3	150	0.375	32582063	0.374	99.7
4	150	0.375	32860930	0.377	100.5
5	150	0.375	32883186	0.377	100.6
6	150	0.375	32483558	0.373	99.4
Promedio				0.376	100.14
Des. est.				0.005	1.29
CV				1.29	1.29
1	100	0.250	18111790	0.246	98.3
2	100	0.250	18347985	0.255	102.0
3	100	0.250	18389709	0.251	100.5
4	100	0.250	18142666	0.250	99.9
5	100	0.250	17982417	0.253	101.1
6	100	0.250	18227690	0.250	100.1
Promedio				0.251	100.32
DER				0.003	1.25
CV				1.24	1.24
1	50	0.125	18111790	0.125	99.7
2	50	0.125	18347985	0.129	103.0
3	50	0.125	18389709	0.123	98.6
4	50	0.125	18142666	0.128	102.7
5	50	0.125	17982417	0.125	99.9
6	50	0.125	18227690	0.128	102.2
Promedio				0.126	101.01
Des. Est.				0.002	1.87
CV				1.85	1.85

**Gráfica 6.** Evaluación de la linealidad del método de la crisina (3).

Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad el método se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resumen de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método.

Estadístico	1	2	3
Pendiente (m)	1.0120	0.9853	0.9971
Ordenada al origen (b_0)	-0.0092	0.0046	0.0016
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9989	0.9988	0.9990
IC(β_0)	-0.0292–0.0109	-0.0096–0.0188	-0.00302–0.0062
IC(β_1)	0.9942–1.0297	0.9670–1.0036	0.9802–1.0141
$S_{y/x}$	0.01114	0.0075	0.0035
S_{b_1}	0.0084	0.0087	0.0080
S_{b_0}	0.0095	0.0067	0.0022
$CV_{y/x}$	1.0245	1.0097	1.3853

De acuerdo a los resultados descritos, se concluye que el método desarrollado es lineal en el rango de concentraciones evaluadas.

La exactitud del método analítico se evaluó como el porcentaje de recobro obtenido a partir del análisis de diferentes muestras enriquecidas con concentraciones conocidas de las sustancias de interés **1–3**. En las Tablas **5–7** y en las Gráficas **4–6** se ilustran los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método de **1–3**. Esta determinación se realizó por triplicado para cada nivel de concentración. De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de este análisis los porcentajes de recobro fueron de 97.9–102.6 para **1**, 96.9–101.7 para **2** y 98.0–102.9 para **3**; y permitieron establecer que el método analítico es exacto, ya que en todos los casos los porcentajes de recobro se encuentran dentro del rango de los límites establecidos por las guías internacionales para métodos cromatográficos (98–102%). El ajuste de los datos mediante un análisis de regresión lineal simple permitió establecer que en todos los casos el 99.9% de los datos se encuentran explicados por los modelos de regresión lineal (**Tabla 8**).

4.3.3.4 Precisión

Para evaluar la precisión del método se realizaron diferentes experimentos conducentes a evaluar la precisión del sistema (repetibilidad), la precisión del método y la precisión intermedia (reproducibilidad). De manera general, estos resultados se expresan en términos de desviación estándar relativa (DER) y se resumen en la **Tabla 9**.

La precisión del sistema se evaluó midiendo los resultados individuales aplicando el mismo procedimiento repetidamente a una misma muestra de análisis. En todos los casos, la DER calculada para **1–3** es de 1.14, 1.24 y 1.25, respectivamente, lo que permite concluir que el método es reproducible bajo las condiciones de ensayo.

Por otra parte, la reproducibilidad y la precisión intermedia del método analizando una solución de **1–3** a una concentración de (1.0, 0.75 y 0.25 mg/mL) en días diferentes de análisis, permitió calcular una DER menor al 2%, evidenciando que en todos los casos el método analítico es repetible y reproducible.

Tabla 9. Datos experimentales para la evaluación de la precisión.

Analito	Precisión		
	Intermedia DER	Reproducibilidad DER	Repetibilidad DER
1	1.01	0.95	1.14
2	0.91	1.04	1.24
3	1.46	0.87	1.25

4.3.3.5 Cuantificación de los compuestos mayoritarios

Una vez desarrollado y validado el método analítico diseñado para el control de calidad de *D. graveolens*, se realizó la cuantificación de los tres compuestos mayoritarios (**1–3**) presentes en la infusión, utilizando dos diferentes muestras de material vegetal (DG y DG-2). En el lote DG las concentraciones calculadas para los analitos **1, 2 y 3** fueron de 30, 166 y 45 mg/g, respectivamente, mientras que para la muestra DG-2 fueron 24, 142 y 21 mg/g para **1, 2 y 3**, respectivamente.

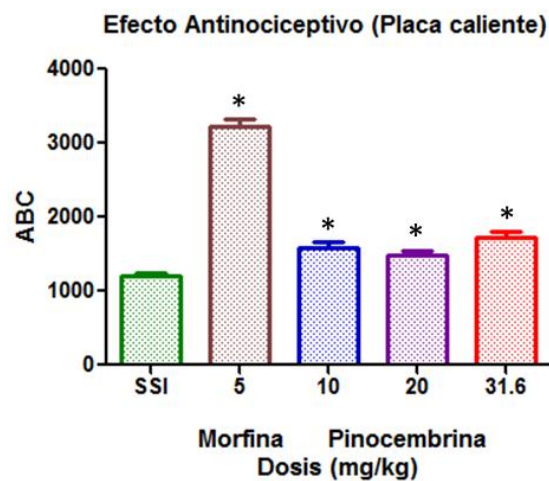
4.4 Efecto antinociceptivo de los constituyentes identificados en la infusión y aceite de epazote de zorrillo

Con la finalidad de establecer los principios activos responsables de la actividad analgésica de la infusión se determinó el potencial antinociceptivo de sus principales metabolitos, la pinostrobrina (**1**) y la pinocembrina (**2**).

La evaluación de la pinostrobrina (**1**) y la pinocembrina (**2**) se realizó utilizando las mismas pruebas farmacológicas descritas para los diferentes preparados. El tratamiento oral de los ratones con la pinocembrina a las dosis de 10, 20 y 31.6 mg/kg en el modelo de la placa caliente, produjo un incremento significativo de la latencia al estímulo térmico de forma independiente de la dosis; el mejor efecto se obtuvo con la mayor dosis. Los resultados obtenidos en el modelo de estiramiento abdominal indicaron que sólo la dosis de 20 mg/kg presentó una actividad importante (**Figura 19**). La pinostrobrina (**1**) no presentó una actividad analgésica en el modelo de la placa caliente. En contraste, en el modelo del estiramiento abdominal, la flavanona mostró un efecto importante e independiente de la dosis, provocando una disminución del número de estiramientos con los tres tratamientos evaluados (**Figura 20**).

La crisina (**3**) no se incluyó en el estudio debido a que su efecto antinociceptivo es conocido, de tal forma que la administración de la flavona a roedores por vía oral y a las dosis de 40 mg/kg de peso corporal reduce el número de contracciones en el modelo de estiramiento abdominal (Thirugnanasambantham *et al.*, 1988). Sin embargo, recientemente se reportó que la administración vía intraperitoneal y vía oral de **3** produce un efecto hiperalgésico significativo en el modelo de inmersión de cola en agua caliente y se propone que el efecto este asociado con los receptores GABA (Zhai *et al.*, 2008).

a)



b)

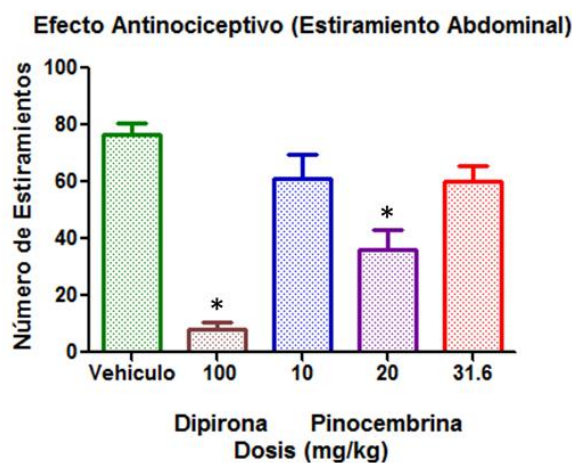
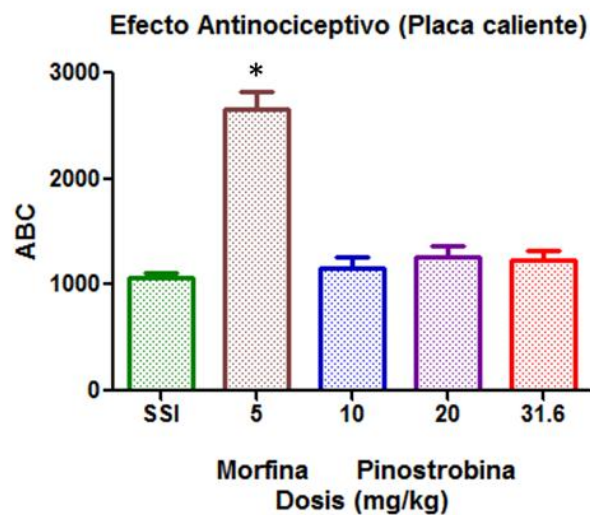


Figura 19. Evaluación del potencial antinociceptivo de la pinocembrina (**2**) en los modelos de **a**) placa caliente y **b**) estiramiento abdominal. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVIA seguida de una prueba de t -Dunnet ($*p < 0.05$).

a)



b)

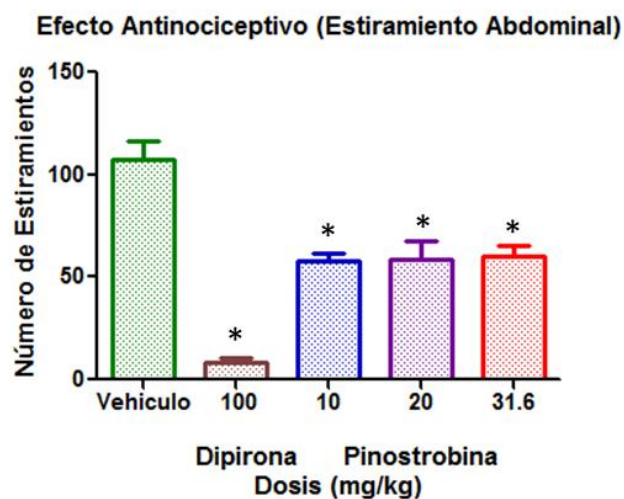


Figura 20. Evaluación del potencial antinociceptivo de la pinostrobin (1) en los modelos de **a)** placa caliente y **b)** estiramiento abdominal. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVIA seguida de una prueba t -Dunnet ($*p < 0.05$).

La actividad antinociceptiva de la cumarina (**19**) también se ha evaluado en los modelos de estiramiento abdominal y placa caliente (Leal *et al.*, 1997). En el primer caso se encontró que **19** (Deraedt *et al.*, 1976; 1980) reduce de manera dosis-dependiente el número de estiramientos que causan una inflamación aguda relacionada con el aumento de los niveles de prostaglandinas (PGE₂ y PGF₂α). En el modelo de placa caliente, **19** incrementa el tiempo de latencia al estímulo térmico. Este efecto observado fue, al menos, en parte dependiente de los receptores opioides, ya que disminuyó parcialmente con la administración previa de naloxona, que es un antagonista opioide (Leal *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha comprobado mediante estudios *in vitro* que la cumarina (**19**) y sus derivados inhiben la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas, que contribuyen a la inflamación. En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que el efecto antinociceptivo de **19** está relacionado con su acción antiinflamatoria, pero la participación de un componente central no puede descartarse.

Varios de los componentes del aceite esencial presentan también propiedades antinociceptivas conocidas. En el caso del *p*-cimeno se comprobó que reduce el número de estiramientos inducidos por el ácido acético y que incrementa significativamente el tiempo de latencia a estímulos térmicos, razón por la cual se concluyó que el monoterpenoide presenta propiedades antinociceptivas a nivel periférico y central. Sin embargo, los posibles mecanismos de acción involucrados en estos efectos se desconocen, pero se presume que el *p*-cimeno puede actuar sobre la cascada del ácido araquidónico y/o la modulación de la producción de moléculas pro-inflamatorias (Santana *et al.*, 2011; Bonjardim *et al.*, 2012).

De igual manera, se ha comprobado que el α-terpineol reduce el número de estiramientos e incrementa el tiempo de latencia al estímulo térmico, es decir, presenta propiedades con un mecanismo de acción que involucra las vías centrales y periféricas (Quintans-Júnior *et al.*, 2011). El efecto antinociceptivo a nivel periférico observado está probablemente relacionado con la inhibición de los niveles de prostaglandinas en el fluido peritoneal, ya que este monoterpenoide inhibe a la enzima ciclooxigenasa (COX) y la producción de interleucina (IL) (Khalil *et al.*, 2004; Kawata *et al.*, 2008). También se comprobado que es un inhibidor NF-κB y promueve la disminución de los niveles de IL-1 (Hassan *et al.*, 2010), así como la formación de IL-6

(Held *et al.*, 2007). El incremento a la latencia térmica en el modelo de placa caliente (Quintans-Júnior *et al.*, 2011), posiblemente sea por la modulación de la neurotransmisión GABAérgica (Watt *et al.*, 2008) o por su acción como depresor de la excitabilidad neuronal (Moreira *et al.*, 2001).

Finalmente, el eucaliptol, compuesto mayoritario presente en el aceite esencial, provoca la inhibición de la respuesta nociceptiva a altas dosis en diversos modelos de nocicepción. En pruebas con roedores tratados con 400 mg/kg del producto natural, se observó una disminución significativa en la locomoción (Santos y Rao, 2000). Por lo tanto, se sugiere que a dosis más altas los efectos deben ser tomados con cautela; en otro estudio en ratas, se demostró que a dosis bajas el efecto del eucaliptol era casi equivalente al de la morfina (Liapi *et al.*, 2007). El eucaliptol también ha demostrado un notable efecto antiinflamatorio (Santos y Rao, 2000). De igual manera, varios estudios han demostrado su efecto sobre la producción de mediadores de la inflamación a través de la inhibición de las ciclooxigenasas y la supresión de ácido araquidónico y citocinas (TNF- α y IL-1 β) (Santos y Rao, 2000; 2001; Santos *et al.*, 2001; Juergens *et al.*, 2003; 2004; Zhou *et al.*, 2007). Por último, cabe mencionar que el eucaliptol puede suprimir la expresión de diversos genes importantes en el proceso inflamatorio mediante la inhibición de la síntesis del factor de crecimiento temprano-1 (Egr-1).

En resumen la presencia de estos constituyentes en la especie validan las propiedades antinociceptivas de los preparados y el uso popular de la planta para el tratamiento de afecciones dolorosas. La presencia de compuestos con diferentes mecanismos de acción antinociceptivo puede traducirse en una sinergia farmacológica que favorece la eficacia de la planta y de sus preparados como agentes analgésicos.

5. Conclusiones

- Se determinó la seguridad preclínica, mediante los estudios de toxicidad aguda de diferentes preparados obtenidos a partir de la especie *D. graveolens* de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke. Los resultados indicaron que el extracto orgánico ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), la infusión y la esencia ($DL_{50} > 3807$ mg/kg) carecen de efectos nocivos para ratones, los cuales sumados al uso de la planta por más de cien años permitirían inferir *a priori*, y de acuerdo a lo establecido por la OMS, que la planta no es tóxica.
- Las pruebas farmacológicas realizadas sobre los diferentes preparados y compuestos puros del epazote de zorrillo permitieron validar el uso tradicional de la planta para el tratamiento de afecciones que cursan con dolor. Así, la evaluación del potencial antinociceptivo de varios preparados de la planta empleando los modelos de la placa caliente y de estiramiento abdominal permitió establecer que la esencia presentó la mejor actividad analgésica. Este efecto puede estar relacionado con el alto contenido de monoterpenoides principalmente el eucaliptol, el *p*-cimeno y el α -terpineol, con propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias comprobadas.
- El análisis de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las especies *D. graveolens* y *D. ambrosioides* permitió identificar al eucaliptol (42.9%), al *p*-cimeno (16.5%) y al α -terpineol (7.4%) como los constituyentes mayoritarios presentes en *D. graveolens*. Por otra parte, *D. ambrosioides* tiene como principales componentes al fitol (36.7%), al carvacrol (15.7%), al *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (10.3%), a la carvona (6.9%), a la piperitona (6.1%) y al ascaridol (6.05%). De manera adicional, el análisis por la técnica de microextracción con soporte sólido en fase gaseosa permitió complementar la identificación de los componentes volátiles para ambas especies. *D. graveolens* contiene *p*-cimeno (84.8%) y eucaliptol (11.3%) como principales componentes y *D. ambrosioides* contiene α -terpineno (25.1%), *p*-cimeno (27.9%), (+)-limoneno (17.3%) y ascaridol (21.6%).

- La investigación química de la infusión obtenida a partir de las partes aéreas de *D. graveolens* permitió el aislamiento y la caracterización de la pinostrobrina (**1**), la pinocembrina (**2**), la crisina (**3**), la negleteina (**20**), el (+)-8 α -hidroxielemol (**9**), del acetato del (+)-8 α -criptomeridiol (**10**), del criptomeridiol (**11**) y la cumarina (**19**), como los compuestos principales presentes en este preparado. La presencia en el epazote de zorrillo de la cumarina (**19**) y la negleteina (**20**) se describe por vez primera.
- Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar de manera simultánea a los flavonoides pinocembrina (**1**), pinostrobrina (**2**) y crisina (**3**) presentes en la infusión de *D. graveolens*. El método analítico resultó ser lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones evaluadas y servirá como base para el establecimiento de las pruebas de composición farmacopéicas del epazote de zorrillo.
- Los perfiles cromatográficos obtenidos por CG-EM del aceite esencial y de los compuestos volátiles, así como los generados por CLAE constituyen pruebas de identidad química de utilidad para el control de calidad de la planta.
- Finalmente, parte de los resultados generados en el presente trabajo de investigación serán de utilidad para integrar la monografía tipo Organización Mundial de la Salud y farmacopéica de esta planta medicinal ampliamente comercializada en México como agente antimicrobiano, analgésico y vermífugo.

6. Perspectivas generales

- Realizar un estudio sobre la variación de la composición química en función de la distribución geográfica y variaciones ontogénicas de *D. graveolens* con la finalidad de establecer en que época y lugar se generan la mayor cantidad de principios activos.
- Completar las pruebas de identidad botánica, mediante la realización de la descripción microscópica del epazote de zorrillo utilizando cortes histológicos de distintas partes de la planta.
- Estudiar con detalle los mecanismos de acción mediante los cuales los diferentes preparados y compuestos mayoritarios presentes en *D. graveolens* ejercen su efecto analgésico.

7. Bibliografía

- Aguilar, A. 1999. Plantas Medicinales del Sur de México. Mexico: Guías prácticas México Desconocido.
- Álvarez-Ospina H., Rivero I., Duarte G., Bye R., Mata R. 2013. HPLC Determination of the Major Active Flavonoids and GC-MS Analysis of Volatile Components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae). *Phytochemical Analysis*, **24**, 248-254.
- Ángeles-López G., Pérez-Vásquez A., Hernández-Luis F., Déciga-Campos M., Bye, R., Linares, E. y Mata R. 2010. Antinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*. *Journal of Ethnopharmacology*, **131**, 425-432.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Epazote_de_zorrillo&id=7647.(Acceso en agosto 2010).
- Arbaiza D. 2005. Neurofisiología del dolor. *Boletín El Dolor*, **14**, 1440.
- Argueta A., Cano A., Rodarte M.E. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 3 Vols. Mexico City: Instituto Nacional Indigenista, México.
- Bauer R. 1998. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved?. *Drug Information Journal*. **32**, 101-110.
- Bauer R., Tittel G. 1996. Quality assessment of herbal preparations as precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine*, **2**, 193-198.
- Besson J. 1999. The neurobiology of pain. *Lancet*, **358**, 1610-1615.
- Bye R. 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of the Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*, **40**, 103-124.
- Bonati A. 1991. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation?. *Journal of ethnopharmacology*, **32**, 195-197.
- Bonjardim LR, Cunha ES, Guimarães AG, Santana MF., Oliveira MGB., Serafini MR., Araújo AAS., Antonioli AR., Cavalcanti SCH., Santos MRV., Quintans-

- Júnior LJ. 2012. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of *p*-cymene in mice. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences N*, **67**, 15-21.
- Busse W. 2000. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Information Journal*, **34**, 15-23.
 - Calzada F., Velázquez C., Cedillo-Rivera R., Esquivel B. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytotherapy research*, **17**, 731-732.
 - Camacho M., Sanchez B., Quiroz H., Contreras J., Mata R. 1991. Pinocembrin: a bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. *Journal of Ethnopharmacology*, **31**, 383-389.
 - Cibeira J. 2006. Tratamiento clínico del dolor. Ed. Corpus. Argentina. 33-45, 73-95, 227-311.
 - Ching A., Wah T., Sukari M., Cheng-Lian G., Rahmani M., Khalid K. Characterization of flavonoid derivatives from *Boedenbergia Rotunda* (L.). *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **11**, 154-159.
 - Chu SS., Feng Hu J., Liu ZL. 2011. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, **67**, 714–718.
 - Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G., Navarrete A., Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, 334-342.
 - Déciga-Campos M., Palacios-Espinosa J.F., Reyes-Ramírez, A., Mata, R. 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **114**, 161–168.
 - De Diego J. 1992. La calidad de los productos y medicamentos fitoterapéuticos. Discurs en l'acte de recepció com a acadèmic corresponent de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya.

- De la Gala S. 1997. Actualización Clínica: Estudio y Tratamiento del Dolor. Fundación MAPFRE Medicina. 6-7, 15-17.
- Deraedt R., Jouquey S. Benzoni J., Peterfalvi M. 1976. Inhibition of prostaglandins biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. *Archives International of Pharmacodynamie*, **224**, 30-42.
- Deraedt, R., Jouquey S. Delevalee E, Flahaut M. 1980. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology*, **61**, 17- 24.
- Eaton M. 2003. Common animal models for spasticity and pain. *Journal of Rehabilitation Research and Development*, **40**, 41-54.
- Ettre L., Kalasz H. The story of Thin Layer Chromatography. *LCGC North America*, **2001**, *19*, 712–721.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2001. Secretaría de Salud, Publicaciones de Calidad, México DF.
- Franz G., Vlietinck A. 2001. Results and methods of work of the European pharmacopoeia. Proceedings of the International Symposium on Herbal Medicinal Products: Quality Evaluation. Contribution of the European Pharmacopoeia. *Pharmaeuropa*, número especial, 17-25.
- Guevara U., Covarrubias A., Hernández A. 2004. Desarrollo de los parámetros de práctica para el manejo del dolor agudo. *Revista Mexicana de Anestesiología*, **27**, 200-204.
- ICH. 2005. Text on Validation of Analytical Procedures. Harmonized Tripartite Guideline [Q2(R1)]. International Conference on Harmonization: Geneva; 1–13. http://www.ich.org/fileadmin/public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (acceso Julio 2012).
- Jiménez M. 2011. Herbolaria mexicana 1ª edición. Colegio de posgraduados, Estado de México. Biblioteca básica de agricultura.
- Juergens UR., Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen A., Repges R., Vetter H. 2003. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo- controlled trial. *Respiratory Medicine*, **97**, 250-256.

- Kawata J., Kameda M., Miyazawa M. 2008. Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, **2**, 145-148.
- Khalil Z., Pearce AL., Satkunanathan N., Storer E., Finlay-Jones JJ., Hartwz PH. 2004. Regulation of wheal and flare by tea tree oil: complementary human and rodent studies. *Journal of Investigative Dermatology*, **123**, 683-690.
- Kumar S., Shukla Y. 2003. Herbal Medicine: current status and the Future. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **4**, 281-288.
- Lazarowich NJ., Pekos P. 1998. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products. *Drug Information Journal*, **32**, 493-512.
- Leal L., Matos M., Matos F., Ribeiro R., Ferreira F., Viana G. 1997. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. *Phytomedicine*, **4**, 221-227.
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, **53**, 597-652.
- Linares E., Flores B., Bye R. 1994. Selección de Plantas Medicinales de México. Mexico, Limusa.
- Liapi C, Anifantis G, Chinou I, Kourounakis AP, Theodosopoulos S, Galanopoulou P. 2007. Antinociceptive properties of 1,8-cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldu lensis* leaves, in rodents. *Planta Medica*, **73**, 1247-1254.
- Lorke D. 1983. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology*, **54**. 275-287.
- Lozoya J., Lozoya M. 1982. Flora Medicinal de México. Primera Parte: Plantas Indígenas, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 31.
- Lozoya X. 1994. Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs In: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley.
- Martin-Smith M., Rudd DR. 1998. Validation of analytical methods. *Analytical Proceedings*, **25**, 154-155.

- Martínez M. 1959. Las Plantas Medicinales de México, Ediciones Bota, México, 128.
- Mata R., Navarrete A., Alvarez L., Pereda R., Delgado G., Romo de Vivar R. 1987. Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochemistry*, **26**, 191-193.
- Meckes M., Paz D., Acosta J., Mata R. 1998. The effects of chrysin and pinostrobin, 2 flavonoids isolated from *Teloxys graveolens* leaves, on isolated guinea-pig ileum. *Phytomedicine*, **5**, 459-463.
- Mendoza CG., García PJ., Estrada LE. 1997. Catalogo y usos terapéutico de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el mercado sonora. Universidad autónoma Chapingo. Departamento de fitotecnia. Programa universitario de plantas medicinales. Serie: materiales para la docencia, N₀. 2, Chapingo, México.
- Monroy-Ortiz C, Castillo-España P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad autónoma del estado de Morelos. Centro de investigaciones biológicas. Centro de investigación en biotecnología. CONABIO.
- Montoya-Cabrera MA., Escalante-Galindo P., Meckes-Fisher M., Sánchez-Vaca G., Flores-Alvárez E., Reynoso-García M. 1996. Fatal poisoning caused by oil of epazote, *Chenopodium graveolens*. *Gaceta Medica de Mexico*, **132**, 433-437.
- Monzote L., Nance MR., García M., Scull R., Setzer WN. 2011. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Communication*, **6**, 281-286.
- Moreira MR, Cruz GM, Lopes MS, Albuquerque AA, Leal-Cardoso JH. 2001. Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34**, 1337-1340.
- Moreno C., Prada D. 2004. Fisiología del dolor clínico. *Asociación Colombiana de Neurología*, **15**, 9-21.
- Mouffok S., Haba H., Lavaud C., Long C., Benkhaled M. 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Natural Product*, **6**, 292-295
- NIST. 2005. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, NIST '05, ASCII Version PC, DG.

- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaria de Salud. México.
- Ortega A., Roca A., Mico J. 2002. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, **9**, 447-453.
- Owolabi MS., Lajide L., Oladimeji MO., Setzer WN., Palazzo MC., Olowu RA., Ogundajo A. 2009. Volatile constituents and antibacterial screening of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. *Natural Product Communication*, **4**, 989–992.
- Palacios-Espinosa F., Déciga-Campos M., Mata R. 2008. Antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, **118**, 448-454.
- Phillipson J. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, **56**, 237-242.
- Plotkin M. 2001. Global Phytochemistry: the ethnobotanist view. *Phytochemistry*, **56**, 117-120
- Quintans-Júnior LJ, Oliveira MGB, Santana MF., Santana MT., Guimaraes AG., Siqueira JS., De Sousa DP., Almeida RN. 2011. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharmaceutical Biology*, **49**, 583-586.
- Ramirez-Muñoz Raquel. 1998. Estudio fitoquímico biodirigido de hojas y tallo del extracto metanólico de *Teloxys graveolens* Willd .Tesis de Licenciatura.
- Repetto M. 2009. Toxicología General. 3ª ed., Ediciones Díaz de Santos.
- Romera E., Perena M., Perena M., Rodrigo M. 2000. Neurophysiology of pain. Neurofisiología del Dolor. *Revista de la Sociedad Española de Dolor*, **7**, 11-17.
- Rzedowski G., Rzedowski J. 2010. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán).
- Santana MF, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SCH, Oliveira MGB., Guimaraes AG., Cunha ES., Melo MS., Santos MRV., Araújo AAS., Bonjardim LR. 2011. *p*-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **21**, 1138-1143.

- Santos FA, Rao VSN. 2000. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, **14**, 240-244.
- Santos FA, Rao VSN. 2001. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, **46**, 331-337.
- Sucher Nikolaus J.; Carles Maria C. 2008. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Medica*; **74**,603-623.
- Timothy F., Chaomei M., Mohsen D. 2004. Medicinal plants and herbs of Newfoundland and part 1. Chemical constituents of aerial part of pineapple weed (*Matricaria matricarioides*). *DARU*, **12**, 131-135.
- Thirugnanasambantham P, Viswanathan S, Ramaswamy S, Krishnamurthy V, Mythirayee CI, Ramachandran S, Kameswaran L. 1988. Involvement of calcium in flavonoid analgesia. *European Journal of Pharmacology*, **152**, 367-369.
- Ulku N., Baykan S., Ozturk B., Apaydin S., Tuglular I. 2006. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja thymbra* L. essential oil. *Pharmaceutical Biology*, **44**, 585–591.
- Van Den Dool H., Kratz P.D. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **11**, 463–471.
- Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. 2008. Chromatographic Science Series: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton FL.
- Walter F. 2005. The pathophysiology of cute pain. *Emergency Medicine Clinics of North America*; **23**, 277-284.
- Watt E.E., Betts B.A., Kotey F.O., Humbert D.J., Griffith T.N., Kelly E.W., Veneskey K.C., Gill N., Rowan K.C., Jenkins A., Hall A.C. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. *European Journal of Pharmacology*, **590**, 120-126.
- Williamson E., Okpako D., Evans F. 1996. Pharmacological Methods in Phytotherapy Research: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of

Plant Material. Wiley. Inglaterra. Capítulo 8. Anti-inflammatory and analgesic activity. 131-154.

- Zhai K., Hu L., Chen J., Fu C., Chen Q. 2008. Chrysin induces hyperalgesia via the GABAA receptor in mice. *Planta Medica*, **74**, 1229-1234
- Zhou JY, Wang XF, Tang FD, Zhou JY, Lu GH, Wang Y, Bian RL. 2007. Inhibitory effect of 1,8-cineol (eucalyptol) on Egr-1 expression in lipopolysaccharidestimulated THP-1 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, **28**, 908-912.

8. Anexos

HPLC Determination of the Major Active Flavonoids and GC–MS Analysis of Volatile Components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae)[†]

Harry Álvarez-Ospina,^a Isabel Rivero Cruz,^a Georgina Duarte,^a Robert Bye^b and Rachel Mata^{a*}

ABSTRACT:

Introduction – *Dysphania graveolens* is used mainly in Mexican traditional medicine against gastrointestinal ailments. Previous investigations revealed that its flavonoids are important active principles; however, there is not a reliable and accurate analytical method for determining these compounds in the crude drug or preparations of the plant. In addition, its volatile chemical composition remains unknown.

Objective – The main goals were to develop a validated HPLC method for quantifying the active flavonoids (pinostrobin (1), pinocembrin (2) and chrysin (3)) of *D. graveolens* and to establish its volatile composition.

Methodology – Separation was carried out on a Licrospher100 RP18 column with a linear gradient acetonitrile 0.1% formic acid and aqueous 0.1% formic acid. Accuracy was determined by spiking the crude drug with the standards, the recoveries were between 99% and 101%. A systematic description of the volatile components of *D. graveolens* was assessed via GC–MS using headspace solid-phase microextraction (HS–SPME) and hydrodistillation extraction methods.

Results – The developed HPLC method represented a powerful technique for the quality control of *D. graveolens* allowing the quantification of the three active flavonoids. For each compound a linear response was evaluated within the range of 0.5–2.0 mg/mL for pinostrobin (1), 0.25–1.25 mg/mL for pinocembrin (2) and 0.05–0.5 mg/mL for chrysin (3). According to SPME the major components in *D. graveolens* were *p*-cymene (84.85%) and eucalyptol (11.26%). On the other hand, the essential oil had eucalyptol (42.89%) and *p*-cymene (16.51%) and did not contain ascaridol. Thus the most relevant volatile components in the species were monoterpenoids. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: HPLC–DAD; quantification; essential oil; flavonoids; Amaranthaceae; *Dysphania graveolens*; *Dysphania ambrosioides*

INTRODUCTION

The aerial parts of *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin & Clemants (synonyms: *Chenopodium graveolens* Willd.; *Teloxys graveolens* (Willd.) W.A. Weber) are highly valued for medicinal and condiment use in contemporary Mexico. The infusion of this herb, commonly known as 'epazote de zorrillo', is ingested to treat gastrointestinal complaints, pain, parasitic worms, coughs and urinary ailments (Bye, 1986; Martínez, 1989).

A few components have been isolated from *D. graveolens* including sterols (stigmaterol, stigmast-22-en-3-ol and 3 α -sitosteril glucoside), flavonoids (pinostrobin (1), pinocembrin (2), chrysin (3), rutin and narcissin), sesquiterpenoids ((+)-8 α -hydroxyelemol, (+)-8 α -acetoxycryptomeridiol and cryptomeridiol) and melilotoside, an *o*-coumaric acid derivative (Mata *et al.*, 1987; Calzada *et al.*, 2003). The pharmacological studies conducted on extracts and compounds from the plant have shown their anthelmintic (Camacho *et al.*, 1991), antiseptic (Rojas *et al.*, 1992), antiprotozoal (Calzada *et al.*, 2003) and spasmolytic activities (Meckes *et al.*, 1998). Thus, the methanolic extract of the plant and melilotoside exhibited potent activity toward *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, while narcissin was selectively active against *E. histolytica* (Calzada

et al., 2003). Pinocembrin (2) exhibited fasciolicide and ovicide activity against newly excysted *Fasciola hepatica* and infective eggs of *Ascaridia galli* (Camacho *et al.*, 1991). Pinostrobin (1) and chrysin (3) inhibited intestinal smooth muscle contractions of guinea-pig ilea preparations by a calcium-mediated mechanism (Meckes *et al.*, 1998). Altogether, these studies have provided scientific support for some of the popular uses of the plant and demonstrated that flavonoids 1–3 are the most important active principles against gastrointestinal ailments.

The anthelmintic properties of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants and *D. graveolens* have long been recognised in Mexico and worldwide (Bye, 1986). Furthermore, the

* Correspondence to: R. Mata, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México. Email: rachel@unam.mx

[†] Taken in part from the PhD thesis of H. Álvarez.

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF México

^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF México

essential oil of the former species was highly valued for many years to treat worms in humans and animals (Bye, 1986; Githiori *et al.*, 2006); therefore the oil composition of *D. ambrosioides* collected in different countries has been extensively analysed, with ascaridol being the most relevant active constituent (Sagrero-Nieves and Bartley, 1995; Owolabi *et al.*, 2009; Jardim *et al.*, 2010; Monzote *et al.*, 2011). In contrast, the components of *D. graveolens*' essential oil have not been established. The only existing work claimed that the oil of *D. graveolens* contained ascaridol in a concentration of 39 mg/mL (Montoya-Cabrera *et al.*, 1996). However, no further detail concerning the composition of the oil or the method employed for the quantification of ascaridol was provided in that study (Montoya-Cabrera *et al.*, 1996).

In spite of the extensive use of *D. graveolens*, no quality control parameters for the crude drug have been developed; this issue is relevant because the efficacy and safety of crude drugs are based on the standardisation of their composition (WHO, 1998). Thus, the main goals of the present study were: (i) to develop a simple and reproducible high-performance liquid chromatography (HPLC) method to detect and quantify the main active principles of the infusion prepared from the dried aerial parts of *D. graveolens*; and (ii) to establish the nature of the volatile compounds obtained by hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) of the aerial parts of *D. graveolens* using GC-MS analysis, and compare the results with those of *D. ambrosioides*. Altogether, the information generated will be suitable for the integration of a pharmacopeic monograph of *D. graveolens*.

EXPERIMENTAL

Materials and reagents

All solvents were purchased from Honeywell Burdick and Jackson (Morristown, New Jersey, USA). Deionised water for HPLC was prepared using a Maxima ultrapure water purifier system (Elgastat, Bucks, UK). Formic acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Coumarin, pinocembrin, chrysin, pinostrobin, eucalyptol, γ -terpinene, α -terpinolene, terpinen-4-ol, α -terpineol, carvacrol, β -caryophyllene, *n*-alkanes (C₈–C₂₀) standards and sodium chloride were acquired from Sigma-Aldrich-Fluka Chemicals (St Louis, Missouri, USA). Manual SPME fibre holder and polydimethylsiloxane (PDMS, 100 μ m)-coated fibres were purchased from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA).

Plant material

The aerial parts of *D. graveolens* were collected in two different regions. The first one (DG) was harvested in Ozumba, Estado de Mexico on August 2010. A voucher specimen was deposited at the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM, Mexico City (Bye & Linares 36470). The second batch (DG-2) was purchased at the store El Abuelito, Mercado Reforma, in Chihuahua City, Chihuahua, on June 2011. A voucher specimen was also deposited at MEXU (Bye 36704). *Dysphania ambrosioides* (DA; Cristians 110) was purchased at the Mercado de Sonora, Mexico City on April 2011, a voucher specimen was deposited at the Science School Herbarium (FCME), UNAM.

Preparation of *D. graveolens* infusion

Air-dried aerial parts (20 g) of *D. graveolens* were ground into powder (top size 2 mm) and extracted with 250 mL of boiling water during 20 min. After filtration, the infusion was exhaustively partitioned with dichloromethane (3 \times 250 mL). The combined organic fractions were

dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated *in vacuo* to yield ~60 mg of dichloromethane soluble fraction. This process was repeated as needed.

Isolation of major compounds from an infusion of *D. graveolens*

One gram of the dichloromethane soluble fraction obtained as described above was subjected to open-column chromatography on silica gel (50 g), eluting with gradients of hexane-chloroform (6:4 \rightarrow 0:10) and chloroform-ethyl acetate (10:0 \rightarrow 0:10) to yield 13 primary fractions (F1–F13) of 280 mL each. From fraction F1, eluted with hexane-chloroform 6:4, 56 mg of pinostrobin (**1**, mp 95–100 °C) were obtained. Coumarin (**4**, 110 mg, m.p. 68–70 °C) crystallised from fraction F3, eluted with hexane-chloroform (5.5:4.5). Negletein (**5**, 8 mg) was obtained as crystalline solid, m.p. 232 °C, from F7, eluted with chloroform. Preparative TLC of F8, eluted with chloroform-ethyl acetate (9.5:0.5), using chloroform-methanol-formic acid (9.4:0.5:0.1) afforded 148 mg of pinocembrin (**2**, *R*_f 0.52; m.p. 195–200 °C) and 118 mg of chrysin (**3**, *R*_f 0.46; m.p. 280–282 °C).

HPLC conditions

Analyses by HPLC were conducted on a Waters 2487 HPLC instrument consisting of a quaternary pump with a degasser, manual injector, UV/Vis dual detector, and Empower 2 software (Milford, Massachusetts, USA). All analyses were carried out on a reversed-phase Licrospher100 RP18 (250 mm \times 4 mm, film thickness 5 μ m) column. A Synergi 4u Hydro-RP (250 mm \times 4.60 mm, 4 μ m) was also tested and found not suitable. Various flow rates, modifiers and binary solvent systems in either isocratic or gradient mode were experimented with, to compare the separation efficiency of the major compounds of the infusion. After a number of trials, a binary mobile phase consisting of 87% deionised water adjusted to pH 2.8 with formic acid (FA) (A) in acetonitrile (pH 2.8 FA; B) was found to be the most appropriate. A flow rate of 0.5 mL/min at 25 °C with an injection volume of 20 μ L was used. Elution was carried out according to the following gradient program: 0 min, 87% B; 5 min, 60% B; 5–10 min, 30% B; 10–45 min, 27% B. The column was equilibrated for 20 min at the starting conditions before each injection. The detection was monitored at 330 nm.

Stock solutions

Pinostrobin (**1**), pinocembrin (**2**) and chrysin (**3**), are partially soluble in water and have limited solubility in methanol, ethanol or acetonitrile. Therefore, binary mixtures of dichloromethane-ethanol or ethanol-water (sodium hydroxide 0.1 N) were selected for the solubility tests of the standards. The stock standards solutions for HPLC determinations were prepared by stepwise dilution by adding 1 mL of a mixture of dichloromethane-ethanol (2:8) to 5 mg of pinostrobin (**1**), 2.5 mL of a mixture of dichloromethane:ethanol (2:8) to 5 mg of pinocembrin (**2**), and 5 mL of a mixture sodium hydroxide (0.1 N)-ethanol (1:4) to 5 mg of chrysin (**3**). All solutions were filtered through 0.45 μ m membrane filters prior to injection. Under the conditions described, the retention times (*R*_T) of **1**, **2** and **3** were found to be 28.8, 21.7 and 22.3 min, respectively. Identification of flavonoids was achieved by comparing their retention times with those of authentic samples.

Validation procedure for HPLC method

Calibration curves, limit of detection and limit of quantitation. Standard calibration curves for quantifying **1–3** were obtained by plotting concentration (mg/mL) against response. Six different concentrations for each of the three standards in the range of 0.5–2.0 mg/mL for pinostrobin (**1**), 0.25–1.25 mg/mL for pinocembrin (**2**) and 0.05–0.5 mg/mL for chrysin (**3**) were prepared in triplicate. All dilutions were made in ethanol. The linearity of these curves was evaluated by least-squares fit

and the correlation coefficient using the software Origin 8.0 (Origin Laboratory, Massachusetts, USA). The lowest concentration of the working solutions was diluted with ethanol to a series of appropriate concentrations for determination of the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10 for each compound (ICH, 2005).

Accuracy. A recovery test was used to evaluate the accuracy of the method. Briefly, an individual standard from the sample matrix was determined according to the amounts detected from the matrix after a blank matrix was spiked with known concentrations of the available standards. In order to assess linearity, three calibration curves correlating recovery concentrations versus added concentrations of the standards were constructed. Each sample was analysed in six times. The recovery of each flavonoid was calculated from the corresponding calibration curve according to the following equation:

$$\% \text{ recovery} = \text{amount found} / \text{amount added} \times 100.$$

Precision and repeatability. Precision was evaluated by analysing six replicated injections of the standard reference of each flavonoid on one and two different days to determine intraday and interday precision, respectively. In order to evaluate repeatability of the developed assay, six identical samples were analysed according the method described. The relative standard deviation (RSD) was calculated for each determination and taken as a measure of precision and repeatability.

Essential oils preparation

Essential oils from *D. graveolens* (DG) and *D. ambrosioides* (DA) were prepared by steam distillation for 4 h from air-dried and ground aerial parts (150 g of plant material and 2.0 L of distilled water) using a modified Clevenger-type apparatus. The distillations were performed in triplicate. In all cases the hydrodistilled mixture was partitioned with dichloromethane (3 × 500 mL) and dried over anhydrous sodium sulphate. The organic phase was concentrated *in vacuo*. The resulting oils were stored in amber bottles at -4 °C until further analysis.

Headspace solid-phase microextraction

Dried plant material (500 mg), sodium chloride (75 mg) and distilled water (5 mL) were hermetically sealed in a 10 mL vial with a polypropylene hole-cap and PTFE/coated silicone septa. The fibre (Supelco polydimethylsiloxane, PDMS; 1 cm) was exposed to the plant material to collect the headspace (HS). For the analysis experimental conditions were set as follows: extraction temperature: 25 °C; equilibrium time: 5 min; extraction time: 10 min. After sampling, the SPME fibre was directly inserted into the GC injector port and the fibre thermally desorbed. A desorption time of 2 min at 250 °C was used. Before GC-MS analysis, the fibre was conditioned in the injector of the GC system, according to the instructions provided by the manufacturer. All samples were analysed in triplicate and the relative proportions of individual components adsorbed to the PDMS fibre under these conditions was calculated based on the total ion chromatogram (TIC) peak areas as a percentage of the sum of all peak areas.

GC-MS

Analyses by GC-MS were carried out in an Agilent 6890N series gas chromatograph equipped with a LECO time-of-flight mass spectrometer detector (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, USA). Compounds were separated on a 5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane (10 m × 0.18 mm, film thickness 0.18 μm) capillary column (Bellefonte, Pennsylvania, USA). The oven temperature was set at 40 to 260 °C at 4 °C/min, held for 20 min, and finally rose to 340 °C at 4 °C/min for 20 min isothermally. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Diluted samples were injected (2 μL) in the split mode (ratio

1:20). The ionisation electron energy was 70 eV and the mass range scanned was 40–400 *m/z*. Injector and MS transfer line temperatures were set at 200 and 300 °C, respectively. Compounds were identified by comparing the retention times of the chromatographic peaks with those of authentic compounds run under the same conditions; by co-injection of the sample with a solution containing the homologous series of *n*-alkanes (C₈–C₂₀) in order to establish the retention indexes (Kovats indexes); and by comparing their MS fragmentation patterns with those of pure compounds, the spectral database of the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS or from literature data (Adams, 2007). All determinations were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimisation of extraction conditions

For sample extraction, water was chosen as the solvent and infusion as the extraction method. The choice of extraction solvent was compared between methanol and boiling water. With methanol considerable amounts of green pigments were extracted; in addition, the turbidity of the extract was persistent; with boiling water the extract was clearer and the amount of pigments extracted was considerably lower; after partitioning the aqueous extract with dichloromethane the resulting organic fraction was clear throughout; furthermore, the major flavonoids pinostrobin (**1**), pinocembrin (**2**) and chrysin (**3**) were selectively extracted in the dichloromethane phase. Phytochemical analysis of the resulting dichloromethane phase indicated that the main components of the infusion were pinostrobin (**1**), pinocembrin (**2**), chrysin (**3**), coumarin (**4**) and negletein (**5**). The compounds were characterised by comparison of their spectral data with those of authentic samples or with those previously described (Mata *et al.*, 1987; Righi *et al.*, 2010). The structures of the isolates are shown in Fig. 1.

Chromatographic separation

The separation by means of HPLC of the major components of the dichloromethane fraction derived from an infusion of *D. graveolens* was then investigated. For this endeavour several mobile and two stationary phases were examined; the columns tested included a Synergi 4u Hydro-RP (250 mm × 4.60 mm, 4 μm Fig. 2) and a Licrospher100 RP18 (250 mm × 4 mm, 5 μm), with the latter being the most appropriate. Regarding the mobile phase, acetonitrile (pH 2.8 FA) in water (pH 2.8 FA) was selected as the optimal, after testing several acids (phosphoric,

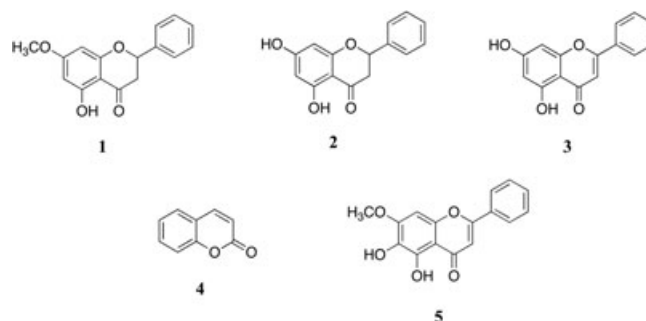


Figure 1. Chemical structures of the isolates from *D. graveolens* infusion. Pinostrobin (**1**), pinocembrin (**2**), chrysin (**3**), coumarin (**4**) and negletein (**5**).

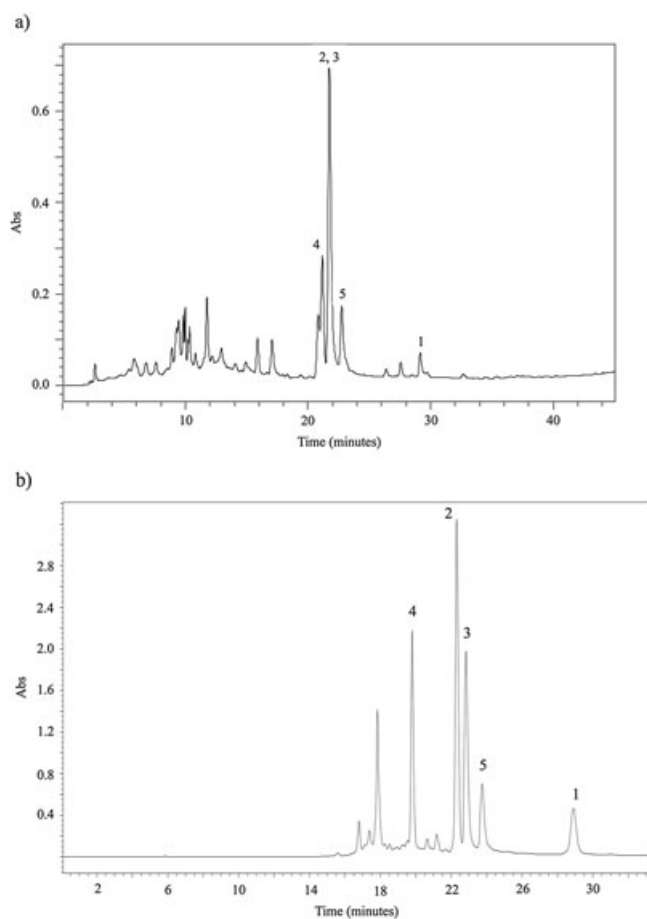


Figure 2. The HPLC chromatograms obtained from the infusion of *D. graveolens*. Columns: (a) Synergi 4u Hydro-RP (250 mm × 4.60 mm, 4 μm); (b) Lichrospher 100 RP18 (250 mm × 4.60 mm, 5 μm). Mobile phase: water–acetonitrile gradient (both solvents adjusted to pH 2.8 with formic acid); 0.5 mL/min; 20 μL; 330 nm, in both cases.

acetic, trichloroacetic and formic acids), and different mixtures of methanol–water and acetonitrile–water. Under the best conditions, effective baseline resolution was achieved for compounds 1–5. A representative chromatogram of the major components in *D. graveolens*' organic soluble fraction of the infusion is also illustrated in Fig. 2. Flavonoids 1–3 were selected as the marker constituents for the quantitative determination because in addition to their pharmacological activity, they were commercially available, and the procedures for their chemical synthesis have been well established (Righi *et al.*, 2010).

Validation of the HPLC–DAD method

A comprehensive validation of the method was carried out according to the International Conference on Harmonization guidelines (ICH, 2005). The overall results are summarised in Tables 1 and 2.

The stock solutions and regression equations for each standard compound, together with the LOD and LOQ are summarised in Table 1. All the calibration curves showed good linearity within the test ranges ($r^2 \geq 0.993$). The LOD values were 2.0, 1.2 and 0.4 μg for pinostrobin (1), pinocembrin (2) and chrysin (3), respectively, whereas the LOQ values were 6.2, 3.8 and 1.0 μg,

Table 1. Regression equations, linear ranges, LODs, LOQs and precision for quantitative analysis

Analyte	Regression equation ^a	Linear range (mg/mL)	r^2	LOD (μg)	LOQ (μg)	Precision		Repeatability	
						Intraday RSD ^b (%)	Interday RSD ^b (%)	Mean (mg/mL)	RSD ^b (%)
Pinostrobin	$y = 27796057.8x - 751764.1$	0.5–2.0	0.9938	2.0	6.2	1.01	0.95	0.99	1.14
Pinocembrin	$y = 24424384.5x + 55320.6$	0.25–1.25	0.9902	1.2	3.8	0.91	1.04	0.74	1.24
Chrysin	$y = 87288849.1x - 43727.9$	0.05–0.5	0.9961	0.4	1.0	1.46	0.87	0.25	1.25

^aIn the regression equation $y = mx + b$, x refers to the concentration of standards (mg/mL), y the peak area.
^bRSD (%) = (SD/mean) × 100.
^c r^2 is the correlation coefficient; LOD, limit of detection ($S/N = 3$); LOQ, limit of quantification ($S/N = 10$).

Table 2. Average recovery of the flavonoids quantified in *D. graveolens*' infusion

Analyte	Amount added (mg/mL)	Amount found (mg/mL)	Average recovery (%)	RSD ^a (%)
Pinostrobin	1.50	1.51	101.43	0.85
	1.00	1.00	99.70	0.97
	0.75	0.75	99.35	1.21
Pinocebrin	1.00	0.99	99.02	1.13
	0.75	0.74	99.05	0.84
	0.50	0.50	99.52	0.76
Chrysin	0.375	0.376	100.14	1.29
	0.25	0.25	100.32	1.24
	0.125	0.126	101.01	1.85

^aRSD (%) = (SD/mean) × 100.

respectively. The intraday and interday precision RSDs were no more than 1.50% while the repeatability variation was no more than 1.25% (Table 1). Percentage recoveries of the selected flavonoids are indicated in Table 2; in each case, an excellent accuracy was obtained in the range from 99.0% to 101.4% (RSD ≤ 2.0%). Altogether the described information revealed that the method was precise, accurate and linear for the simultaneous quantitative evaluation of the three major active marker flavonoids of *D. graveolens*. As the validated method was successively applied for the quantification of these components in two different geographical batches (DG and DG-2) of the plant, it would be appropriate for its intended use in the process of quality control of the crude drug of *D. graveolens*. Although it is necessary to analyse a higher number of samples, our initial results revealed that **3** was the component that showed the higher variability. In DG the amounts of pinostrobin (**1**), pinocebrin (**2**) and chrysin (**3**) were 30, 166 and 45 mg/g, respectively, while in DG-2 they were 24, 142 and 21 mg/g, respectively.

In conclusion, a fast and reliable HPLC–DAD method for quantifying the contents of the major active flavonoids in aqueous extracts prepared from the aerial parts of *D. graveolens* was developed and validated.

Volatile chemical composition analysis

The volatile components profile of *D. graveolens* was assembled via GC–MS analyses of both HS–SPME-adsorbed compounds and those of the essential oils obtained by hydrodistillation of the aerial parts of the plant. The results were compared with those of the related species *D. ambrosioides*. A PDMS fibre was selected as the most efficient for HS–SPME. As summarised in Table 3 and Fig. 3a and b, 13 components were characterised in *D. graveolens*, while in *D. ambrosioides* only eight compounds were identified; their relative percentages and retention indexes are also indicated in Table 3. The major components in both species are monoterpenoids (> 90% in both batches of DG and in DA). *p*-Cymene (84.8%) and eucalyptol (11.3%) were the most relevant components in *D. graveolens*, while α -terpinene, *p*-cymene, (+)-limonene and *cis*-ascaridol were the most abundant components of *D. ambrosioides*.

The results of the analyses of the essential oils of both plants are summarised in Table 3 and Figs 4 and 5. The yield of the essential oil of *D. graveolens* was 0.16 mg/g and that of *D. ambrosioides* was 0.15 mg/g. For *D. graveolens*, 21 chemical constituents, representing about 99% of the total content, were

identified. *Dysphania graveolens* has considerable amounts of eucalyptol (42.9%) and *p*-cymene (16.5%) and did not contain *cis*-ascaridol. The oil of *D. ambrosioides*, on the other hand, contained large amounts of *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, carvacrol, phytol, carvone and ascaridol, thus revealing important differences between the oils of both species. Our results on *D. graveolens* contrasted with those described previously by Montoya-Cabrera *et al.* (1996), who claimed that the oil of a non-authenticated species of this plant was rich in ascaridol and thus highly toxic. The results were based on the TLC analysis of a sample regarded as 'oil of epazote', which could have been obtained from *D. ambrosioides* rather than from *D. graveolens* as the authors stated. The composition of *D. ambrosioides* found in the present work showed similarities, albeit partial, with those reported for the plant material growing in Cuba, Spain, Togo, India, Nigeria, Brazil and China, all containing ascaridol (Owolabi *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2011). So far, only two reports have failed to describe the presence of the latter monoterpenoid in *D. ambrosioides*, one dealt with a sample collected in Veracruz, Mexico, which was rich in *trans*-pinocarveol. The second was a sample collected in Nigeria and contained large amounts of α -terpinene (Sagrero-Nieves, 1995; Kasali *et al.*, 2006). Whether these differences are due to infraspecific species variability or are related with the procedures used for the preparation of the analytical samples remains to be determined.

The volatile composition estimated by means of SPME was different to that for hydrodistillation; in the case of *D. graveolens*, of the total volatile compounds identified only eight were detected by both extraction procedures, and for *D. ambrosioides* only four (Fig. 3b). In both cases the relative total ion chromatogram peak areas of the compounds identified differed greatly between the two techniques. Comparative analysis of the nature of the compounds identified by the two extraction methods revealed that HS–SPME detected a higher content of the less polar volatile components (e.g. hydrocarbons), while the more polar components (e.g. α -terpineol, eucalyptol and carvacrol), with the exception of ascaridol, which probably decomposed during the distillation process, were detected in the essential oil. The same trend has been described previously (Tolstikov *et al.*, 1996; Dawidowicz *et al.*, 2008; Drew *et al.*, 2012) during the analysis of the volatile components of other plant species and using the same procedures. In Tolstikov and coworkers (1996) reported that upon boiling ascaridol yielded a dioxide and a glycol; however, these products were not detected in our study.

Table 3. Volatile components identified by GC-MS and HS-SPME in *D. graveolens* and *D. ambrosioides*

Compound ^a	Kovats index (I) ^b	Percent of each component		Percent of each component		Method of identification ^c
		HS-SPME		Essential oil		
		DG ± SD	DA ± SD	DG ± SD	DA ± SD	
α -Thujene	932	0.28 ± 0.01	-	0.24 ± 0.03	-	a,b,c
Camphene	950	0.22 ± 0.01	-	-	-	a,b,c
<i>trans</i> -3-Carene-2-ol	976	-	-	-	0.30 ± 0.04	a,b,c
δ -3-Carene	1010	0.39 ± 0.01	-	0.93 ± 0.05	-	a,b,c
α -Terpinene	1013	0.38 ± 0.03	25.05 ± 1.02	-	0.57 ± 0.03	a,b,c
<i>p</i> -Cymene	1015	84.85 ± 2.53	27.94 ± 1.52	16.51 ± 1.04	1.28 ± 0.03	a,b,c
Eucalyptol	1024	11.26 ± 0.64	-	42.89 ± 2.06	1.36 ± 0.03	a,b,c
(+)-Limonene	1025	-	17.35 ± 0.70	-	-	a,b,c
γ -Terpinene	1051	0.86 ± 0.06	1.15 ± 0.08	-	-	a,b,c
<i>p</i> -Cymenene	1075	-	-	-	0.08 ± 0.01	a,b,c
α -Terpinolene	1082	0.01 ± 0.00	-	-	-	a,b,c
Chrysanthenone	1110	-	3.39 ± 0.45	-	-	a,b,c
<i>trans-p</i> -Mentha-2-en-1-ol	1123	-	-	0.66 ± 0.05	-	a,b,c
<i>cis</i> -Limonene oxide	1126	-	1.00 ± 0.15	-	-	a,b,c
β -Terpineol	1137	-	-	1.51 ± 0.15	-	a,b,c
Terpinen-4-ol	1164	0.15 ± 0.01	-	3.35 ± 0.45	-	a,b,c
Cymen-8-ol	1169	-	-	-	1.87 ± 0.15	a,b,c
α -Terpineol	1176	0.72 ± 0.04	-	7.38 ± 0.40	-	a,b,c
Compound ^a	Kovats index (I) ^b	Percent of each component		Percent of each component		Method of identification ^c
		HS-SPME		Essential oil		
		DG ± SD	DA ± SD	DG ± SD	DA ± SD	
<i>trans-p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1176	-	-	-	10.31 ± 0.51	a,b,c
2- α -Hydroxy-1,8-cineol	1196	0.33 ± 0.04	-	4.58 ± 0.32	-	a,b,c
<i>cis</i> -Ascaridol	1206	-	21.60 ± 1.50	-	6.05 ± 0.31	a,b,c
<i>cis</i> -Carveol	1210	-	-	-	0.91 ± 0.06	a,b,c
Carvone	1214	-	-	-	6.92 ± 0.10	a,b,c
Thymol methyl ether	1215	0.23 ± 0.01	-	-	-	a,b,c
6-Oxocineole	1217	-	-	2.36 ± 0.20	-	a,b,c
Piperitone	1226	-	-	-	6.05 ± 0.31	a,b,c
Isotheaspirane	1263	-	-	0.10 ± 0.01	-	a,b,c
Thymol	1267	-	-	-	0.39 ± 0.03	a,b,c
Limonen-10-ol	1272	-	-	-	2.90 ± 0.20	a,b,c
Carvacrol	1278	-	2.51 ± 0.40	1.65 ± 0.04	15.72 ± 0.46	a,b,c
Coumarin	1392	-	-	2.78 ± 0.25	-	a,b,c
2-Phenylethyl butyrate	1412	-	-	0.33 ± 0.05	-	a,b,c
β -Caryophyllene	1421	0.32 ± 0.01	-	1.60 ± 0.26	-	a,b,c
γ -Elemene	1429	-	-	0.39 ± 0.05	-	a,b,c

Compound ^a	Kovats index (I) ^b	Percent of each component		Percent of each component		Method of identification ^c
		HS-SPME	DA ± SD	DG ± SD	Essential oil	
<i>m</i> -Mentha-3(8)-ene	1445	-	-	-	1.20 ± 0.15	a,b,c
β -Ionone epoxide	1460	-	-	-	0.95 ± 0.20	a,b,c
α -Caryophyllene	1468	-	-	0.39 ± 0.05	-	a,b,c
β -Ionone	1468	-	-	-	0.75 ± 0.15	a,b,c
β -Caryophyllene oxide	1546	-	-	4.78 ± 0.25	-	a,b,c
Geranyl tiglate	1670	-	-	-	4.85 ± 0.43	a,b,c
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one	1817	-	-	0.36 ± 0.08	0.87 ± 0.21	a,b,c
Occidol	1824	-	-	3.95 ± 0.37	-	a,b,c
<i>n</i> -Hexadecanoic acid	1951	-	-	3.26 ± 0.22	-	a,b,c
Phytol	2114	-	-	-	36.66 ± 2.36	a,b,c

(-): Compound not detected.
^aCompounds are listed in order of elution.
^bRetention index on DB-5 column.
^ca: retention time; b: retention index; c: mass spectrum.

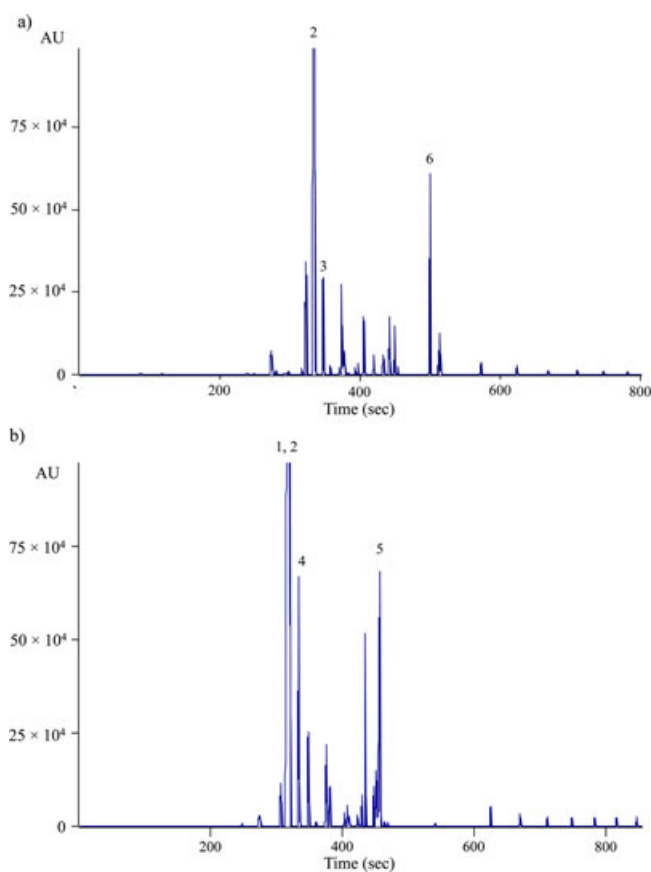


Figure 3. Total ion current chromatograms of the volatile components from (a) *D. graveolens* and (b) *D. ambrosioides* extracted using HS-SPME-GC (numbered peaks are: **1**, α -terpinene; **2**, *p*-cymene; **3**, eucalyptol; **4**, (+)-limonene; **5**, *cis*-ascaridol; **6**, β -caryophyllene).

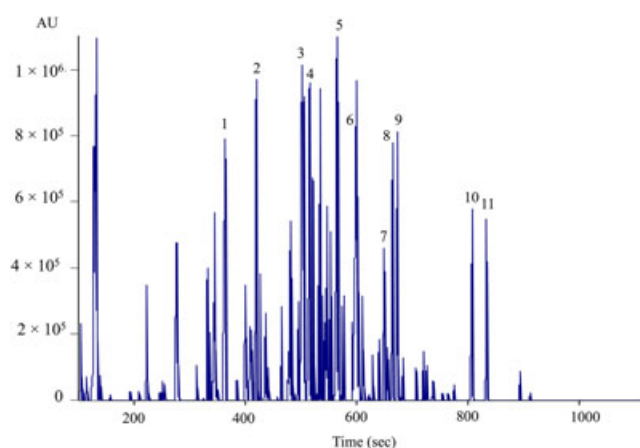


Figure 4. Total ion current chromatogram of the essential oil from *D. graveolens* extracted using hydrodistillation (numbered peaks are: **1**, *p*-cymene; **2**, eucalyptol; **3**, α -terpineol; **4**, 2- α -hydroxy-1,8-cineol; **5**, 6-oxocineole; **6**, carvacrol; **7**, coumarin; **8**, β -caryophyllene; **9**, β -caryophyllene oxide; **10**, occidol; **11**, *n*-hexadecanoic acid).

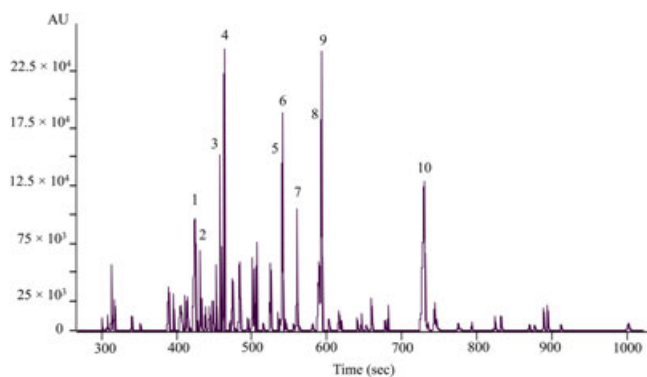


Figure 5. Total ion current chromatogram of the essential oil from *D. ambrosioides* extracted using hydrodistillation (numbered peaks are: **1**, *p*-cymene; **2**, eucalyptol; **3**, cymen-8-ol; **4**, *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol; **5**, *cis*-ascaridol; **6**, carvone; **7**, carvacrol; **8**, *m*-mentha-3(8)-ene; **9**, geranyl tiglate; **10**, phytol).

Acknowledgements

This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN-212913) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 99395). The authors wish to thank the technical assistance of Araceli Pérez-Vásquez, Margarita Guzmán and Ramiro del Carmen. H.A. acknowledges the fellowship grant CONACyT.

REFERENCES

- Adams RP. 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy*, 4th edn. Allured Publishing Corporation: Chicago.
- Bye R. 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of the Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* **40**: 103–124.
- Calzada F, Velázquez C, Cedillo-Rivera R, Esquivel B. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytother Res* **17**: 731–732.
- Camacho M del R, Sanchez B, Quiroz H, Contreras JL, Mata R. 1991. Pinocembrin: a bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. *J Ethnopharmacol* **31**: 383–389.
- Chu SS, Feng Hu J, Liu ZL. 2011. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Manag Sci* **67**: 714–718.
- Dawidowicz AL, Rado E, Wianowska D, Mardarowicz M, Gawdzik J. 2008. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta* **76**: 878–884.
- Drew DP, Rasmussen SK, Avato P, Simonsen HT. 2012. A comparison of headspace solid-phase microextraction and classic hydrodistillation for the identification of volatile constituents from *Thapsia* spp. provides insights into Guaianolide biosynthesis in Apiaceae. *Phytochem Anal* **23**: 44–51.
- Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol* **139**: 308–320.
- ICH. 2005. *Text on Validation of Analytical Procedures. Harmonized Tripartite Guideline [Q2(R1)]*. International Conference on Harmonization: Geneva; 1–13. http://www.ich.org/fileadmin/public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (accessed July 2012).
- Jardim CM, Jham GN, Dhingra OD, Freire MM. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Braz Chem Soc* **21**: 1814–1818.
- Kasali AA, Ekundayo O, Paul C, König WA, Eshilokun AO, Ige B. 2006. 1,2:3,4-Diepoxy-*p*-menthane and 1,4-epoxy-*p*-menth-2-ene: Rare monoterpenoids from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var *ambrosioides* leaves. *J Essent Oil Res* **18**: 13–15.
- Martínez M. 1989. *Las Plantas Medicinales de México*, 6th edn. Ediciones Botas: México, DF; 127, 181.
- Mata R, Navarrete A, Álvarez L, Pereda-Miranda R, Delgado G, Romo de Vivar A. 1987. Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochemistry* **26**: 191–193.
- Meckes M, Paz D, Acosta J, Mata R. 1998. The effects of chrysin and pinostrobin, two flavonoids from *Teloxys graveolens* leaves, on isolated guinea-pig ileum. *Phytomedicine* **5**: 459–463.
- Montoya-Cabrera MA, Escalante-Galindo P, Meckes-Fisher M, Sánchez-Vaca G, Flores-Alvárez E, Reynoso-García M. 1996. Fatal poisoning caused by oil of epazote, *Chenopodium graveolens*. *Gac Med Mex* **132**: 433–437.
- Monzote L, Nance MR, García M, Scull R, Setzer WN. 2011. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. *Nat Prod Commun* **6**: 281–286.
- Owolabi MS, Lajide L, Oladimeji MO, Setzer WN, Palazzo MC, Olowu RA, Ogundajo A. 2009. Volatile constituents and antibacterial screening of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. *Nat Prod Commun* **4**: 989–992.
- Righi G, Antonioletti R, Proietti Silvestri I, D'Antona N, Lambusta D, Bovicelli P. 2010. Convergent synthesis of mosloflavone, negletein and baicalein from chrysin. *Tetrahedron* **66**: 1294–1298.
- Rojas A, Hernández L, Pereda-Miranda R, Mata R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* **35**: 275–283.
- Sagrero-Nieves L, Bartley JP. 1995. Volatile constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *J Essent Oil Res* **7**: 221–223.
- Tolstikov GA, Tolstikov AG, Tolstikova OV. 1996. Natural peroxides. Chemistry and biological activity. *Russ Chem Rev* **65**: 769–783.
- WHO. 1998. *Quality Control Methods for Medicinal Plants*. World Health Organization: Geneva, Switzerland.