



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Pruebas de control de calidad de *Matricaria recutita* L. (Asteraceae)  
cultivada en el centro de México”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ROSA JENIFER MUÑOZ GÓMEZ

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA

CDMX, JUNIO DEL 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Pruebas de control de calidad de *Matricaria recutita* L. (Asteraceae)  
cultivada en el centro de México”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ROSA JENIFER MUÑOZ GÓMEZ



Ciudad de México, Junio 2018

Jurado asignado:

Presidente: M. en C. Juan Manuel Rodríguez

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Secretario: Dra. Nuria Esturau Escofet

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

-  
Q.F.B. Rosa Jenifer Muñoz Gómez  
Sustentante

-  
Dra. Rachel Mata Essayag  
Tutora

## AGRADECIMIENTOS.

- Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, que mediante el Programa de Maestría en Ciencias Químicas, me permitió continuar y ampliar mi formación académica y profesional.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría con el número de becario (608747).
- Al CONACyT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (219765) y DGAPA-UNAM (217516).
- A los miembros del jurado asignado, por sus valiosos comentarios y acertadas observaciones.
- A la Dra. Rachel Mata, le agradezco infinitamente por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, gracias por ser una tutora excelente y brindarme su apoyo incondicional, por ser un ejemplo a seguir.
- A la Dra. Isabel Rivero Cruz, gracias por su valiosa asesoría y ayuda incondicional. Gracias por confiar en mí y darme valiosos consejos que han marcado mi vida académica y personal. Por ser un ejemplo a seguir, por su dedicación y su valiosa amistad que me ha brindado.
- A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su asesoría técnica relevante durante el desarrollo de este proyecto de investigación.
- A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes, por su asesoría técnica que fue significativa en este trabajo.
- Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su invaluable asesoría durante la realización de las pruebas de identidad en este proyecto de investigación.

- A la Dra. Nuria Esturau Escofet, por su valiosa asesoría en la realización de los experimentos de RMN-<sup>1</sup>H y CPMG-<sup>1</sup>H.
- A la empresa Perkin-Elmer, por su colaboración en la realización de las pruebas de identidad por DSA-HR-APCI-MS.
- Al M. en C. Rafael Torres, investigador del Instituto de Biología, por realizar la identificación del material vegetal utilizado en el presente estudio.
- A mis compañeros del Laboratorio 124 por su apoyo incondicional.

## INDICE.

LISTA DE FIGURAS.	i
LISTA DE TABLAS.	iii
LISTA DE CUADROS.	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.	v
RESUMEN.	vii
ABSTRACT.	ix
1. ANTECEDENTES.	2
1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie <i>Matricaria recutita</i> .	2
1.2 Composición química de <i>Matricaria recutita</i> L.	7
1.3 Consumo global de <i>Matricaria recutita</i> L.	12
1.4 Manzanilla en México y su comercialización.	14
1.5 Control de calidad de la manzanilla.	15
2. JUSTIFICACIÓN.	19
3. OBJETIVOS.	22
4. PARTE EXPERIMENTAL.	23
4.1 Material vegetal.	23
4.2 Muestras comerciales.	23
4.3 Preparación de las muestras.	25
4.3.1 Preparación de los extractos acuosos.	25
4.3.2 Preparación de las fracciones de AcOEt.	26
4.4 Pruebas de Identidad.	26
4.4.1 Identificación de la xantocilina (21) y el 7- <i>O</i> -glucósido de apigenina (1) por cromatografía en capa fina (CCF).	26
4.4.2 Identificación de la xantocilina (21) utilizando DSA-HR-APCI-MS.	27
4.4.3 Identificación de la xantocilina (21) en los extractos acuosos y las fracciones de AcOEt utilizando resonancia magnética nuclear (RMN).	28
4.5 Prueba de composición.	29
4.5.1 Desarrollo del perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt de <i>M. recutita</i> .	29
4.5.2 Validación del método analítico para cuantificar a la xantocilina (21).	30
4.5.2.1 Linealidad del sistema.	30
4.5.2.2 Linealidad del método y exactitud.	31
4.5.2.3 Precisión del sistema.	32
4.5.2.4 Cuantificación de la xantocilina (21) en diferentes muestras de manzanilla.	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
5.1 Identificación botánica de la especie.	33
5.2 Preparación de las muestras.	34
5.3 Pruebas de identidad.	36

5.3.1 Cromatografía en capa fina.	37
5.3.2 Espectrometría de masas.	39
5.3.3 Resonancia magnética nuclear.	41
5.4 Prueba de composición.	45
5.4.1 Desarrollo de un método analítico apropiado para cuantificar a la xantocilina (21) en la droga cruda de <i>M. recutita</i> .	45
5.4.1.1. Validación del método analítico.	49
5.4.1.1.2 Linealidad del sistema.	49
5.4.1.1.3 Linealidad y exactitud del método.	50
5.4.1.1.3.1 Linealidad del método.	50
5.4.1.1.3.2 Exactitud del método.	53
5.4.1.1.4 Precisión del sistema.	54
5.4.1.1.5 Cuantificación de la xantocilina (21) en diferentes muestras de manzanilla por CLUE-ESI/EM.	55
6. CONCLUSIONES.	57
7. PERSPECTIVAS.	59
8. BIBLIOGRAFÍA.	60
9. ANEXOS.	64

---

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Flores de <i>Matricaria recutita</i> L. Imagen editada de Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, 2003.	4
Figura 2. Manzanilla ( <i>Matricaria recutita</i> L.). (Fuchs, L. [1543], imagen editada de Chamomile Industrial Profiles, 2004).	4
Figura 3. Principales actividades farmacológicas de las flores de <i>Matricaria recutita</i> L.	6
Figura 4. 7- <i>O</i> -glucósido de apigenina (1).	8
Figura 5. Componentes principales reportados en el extracto de <i>Matricaria recutita</i> L.	10
Figura 6. Componentes principales reportados en el aceite esencial de <i>M. recutita</i> L.	11
Figura 7. Cultivos de manzanilla en diferentes regiones del mundo.	12
Figura 8. Diversidad en la venta de té de manzanilla en un famoso centro comercial del país.	14
Figura 9. Países con regulaciones nacionales sobre el uso de la droga cruda de <i>M. recutita</i> .	17
Figura 10. Xantocilina (21).	21
Figura 11. Diagrama del procedimiento experimental de la preparación de muestras.	25
Figura 12. Muestra de referencia botánica de la especie medicinal (Mz18) de la especie (No. de voucher 1471891).	34
Figura 13. Cromatograma en capa fina de los compuestos 21 y 1 en diferentes muestras de manzanilla ( $\lambda=254$ nm). Xantocilina (21), 7- <i>O</i> -glucósido de apigenina (1), muestras comerciales (B <sub>Mz1</sub> -B <sub>Mz17</sub> ) y muestra de referencia (B <sub>Mz18</sub> ). Sistema de elución AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (85:12:3).	38
Figura 14. Cromatograma en capa fina revelado con AlCl <sub>3</sub> y observada en la longitud de onda de 365 nm, para la identificación de los compuestos 21 y 1. Xantocilina (21), 7- <i>O</i> -glucósido de apigenina (1), muestras comerciales (B <sub>Mz1</sub> -B <sub>Mz17</sub> ) y muestra de referencia (B <sub>Mz18</sub> ). Sistema de elución AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (85:12:3).	38
Figura 15. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 25°C) de la muestra de referencia (B <sub>Mz18</sub> ).	42
Figura 16. Comparación de los espectros de <sup>1</sup> H-RMN (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 25°C) de todas las matrices de AcOEt (B <sub>Mz1</sub> - B <sub>Mz18</sub> ).	43
Figura 17. Apilamiento de los espectros de <sup>1</sup> H-RMN (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 25°C) de todas las matrices del extracto acuoso (A <sub>Mz1</sub> - A <sub>Mz18</sub> ).	44
Figura 18. Apilamiento de los espectros de <sup>1</sup> H-CPMG (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 25°C) de todas las matrices del extracto acuoso (A <sub>Mz1</sub> - A <sub>Mz18</sub> ).	45

Figura 19. Cromatograma de corriente iónica total (TIC) identificando a los picos en una relación masa-carga de la (A) xantocilina (21) 197.5 [M+H] <sup>+</sup> , (B) 7- <i>O</i> -glucósido de isoramnetina (22) 477.5 [M-H] <sup>-</sup> , (C) 7- <i>O</i> -glucósido de apigenina (1) 431.5 [M-H] <sup>-</sup> y (D) perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda= 285$ ) de la fracción de AcOEt de <i>M. recutita</i> .	47
Figura 20. Espectro de masas de la xantocilina (21) obtenido mediante la técnica de electrospray en modo positivo [ESI] <sup>+</sup> .	48
Figura 21. 7- <i>O</i> - glucósido de isoramnetina (22).	48
Figura 22. Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico por [ESI] <sup>+</sup> .	50
Figura 23. Gráfica de la linealidad del método para la xantocilina (21).	52
Figura 24. A) Perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt de la muestra comercial B <sub>Mz10</sub> ( $\lambda=285$ nm). B) Cromatograma de corriente iónica total modo positivo para identificar a la xantocilina (21) ( $t_R$ 4.82 min).	56

## LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Nombres comunes de <i>Matricaria recutita</i> L. alrededor del mundo.	3
Tabla 2. Principales constituyentes de la droga cruda de <i>Matricaria recutita</i> L. y sus actividades biológicas.	9
Tabla 3. Farmacopeas que contienen a la monografía de las flores de <i>Matricaria recutita</i> L.	17
Tabla 4. Identificación de las muestras comerciales.	24
Tabla 5. Rendimientos de los extractos acuosos secos ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz18}$ ) y fracciones de AcOEt ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ) obtenidos a partir de las distintas muestras de manzanilla.	35
Tabla 6. Compuestos identificados en las fracciones de AcOEt de <i>M.recutita</i> y muestras comerciales utilizando DSA-HR-APCI-MS en modo positivo.	40
Tabla 7. Datos espectroscópicos de $^1\text{H-RMN}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $25^\circ\text{C}$ ) de la xantocilina ( <b>21</b> )	41
Tabla 8. Parámetros estadísticos de la linealidad del sistema del compuesto <b>21</b> .	49
Tabla 9. Resultados experimentales para la evaluación de la linealidad del método.	51
Tabla 10. Parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad de método.	52
Tabla 11. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la xantocilina ( <b>21</b> ) por $[\text{ESI}]^+$ .	53
Tabla 12. Repetibilidad del método para la cuantificación de xantocilina ( <b>21</b> ).	54
Tabla 13. Cuantificación de xantocilina ( <b>21</b> ) por CLUE-ESI/EM en varias muestras de manzanilla.	55

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas para la CCF.	27
Cuadro 2. Condiciones cromatográficas del método analítico por CLUE-EM.	29
Cuadro 3. Gradiente de elución utilizado para el desarrollo de los perfiles cromatográficos.	30

## LISTA DE ABREVIATURAS.

ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
CH <sub>3</sub> -CN	Acetonitrilo
CCF	Cromatografía de capa fina
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía de líquidos
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLUE-EM	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas
cm	Centímetro
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CV	Coeficiente de variación
d	Doblete
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de masas
EP	European Pharmacopoeia
ESCOP	European scientific cooperative on phytotherapy
ESI	Ionización por electrospray
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	gramo
HR	Alta resolución
hr	Hora
ICH	International Conference on Harmonisation
kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
°C	Grado centígrado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
r	Coeficiente de correlación

$r^2$	Coeficiente de determinación
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- $^1\text{H}$	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
$t_R$	Tiempo de retención
TSP	Ácido trimetilsililpropanoico
USP	United States Pharmacopeia
$\bar{x}$	Promedio aritmético
$\beta_0$	Ordenada al origen
$\beta_1$	Pendiente
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMEN.

La flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.) es una planta medicinal introducida a nuestro país a partir del descubrimiento de América. Hoy en día, es una de las plantas medicinales más consumidas bajo la forma de infusión y/o aceite esencial. La monografía farmacopéica actual de la droga cruda de la planta que se cultiva en México es una fiel copia de la publicada en la Farmacopea Europea. De acuerdo a observaciones previas a este estudio, esta monografía no es apropiada para el control de calidad del aceite esencial y droga cruda derivados de esta importante planta medicinal. Con base en estas consideraciones, en el presente trabajo de tesis, se desarrollaron pruebas de identidad y composición para el control de calidad de la manzanilla cultivada en nuestro país. Se propone a la xantocilina (21) como compuesto marcador. Se proponen ensayos de identidad por tres técnicas diferentes: cromatografía en capa fina (CCF), espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN); en todos los casos se analizaron 17 marcas comerciales y una de referencia, mediante la preparación de dos matrices de trabajo; el extracto acuoso seco y la fracción de AcOEt derivada de la infusión. Esta última, fue la más adecuada para los ensayos de identidad y composición.

La prueba de identidad por la técnica ionización química a presión atmosférica (APCI) evidenció la presencia de la xantocilina (21) en todas las muestras evaluadas, sin embargo por las técnicas de CCF y RMN no se identificó la presencia del marcador en las muestras extranjeras.

Para el ensayo de composición, se generó un perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt derivada de la infusión de *M. recutita* por cromatografía de líquido de ultra-eficiencia acoplada a espectrometría de masas por ionización de tipo "electrospray" (CLUE-ESI/EM); en este perfil se identificó la presencia de la xantocilina (21) y de los flavonoides 7-*O*-glucósido de apigenina (1) y 7-*O*-glucósido de isoramnetina (22). Posteriormente, se validó un método analítico por CLUE-ESI/EM para cuantificar el contenido de xantocilina (21) en

las 18 muestras problema. El método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas. Al aplicar el método en todas las muestras se encontró que el contenido del marcador fue mucho mayor en las muestras de origen mexicano que en las cultivadas en Europa o Estados Unidos. Cabe señalar que no se realizó un diseño de experimentos y que se siguieron los protocolos establecidos en la organización mundial de la salud para cuantificar marcadores, activos o no, de plantas medicinales (OMS, 2011).

Los resultados generados constituyen pruebas de identidad química y composición para el control de calidad de la droga cruda de *M. recutita* y será de utilidad para la actualización de la monografía de la droga cruda en 3ª edición de la FHEUM. La generación de este documento permitirá establecer el control de calidad riguroso de esta especie cultivada en México.

## ABSTRACT.

*Matricaria recutita* L. is a medicinal plant brought to Mexico by the Spanish conquerors. Nowadays, it is one of the medicinal plants most consumed in the country. The monograph currently used for quality control of the crude drug of chamomile and its essential oil are not suitable for the plant grown in Mexico. According to a preliminary analysis, the chemical composition of the oil and crude drug from Mexico showed some differences, albeit partial, with the European and American plant material. Thus, there is an urgent need to develop suitable procedure for quality control of Mexican chamomile.

In this work, some identity tests are proposed for the crude drug using xanthoxylin (**21**) as the marker compound. The tests were performed with three different techniques: thin layer chromatography (TLC), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Seventeen commercial brands and one reference material were analyzed. Two working matrices were proposed: The dry aqueous extract and the EtOAc fraction derived from the infusion. The latter was the most appropriate for the identity and composition tests.

The identity test by MS used atmospheric pressure chemical ionization (APCI) technique in positive mode. In all samples, this technique detected the presence of xanthoxylin (**21**). The TLC and NMR techniques did not allow identification of this marker in the foreign samples but in the Mexican ones, reinforcing the proposal of xanthoxylin (**21**) as the marker compound for the plant growing in central Mexico.

For the composition test, a chromatographic profile of the EtOAc fraction of the infusion of *M. recutita* using ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-ESI / MS) was developed; the chromatographic profile of the reference sample revealed the presence of xanthoxylin (**21**) and flavonoids apigenin 7-*O*-glucoside (**1**)

and isorhamnetin 7-*O*-glucoside (22). The method was validated to quantify the content of xanthoxylin (21) in all samples; it was selective, linear, exact and precise in the range of concentrations evaluated. The results of all testing revealed that the content of the marker was much higher in the Mexican samples than in those cultivated in Europe or the United States. WHO methodology was followed for the analytical validation. This procedure did not imply experimental design.

The overall results will be useful for the integration of a suitable monograph for the crude drug of Mexican chamomile, which could be included in the 3rd edition of the Mexican Herbal Pharmacopeia.

## 1. ANTECEDENTES.

### 1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie *Matricaria recutita*.

*Matricaria recutita* L. (syn. *Matricaria chamomilla*, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), comúnmente conocida como manzanilla alemana, es una planta medicinal y aromática importante a nivel global de la familia de las margaritas (Asteraceae). El nombre Chamomile se deriva de dos palabras griegas: Khamai que significa "en el suelo" y melón que significa "manzana". La planta se conoce con numerosos nombres comunes que varían de acuerdo a la región geográfica como se resume en la **Tabla 1**.

*Matricaria recutita* es una planta herbácea de 10 a 50 cm de altura, con tallos erectos, ramificados y alternados, tiene una raíz delgada y fusiforme. Sus hojas son largas estrechas bi o tripinadas. La flor es un receptáculo hueco cónico (6 a 8 mm ancho). La cabezuela, se extiende de 10 a 17 mm de diámetro y está formada por florecillas sésiles o semisésiles que surgen sobre el receptáculo, puede llegar a tener hasta 20 florecillas liguladas marginales y muchos floretes tubulares. Comparativamente, *M. recutita* tiene las cabezuelas florales más pequeñas que la manzanilla inglesa. Las cabezuelas están separadas y tienen un diámetro de 10 a 30 mm, son pedunculadas y heterógamas. Los floretes tubulares amarillos dorados con cinco dientes miden de 1.5 a 2.5 mm de largo, terminando siempre en un tubo glandular. Las flores liguladas de la planta son de 6 a 11 mm de largo, 3.5 mm de ancho, y están dispuestas concéntricamente (**Figura 1**). Tiene un sabor amargo y aromático, pero el olor suele ser más débil que el de la manzanilla romana. Los frutos en forma de aquenio son marrón amarillento (**Figura 2**) (Fajemiroye *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2011; Wichtl, 2003). La planta es originaria de la península de los Balcanes, desde donde se extendió por el resto del mundo, principalmente Europa y las zonas templadas de Asia. Se ha adaptado a todas las zonas templadas del globo, ya que es una planta resistente al sol, el frío, los suelos pobres en nutrientes y otras condiciones edafológicas desfavorables.

Tabla 1. Nombres comunes de *Matricaria recutita* L. alrededor del mundo.

Nombre común	País o países
Babounag	Egipto
Babuna	India
Babunah	Persia
Babunaj	Países Arábigos
Babunj	Túnez
Babunphul	India
Bachati	Nicaragua
Bahboonig	África
Calamido	Francia
Camamilla	España
Camomiha	Francia
Camomile	Alemania
Camomilha	Brasil
Camomilla comune	Italia
Camomilla	Colombia e Italia
Camomirra	Italia
Campomilla	Italia
Chamomile	Argentina, Alemania, Inglaterra, Estonia, India y Japón
Chamomille	México y Nicaragua
Chrysanthemum	Alemania
Chamomile English	Japón
Chamomile German	Estados Unidos y Rusia
German Chamomille	Inglaterra
Herba de la mera	Francia
Hungarian Chamomile	Estados Unidos
Kamille	Francia y Noruega
Kamitsure	Japón
Kamiture	Japón
Manzanilla chiquita	Colombia
Manzanilla Cimarrona	Argentina
Manzanilla común	Colombia
Manzanilla dulce	Colombia
Manzanilla romana	Colombia
Manzanilla	Argentina, Bolivia, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Perú
Manzilla	Guatemala
Matricaire	Francia y Túnez
Matricaris	Francia
Papatya	Turquía
Pin heads	Europa
Sweet Feverfew	Inglaterra
Wild Chamomile	Alemania
Yumancek Kamilkovy	Eslovaquia

(Franke, 2005; Ross, 2001; Singh *et al.*, 2011).



El uso medicinal de esta planta se remonta a las civilizaciones antiguas. Así, los egipcios consideraban a la planta como un regalo sagrado del Dios del sol ya que sus flores eran útiles contra la fiebre alta y el golpe de calor. Pero fueron los griegos quienes describieron con detalle el poder curativo de la manzanilla como se puede apreciar en las obras de Hipócrates, Plinio, Dioscórides y Galeno.

Hoy en día, la manzanilla es la planta medicinal más utilizada a nivel global; los europeos en general la consideran como la "cura todo"; en Alemania se refieren a ella como "alles zutraut", que significa "capaz de cualquier cosa"; los ingleses la consideran una de las nueve hierbas sagradas que Dios ha dado a los humanos (Fajemiroye *et al.*, 2016, Franke-Schilcher, 2004, Šalamon, 2004, Singh *et al.*, 2011). Un viejo refrán popular en Eslovaquia señala: "*Un individuo siempre debe inclinarse ante los poderes curativos del té de flores de manzanilla*".

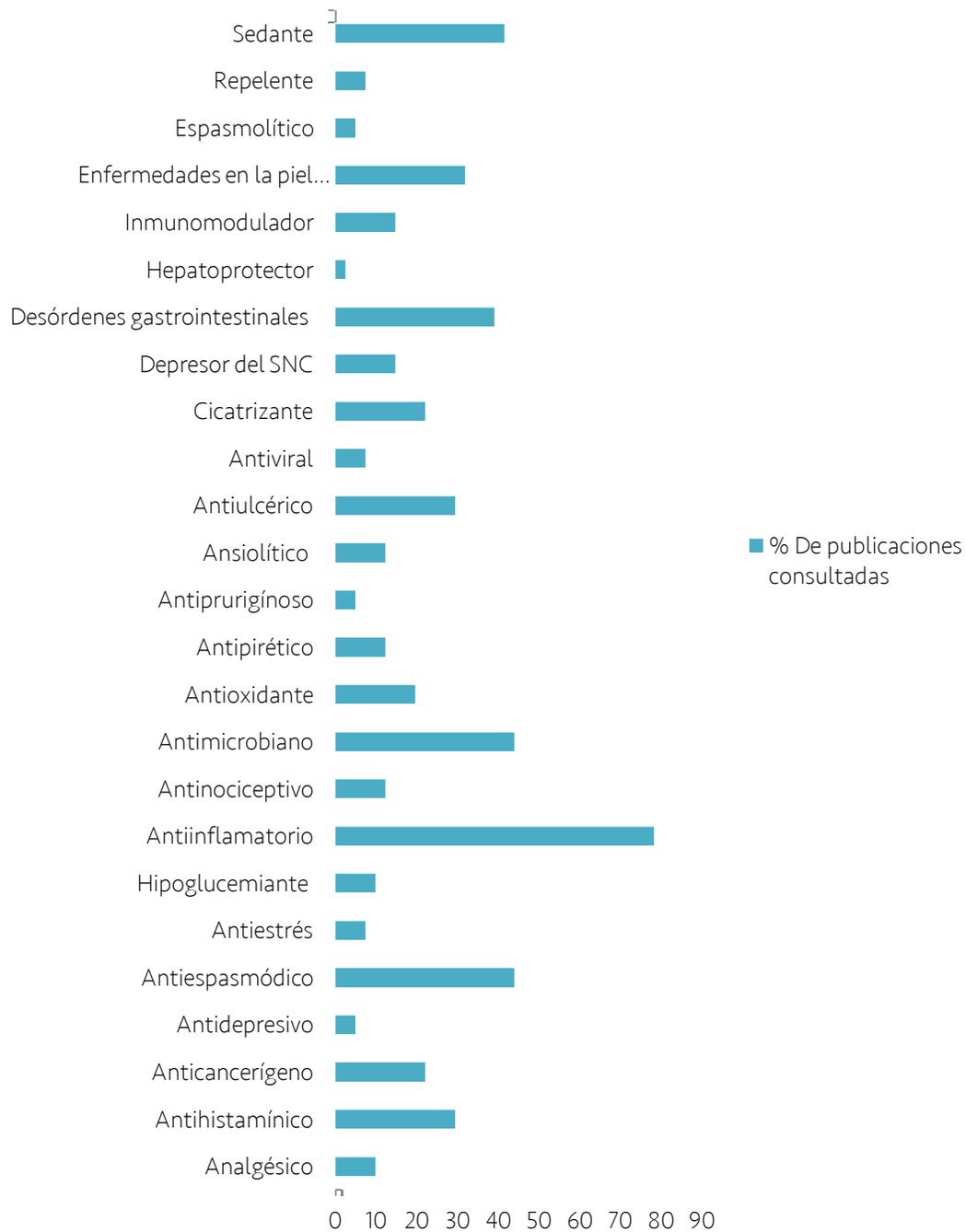
Con relación a los estudios clínicos de las flores de manzanilla, en el 2003, Schmidt determinó que el aceite esencial se puede utilizar para el tratamiento de la dermatitis atópica (Schmidt, 2003). Langhorst y colaboradores comprobaron la seguridad y la eficacia de un preparado medicinal, que contenía manzanilla y otras drogas vegetales para tratar la colitis ulcerosa (Langhorst *et al.*, 2013). Por otro lado, se comprobó el efecto hipnótico de la gelatina y/o extracto estandarizado de manzanilla para personas con problemas en la conciliación del sueño (Kakuta *et al.*, 2007; Zick *et al.*, 2011). Finalmente, otro estudio clínico demostró el efecto ansiolítico y la reducción de los estados de estrés por la inhalación de los vapores del aceite esencial (Roberts-Williams, 1992).

Las propiedades medicinales comprobadas a la droga cruda se resumen en **Figura 3**. Para mayor detalle el lector interesado puede consultar el libro de texto *Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Chamomile Medicinal, Biochemical, and Agricultural Aspects Volumen 13* (Hardman. 2015) y algunas revisiones recientes publicadas en revistas especializadas (Fajemiroye *et al.*, 2016; Franke, 2005; Ross, 2001; Singh *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2009).

Figura 3. Principales actividades farmacológicas de las flores de *Matricaria recutita* L.

□

### Principales actividades de la droga cruda *M. recutita*



## 1.2 Composición química de *Matricaria recutita* L.

Numerosas referencias bibliográficas describen la composición química de la droga cruda de *M. recutita*. A la fecha, más de 120 constituyentes químicos han sido identificados incluyendo 28 terpenoides, 36 flavonoides y 52 compuestos adicionales con una importante actividad farmacológica (**Tabla 2**) (Haghi *et al.*, 2014; Rubiolo *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

Algunos de los compuestos mayoritarios encontrados tanto en el aceite esencial como en los extractos de la droga cruda han sido extensamente utilizados en diferentes formulaciones medicinales, como aromatizantes, perfumes y cosméticos. El aceite esencial se obtiene de las flores a través de un proceso de hidrodestilación mientras que el extracto mediante la técnica de maceración utilizando disolventes polares tales como etanol, acetato de etilo y agua, entre otros (Hardman, 2015).

Los compuestos fenólicos bioactivos presentes en los extractos de las flores de manzanilla incluyen cumarinas como la herniarina, la umbeliferona y la esculetina; fenilpropanoides como los ácidos clorogénico y caféico y los flavonoides como la apigenina, 7-*O*-glucósido de apigenina, luteolina y el 7-*O*-glucósido de la luteolina (flavonas), quercetina y rutina (flavonoles) y naringenina (flavanona) (**Figuras 4-5**) (Fajemiroye *et al.*, 2016; Haghi *et al.*, 2014; Hardman 2015; Kato *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011).

El aceite esencial de las flores de manzanilla contiene terpenoides bioactivos, principalmente a los sesquiterpenoides  $\alpha$ -bisabolol, óxidos de  $\alpha$ -bisabololes A y B, camazuleno,  $\beta$ -farneseno, y lactonas sesquiterpénicas como la matricina. Otros compuestos encontrados en menor cantidad son los espiroéteres *cis*- y *trans*-dicroéteres. El rendimiento del aceite esencial de las flores es de aproximadamente un 0.4% (**Figura 6**) (Hardman, 2015; Kato *et al.*, 2008).

El 7-*O*-glucósido de apigenina es un compuesto polifenólico perteneciente a la categoría de las flavonas y es considerado como el marcador para el control de calidad y estandarización de preparados a base de *M. recutita*. Varios reportes, indican que el 7-*O*-glucósido de apigenina posee una variedad de actividades biológicas como se indica en la **Tabla 2**.

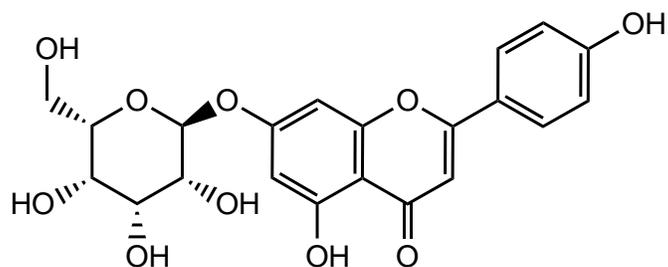


Figura 4. 7-*O*-glucósido de apigenina (1).

**Tabla 2.** Principales constituyentes de la droga cruda de *Matricaria recutita* L. y sus actividades biológicas.

Nombre	Actividades
7- <i>O</i> -glucósido de apigenina (1)	Anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, antiviral y pro- o antimutagénico.
Herniarina (2)	Analgésico, anticancerígeno, antimicrobiano y espasmolítico.
Umbeliferona (3)	Analgésico, anticoagulante, antifúngico, antihelmíntico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antiulcérico, estrogénico, fungistático, hipnótico, hipotérmico y sedante.
Esculetina (4)	Anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, antipatógeno, neuroprotector y protector vascular.
Ácido caféico (5)	Antihipertensivo, antiisquémico, antioxidante, antitumoral y antiviral.
Ácido clorogénico (6)	Anticancerígeno, antidiabético, antiinflamatorio, antilipídémico, antioxidante, cardiovascular, hepatoprotector y renoprotector.
Apigenina (7)	Anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, antiviral, ansiolítico, fitoestrógeno, pro- o anti-mutagénico y sedante.
Luteolina (8)	Anticancerígeno, antidiabético, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante y fitoestrógeno.
Quercetina (9)	Antiaterosclerótico, antihipercolesterolémico, antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante, fitoestrógeno y vasodilatador.
Naringenina (10)	Antidiabético, antiinflamatorio y antioxidante.
Rutina (11)	Anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, cardioprotector, citoprotector, neuroprotector y vasoprotector.
7- <i>O</i> -glucósido de luteolina (12)	Antidiabético, antiinflamatorio y antioxidante.

(Anand *et al.*, 2016; Begum *et al.*, 2010; Fajemiroye *et al.*, 2016, Franke-Schilcher, 2004; Ganeshporkar and Saluja, 2016; Hardman, 2015; Henrique *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2004; Lázaro 2009; Liang *et al.*, 2017; Maalik *et al.*, 2016; Šalamon, 2004; Singh *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2009; Tomaya *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016).

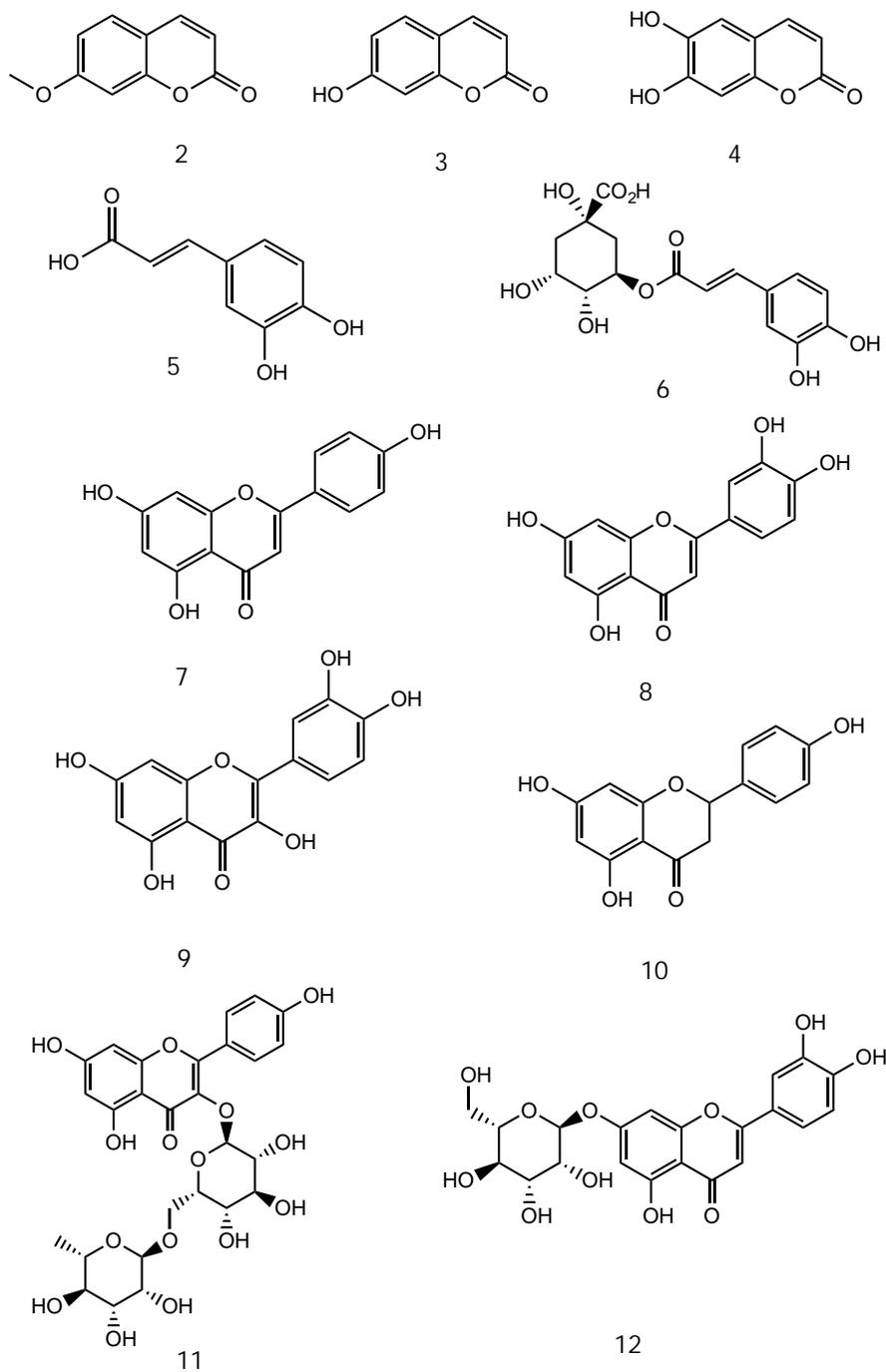


Figura 5. Componentes principales reportados en el extracto de *Matricaria recutita* L. Herniarina (2), umbeliferona (3), esculetina (4) ácido caféico (5), ácido clorogénico (6), apigenina (7), luteolina (8), quercetina (9), naringenina (10), rutina (11) y 7-*O*-glucósido de luteolina (12).

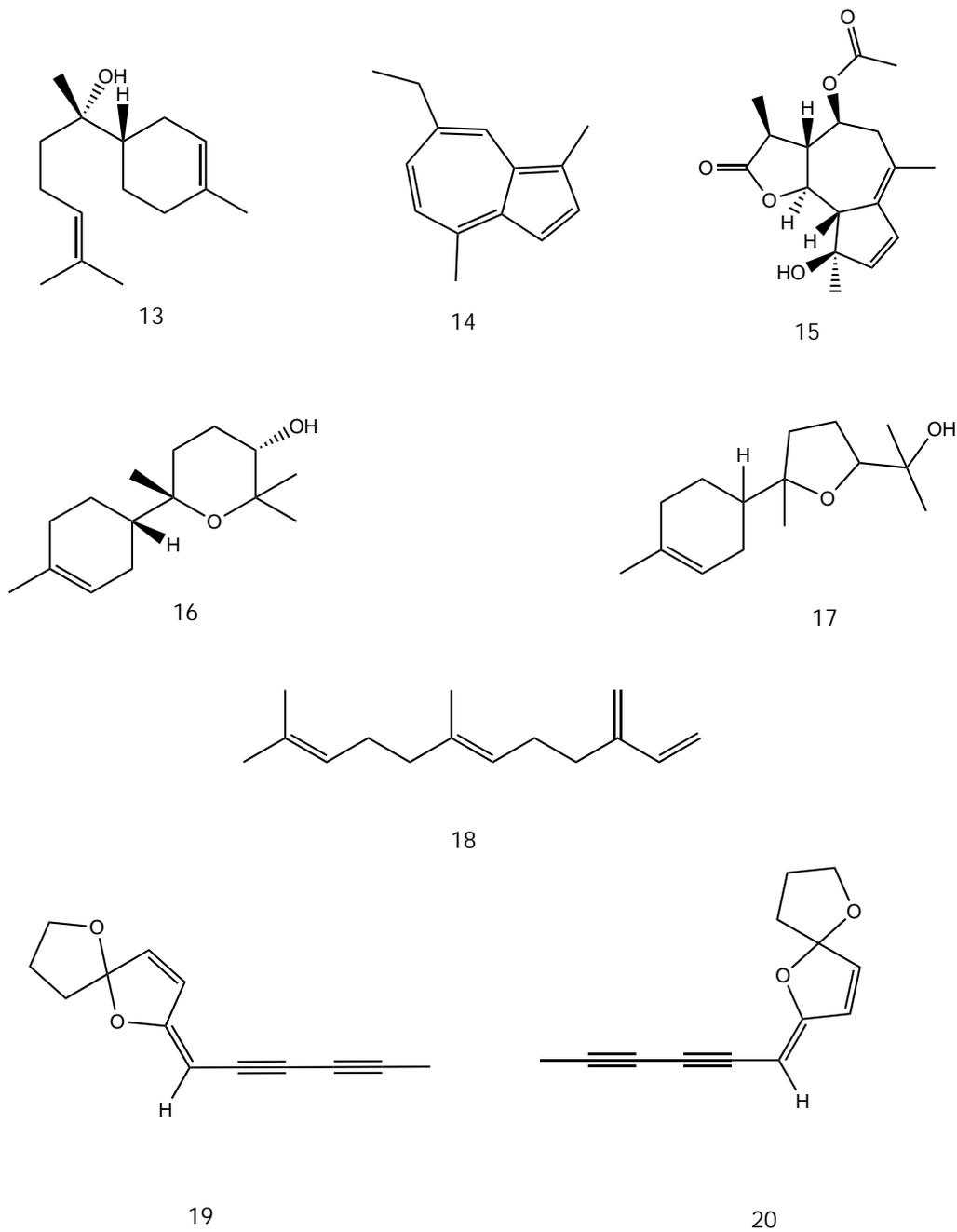
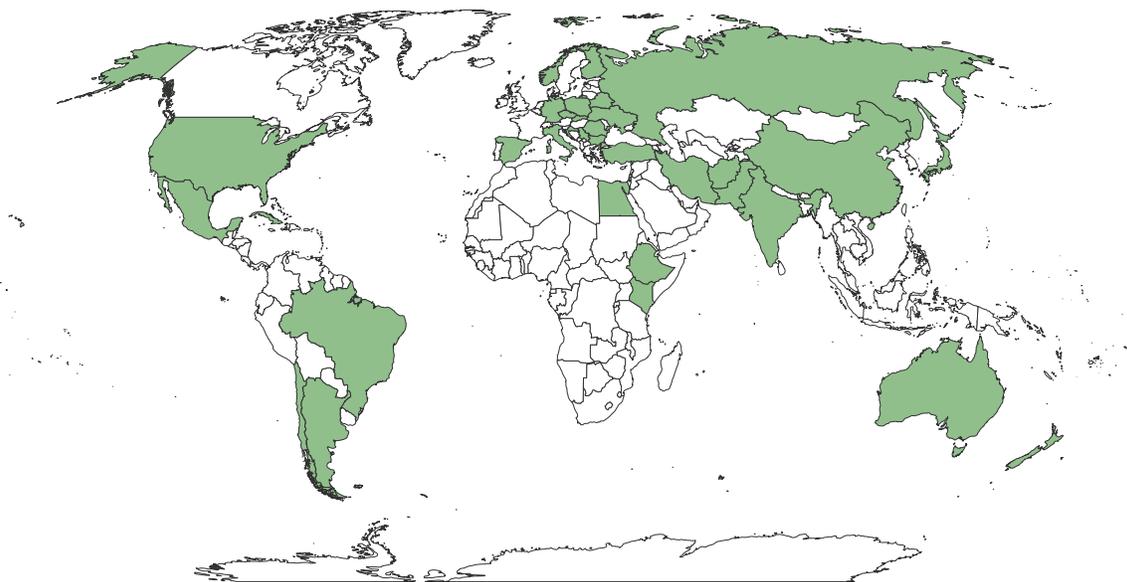


Figura 6. Componentes principales reportados en el aceite esencial de *M. recutita* L.  $\alpha$ - bisabolol (13), camazuleno (14), matricina (15), óxido de  $\alpha$ -bisabolol A (16), óxido de  $\alpha$ -bisabolol B (17),  $\beta$ -farnesano (18), *trans*-dicycloéter (19) y *cis*- dicycloéter (20).

### 1.3 Consumo global de *Matricaria recutita* L.

La manzanilla es una hierba medicinal nativa del Sur y Este de Europa. Se cultiva en Europa y la antigua URSS (Bielorrusia, Ucrania, Moldavia), desde Cáucaso Norte a Siberia del Sur, África del Norte y Oriental (Egipto, Etiopía), Asia (Turquía, Afganistán, Pakistán, India del Norte y Japón), América del Norte (Costa Este de los Estados Unidos), América del Sur (Argentina y Brasil), Cuba y Nueva Zelanda (**Figura 7**). Hungría es el principal productor de la biomasa de la planta, en consecuencia la producción de manzanilla es una fuente de ingresos importante para la zona ya que sus flores se exportan a diferentes lugares de Europa. La demanda internacional de manzanilla y su consumo bajo la forma de infusión y/o aceite esencial ha sido creciente. El éxito de la comercialización de cultivos de *M. recutita* radica en la eficiencia del proceso de la recolección de las flores en el escenario correcto; es decir, durante el pico de floración, temporada que se extiende durante un período de tres a seis semanas durante los meses de marzo y abril (Fajemiroye *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Cultivos de manzanilla en diferentes regiones del mundo.

*M. recutita*, es una de las plantas medicinales más documentadas en todo el mundo y los productos preparados a base de la planta han creado numerosas patentes con gran impacto en el mercado internacional. Estas patentes corresponden a medicamentos orales y tópicos, artículos de salud y belleza, alimentos, bebidas, productos veterinarios, herbicidas y pesticidas. Según la información disponible, estas patentes han sido otorgadas desde el siglo XIX y la mayoría de ellas pertenecen a los Estados Unidos de América, Europa, Japón, Corea, Rusia e India. Esto ha motivado a más empresarios a iniciar el cultivo de la manzanilla y/o producir productos a base de manzanilla con un valor agregado en el futuro (Hardman, 2005; Šalamon, 2004; Singh *et al.*, 2011).

#### 1.4 Manzanilla en México y su comercialización.

Por cientos de años *M. recutita* formó parte de la herbolaria tradicional de pueblos europeos y asiáticos; después del descubrimiento de América los españoles la trajeron a Iberoamérica incorporándola a la herbolaria indígena precedida por una lista de estimadas propiedades curativas. La manzanilla hoy en día, es una de las plantas más valoradas en la medicina popular de México a lo largo y ancho de la República.

En México, la manzanilla se cultiva en huerto y gracias a su naturaleza adaptativa; crece con facilidad en sitios dominados por climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. El cultivo y comercialización de *M. recutita* se ha visto favorecidos por su alto consumo en las prácticas médicas alternativas. La sencillez de su cultivo, los bajos costos de inversión y sus propiedades aromáticas y cosméticas, son un aliciente para muchos campesinos locales que la alternan con sus cultivos tradicionales. En la actualidad, el comercio de la manzanilla se ha expandido notablemente por su gran valor industrial y su demanda en virtud de sus innumerables propiedades medicinales y cosméticas (Figura 8) (Escobar, 2008; Hardman, 2015).



**Figura 8.** Diversidad en la venta de tés de manzanilla en un famoso centro comercial del país.

## 1.5 Control de calidad de la manzanilla.

Los medicamentos obtenidos de plantas medicinales son ampliamente utilizados en diversas partes del mundo. Por este motivo, es necesario asistir a las autoridades sanitarias con información actualizada y autorizada para establecer la seguridad, eficacia, y pruebas para el control de calidad de las plantas más comercializadas. Esta información constituye la base para la integración de monografías farmacopéicas y/o tipo Organización Mundial de la Salud (OMS) de las especies que indudablemente constituyen una herramienta fundamental para la regulación del comercio de las drogas crudas y sus derivados (Liang *et al.*, 2004; OMS, 1999).

Para asegurar la identidad, la pureza y la composición de los insumos de origen vegetal que se utilizan para la fabricación de medicamentos, es necesario el desarrollo de metodologías específicas. Estos ensayos, se realizan a través de una comparación de las características botánicas, químicas, y hasta genéticas de materiales de referencia autenticados (ARM) o bien estándares de referencia. Durante el análisis de las materias primas, los ARM, también se someten a las mismas pruebas de análisis (OMS, 1999).

Las pruebas de pureza permiten garantizar que el material vegetal se encuentre libre de diversos contaminantes (microorganismos, radioactividad, metales pesados, residuos de plaguicidas, insectos, piedras, arena y todo aquello que no forma parte de la materia prima). Estos ensayos son de carácter general y están descritos en las farmacopeas y directrices de la OMS (OMS, 2007).

La identificación botánica de una especie medicinal requiere de personal capacitado (botánico). Este proceso debe realizarse en el hábitat natural o bien en el campo de cultivo. Alternativamente, una muestra representativa de la colecta se debe identificar por comparación con una muestra botánica de referencia que se encuentre almacenada en un herbario. Una vez realizada la identificación botánica se lleva a cabo la identificación

química para confirmar la autenticidad del insumo herbolario. En la identificación química se emplean procedimientos espectroscópicos (UV, IR, RMN) o cromatográficos (CG, CL, CLAE, CLUE) para detectar la presencia de compuestos activos y/o marcadores específicos de la planta, y también de perfiles cromatográficos o espectroscópicos (huellas dactilares) comparativos con aquellos de un estándar de referencia. Los métodos analíticos seleccionados para detectar huellas digitales deben ser capaces de identificar el mayor número de componentes posibles. En ocasiones, es mejor utilizar varios métodos analíticos. También existen las pruebas de identidad genéticas que consisten en el análisis de los marcadores moleculares, los cuales son únicos, estables y específicos para cada especie, y no están influenciados por la edad, y factores fisiológicos o ambientales.

Las pruebas de composición consisten en la cuantificación de los principios activos, si estos son conocidos, o de los marcadores en las drogas crudas y/o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados de utilidad para la elaboración de los preparados herbolarios (Kinara *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2004; OMS, 1999).

En México, a pesar de la gran tradición en el uso de plantas medicinales existe una carencia notable de estándares para realizar el control de calidad de los recursos naturales y sus preparados. Las monografías de las plantas introducidas en general son copia fiel de las monografías que se han generado en otros países. Este último es el caso de *M. recutita* cuya droga cruda está representada por las flores secas de la planta (capítulos globosos). La droga es un ingrediente de varias preparaciones medicinales tradicionales, complementarias y homeopáticas (Šalamon, 2004).

Los parámetros de calidad de la droga cruda de la manzanilla y su aceite esencial están incluidos en diferentes monografías no oficiales (ESCOP, Monografía WHO volumen 1, entre otros), documentos oficiales (German Commission E monographs), y 26 farmacopeas de diferentes países (Figura 9), algunas se resumen en la Tabla 3.

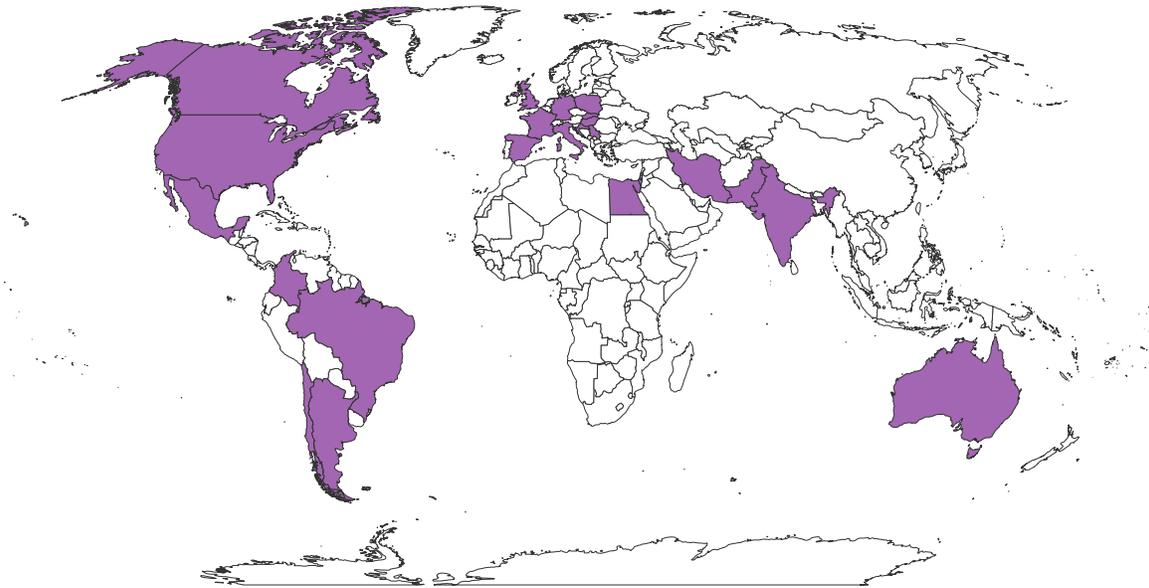


Figura 9. Países con regulaciones nacionales sobre el uso de la droga cruda de *M. recutita*.

Tabla 3. Farmacopeas que contienen la monografía de las flores de *Matricaria recutita* L.

Farmacopeas	
<i>African Pharmacopoeia</i>	<i>Farmakopea Polska</i>
<i>Austrian Pharmacopoeia</i>	<i>German Pharmacopoeia</i>
<i>British Herbal Pharmacopoeia</i>	<i>Nederlandse Pharmacopee</i>
<i>British Pharmacopoeia</i>	<i>Pharmacopoea Hungarica</i>
<i>Egyptian Pharmacopoeia</i>	<i>Pharmacopoea Bohemeslovenica</i>
<i>Estra Farmakope Indonesia</i>	<i>Pharmacopoea Danica</i>
<i>European Pharmacopoeia</i>	<i>Pharmacopoea Hungarica</i>
<i>Farmacopea Argenina</i>	<i>Pharmacopoeia Helvetica</i>
<i>Farmacopea Chilena</i>	<i>Pharmacopée Belge</i>
<i>Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos</i>	<i>Pharmacopée Française</i>
<i>Farmacopea Jugoslavica</i>	<i>Polish Pharmacopoeia</i>
<i>Farmacopea Romana</i>	<i>Real Farmacopea Española</i>
<i>Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana</i>	<i>Svenska Farmacopen</i>
<i>Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil</i>	<i>The United States Pharmacopeia</i>

Según la Farmacopea Europea y la Mexicana, las flores de manzanilla deben contener al menos un 0,4% de aceite esencial y 0,25% del 7-*O*- glucósido de apigenina (Haghi *et al.*, 2014). Con respecto al aceite esencial, estos documentos presentan como prueba de identidad el color del aceite el cual debe ser azul por su contenido de camazuleno (14); este aceite debe contener también  $\alpha$ -bisabolol (13). El ensayo de identidad y composición de la droga cruda se basa en la presencia de camazuleno (14),  $\alpha$ -bisabolol (13) y acetato de bornilo por CCF y la cuantificación del contenido del 7-*O*-glucósido de apigenina (1) por un método analítico por CLAE. En el caso de la monografía de la USP, la prueba de identidad del aceite esencial está dirigida a la determinación del  $\alpha$ -bisabolol (13) y sus derivados (óxido de bisabolol A y B (16 y 17)) y no hace referencia al contenido de camazuleno (14) sino al de guayazuleno por cromatografía en capa fina. En lo que respecta a la prueba de composición de la droga cruda se determina el contenido del 7-*O*-glucósido de apigenina a través de un procedimiento similar a los descritos en las monografías de las Farmacopeas Europea y Mexicana (FHEUM, 2013; EP, 2017; USP 40-NF 35, 2017).

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Debido al incremento en el interés de la población por el uso de plantas medicinales, diversas organizaciones nacionales e internacionales han impulsado el desarrollo de metodologías y técnicas analíticas que permitan determinar la identidad, pureza y adecuada composición de las mismas. La aplicación de estas técnicas permitirá garantizar la calidad de estos productos y evitar posibles adulteraciones y/o sustituciones. La falta de calidad de los preparados de plantas medicinales y fitomedicamentos representa un problema importante relacionado con su uso, tanto en los países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo. A menudo los productos que alcanzan al consumidor no tienen la calidad óptima, y se encuentran adulterados o inclusive pueden tratarse de sustitutos menos eficaces (Ramírez *et al.*, 2007).

Con base en las consideraciones anteriores, la Organización Mundial de la Salud (OMS) continuamente promueve una serie de recomendaciones para la regularización de los productos terapéuticos preparados con plantas medicinales. Así en 1979 la OMS planteó la necesidad de elaborar monografías específicas para cada droga vegetal, con métodos generales de control de calidad. En el año de 1999 la OMS publicó un primer grupo de 28 monografías y posteriormente la segunda edición la cual contiene 30 monografías. Estas proporcionan información científica sobre la seguridad, eficacia y control de calidad de las plantas medicinales de amplio uso en los Estados Miembros de la OMS. Además constituyen modelos para asesorar a los Estados Miembros de la OMS en el desarrollo de las monografías de sus plantas autóctonas e introducidas. Posteriormente se publicaron cuatro volúmenes adicionales con las monografías de otras plantas de uso global.

En respuesta a estas recomendaciones las autoridades sanitarias de diversas regiones del mundo han demostrado un creciente interés en elaborar un registro oficial del control de calidad de los medicamentos herbolarios. Así en 2001, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) y,

posteriormente, en 2013 la segunda edición. Actualmente se está estructurando la tercera edición.

En las versiones de 2001 y 2013, las monografías de plantas autóctonas son escasas, debido a la falta de información científica para integrarlas; por este motivo es importante investigar aquellas especies de mayor uso medicinal en México con la finalidad de elaborar sus monografías con el propósito de regular los productos herbolarios en cuanto a la calidad, eficacia y pureza de estos recursos, tal como establece la NOM-248-SSA1-2011 para las buenas prácticas de fabricación para establecimiento dedicados a la fabricación de remedios herbolarios comercializados en nuestro país (NOM-248-AA1-2011).

En el caso de las plantas introducidas, como *M. recutita*, la mayoría de las monografías son una fiel copia de las publicadas en las Farmacopeas Española y Europea. Por lo tanto y ante la falta de una validación apropiada, la utilidad de esas monografías para el control de calidad de las plantas que se cultivan en México deja lugar a dudas. Esta incertidumbre no permite cumplir satisfactoriamente con las nuevas exigencias de la Secretaría de Salud para el registro de medicamentos o remedios herbolarios.

De manera adicional, en estudios paralelos y anteriores a este trabajo, se demostró la ausencia de camazuleno (14) en los aceites esenciales de manzanilla cultivada en México. Por ello se buscó una nueva estrategia experimental en el control de calidad del aceite esencial de *M. recutita* proveniente de la República Mexicana, encontrándose que la xantocilina (21) era el compuesto marcador para este fin (Díaz, 2007). El estudio se realizó con una manzanilla cultivada en la Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México y otras muestras. En esa misma investigación se encontró que la xantocilina (21) era el principio activo mayoritario responsable de las actividades antinociceptiva y antiespasmódica del aceite esencial (Álvarez y Mungía, 2006). Cabe mencionar que en otros países ha sido necesario adecuar también la monografía farmacopéica de esta importante planta medicinal.

En este contexto, surge el presente trabajo de tesis el cual pretende actualizar la monografía de la especie *M. recutita* presente en la primera y segunda edición de la FHEUM. Este trabajo forma parte de un proyecto multidisciplinario que tiene por objetivo generar la información científica necesaria para establecer la eficacia, la inocuidad y algunos de los parámetros de calidad de especies vegetales selectas de la flora medicinal de México.

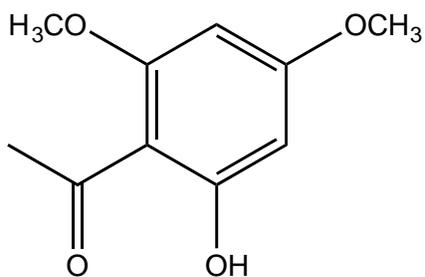


Figura 10. Xantocilina (21).

### 3. OBJETIVOS.

Establecer las pruebas de identidad química y composición de la droga cruda de *M. recutita* cultivada en el centro de México con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para la actualización de la monografía de la droga cruda en la tercera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

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

- a) Desarrollar una nueva estrategia experimental para la preparación de muestra (matriz de trabajo) más sencilla que la descrita en la FHEUM 2ª Edición.
- b) Establecer mediante las técnicas de Cromatografía en Capa Fina (CCF), Espectrometría de Masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) si el compuesto marcador de la droga cruda corresponde al establecido por las farmacopeas europeas.
- c) Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplado a Espectrometría de Masas (CLUE-EM) para cuantificar al compuesto marcador.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL.

### 4.1 Material vegetal.

Las flores de la especie medicinal *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) fueron adquiridas en el Mercado de la bola, local 144, Mixtecas y Reyna Ixtlixóchitl, Ajusco, 04300, Ciudad de México, provenientes de la finca del Señor José Luis en Juchitepec, Estado de México. Una muestra de referencia (Mz 18) se encuentra depositada en el Herbario Nacional MEXU (Voucher # 1471891). La identidad de la especie fue establecida por el Maestro en Ciencias Rafael Torres (Instituto de Biología, UNAM). El material vegetal seco se fragmentó en un mortero con pistilo.

### 4.2 Muestras comerciales.

Las muestras comerciales fueron adquiridas en centros comerciales y mercados localizados en la Ciudad de México. A estas muestras se les asignó una clave y se realizó el registro de la caducidad, lote, presentación y contenido por unidad reportada en el marbete (**Tabla 4**).

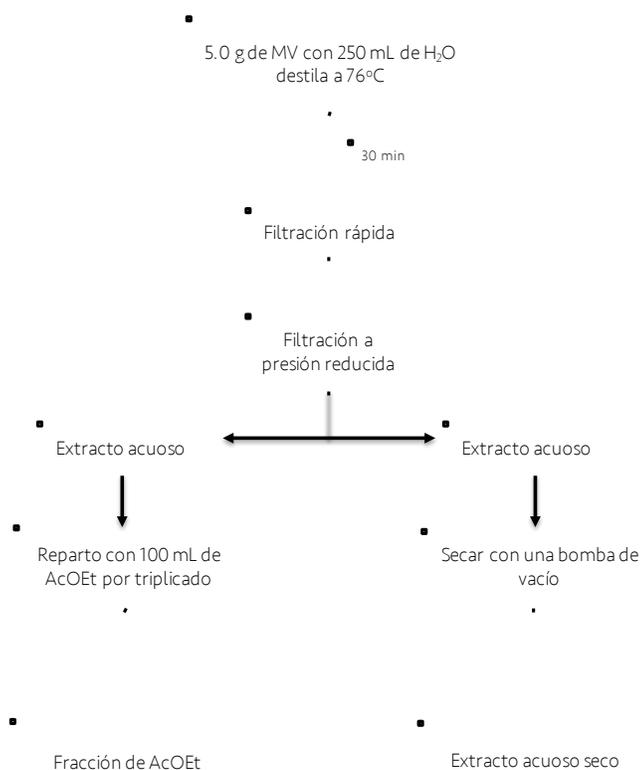
**Tabla 4.** Identificación de las muestras comerciales.

Muestra	Producto	Presentación	Origen
Mz 1	Flor de campo	Corte en T	*
Mz 2	Pure chamomile: Twinings of London	Corte en T	Polonia (origen) y elaborado en Gran Bretaña
Mz 3	Flor de manzanilla, Farmacia Paris SA de CV	Flor y partes aéreas molidas	CDMX, México
Mz 4	Chamomile caffeine free: STASH	Corte en T	Con insumos en Egipto, México y Croacia y elaborado en Estados Unidos de América
Mz 5	Chamomile Tea Ballys	Corte en T	CDMX, México
Mz 6	Manzanilla <i>Matricaria</i> <i>recutita</i> : PLAMESI	Corte en T	San Luis Potosí, México
Mz 7	Chamomile Tea: Alpont Tea Stir	Corte en T	Turquía
Mz 8	Té de manzanilla gourmet: La pastora	Corte en T	CDMX, México
Mz 9	La alternativa natural	Corte en T	CDMX, México
Mz 10	Mc Cormick	Corte en T	CDMX, México
Mz 11	Lagg's	Corte en T	CDMX, México
Mz 12	Great value	Corte en T	Estados Unidos de América
Mz 13	Therbal	Corte en T	México
Mz 14	Vitte	Corte en T	*
Mz 15	Selecto Brand	Corte en T	*
Mz 16	Covent Garden	Corte en T	CDMX, México
Mz 17	Droguería Cosmopolita	Flor y partes aéreas molidas	CDMX, México

\* No se encontró lugar de origen.

### 4.3 Preparación de las muestras.

En la **Figura 11** se ilustra el diagrama general del procedimiento experimental para la obtención de las muestras de análisis.



**Figura 11.** Diagrama del procedimiento experimental de la preparación de muestras. MV: material vegetal.

#### 4.3.1 Preparación de los extractos acuosos.

La preparación de los extractos acuosos tanto del material vegetal de referencia como de las muestras comerciales se realizó a partir de 5 g del material vegetal seco y molido, mediante la técnica de infusión, utilizando 250 mL de agua a una temperatura entre 75 y 76°C. La infusión se dejó reposar durante 30 minutos. Al término de este periodo de extracción, se filtró con algodón desgrasado y el extracto acuoso resultante se filtró

nuevamente a través de un embudo Büchner utilizando papel filtro marca Whatman número 1 con un diámetro de 5.5 cm. El extracto acuoso resultante se concentró en una bomba de vacío hasta sequedad.

#### 4.3.2 Preparación de las fracciones de AcOEt.

La preparación de las fracciones de AcOEt de todas las muestras de manzanilla se realizó por la técnica de infusión como se describe en el inciso **4.3.1**, y el extracto acuoso resultante de la filtración a vacío se sometió a un proceso de reparto con 100 mL de AcOEt, este procedimiento se realizó por triplicado. Posteriormente, la fracción de AcOEt obtenida se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio.

#### 4.4 Pruebas de Identidad.

##### 4.4.1 Identificación de la xantocilina (21) y el 7-*O*-glucósido de apigenina (1) por cromatografía en capa fina (CCF).

Se realizó la identificación de la xantocilina (21) y el 7-*O*-glucósido de la apigenina (1) por CCF utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el **Cuadro 1**. Una vez preparadas la solución de referencia (B<sub>Mz18</sub>) y las soluciones comerciales (B<sub>Mz1</sub>-B<sub>Mz17</sub>), se aplicaron en el cromatofolio en forma de banda, con 10 µL de cada preparación. Enseguida se desarrolló la cromatoplaque permitiendo que el frente de elución recorriera el 90 por ciento de la longitud de la cromatoplaque. Posteriormente, se roció con el revelador. Enseguida se dejó secar a temperatura ambiente nuevamente y se observó en una lámpara de UV a las longitudes de 254 y 365 nm.

**Cuadro 1.** Condiciones cromatográficas para la CCF.

Soporte	Gel de sílice GF <sub>254</sub>
Fase móvil	Acetato de etilo: metanol: agua (85: 12: 3).
Preparación de referencia 1	Se disolvió 1 mg de la xantocilina ( <b>21</b> ) en 100 $\mu$ L de metanol.
Preparación de referencia 2	Se disolvió 1 mg del 7- <i>O</i> -glucósido de apigenina ( <b>1</b> ) en 100 $\mu$ L de metanol
Preparación de las muestras	Se disolvió 5 mg de la fracción de acetato de etilo de cada muestra (B <sub>Mz17</sub> -B <sub>Mz18</sub> ) en 100 $\mu$ L de metanol
Revelador	AlCl <sub>3</sub> en etanol

#### 4.4.2 Identificación de la xantocilina (**21**) utilizando DSA-HR-APCI-MS.

La preparación de todas muestras de manzanilla tanto de la referencia como de las comerciales se llevaron a cabo, pesando aproximadamente 2 mg de la fracción de AcOEt y del extracto acuoso seco, enseguida se disolvieron con 200  $\mu$ L de una mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30). De estas soluciones se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L y se colocó en una malla de acero inoxidable de aproximadamente 8 mm de diámetro y posteriormente se introdujeron en el aditamento Direct Sample Analysis <sup>TM</sup> (DSA <sup>TM</sup>) (PerkinElmer, Waltham, MA). Las muestras en la malla se ionizaron desde la pantalla con el sistema DSA <sup>TM</sup> en un equipo AxION TOF 2, PerkinElmer. El espectrómetro de masas se generó en un modo de trampa de iones positivo para aumentar la sensibilidad con una adquisición de cinco espectros por segundo. Los resultados fueron procesados mediante el software AxION 2 TOF MS (USB) Driver 6.2.

#### 4.4.3 Identificación de la xantocilina (21) en los extractos acuosos y las fracciones de AcOEt utilizando resonancia magnética nuclear (RMN).

Para determinar la presencia de la xantocilina (21) en los extractos acuosos y las fracciones de AcOEt derivados de las muestras de manzanilla de referencia y comerciales, se disolvieron 10 mg de la fracción de AcOEt y 20 mg del extracto acuoso seco de cada muestra en 600  $\mu$ L de DMSO- $d_6$  con 0.01% de TSP (ácido trimetilsililpropanoico), que tras su disolución se transfirieron a tubo de RMN de 5mm. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$ -RMN) y de Carr-Purcell-Meiboom-Gill ( $^1\text{H}$ -CPMG) se registraron en equipo Bruker AVANCE III de 16.44 Teslas (700 MHz para  $^1\text{H}$ ) equipado con una criosonda TCI de 5 mm.

Las FIDs se exportaron al programa MestReNova versión 12.0.0-20080 © 2017 Mestrelab Research S.L., donde se procesaron mediante transformada de Fourier, apodización por función exponencial utilizando un ancho de línea de 0.3 Hz, ajuste manual de fase y corrección de línea base con ajuste polinomial. Los espectros se referenciaron a la señal del TSP (0 ppm).

Estos experimentos se realizaron bajo la supervisión de la Doctora Nuria Esturau Escofet (Instituto de Química, UNAM) y del Doctor José Fausto Rivero Cruz (Facultad de Química, UNAM).

## 4.5 Prueba de composición.

### 4.5.1 Desarrollo del perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt de *M. recutita*.

Con el propósito de desarrollar las pruebas de composición de la droga cruda de *M. recutita*, se desarrolló un perfil cromatográfico por CLUE-ESI/EM. El análisis se efectuó en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) clase H marca Waters (Milford, MA, EE.UU), equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un horno para columna y un detector PDA acoplado a un detector de masas SQD2 (cuadripolo simple) con una fuente ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo (ESI<sup>+</sup>) y negativo (ESI<sup>-</sup>). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa MassLynx<sup>®</sup> versión 4.1 (Waters). Todos los análisis se realizaron en una columna BEH C-18 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) (Waters). En los Cuadros 2-3 se muestran las condiciones del equipo y el gradiente de la fase móvil empleada, la cual consistió en un mezcla binaria compuesta por CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O ambos acidificados al 0.1 % con ácido fórmico. La matriz de trabajo utilizada fue la fracción de AcOEt derivada de la infusión de la especie objeto de estudio.

**Cuadro 2.** Condiciones cromatográficas para los análisis por CLUE-ESI/EM.

Fase móvil	A: Agua acidificada (0.1% FA) B: CH <sub>3</sub> -CN acidificado (0.1% FA)
Temperatura	40 °C
Volumen de inyección	3 $\mu$ L
Flujo	0.3 mL/min
Longitud de onda de detección	285 nm
Voltaje del cono	30 V
Voltaje del capilar	3.0 kV (modo positivo) y 2.5 kV (modo negativo)
Temperatura de desolvatación	275°C
Flujo de nitrógeno	400 L/hr

Cuadro 3. Gradiente de elución utilizado para el desarrollo del perfil cromatográfico.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
1.5	60	40
4	30	70
6	20	80
7	0	100
9	0	100
9.10	85	15
12	85	15

Estas condiciones cromatográficas, permitieron identificar a la xantocilina (21) presente en la fracción de AcOEt analizada. La identificación del producto de interés se realizó mediante el análisis de su tiempo de retención y el espectro de masas generado.

#### 4.5.2 Validación del método analítico para cuantificar a la xantocilina (21).

Las condiciones utilizadas para la validación del método analítico por CLUE-ESI/EM para cuantificar al compuesto 21, presente en la fracción de AcOEt de *M. recutita*, fueron las mismas descritas en el inciso anterior. La validación del método se realizó de acuerdo a los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la Internacional Conference on Harmonisation (ICH; Q2 (R1) 2005). Los parámetros de calidad evaluados fueron:

##### 4.5.2.1 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se evaluó preparando diez curvas de calibración de xantocilina (21) a las concentraciones finales de 1, 2.5, 5, 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cada curva se preparó mediante diluciones seriadas e independientes a partir de una solución de referencia (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El

análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal simple entre las variables concentración (x) y el área bajo la curva (y). Los parámetros calculados fueron: la ordenada al origen ( $\beta_0$ ), la pendiente de la recta ( $\beta_1$ ), el coeficiente de determinación (r) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ). Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ,  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  (ICH; Q2 (R1) 2005).

#### 4.5.2.2 Linealidad del método y exactitud.

La linealidad del método se determinó mediante la preparación, por octuplicado, de diferentes curvas enriqueciendo a la matriz de trabajo (444  $\mu\text{g/mL}$ ) con tres concentraciones de xantocilina (21) (5, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Con los datos obtenidos se determinó la linealidad del método mediante un análisis de regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y), y se calcularon los siguientes parámetros estadísticos:  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ , r y  $r^2$ . Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ,  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  (ICH; Q2 (R1) 2005).

Por otro lado, para establecer la exactitud del método se calculó el porcentaje de recobro para cada muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

Finalmente, se calculó para cada nivel el promedio aritmético y el coeficiente de variación (CV). El método analítico es exacto si los porcentajes de recobro se encuentran en un rango entre el 98-102% y el coeficiente de variación no es mayor del 2%(ICH; Q2 (R1) 2005).

#### 4.5.2.3 Precisión del sistema.

La precisión del sistema se determinó en términos de repetibilidad mediante el análisis por sextuplicado de una solución del estándar a una concentración de 25 µg/mL. Con los datos obtenidos se calculó la desviación estándar (DE) y el CV de las respuestas analíticas registradas. El criterio de aceptación establece que para que un método tenga repetibilidad el CV no debe ser mayor al 2.0% (ICH; Q2 (R1) 2005).

#### 4.5.2.4 Cuantificación de la xantocilina (21) en diferentes muestras de manzanilla.

Una vez que se validó el método analítico, se realizó la cuantificación de la xantocilina (21) en las fracciones de AcOEt derivadas de las infusiones de 17 muestras comerciales (B<sub>Mz1</sub>-B<sub>Mz17</sub>) y una de referencia (B<sub>Mz18</sub>). Para ello se prepararon diferentes soluciones de cada una de las muestras problema a una concentración de 500 µg/mL disueltas en una mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1). Todas las muestras fueron inyectadas por duplicado en las condiciones descritas en el inciso 4.5.1.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para cumplir el objetivo general de este trabajo de investigación se siguió la siguiente estrategia: En primer lugar, se realizó la identificación botánica de la especie bajo estudio que se utilizaría como referencia. A continuación se elaboraron las tisanas ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz17}$ ) y las fracciones de AcOEt ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz17}$ ) de 17 muestras comerciales y las de la referencia ( $A_{Mz18}$  y  $B_{Mz18}$ ) que constituyen las matrices de trabajo. Posteriormente se desarrollaron las pruebas de identidad mediante CCF, EM y RMN con el propósito de detectar la presencia de xantocilina (21), designado como compuesto marcador, y por último, se desarrolló un método analítico por CLUE-ESI/EM para cuantificar el marcador en las muestras objeto de estudio. A continuación se describen los resultados obtenidos.

### 5.1 Identificación botánica de la especie.

Para iniciar los ensayos de identidad y composición de *M. recutita* fue necesario establecer la identidad botánica de la muestra (Mz 18) de la especie objeto de estudio. La identidad fue establecida por el Maestro en Ciencias Rafael Torres (Instituto de Biología, UNAM) y fue identificada como *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) con un número de voucher 1471891 (Figura 12).



Figura 12. Muestra de referencia botánica de la especie medicinal (Mz18) (No de voucher 1471891).

## 5.2 Preparación de las muestras.

El primer paso para la preparación de las muestras fue desarrollar un procedimiento experimental más sencillo que el descrito en la FHEUM 2ª Edición, al ser un método tedioso que puede conllevar a una acumulación de errores. En este estudio se proponen dos matrices de trabajo de fácil preparación, las tisanas y las fracciones obtenidas por reparto con AcOEt a partir de las infusiones. En la Tabla 5 se resumen los rendimientos por gramo de la droga cruda y los porcentuales de las muestras elaboradas.

**Tabla 5.** Rendimientos de los extractos acuosos secos ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz18}$ ) y fracciones de AcOEt ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ) obtenidos a partir de las distintas muestras de manzanilla.

Muestra	Peso de la droga cruda (g)	Peso del extracto acuoso(g)	% Rendimiento (g/g de la droga cruda)	Muestra	Peso de la droga cruda (g)	Peso del reparto de AcOEt (g)	% Rendimiento (g/g de la droga cruda )
$A_{Mz1}$	5.0648	1.023	20.2061	$B_{Mz1}$	5.0808	0.0334	0.6574
$A_{Mz2}$	5.0343	0.924	18.3620	$B_{Mz2}$	5.0096	0.0503	1.0040
$A_{Mz3}$	5.0261	1.028	20.4572	$B_{Mz3}$	5.0758	0.0608	1.1980
$A_{Mz4}$	5.0323	0.982	19.5120	$B_{Mz4}$	5.0163	0.0542	1.0804
$A_{Mz5}$	5.0761	1.094	21.5599	$B_{Mz5}$	5.016	0.0399	0.7954
$A_{Mz6}$	5.0618	0.826	16.3223	$B_{Mz6}$	5.0512	0.0286	0.5662
$A_{Mz7}$	5.0267	0.992	19.7386	$B_{Mz7}$	5.0785	0.0346	0.6813
$A_{Mz8}$	5.0171	0.937	18.6801	$B_{Mz8}$	5.0714	0.0319	0.6290
$A_{Mz9}$	5.0657	1.371	27.0624	$B_{Mz9}$	5.0356	0.0435	0.8640
$A_{Mz10}$	5.0469	0.796	15.7800	$B_{Mz10}$	5.0369	0.0217	0.4310
$A_{Mz11}$	5.0502	0.840	16.6389	$B_{Mz11}$	5.0417	0.0332	0.6585
$A_{Mz12}$	5.0276	0.778	15.4646	$B_{Mz12}$	5.0374	0.0283	0.5620
$A_{Mz13}$	5.0457	1.041	20.6374	$B_{Mz13}$	5.0869	0.0287	0.5642
$A_{Mz14}$	5.0197	1.131	22.5352	$B_{Mz14}$	5.0604	0.0312	0.6165
$A_{Mz15}$	5.0538	1.101	21.7915	$B_{Mz15}$	5.0421	0.0291	0.5771
$A_{Mz16}$	5.074	1.027	20.2385	$B_{Mz16}$	5.0153	0.026	0.5184
$A_{Mz17}$	5.0771	1.322	26.0365	$B_{Mz17}$	5.1728	0.0414	0.8003
$A_{Mz18}$	0.5098*	0.108	21.2240	$B_{Mz18}$	5.0276	0.1058	2.1043

\*La muestra  $A_{Mz18}$  se trabajó en un escala 1 en 10 por la disponibilidad del material vegetal.

Los rendimientos en cada caso fueron diferentes a pesar que se utilizó la misma cantidad del material vegetal seco; este resultado cabría esperarse considerando que las muestras son de distinto origen, sin embargo en todos los casos la cantidad obtenida fue suficiente para realizar los estudios posteriores. Cabe resaltar que el mejor rendimiento de la fracción de AcOEt se obtuvo de la infusión de la muestra de referencia B<sub>Mz18</sub>; esto se atribuye a que ésta se obtuvo exclusivamente de las flores secas de manzanilla; en tanto que en las muestras comerciales no hay certeza del contenido de la droga cruda. En un estudio realizado por Milla-Escobar (2008) se indica que los principales empacadores de manzanilla de México manejan una calidad variable, ya que combinan la droga cruda con los tallos de la planta en diferentes proporciones con el propósito de incrementar el peso del material empacado.

### 5.3 Pruebas de identidad.

Invariablemente la CCF es una técnica de rutina para el análisis de las huellas dactilares (fingerprints) de muestras vegetales, es también la más utilizada como prueba de identidad en todas las farmacopeas herbolarias; esta técnica permite obtener conclusiones cualitativas de manera rápida y su implementación resulta sencilla (Guzelmeric *et al.*, 2017; Mohammad *et al.*, 2010). Otras técnicas analíticas como la EM, la RMN y la CLUE-EM permiten un análisis más completo brindando mayor información con respecto a la composición y naturaleza química de la muestras herbolarias. Estas técnicas cada vez se integran más en las monografías farmacopéicas de los productos herbolarios. Recientemente, la EM ha sido reconocida como una herramienta que ofrece un gran potencial para establecer la identidad de muestras herbolarias gracias a que requiere cantidades menores a dos miligramos de muestra, fácil preparación y sin duda la rapidez de análisis (tan solo segundos), permitiendo un mayor número de análisis al día en comparación con otras técnicas. Sin embargo, la destrucción de la muestra es una de sus desventajas. Por otro lado, la RMN es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de huellas digitales de matrices herbolarias debido a sus muchos beneficios sobre otras

técnicas tales como la naturaleza no destructiva, la recuperación de muestras y cuantificación relativa sin usar estándares internos. Su baja sensibilidad es uno de sus principales inconvenientes, pero este problema se puede resolver usando un campo magnético más alto a baja temperatura (estado criogénico). Esta técnica tiene la gran ventaja de proporcionar una vista macroscópica del perfil metabólico de cualquier producto natural (Kumar *et al.*, 2016).

### 5.3.1 Cromatografía en capa fina.

El cromatograma obtenido de las 17 muestras comerciales ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz17}$ ), una de referencia ( $B_{Mz18}$ ) y los estándares comerciales de la xantocilina (**21**) y del 7-*O*-glucósido de apigenina (**1**) utilizando como detector una lámpara en el UV y dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y un sistema de elución AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O (85: 12: 3) se muestra en las **Figuras 13-14**. Como se puede observar, todas las muestras evaluadas contienen el marcador farmacopéico **1** ( $R_F = 0.37$ ). Por otro lado, la presencia de la xantocilina (**21**) ( $R_F = 0.72$ ) se visualiza en la muestra de referencia ( $B_{Mz18}$ ) y en algunas de las comerciales de manera tenue; esto se debe a que la xantocilina (**21**) no es un compuesto mayoritario de la droga cruda con respecto al 7-*O*-glucósido de apigenina (**1**). En las muestras extranjeras no se identificó este producto ( $B_{Mz2}$  y  $B_{Mz4}$ ). Cabe mencionar que previo al análisis mostrado en las **Figuras 13 y 14** se hicieron pruebas de coelución con los estándares para garantizar que la respuesta fuera selectiva.

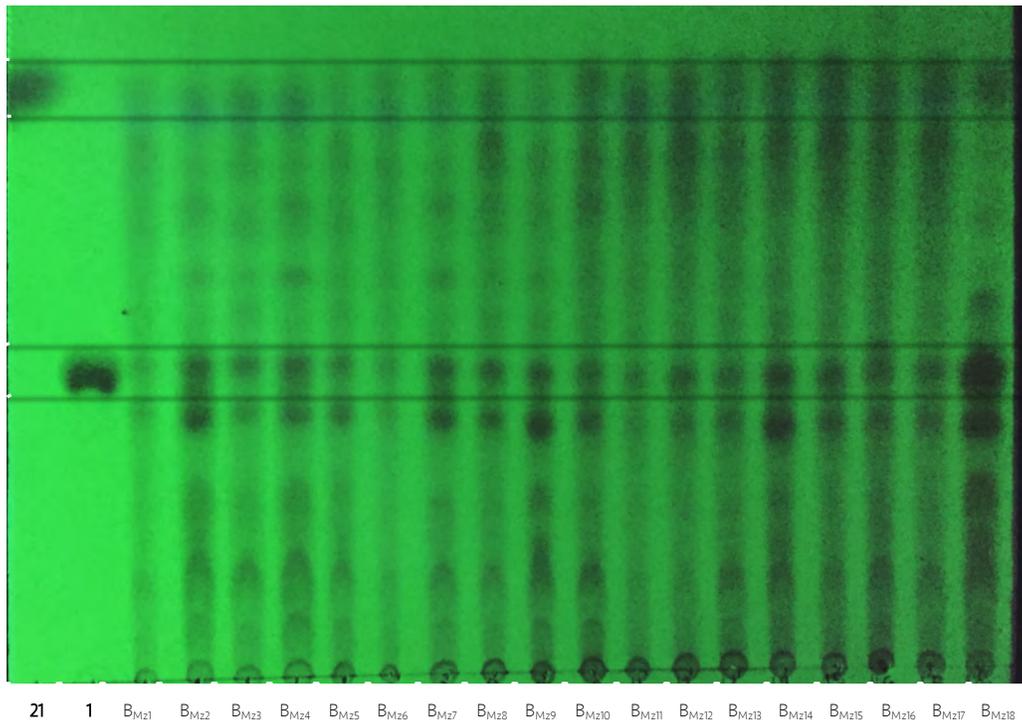


Figura 13. Cromatograma en capa fina de los compuestos **21** y **1** en diferentes muestras de manzanilla ( $\lambda=254$  nm) Xantocilina (**21**), 7-*O*-glucósido de apigenina (**1**), muestras comerciales ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz17}$ ) y muestra de referencia ( $B_{Mz18}$ ). Sistema de elución: AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O (85: 12: 3).

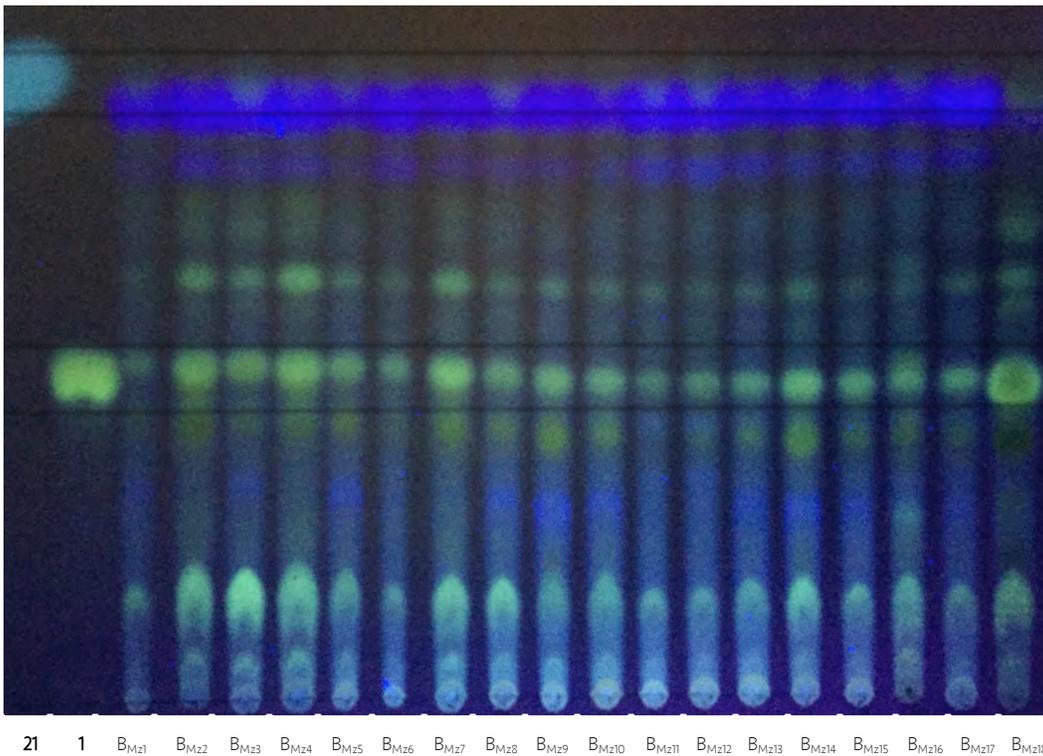


Figura 14. Cromatograma en capa fina revelada con AlCl<sub>3</sub> y observado en la longitud de onda de 365 nm, para la identificación de los compuestos **21** y **1** en diferentes muestras de manzanilla. Xantocilina (**21**), 7-*O*-glucósido de apigenina (**1**), muestras comerciales ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz17}$ ) y muestra de referencia ( $B_{Mz18}$ ). Sistema de elución: AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O (85: 12: 3).

Recientemente un estudio realizado por Guzelmeric y colaboradores en el año 2017, reportó que el procedimiento indicado como prueba de composición en la Farmacopea Europea no es adecuado para la identificación de la especie *M. recutita* cultivada en Turquía. Los autores consideran que el procedimiento experimental de la preparación de la muestra, que implica una hidrólisis básica preliminar, causa la eliminación de muchos otros compuestos que podría ser útiles para detectar adulteraciones. Este hallazgo aplica también para la manzanilla mexicana, ya que la xantocilina (**21**) no se detecta en aquellas muestras que se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en las Farmacopea Mexicana y Europea. Además el 7-*O*-glucósido de apigenina (**1**) es un marcador ubicuo, y es preferible utilizar también otros componentes para la autenticación de la manzanilla genuina. En consecuencia, el método descrito para la preparación de muestras del presente estudio puede considerarse como una forma ideal para la identificación de *M. recutita* cultivada en México.

### 5.3.2 Espectrometría de masas.

Los espectros de masas de alta resolución de las fracciones de AcOEt derivadas de las infusiones  $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$  se registraron con un modo de ionización positivo debido a que estas condiciones utilizadas ionizaron mejor en comparación con el modo negativo. El marcador analítico xantocilina (**21**) también ionizó adecuadamente en este modo. La identificación de los compuestos de interés se realizó considerando las masas exactas de los compuestos y las masas teóricas reportadas. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**. En todas las muestras analizadas se detectó la presencia de la xantocilina (**21**). De manera adicional se identificaron a las cumarinas herniarina (**2**) y esculetina (**4**). Por último, se identificó la masa exacta de los dicitioéteres (**19** y **20**). Éstos últimos son dos de los componentes mayoritarios del aceite esencial de la manzanilla europea (Hardman, 2015; Šalamon, 2004; Singh *et al.*, 2011). La herniarina (**2**) se detectó en casi todas las muestras excepto en las muestras  $B_{Mz1}$ ,  $B_{Mz2}$  y  $B_{Mz3}$  en tanto que la esculetina (**4**) y los dicitioéteres (**19** y **20**) solo se encontraron en el 50 % de las muestras analizadas.

**Tabla 6.** Compuestos identificados en las fracciones de AcOEt de *M.recutita* y muestras comerciales utilizando DSA-HR-APCI-MS en modo positivo.

Muestra	Xantocilina (21)	Herniarina (2)	Esculetina (4)	Dicicloeter (19) o (20)
B <sub>Mz1</sub>	+		+	
B <sub>Mz2</sub>	+		+	
B <sub>Mz3</sub>	+			+
B <sub>Mz4</sub>	+	+	+	+
B <sub>Mz5</sub>	+	+	+	+
B <sub>Mz6</sub>	+	+	+	
B <sub>Mz7</sub>	+	+		+
B <sub>Mz8</sub>	+	+		+
B <sub>Mz9</sub>	+	+		
B <sub>Mz10</sub>	+	+		+
B <sub>Mz11</sub>	+	+		+
B <sub>Mz12</sub>	+	+	+	
B <sub>Mz13</sub>	+	+		
B <sub>Mz14</sub>	+	+		
B <sub>Mz15</sub>	+	+	+	
B <sub>Mz16</sub>	+	+	+	+
B <sub>Mz17</sub>	+	+		+
B <sub>Mz18</sub>	+	+		+

(21) C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> (*m/z*) 197.0703 [M+H]<sup>+</sup>, (2) C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (*m/z*) 177.0551 [M+H]<sup>+</sup>, (4) C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (*m/z*) 179.0703 [M+H]<sup>+</sup>, (19) y (20) C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> (*m/z*) 201.0915 [M+H]<sup>+</sup>. Todos los espectros de masas se muestran en el ANEXO 1.

### 5.3.3 Resonancia magnética nuclear.

Los datos de RMN  $^1\text{H}$  para la xantocilina (**21**) se muestran en la **Tabla 7** y el espectro de  $^1\text{H}$  se muestra en el **ANEXO 2**. Dos son las señales diagnósticas para el producto **21**; éstas corresponden a las de los dos protones aromáticos **H-4** y **H-5**, que se observan como dos señales dobles en  $\delta_{\text{H}}$  6.08 (d,  $J = 2.36$ ) y 6.11 (d,  $J = 2.36$ ). Estas señales se identificaron en la fracción de AcOEt de referencia ( $B_{\text{Mz18}}$ ), los resultados se muestran en la **Figura 15**.

**Tabla 7.** Datos espectroscópicos de RMN para la xantocilina (**21**) en DMSO- $d_6$  con 0.01% de TSP ( $^1\text{H}$  a 700 MHz)

Posición	$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ en [Hz])
1	2.54 (s)
2	3.81 (s)
3	3.86 (s)
4	6.08 (d, 2.36)
5	6.11 (d, 2.36)
6	13.78 (s)

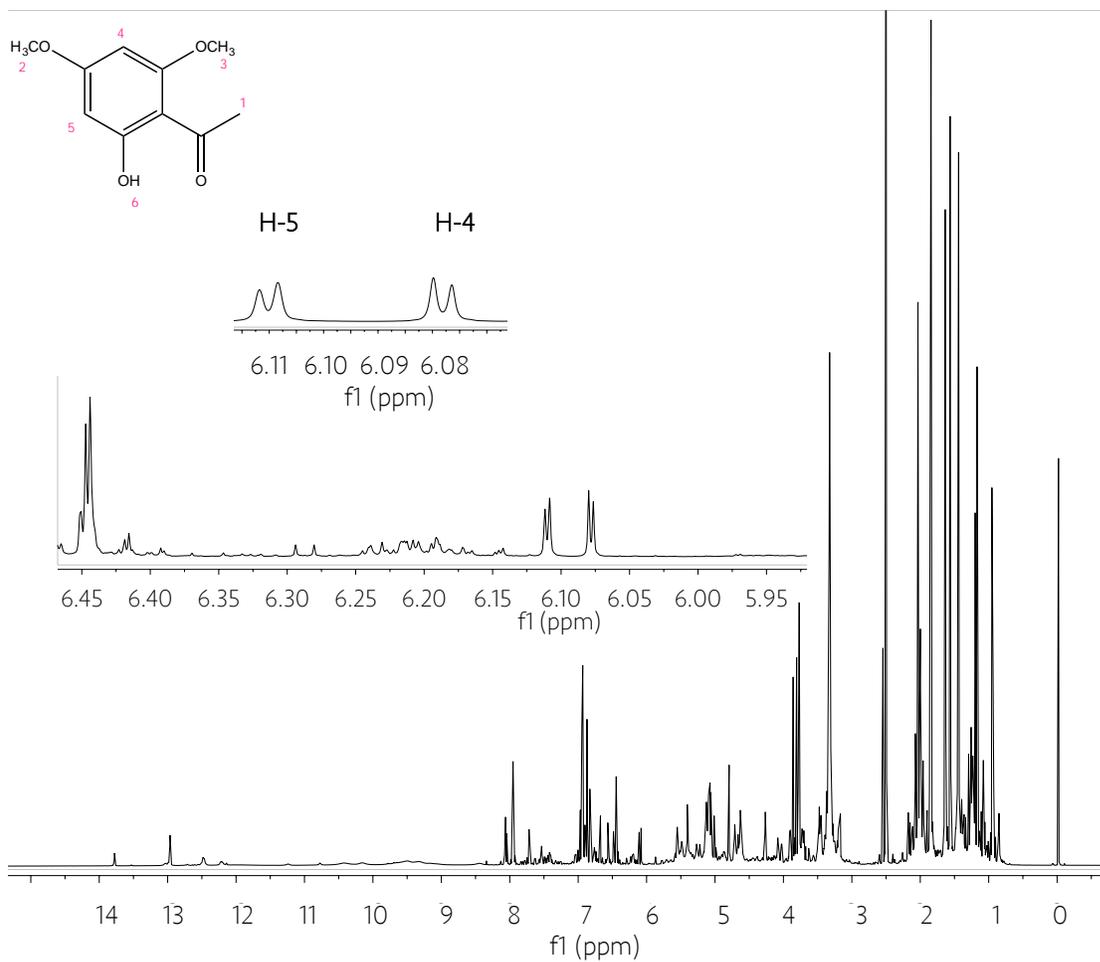


Figura 15. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) de la muestra de referencia (B<sub>Mz18</sub>).

La xantocilina (21) se detectó en 16 de las 18 muestras analizadas (Figura 16). En las muestras B<sub>Mz2</sub> y B<sub>Mz4</sub> de origen extranjero no se observó la presencia del marcador.

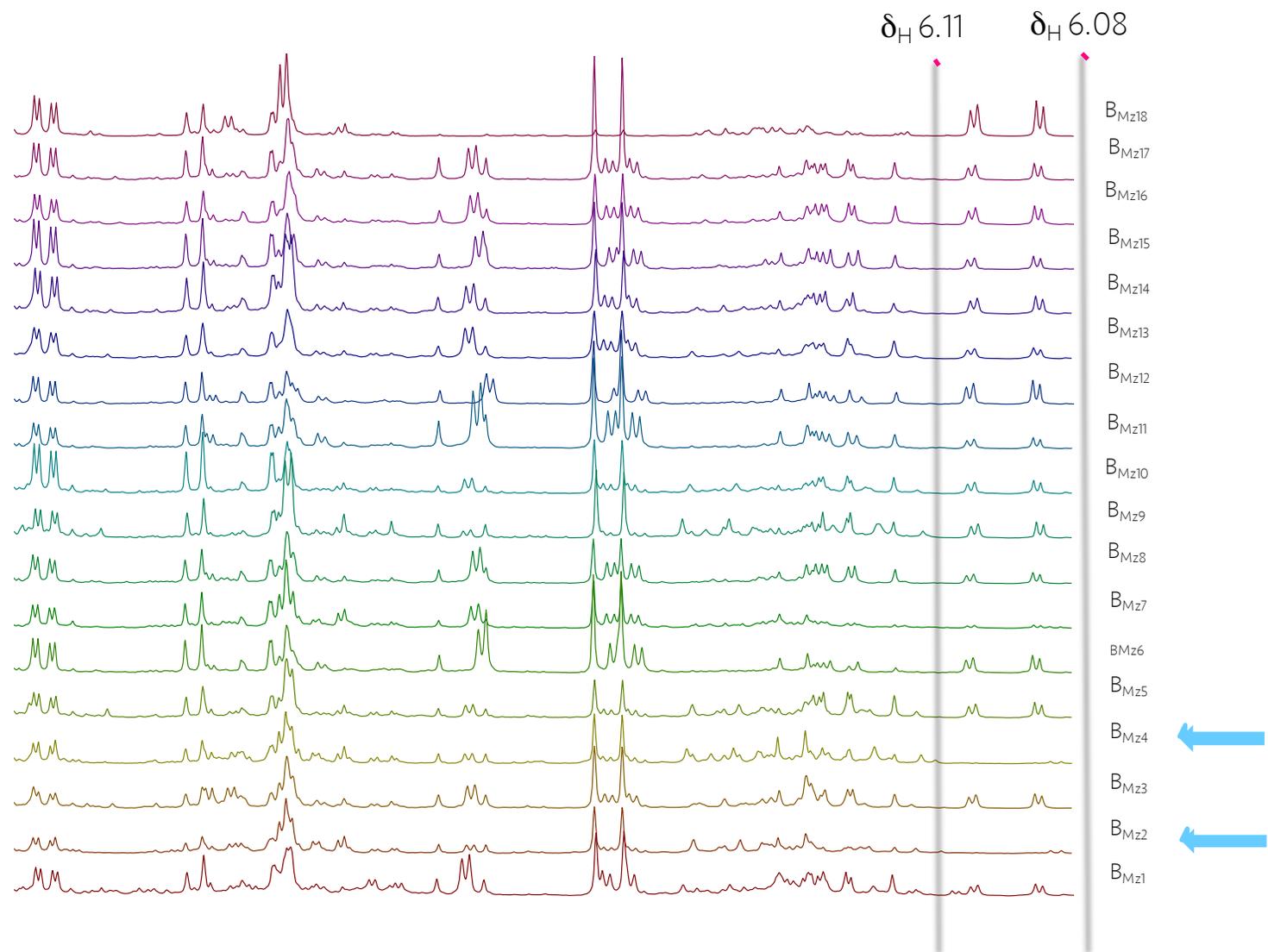


Figura 16. Comparación de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) de todas las matrices de AcOEt (B<sub>Mz1</sub>- B<sub>Mz18</sub>).

Las muestras provenientes de las matrices acuosas ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz18}$ ) fueron analizadas mediante un experimento  $^1\text{H}$ -CPMG para evitar el ensanchamiento de las señales debido a los  $-\text{OH}$  (Figura 17). En la Figura 18 se muestra el apilamiento de todos los espectros y se puede observar que los extractos acuosos tienen un patrón similar en todos los casos salvo ligeras diferencias. Sin embargo, esta matriz de trabajo, no fue adecuada para la detección del marcador, debido a la baja concentración de éste en el extracto acuoso, además de la presencia de compuestos como aminoácidos, azúcares, compuestos glucosilados y derivados de los ácidos clorogénico y caféico (Wang *et al.*, 2004). Únicamente se detectó en la muestra  $A_{Mz18}$ .

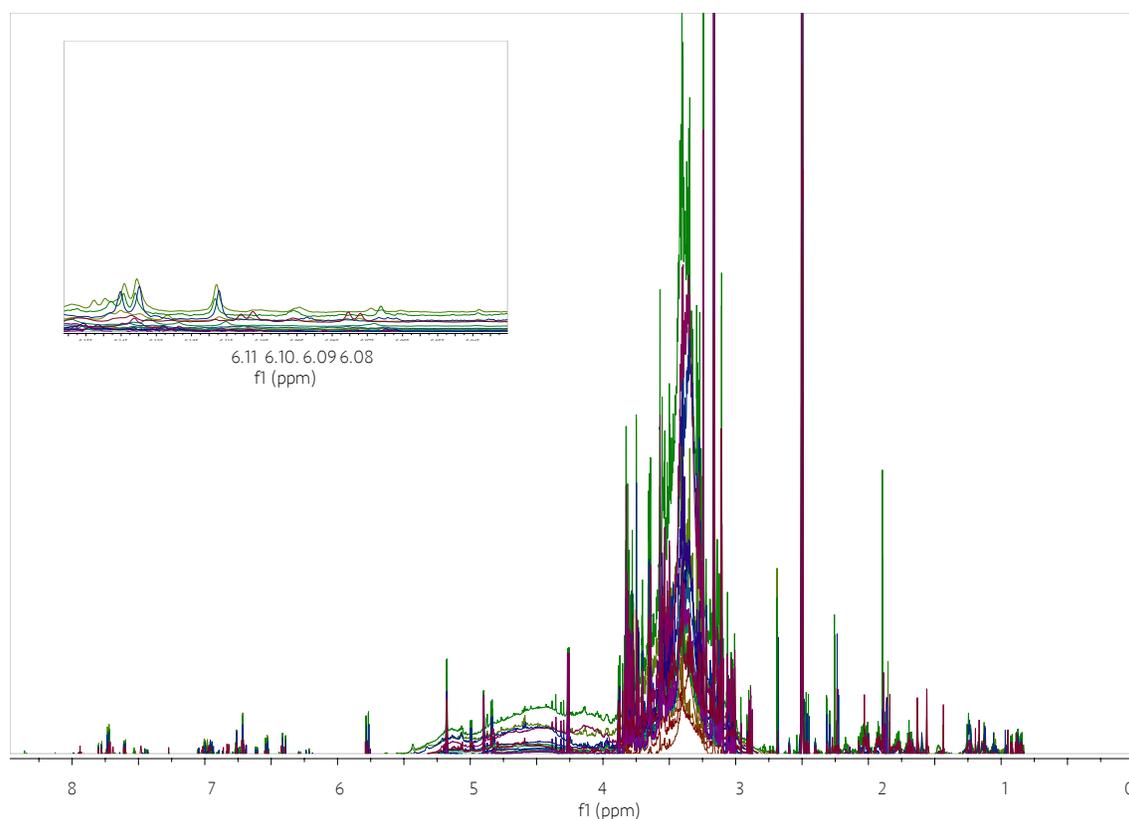
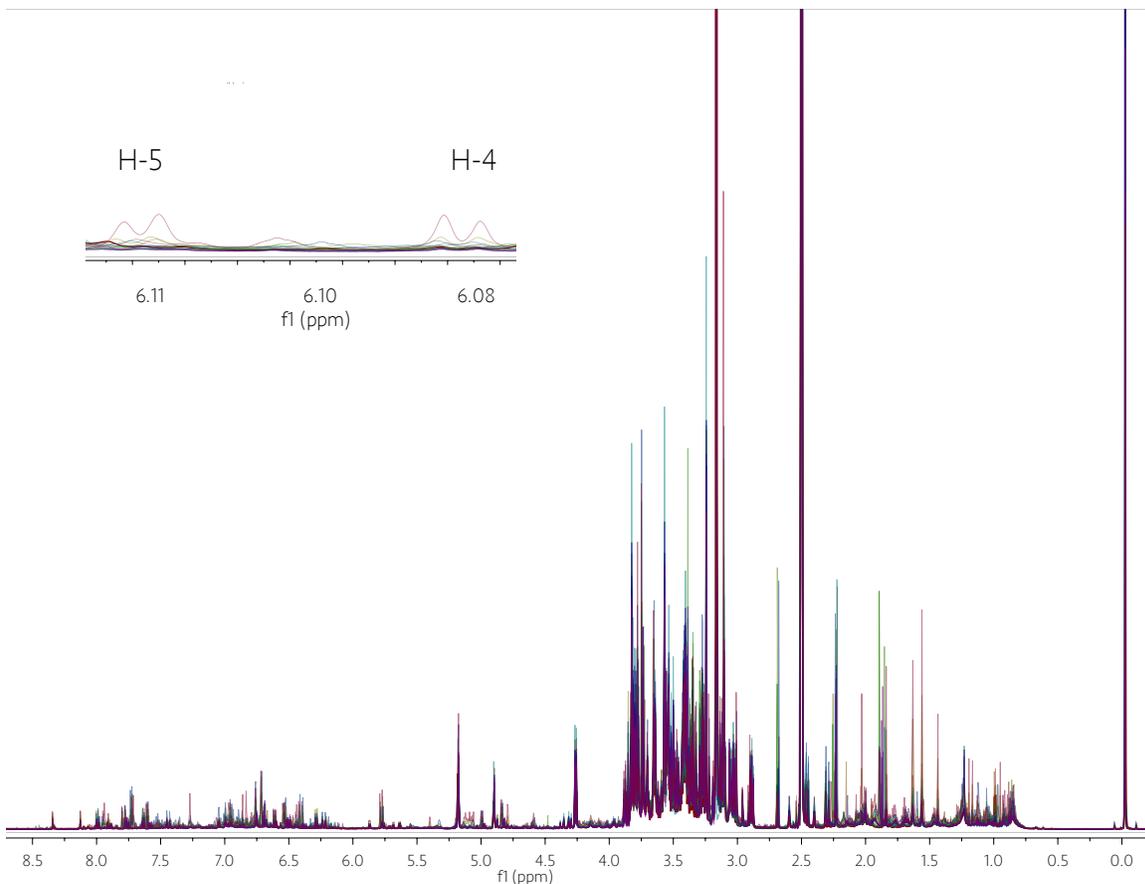


Figura 17. Apilamiento de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 25 °C) de todas las matrices del extracto acuoso ( $A_{Mz1}$ -  $A_{Mz18}$ )



**Figura 18.** Apilamiento de los espectros de  $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 25 °C) de todas las matrices del extracto acuoso ( $A_{Mz1}$ -  $A_{Mz18}$ )

#### 5.4 Prueba de composición.

##### 5.4.1 Desarrollo de un método analítico apropiado para cuantificar a la xantocilina (21) en la droga cruda de *M. recutita*.

Para el desarrollo del método analítico se decidió seleccionar a la técnica acoplada CLUE-ESI/EM debido a su gran selectividad permitiendo realizar una “doble detección”, al introducir una muestra en el sistema cromatográfico; ésta se analiza primero en un detector en el UV y enseguida en el detector de masas, además se seleccionó debido a que

la muestra a analizar es una matriz multi-componente de naturaleza química muy compleja (Engström *et al.*, 2015; Nordtröm *et al.*, 2006).

Como primer paso para el desarrollo del método analítico, se establecieron las condiciones cromatográficas mediante ensayo y error, hasta encontrar las mejores condiciones para la separación de los componentes de interés en la fracción de AcOEt de *M. recutita* (OMS, 2011). Estas condiciones incluyeron una columna (Fase reversa), un sistema binario de disolventes (agua y acetonitrilo) y los detectores en el UV (PDA) y EM (SQD2). Con base en estas consideraciones se ensayaron varias columnas C18, diversos sistemas de elución y flujos hasta encontrar las mejores condiciones para la separación del compuesto **21** presente en la matriz de trabajo. La identificación del marcador **21** en la fracción de AcOEt se realizó mediante el análisis de los tiempos de retención y los espectros de masas generados. De manera adicional, se identificaron a los flavonoides, 7-*O*-glucósido de apigenina (**1**) (marcador farmacopéico) y al 7-*O*-glucósido de isoramnetina (**22**) (**Figura 21**). Estos últimos compuestos fueron identificados mediante los iones moleculares observados para cada producto en las relaciones masa carga ( $m/z$ ) 431.50 y 477.50  $[M-H]^-$  y su análisis comparativo con los datos reportados en la literatura. El compuesto **22** de tipo flavonol, no se ha reportado como compuesto mayoritario en la droga cruda de *M. recutita* (Hardman, 2015). Los tiempos de retención ( $t_R$ ) obtenidos para cada compuesto identificado, bajo las condiciones empleadas, fueron los siguientes: xantocilina (**21**) ( $t_R$  4.82), 7-*O*-glucósido de apigenina ( $t_R$  2.88) y 7-*O*-glucósido de isoramnetina ( $t_R$  2.84). En las **Figuras 19-20** se ilustra el perfil cromatográfico en el UV y el cromatograma de corriente iónica total (TIC) de cada compuesto identificado en la fracción de AcOEt.

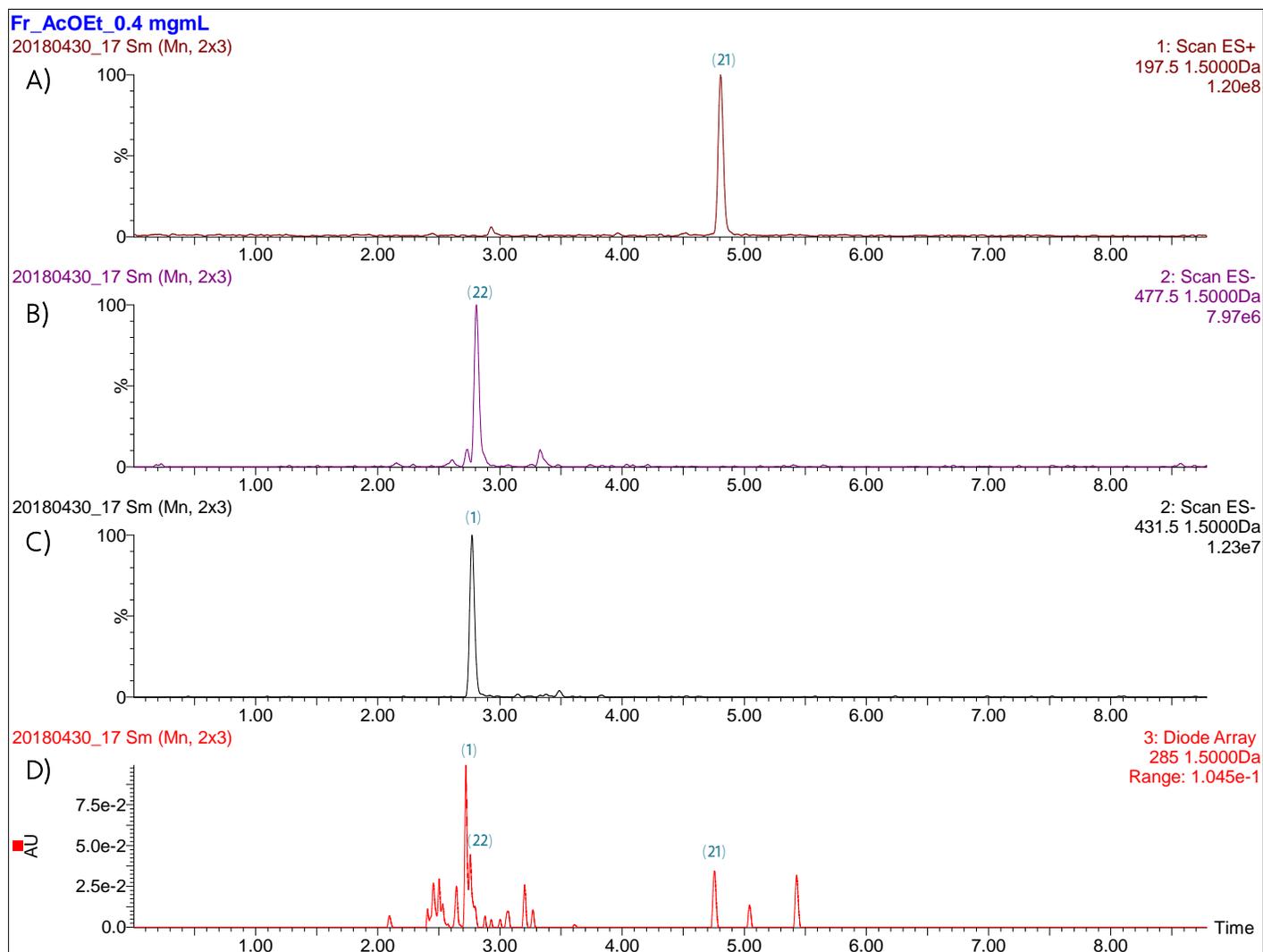


Figura 19. Cromatograma de corriente iónica total (TIC) identificando a los picos en una relación masa/carga de (A) xantocilina (21) 197.5 [M+H]<sup>+</sup>, (B) 7-*O*-glucósido de isoramnetina (22) 477.5 [M-H]<sup>-</sup>, (C) 7-*O*-glucósido de apigenina (1) 431.5 [M-H]<sup>-</sup> y (D) perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda = 285$ ) de la fracción de AcOEt de *M. recutita*.

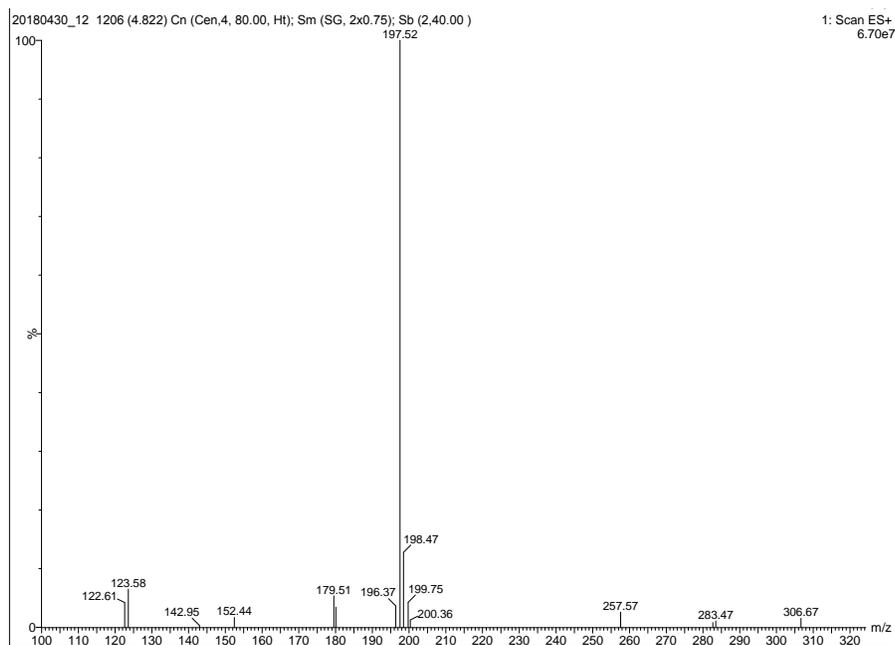


Figura 20. Espectro de masas de la xantocilina (21) obtenido por la técnica de electrospray en modo positivo [ESI]<sup>+</sup>.

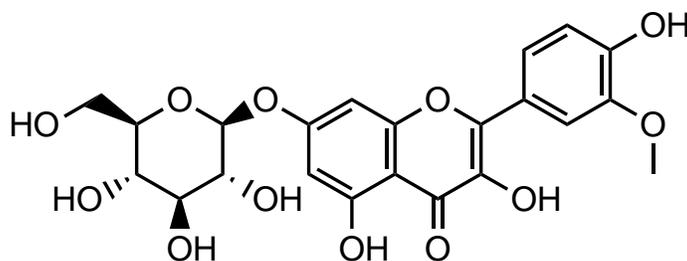


Figura 21. 7-*O*-glucósido de isoramnetina (22).

#### 5.4.1.1 Validación del método analítico.

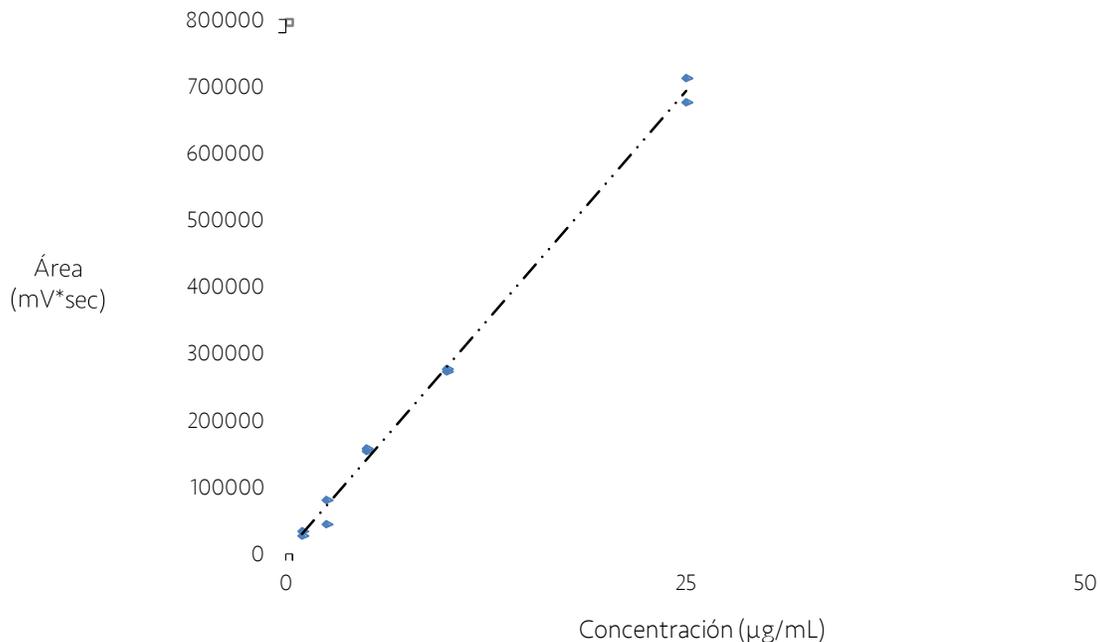
Una vez establecido el perfil cromatográfico se procedió a realizar la validación del método analítico para la cuantificación de la xantocilina (**21**) presente en diferentes muestras de manzanilla, utilizando como sistema de detección al detector SQD2. La validación tiene como objetivo demostrar que la estrategia experimental desarrollada es adecuada para un propósito específico. De esta manera, el proceso de validación consiste en generar la información que demuestre desde punto de vista analítico, que dicho método cumple con las características de desempeño aprobadas por las Guías de Validación de la FDA (ICH Q2 (R1), 2005).

#### 5.4.1.1.2 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se define como la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración de un analito en un intervalo de concentraciones pertinentes para la aplicación de un método (ICH Q2 (R1), 2005). La linealidad del sistema se estableció preparando curvas de calibración de la xantocilina (**21**) (1, 2.5, 5, 10 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ); y la respuesta analítica se determinó obteniendo el ABC del pico cromatográfico correspondiente al producto **21** en el detector de masas utilizando la técnica de electrospray en modo positivo  $[\text{ESI}]^+$ . En la **Tabla 8** y **Figura 22** se muestran los resultados de esta evaluación. Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ;  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  (ICH; Q2 (R1) 2005).

**Tabla 8.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema del compuesto **21**.

ESI-Positivo		
$\beta_1$	27635.39572	
$\beta_0$	2244.157207	
r	0.9982	
$r^2$	0.9965	
IC ( $\beta_1$ ) al 95%	IC superior	IC inferior
	28967.61	26303.17
IC ( $\beta_0$ ) al 95%	IC superior	IC inferior
	18639.15	-14150.84



**Figura 22.** Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico por [ESI]<sup>+</sup>.

Como puede observarse los valores de  $\beta_1$ ,  $\beta_0$ ,  $r$  y  $r^2$  de las curvas de calibración obtenidas se encuentran dentro de los límites establecidos por la ICH, por lo que se puede concluir que la linealidad del sistema se cumple para la xantocilina (21) dentro del rango de concentraciones analizadas.

#### 5.4.1.1.3. Linealidad y exactitud del método.

##### 5.4.1.1.3.1 Linealidad del método.

Para evaluar la linealidad del método se realizaron ocho curvas del estándar (21) recuperado a partir del análisis de la matriz. Las concentraciones adicionadas del estándar a la matriz fueron de 5, 10 y 20 µg/mL. La respuesta de la cantidad recuperada del estándar se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz de trabajo sin adicionar el marcador analítico. En las **Tablas 9-10** se muestran los resultados obtenidos y en la **Figura 23** se muestra la curva de calibración del compuesto 21.

**Tabla 9.** Resultados experimentales de la evaluación de la linealidad del método.

Concentración de xantocilina (21) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración de xantocilina (21) adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	ESI-Positivo	
		ABC	Concentración de xantocilina (21) recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
5	5	147681.7	5.26
5	5	147586.7	5.26
5	5	155411.7	5.54
5	5	153059.7	5.46
5	5	156720.7	5.59
5	5	156209.0	5.57
5	5	154297.0	5.50
5	5	154686.0	5.52
10	10	266674.7	9.57
10	10	266579.7	9.57
10	10	274404.7	9.85
10	10	272052.7	9.76
10	10	275713.7	9.90
10	10	275202.0	9.88
10	10	273290.0	9.81
10	10	273679.0	9.82
20	20	547027.7	19.71
20	20	546932.7	19.71
20	20	554757.7	19.99
20	20	552405.7	19.91
20	20	556066.7	20.04
20	20	555555.0	20.02
20	20	553643.0	19.95
20	20	554032.0	19.97



Figura 23. Gráfica de la linealidad del método para la xantocilina (21).

Tabla 10. Parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad de método.

ESI-Positivo		
$\beta_1$	0.9707	
$\beta_0$	0.3903	
r	0.9990	
$r^2$	0.9980	
IC ( $\beta_1$ ) al 95%	IC superior	IC inferior
	0.98955	0.951779
IC ( $\beta_0$ ) al 95%	IC superior	IC inferior
	0.64016	0.14041

Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ,  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  (ICH; Q2 (R1) 2005). Estos resultados permiten establecer que el método es lineal ya que cumple con los parámetros de calidad establecidos por la ICH.

#### 5.4.1.1.3.2 Exactitud del método.

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de la concentración del estándar recuperado y el valor de referencia (concentración adicionada); así este parámetro de desempeño se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro. Los resultados de estos análisis se resumen en la **Tabla 11**. El método analítico es exacto si los porcentajes de recobro se encuentran en un rango entre el 98-102% y el coeficiente de variación no es mayor del 2%(ICH; Q2 (R1) 2005).

**Tabla 11.** Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la xantocilina (21) por [ESI]<sup>+</sup>.

Concentración de xantocilina (21) adicionada (µg/mL)	Recobro (%)	X	DE	CV (%)
5	105.25			
5	105.19			
5	110.85			
5	109.15			
5	111.80			
5	111.43			
5	110.04			
5	110.32	109.3	2.91	2.66
10	95.69			
10	95.65			
10	98.48			
10	97.63			
10	98.96			
10	98.77			
10	98.08			
10	98.22	98.0	1.31	1.34
20	98.57			
20	98.55			
20	99.96			
20	99.54			
20	100.20			
20	100.11			
20	99.76			
20	99.83	99.6	0.65	0.66

Los porcentajes de recobro para las determinaciones de la concentración de 21 por [ESI]<sup>+</sup> no se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de validación. Esto debido por una parte a la complejidad de la matriz de trabajo y también debido a la sensibilidad del detector utilizado.

#### 5.4.1.1.4 Precisión del sistema.

La precisión de un sistema se define como la concordancia entre resultados analíticos individuales aplicando el procedimiento repetidamente a una muestra del estándar de referencia. Para realizar la evaluación de la precisión del sistema se debe considerar la dispersión de los datos individuales con relación a la media, esto expresado como la DE y el CV. En el presente trabajo se evaluó la precisión del sistema en términos de repetitividad mediante el análisis de seis réplicas de cada estándar a una concentración conocida (25 µg/mL). Para este análisis se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones experimentales, mismo analista y durante un intervalo corto de tiempo. Los resultados y el análisis estadístico de los mismos se muestran en la **Tabla 12**. El criterio de aceptación establece que para que un método tenga repetibilidad el CV no debe ser mayor al 2.0%.

**Tabla 12.** Repetibilidad del método para la cuantificación de la xantocilina (21).

Réplica	Concentración del estándar (µg/mL)	ESI-Positivo	
		ABC	
1	25	698793	
2	25	700983	
3	25	705890	
4	25	705668	
5	25	706018	
6	25	704956	
		X	703718.00
		DE	3068.50
		CV (%)	0.44

Los resultados anteriores demuestran que el método es preciso ya que cumple con el parámetro de calidad establecido en la ICH.

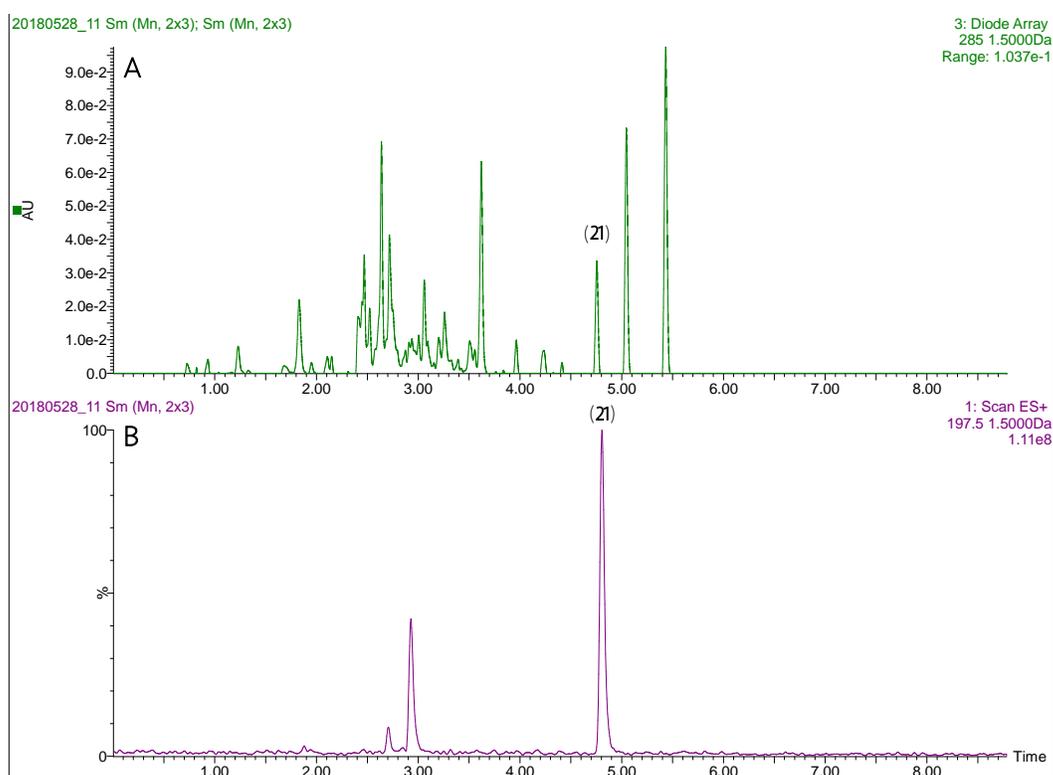
#### 5.4.1.1.5 Cuantificación de la xantocilina (21) en diferentes muestras de manzanilla por CLUE-ESI/EM.

Enseguida, utilizando el método analítico validado, se realizó la cuantificación del contenido de la xantocilina (21) en 17 muestras comerciales ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz17}$ ) y una muestra de referencia ( $B_{Mz18}$ ), las cuales se prepararon a una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (matriz multicomponente). Para realizar este análisis se utilizó la ecuación de la recta descrita para la linealidad del sistema  $y = 27635x + 2244.2$ . Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Cuantificación de la xantocilina (21) por CLUE-ESI/EM en varias muestras de manzanilla.

Muestra	ESI-Positivo ABC	Cantidad de xantocilina (21) ( $\mu\text{g}$ ) por cada gramo de droga cruda	% de xantocilina (21)
$B_{Mz1}$	168836	6.03	1.21
$B_{Mz2}$	7663	0.20	0.04
$B_{Mz3}$	261367	9.38	1.88
$B_{Mz4}$	7929	0.21	0.04
$B_{Mz5}$	316551	11.37	2.27
$B_{Mz6}$	401822	14.46	2.89
$B_{Mz7}$	73857	2.59	0.52
$B_{Mz8}$	174194	6.22	1.24
$B_{Mz9}$	186758	6.68	1.34
$B_{Mz10}$	841072	30.35	6.07
$B_{Mz11}$	194471	6.96	1.39
$B_{Mz12}$	309208	11.11	2.22
$B_{Mz13}$	303081	10.89	2.18
$B_{Mz14}$	171752	6.13	1.23
$B_{Mz15}$	292090	10.49	2.10
$B_{Mz16}$	322511	11.59	2.32
$B_{Mz17}$	324566	11.66	2.33
$B_{Mz18}$	349942	12.58	2.52

Los resultados obtenidos muestran que las marcas extranjeras ( $B_{Mz2}$  y  $B_{Mz4}$ ) contienen en trazas a la xantocilina (21), este experimento concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de identidad por RMN y EM exactas. La muestra  $B_{Mz10}$  contiene el mayor porcentaje de xantocilina (21) en comparación con las demás muestras comerciales que tienen un porcentaje muy similar en su contenido de xantocilina (21). En la **Figura 24** se ilustra el perfil cromatográfico por el detector de PDA y el de corriente iónica total modo positivo de la muestra  $B_{Mz10}$ .



**Figura 24.** A) Perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt de la muestra comercial  $B_{Mz10}$  ( $\lambda=285$  nm). B) Cromatograma de corriente iónica total en modo positivo para identificar a la xantocilina (21) ( $t_R$  4.82 min).

## 6. CONCLUSIONES.

- o Se desarrolló un procedimiento experimental más sencillo para la preparación de muestras multicomponentes de la droga cruda de *M. recutita* en comparación con el descrito en la FHEUM 2ª Edición. En este trabajo se propusieron dos matrices multicomponentes de trabajo; el extracto acuoso seco y la fracción de AcOEt derivada de la infusión. Esta última la más adecuada para los ensayos de identidad y composición.
- o Se analizaron 17 marcas comerciales de manzanilla y una de referencia a través de la preparación de 36 matrices de trabajo, 18 de las fracciones de AcOEt y 18 de los extractos acuosos. Se desarrollaron tres ensayos de identidad (CCF, EM y RMN) para la identificación de xantocilina (21), marcador propuesto en el presente proyecto para la manzanilla cultivada en México. En otro estudio paralelo al presente realizado en el grupo de trabajo se propuso este mismo compuesto como marcador del aceite esencial, en el cual el contenido de este producto es mucho mayor (~50 %). Mediante la técnica de espectrometría de masas de alta resolución en modo positivo se evidenció también la presencia de la xantocilina (21) en todas las muestras evaluadas. Por esta misma técnica se identificaron a las cumarinas herniarina (2) y esculetina (4) y los dicitloéteres (19 y 20). Se obtuvo un perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt de *M. recutita* por CLUE-ESI/EM en las cuales se identificó la presencia de la xantocilina (21) y de los flavonoides, el 7-*O*-glucósido de apigenina (1) y al 7-*O*-glucósido de isoramnetina (22).
- o Se validó un método analítico por CLUE-ESI/EM para cuantificar el contenido de xantocilina (21) en 18 muestras problema. El método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas. Al aplicar el método en todas las muestras se encontró que el contenido del marcador fue mucho mayor en las muestras de origen mexicano que en las cultivadas en Europa o Estados Unidos;

estas muestras solo contenían trazas del producto 21. Este análisis debería extenderse a muestras europeas y americanas para determinar, sin lugar a dudas, que el contenido del marcador propuesto para la especie mexicana es mínimo en las mismas.

- o No se puede definir con los resultados obtenidos si el mayor contenido de xantocilina (21) en las muestras comerciales de México se deba a un cambio genético en los cultivares mexicanos. Habría que analizar las muestras recolectadas directamente de las zonas de cultivo y en diferentes épocas del año. En este trabajo se asumió que las drogas fueron recolectadas en una misma época. Lamentablemente en México no existe una regulación al respecto.
- o Los resultados generados constituyen pruebas de identidad química y composición para el control de calidad de la droga cruda de *M. recutita* y será de utilidad para la actualización de la monografía de la droga cruda en la tercera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. La generación de este documento permitirá establecer el control de calidad riguroso de esta especie cultivada en México.

## 7. PERSPECTIVAS.

- Analizar los tallos y partes aéreas de *M. recutita* con la finalidad de comparar la composición química de las flores con la de las ramas mediante EM-APCI, y así determinar de manera concluyente la inclusión de los tallos en los productos comerciales elaborados con manzanilla.
- Establecer las variaciones fenológicas de la flor de manzanilla recolectada en Juchitepec, Estado de México.
- Establecer las variaciones geográficas de la flor de manzanilla recolectada en varias zonas de México.
- Se propone realizar un análisis de los componentes principales (PCA) con el objetivo de obtener información estadísticamente significativa de la composición química en varias muestras comerciales de manzanilla.
- Cuantificar el contenido de xantocilina (21) en muestras comerciales mediante la técnica de RMN.
- Redactar la nueva monografía de manzanilla para su inclusión en la tercera edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Agatonovic-Kustrin, S., Babazadeh, D., Morton, D., Yusof, A. (2015) Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. *Journal of Chromatography*, 1385, 103-110.
- Alvarez. A., Mungía N. (2006) Pruebas de identidad y eficacia de la droga cruda *Matricaria recutita* (ASTERACEAE): una contribución para la elaboración de la monografía tipo OMS de la planta cultivada en México (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Avonto, C., Rua, D., Lasonkar, P., Chinttiboyina, A., Khan, I. (2017) Identification of a compound isolated from German chamomile (*Matricaria chamomilla*) with dermal sensitization potential. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 318, 16-22.
- Avula, B., Wang, YH., Wang, M., Avonto, C., Zhao, J., Smillie, TJ., Rua, D., Khan, I.A. (2014) Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/*Chrysanthemum* flower heads. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 278-288.
- Avula, B., Wang YH., Isaac, G., Yuk, J., Wrona, M., Yu, K., Khan I. (2017) Metabolic Profiling of *Hoodia*, Chamomile, *Terminalia Species* and Evaluation of Commercial Preparations Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Planta Medica*, 83, 1297-1308.
- Begun J., Bhuiyan N., Taznin T. (2010) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Eupatorium Triplinerve* Vahl. Aerial parts. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences*, 3, 543-547.
- Chao-Mei, M., Winsor, L., Daneshtalab, M. (2007) Quantification of Spiroether Isomers and Herniarin of Different Parts of *Matricaria matricarioides* and Flowers of *Chamaemelum nobile*. *Phytochemical Analysis*, 18, 42-49.
- Crockford, D., Maher, A., Ahmadi, K., Barrett, A., Plumb, R., Wilson, I., Nicholson, J., (2008) <sup>1</sup>H NMR and UPLC-MS statistical heterospectroscopy: Characterization of drug metabolites (xenometabolome) in epidemiological studies. *Analytical Chemistry*, 80, 6835.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A., Ciric, A., Barreira, J., Sokovic, M., Oliveira, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. (2015) Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Journal of Functional Food*, 16, 114-124.
- Díaz., M. (2007) Validación de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar xantocilina en *Matricaria recutita* y establecer los perfiles de disolución de

- cápsulas duras de un extracto acuoso de *Hintonia standleyana*. (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Engström, M., Plijrvi, M., Salminen, J. (2015) Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin, kaempferol and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4068-4070.
  - Escobar, K. (2008) La manzanilla: Una forma de consumo global, *Revista de Ciencias Sociales de la Universidad Iberoamericana*, 6, 37-57.
  - Fajemiroye, JO., Ferreira, NL., Oliveira, LP., Elusiyan, CA., Pedrino, GR., Cunha, LC., Conceição, EC. (2016) *Matricaria recutita* and its Isolate-Apigenin: Economic Value, Ethnopharmacology and Chemico-Biological Profiles in Retrospect. *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4, 17-31.
  - FHEUM (2013). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos segunda edición, Secretaría de Salud, CDMX 119p
  - Franke, R., Schilcher, H. (2005) Chamomile Industrial Profiles, United States of America.
  - Guzelmeric, E., Ristivojević, P., Vovk, I., Milojković-Opsenica, D. (2017) Quality assessment of marketed chamomile tea products by a validated HPTLC method combined with multivariate analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 132, 35-45.
  - Hagh, G., Hatami, A., Safaei, A., Mehran, M. (2014) Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9, 31-37.
  - Hardman, R. (2015) Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Chamomile Medicinal, Biochemical, and Agricultural Aspects Volumen 13, United States of America.
  - International Conference on Harmonisation (ICH Harmonised Tripartite Guideline) (2005). Validation of analytical procedures: Text and Metodology Q2A y Q2B, Q2 (R1).
  - Jabri, MA., Hajji, N., Wannes, D., Tounsi, MJ., Abdellaoui, A., Nasri, M., Marzouki, L., Sebai, H. (2017) HPLC/PDA/ESI-MS/MS analysis of chamomile decoction and mechanism of its protective effects on aspirin-induced small bowel injuries. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 53472-534780.
  - Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, AA., Nash, RJ. (2008) Protective Effects of Dietary Chamomile Tea on Diabetic Complications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8206-8211.
  - Katti HP., Singh P., Ramkishan A., Chandrashekhar VM., Sowmya C., Panji MA. (2014) Anti-inflammatory Activity of *Matricaria recutita* L. against Acute and Chronic Inflammatory Models. *Star Journal*, 3, 1-7.
  - Kumar, D. (2016) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy for Metabolic Profiling of Medicinal Plants and Their Products. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46, 400-412.

- Liang, Y., Xie, P., Chan, K. (2004) Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography A*, 11, 2033-2044.
- Liang, C., Ju, W., Pei, S., Tang, Y., Xiao, Y. (2017) Pharmacological Activities and Synthesis of Esculetin and Its Derivatives: A Mini-Review. *Molecules*, 22, 1-13.
- Loomuis, T.F., Ma, C., Daneshtalab, M. (2004) Medicinal plants and herbs of newfoundland. Part 1. Chemical constituents of the arial part of pineapple weed (*Matricaria matricarioides*). *DARU*, 12, 131-135.
- Maalik, A., Bukhari, SM., Zaidi, A., Shah, KH., Khan, F. (2016) Chlorogenic Acid: A Pharmacologically Potent Molecule. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 73, 851-854.,
- Meneses, JC., Soto, RM., Espinosa, T., Ramírez, M. (2008) Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *AGROCIENCIA*, 42, 425-433.
- Nordtröm A., Omaille G., Qin C., Siuzdak G. (2006). Nonlinear data alignment for ULPC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. *Analytical Chemistry*, 78, 3289-3295.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios.
- Nováková, L., Vildová, A., Mateus, J. P., Goncalves, T., Solich P. (2010) Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. *Talanta*, 82, 1271-1280.
- OMS (2011) Quality control methods for herbal materials. Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials, 1998. WHO Press, Geneva, p 187.
- Ortiz, M. I., Fernández-Martínez, E., Soria-Jasso, LE., Lucas-Gómez, I., Villagómez-Ibarra, R., González-García, MO., Castañeda-Hernández, G., Salinas-Caballero, M. (2016) Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 78, 248-256.
- Petitet, F. (2016) Les matricaires, des << camomilles >> d' intérêt pour la phyto-aromathérapie. *Phytherapie*, 14, 196-202.
- Petronilho, S., Maraschin, M., Coimbra, MA., Rocha, SM. (2012) *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*, 40, 1-12.
- Ph. Eur. (2017) The European Pharmacopoeia.
- Raal, A., Arak, E., Orav, A., Ivask, K. (2003) Comparación de aceites esenciales de *Matricaria recutita* L. de origen diverso. *Ars Pharmaceutica*, 2, 159-165.

- Raal, A., Orav, A., Pussa, T., Valner, C., Malmiste, B., Arak E. (2012) Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in comercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from differents countries. *Food Chemistry*, 131, 632-638.
- Ramírez-Durón, R., Cenicerós-Almaguer, L., Salazar-Aranda, R., Salazar-Cavazos, ML., Waksman de Torres, N. (2007) Evaluation of Thin-Layer Chromatography Methods for Quality Control of Commercial Products Containing *Aesculus hippocastanum*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Passiflora incarnata*, and *Tilia occidentalis*. *Journal of AOAC International*, 90, 920-924.
- Ross, IA. (2001) Medicinal Plants of the World, Vol 2. Totowa, NJ.
- Rubiolo, P., Belliardo, F., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Bicchi, C. (2006) Headspace-Solid-phase Microextraction Fast GC in Combination with Principal Component Analysis as a Tool to Classify Different Chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.). *Phytochemical Analysis*, 17, 217-225.
- Šalamon (2004) The Slovak gene pool of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) and comparison in its parameters. *HORT.SCI (PRAGUE)*, 31, 70-75.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava MK. (2011) Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 5, 82-96.
- Spiteri M., Jamin E., Thomas F., Rebours A., Lees M., Rogers. K. M., Retledge. D. N. (2015) Fast and global authenticity screening of honey using <sup>1</sup>H-NMR profiling. *Food Chemistry*. 189, 60-66.
- Srivastava, JK., Shankar, E., Gupta, S. (2011) Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *National Institutes of Health*, 12-13.
- Spraul-Mafred (2005), Abstracts, 57th Southeast/61st Southwest Joint Regional Meeting of the American Chemical Society Memphis, TN, Estados Unidos, Noviembre 4.
- Tomaya, DDO., Diz Filho, EBDS., Cavada, BS., Matias da Rocha, BA., Buzzo de Oliveira, SC., Cotrim, CA., Gomes Soares, VC., Delatorre, P., Marangoni, S., Toyama, MT. (2011) Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A<sub>2</sub> isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*. *Toxicon*, 57, 851-860.
- Tschiggerl, C., Bucar, F. (2012) Guaianolides and Volatile Compunds in Chamomile Tea. *Plant Foods Human Nutrition*, 67, 129-135.
- USP (2013) United States Pharmacopeia.
- Wang, Y., Tang, H., Nicholson, JK., Hylands, PJ., Sampson,, J., .Whitcombe, I., Stewart, CG., Calger, S., Oru, I., Holmes, E. (2006) Metabolic Strategy for the Classification and Quality Control of Phytomedicine: A Case Study of Chamomile Flower (*Matricaria recutita* L.). *Planta Medica*, 70, 250-255.
- Wichtl., M. (2004) Herbal drugs and phytopharmaceuticals 3<sup>o</sup> edición, Estados Unidos de Norte América.

- Zhang Z., He L., Lu L., Liu Y., Dong G., Miao J., Luo P. (2015) Characterization and quantification of the chemical compositions of *Scutellariae Barbatae herba* and differentiation from its substitute by combining UHPLC-PDA-QTOF-MS/MS with UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 109, 62-66.

## 9. ANEXOS.

-ANEXO 1. Espectros de masas de las fracciones de AcOEt ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ) y de la xantocilina (**21**) en modo positivo.

-ANEXO 2. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **21** y las muestras ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz17}$ ).

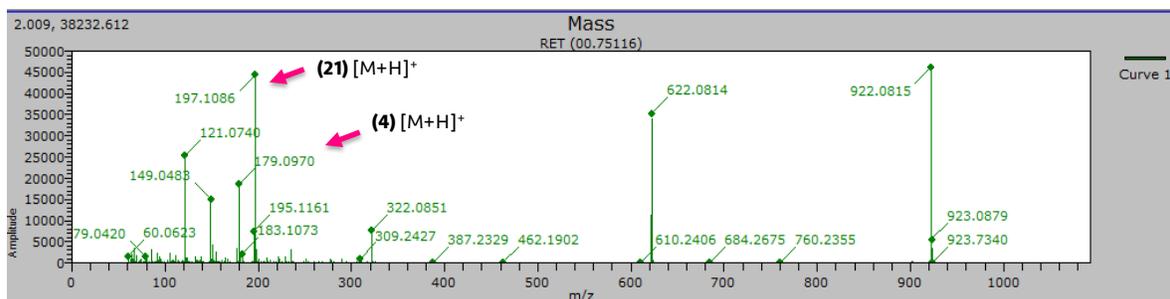
-ANEXO 3. Espectros de RMN  $^1\text{H}$ -CMPG de las muestras acuosas ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz18}$ ).

ANEXOS	
ANEXO 1. Espectros de masas de las fracciones de AcOEt ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ) y la xantocilina ( <b>21</b> ) en modo positivo.	67
Figura 1. Espectros de masas en modo positivo de las muestras $B_{Mz1-4}$ .	67
Figura 2. Espectros de masas en modo positivo de las muestras $B_{Mz5-8}$ .	68
Figura 3. Espectros de masas en modo positivo de las muestras $B_{Mz9-12}$ .	69
Figura 4. Espectros de masas en modo positivo de las muestras $B_{Mz13-16}$ .	70
Figura 5. Espectros de masas en modo positivo de las muestras $B_{Mz17}$ y $B_{Mz18}$ .	71
Figura 6. Espectros de masas en modo positivo de la xantocilina ( <b>21</b> ).	71
ANEXO 2. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN de <b>21</b> y las muestras ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ).	72
Figura 7. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de la xantocilina	72
Figura 8. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de la muestra $B_{Mz1}$ .	72
Figura 9. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz2}$ - $B_{Mz3}$ .	73
Figura 10. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz4}$ - $B_{Mz5}$ .	74
Figura 11. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz6}$ - $B_{Mz7}$ .	75
Figura 12. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz8}$ - $B_{Mz9}$ .	76
Figura 13. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz10}$ - $B_{Mz11}$ .	77
Figura 14. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz12}$ - $B_{Mz13}$ .	78
Figura 15. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz14}$ - $B_{Mz15}$ .	79
Figura 16. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $B_{Mz16}$ - $B_{Mz17}$ .	80
ANEXO 3. Espectros de RMN $^1\text{H}$ -CPMG de las muestras acuosas ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz18}$ ).	81
Figura 17. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz1}$ - $A_{Mz2}$ .	81

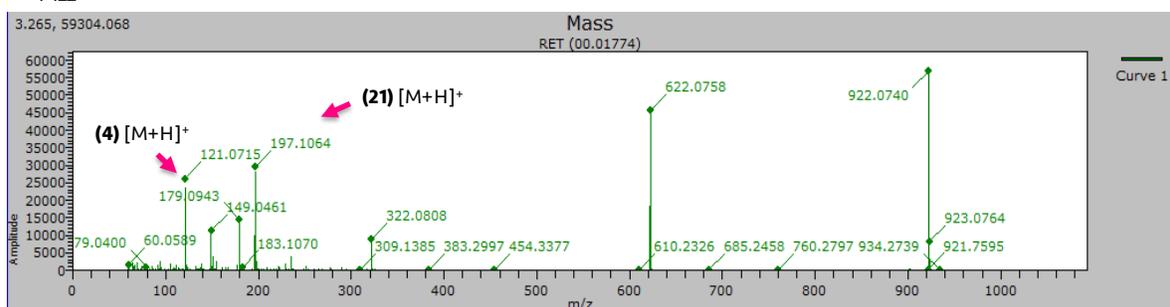
Figura 18. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz3}$ - $A_{Mz4}$ .	82
Figura 19. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz5}$ - $A_{Mz6}$ .	83
Figura 20. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz7}$ - $A_{Mz8}$ .	84
Figura 21. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz9}$ - $A_{Mz10}$ .	85
Figura 22. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz11}$ - $A_{Mz12}$ .	86
Figura 23. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz13}$ - $A_{Mz14}$ .	87
Figura 24. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz15}$ - $A_{Mz16}$ .	88
Figura 25. Espectros de $^1\text{H}$ -CPMG (700 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C) de las muestra $A_{Mz17}$ - $A_{Mz18}$ .	89

ANEXO 1. Espectros de masas de las fracciones de AcOEt ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ) y la xantocilina (21) en modo positivo.

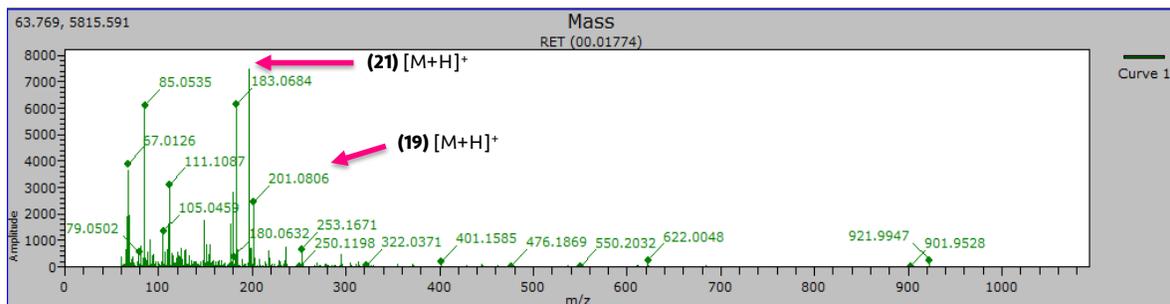
$B_{Mz1}$



$B_{Mz2}$



$B_{Mz3}$



$B_{Mz4}$

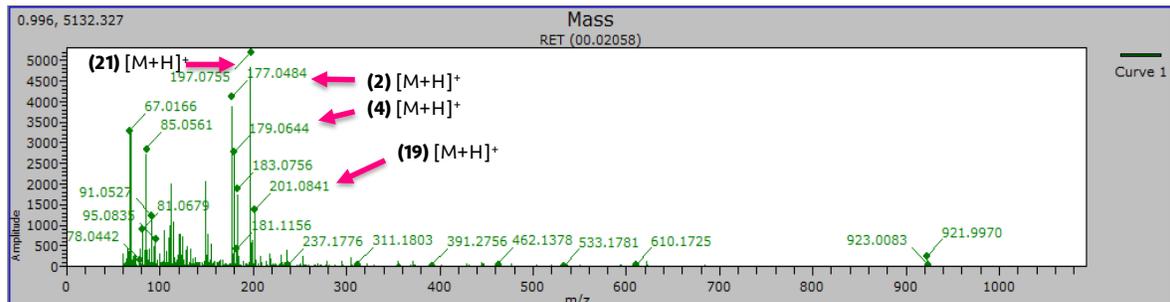
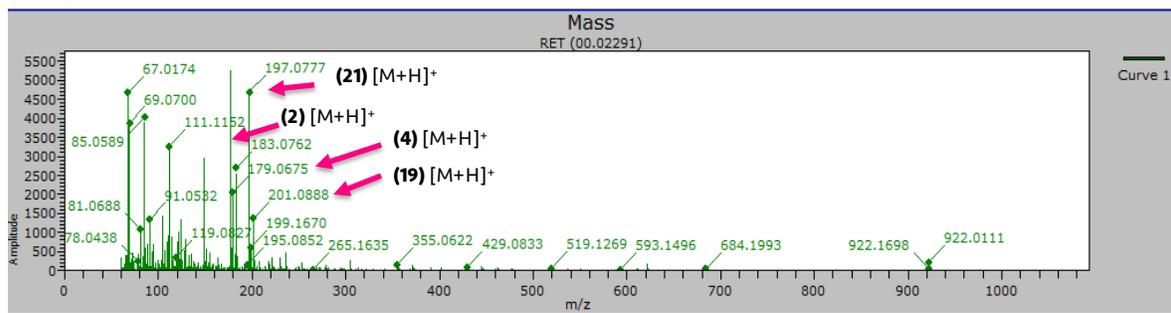
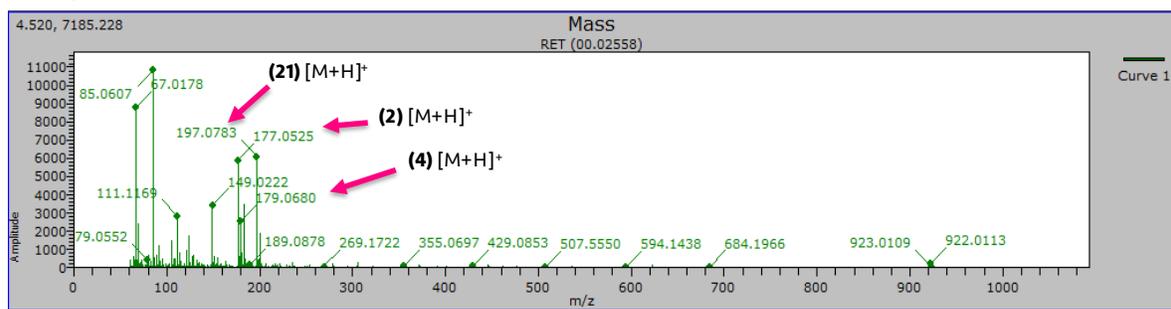


Figura 1. Espectros de masas en modo positivo de las muestras  $B_{Mz1-4}$ .

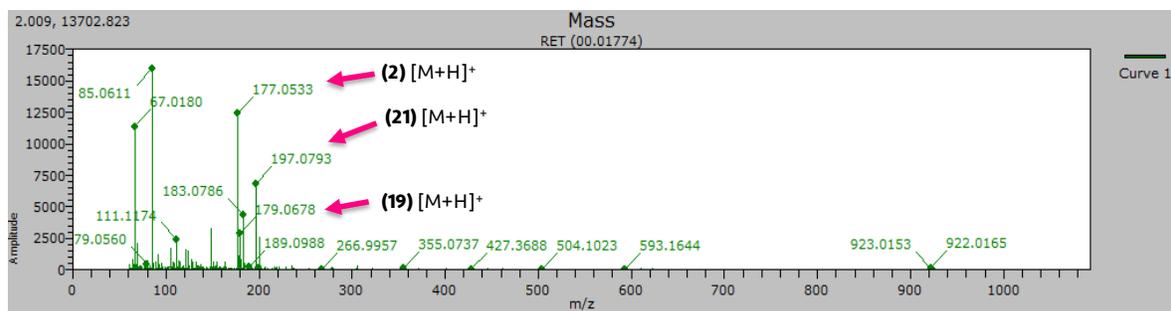
B<sub>Mz5</sub>



B<sub>Mz6</sub>



B<sub>Mz7</sub>



B<sub>Mz8</sub>

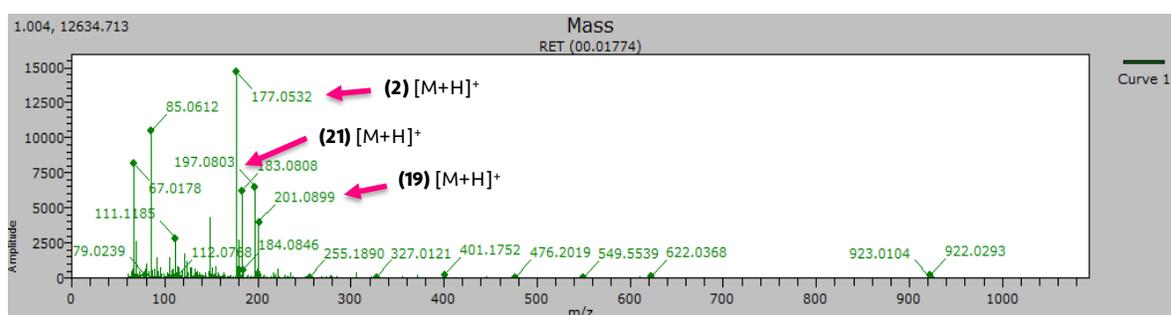
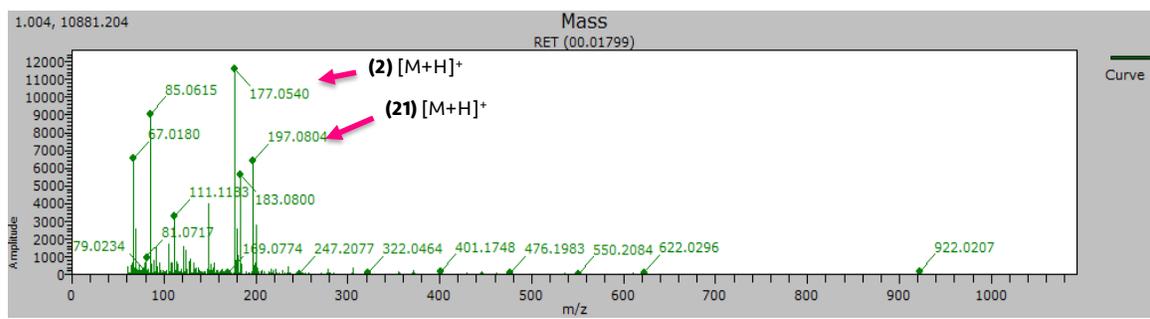
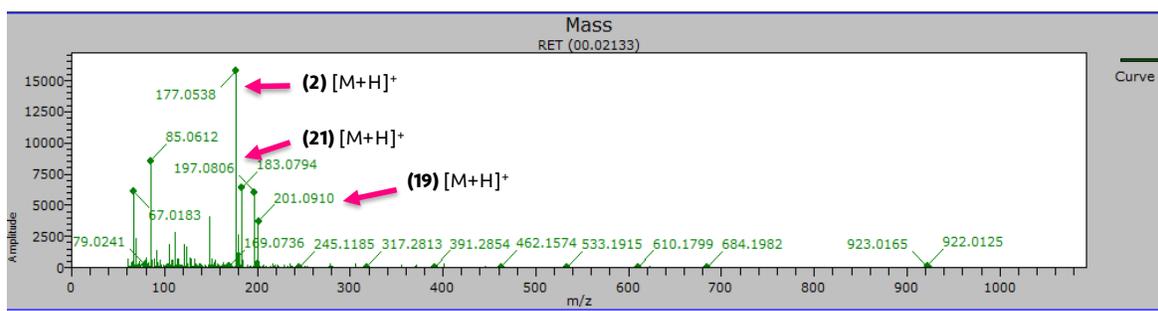


Figura 2. Espectros de masas en modo positivo de las muestras B<sub>Mz5-8</sub>

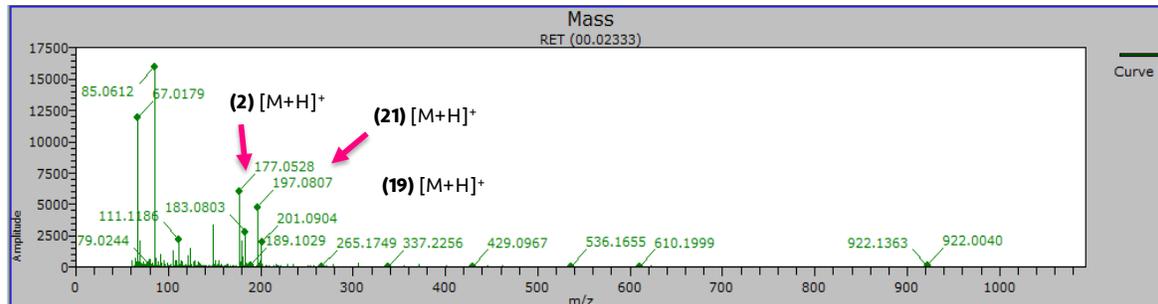
B<sub>Mz9</sub>



B<sub>Mz10</sub>



B<sub>Mz11</sub>



B<sub>Mz12</sub>

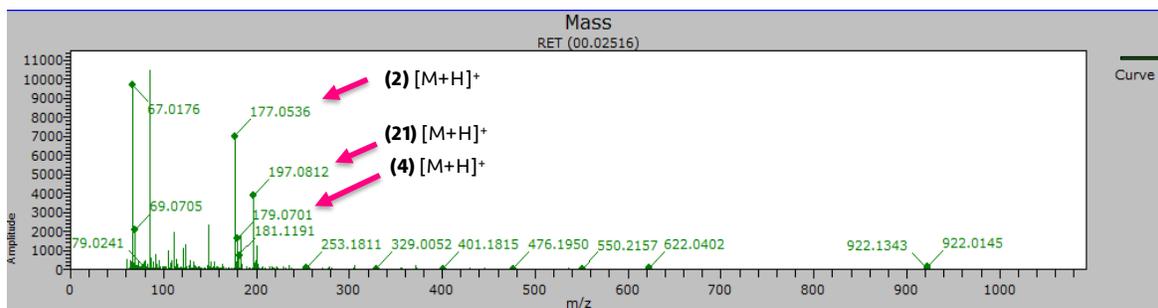
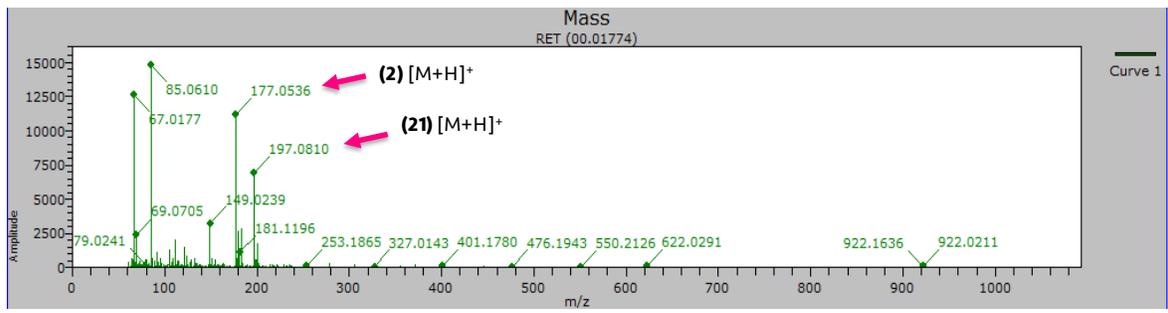
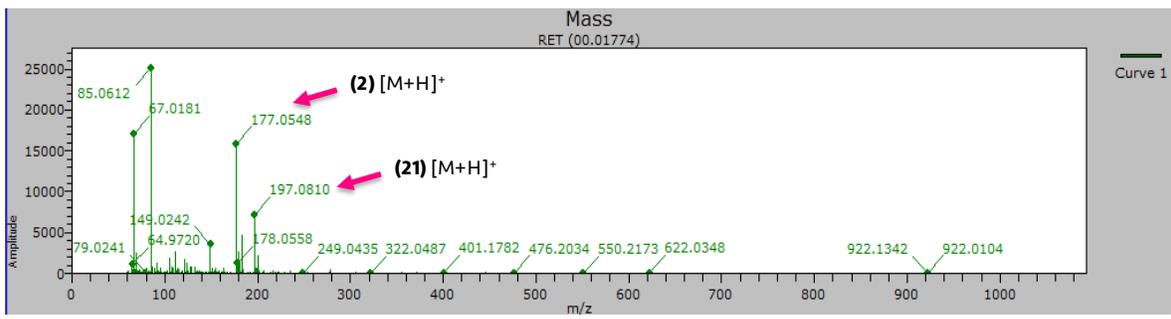


Figura 3. Espectros de masas en modo positivo de las muestras B<sub>Mz9-12</sub>

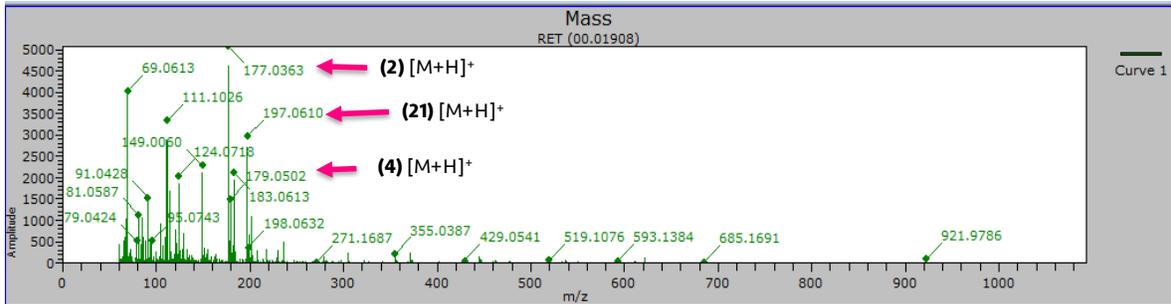
B<sub>Mz13</sub>



B<sub>Mz14</sub>



B<sub>Mz15</sub>



B<sub>Mz16</sub>

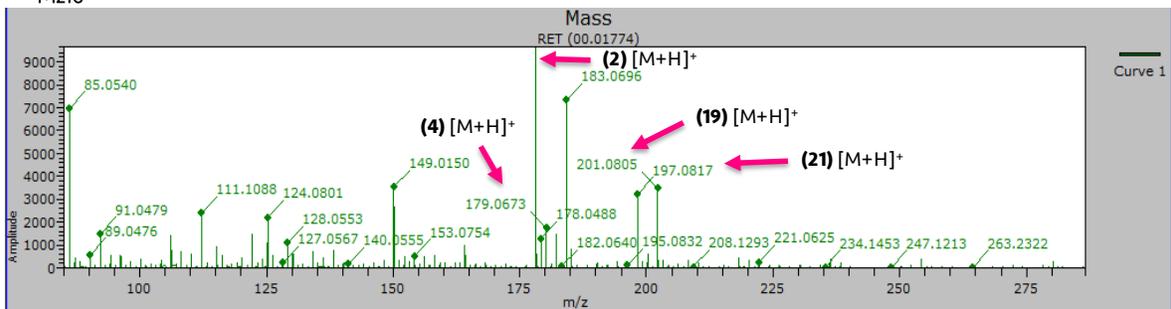
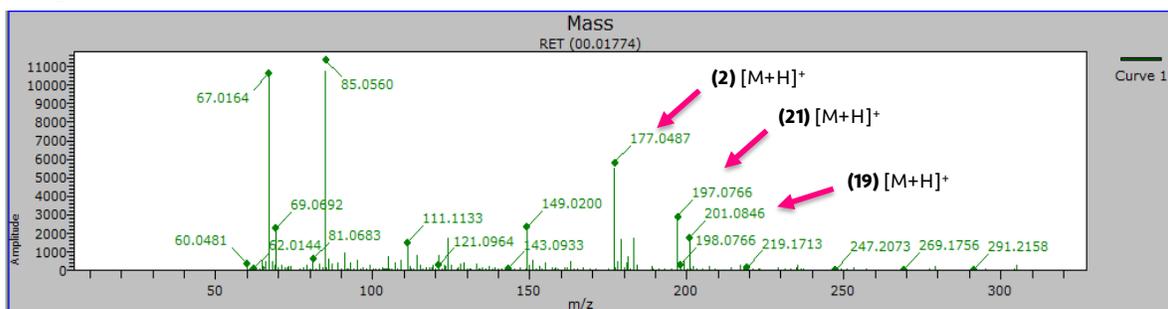


Figura 4. Espectros de masas en modo positivo de las muestras B<sub>Mz13-16</sub>

B<sub>Mz17</sub>



B<sub>Mz18</sub>

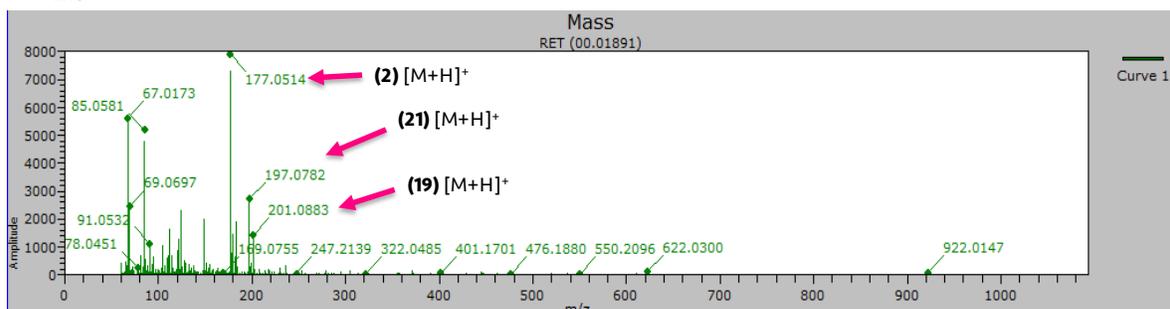


Figura 5. Espectros de masas en modo positivo de las muestras B<sub>Mz17</sub> y B<sub>Mz18</sub>.

Xantocilina

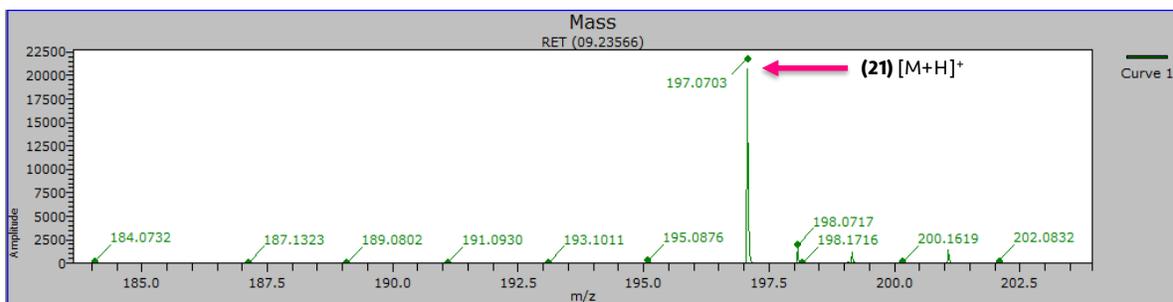


Figura 6. Espectros de masas en modo positivo de la xantocilina (21).

ANEXO 2. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **21** y las muestras ( $B_{Mz1}$ - $B_{Mz18}$ ).

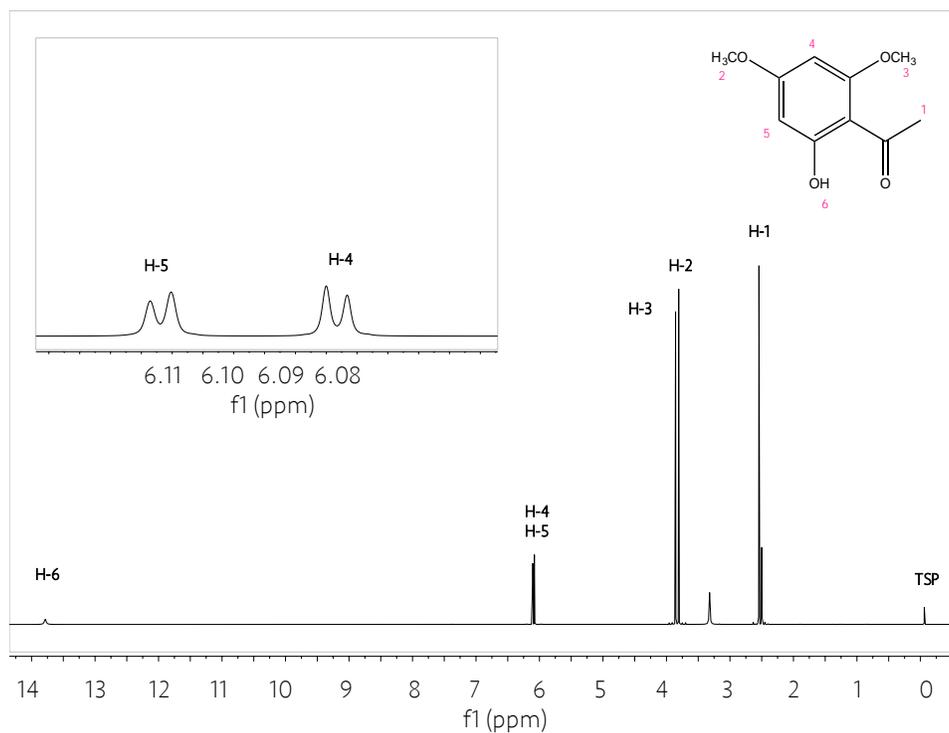


Figura 7. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de la xantocilina

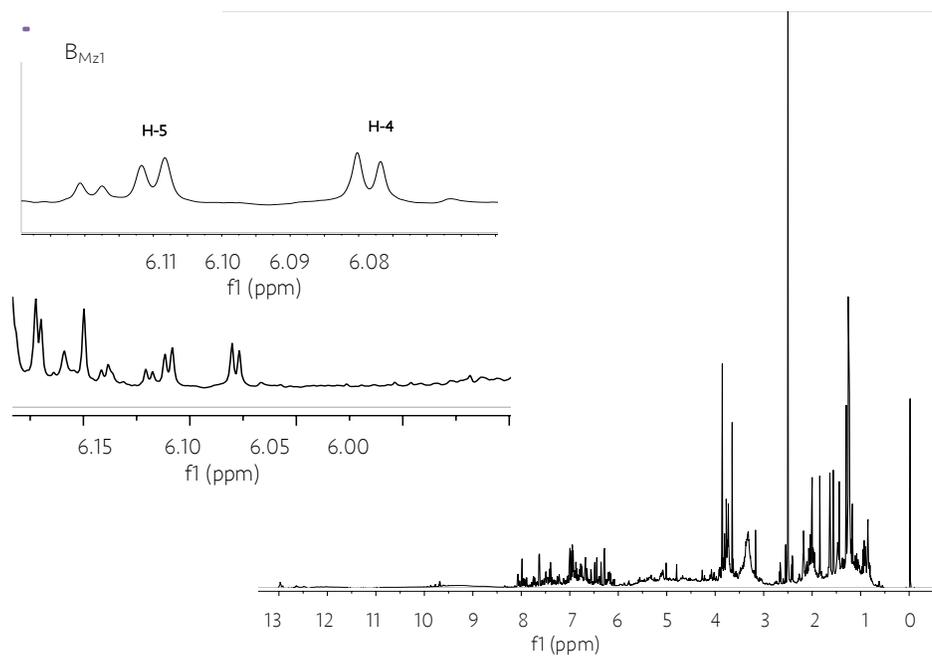


Figura 8. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de la muestra  $B_{Mz1}$ .

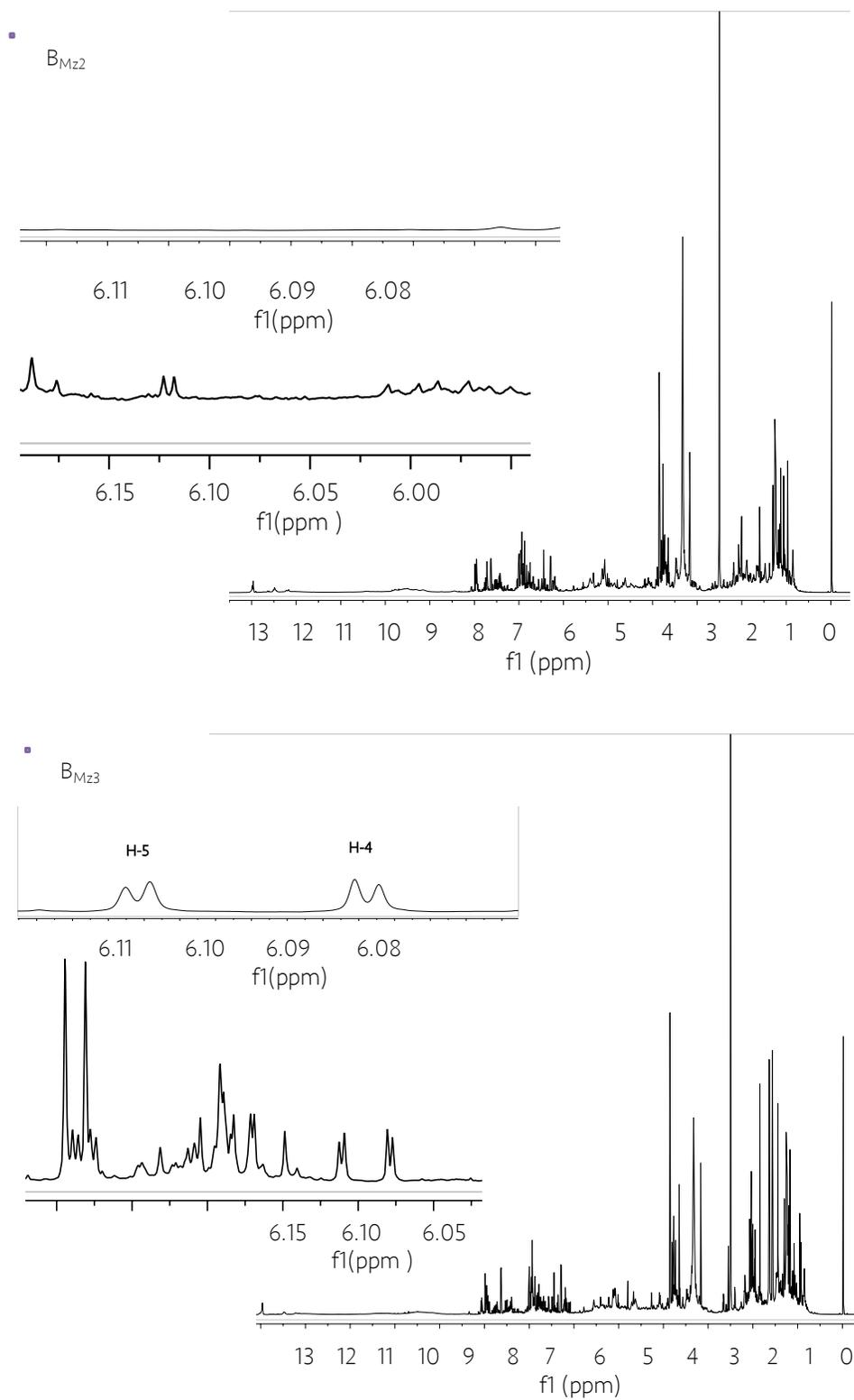


Figura 9. Espectros de  $^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $B_{Mz2}$ - $B_{Mz3}$ .

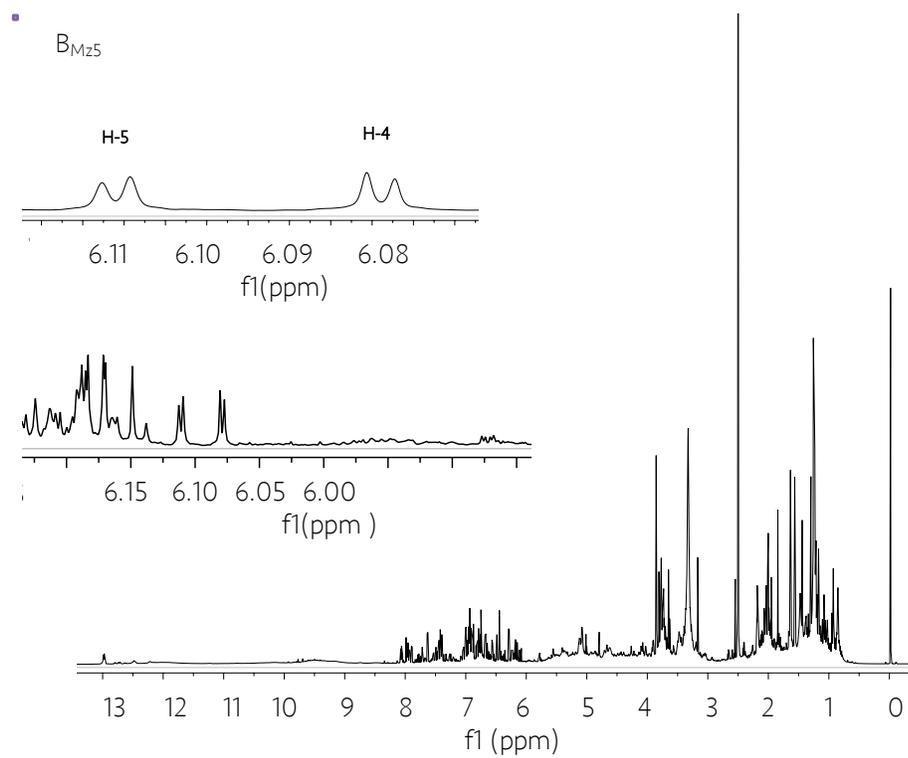
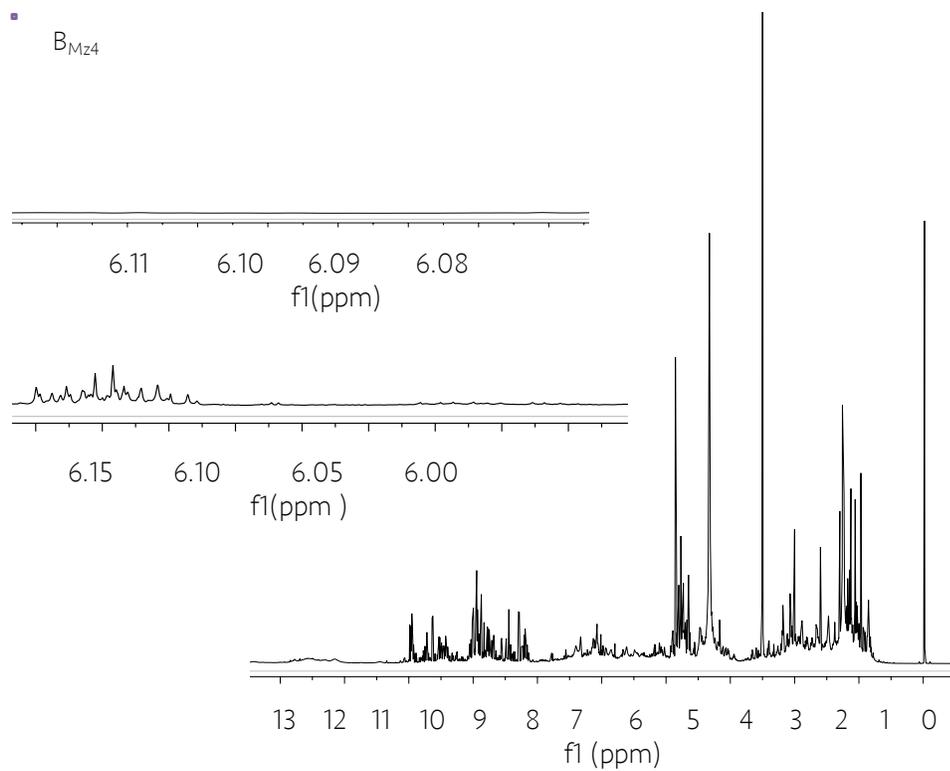


Figura 10. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $B_{Mz4}$ - $B_{Mz5}$ .

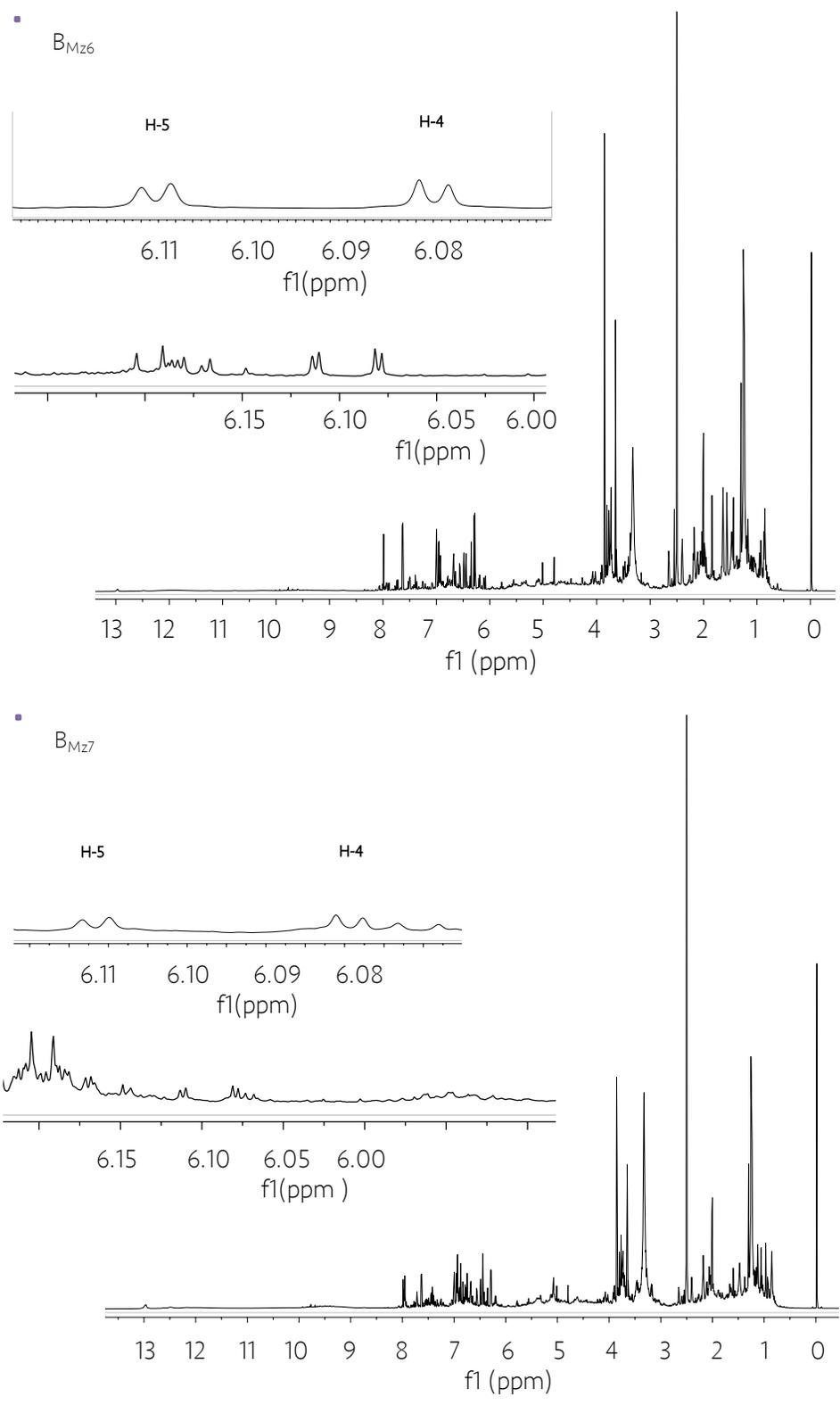


Figura 11. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $B_{Mz6}$ - $B_{Mz7}$ .

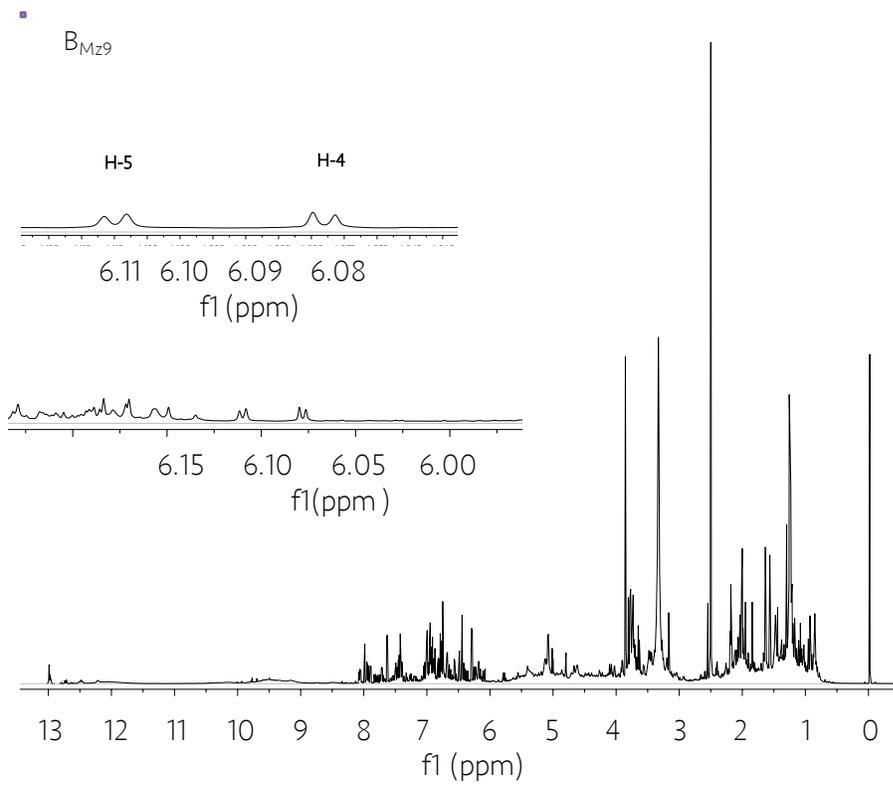
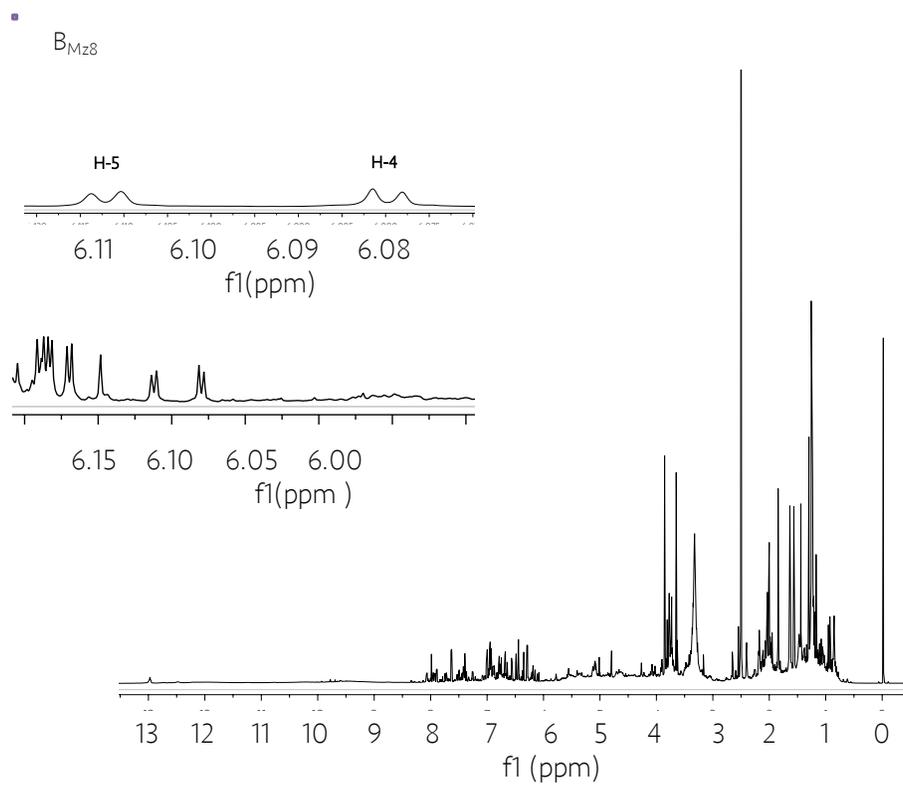


Figura 12. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25°C) de las muestra B<sub>Mz8</sub>-B<sub>Mz9</sub>.

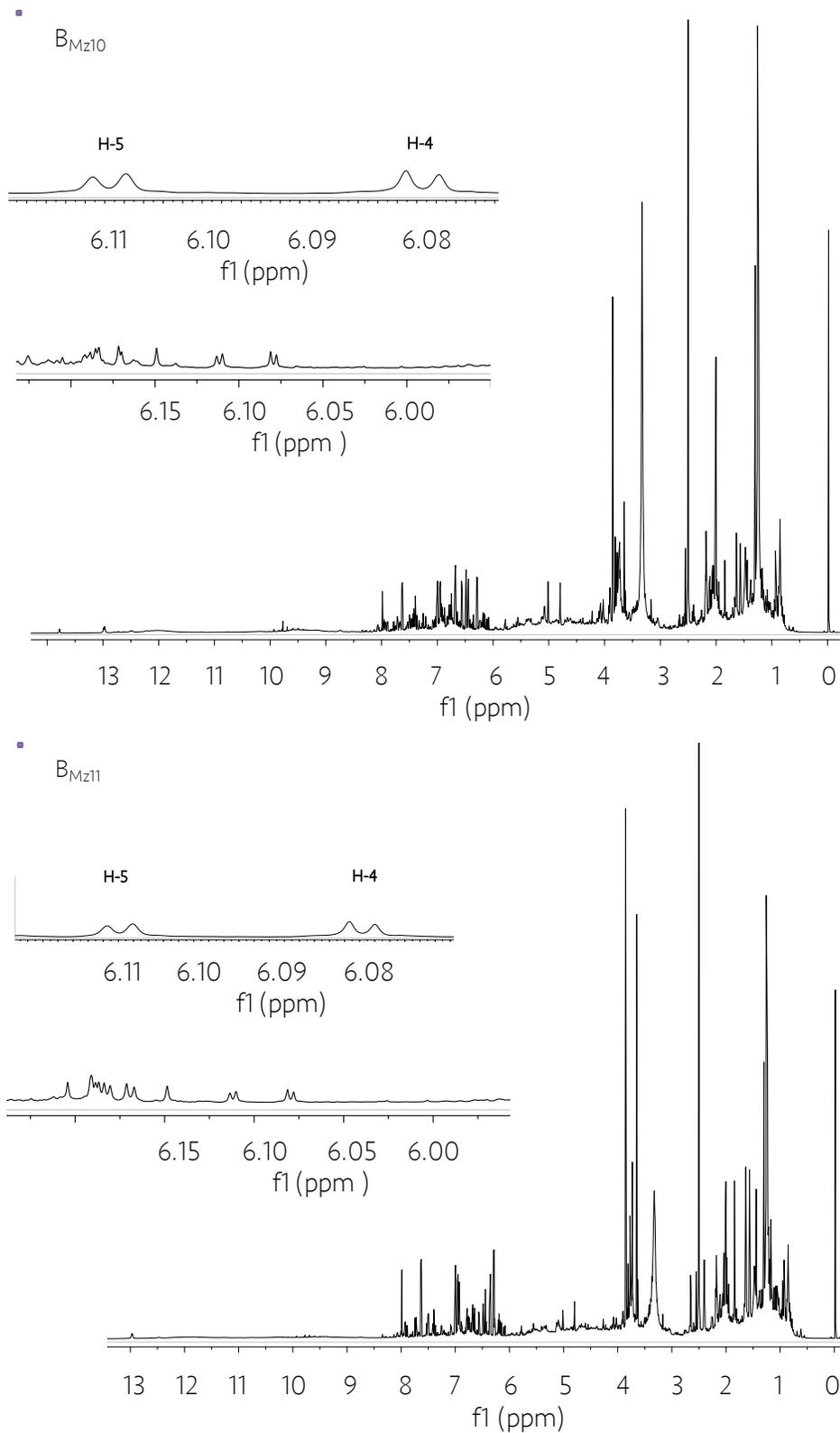


Figura 13. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $B_{Mz10}$ - $B_{Mz11}$ .

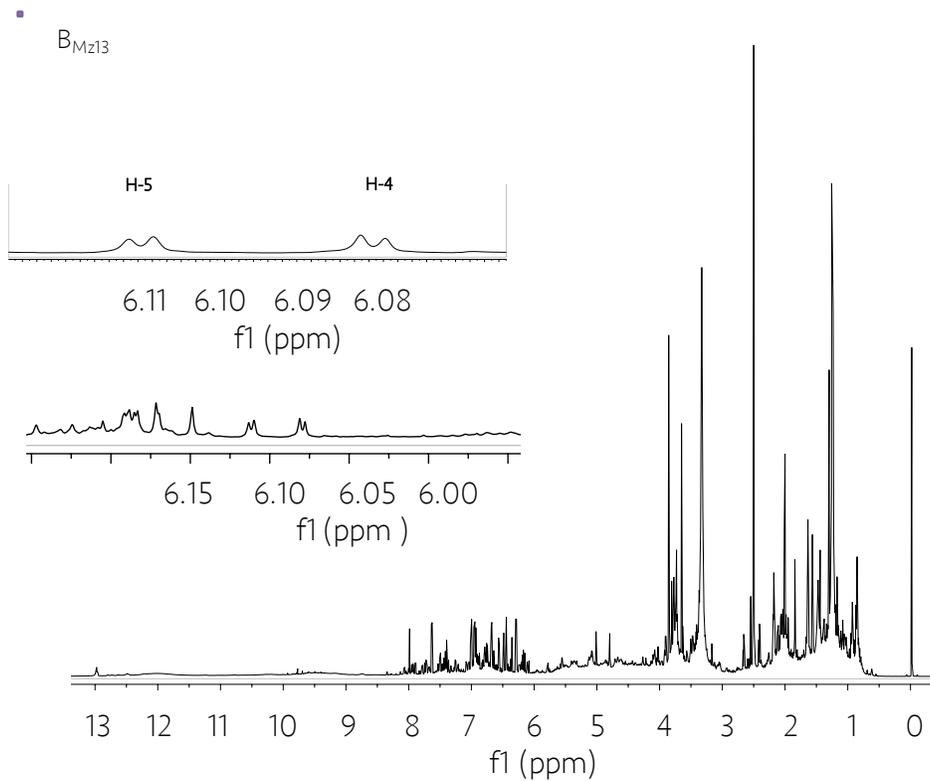
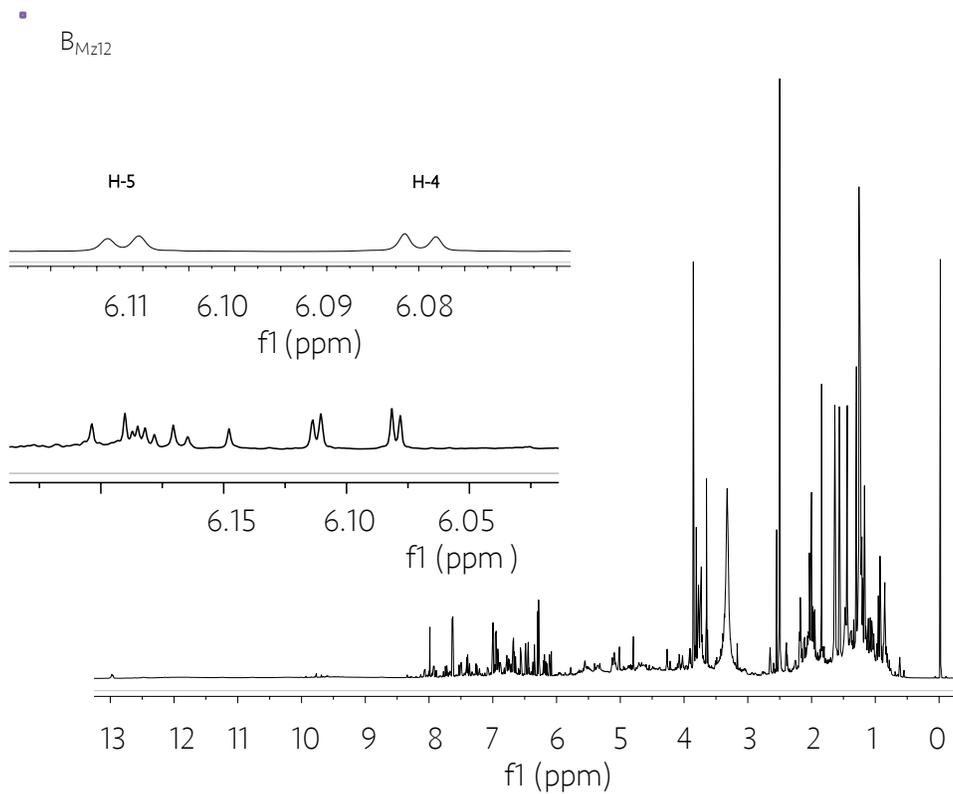


Figura 14. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25°C) de las muestra B<sub>Mz12</sub>-B<sub>Mz13</sub>.

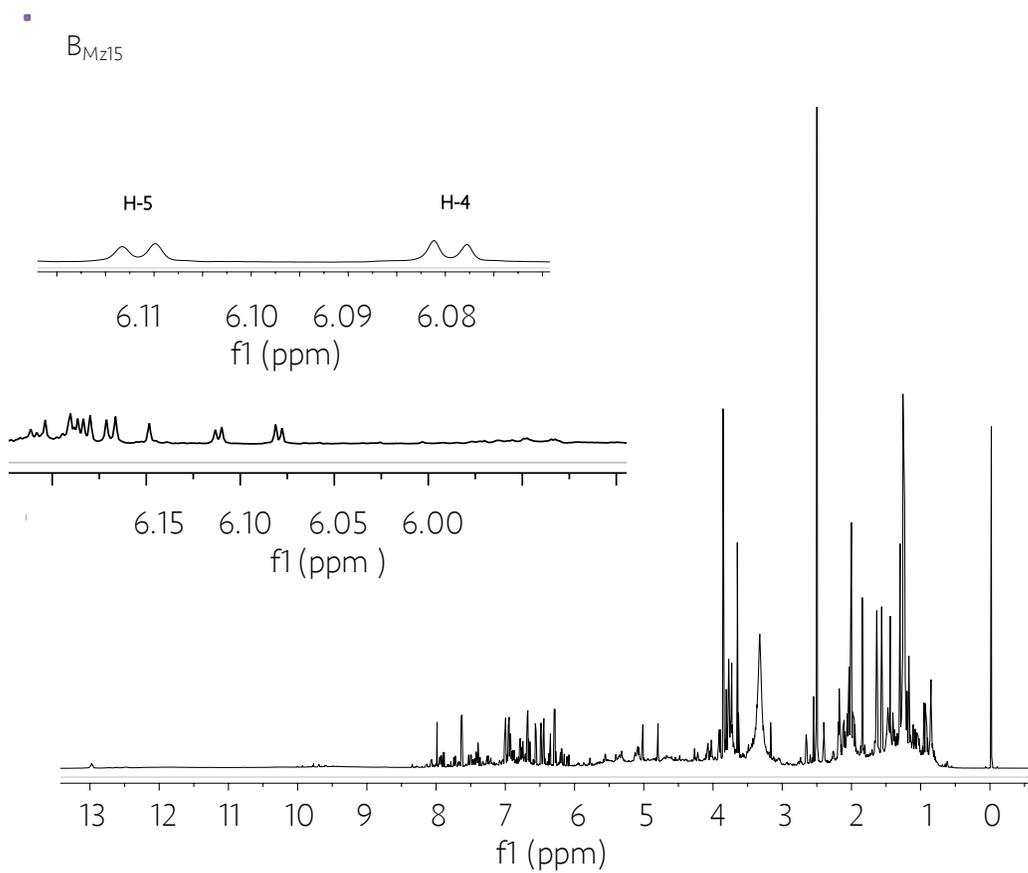
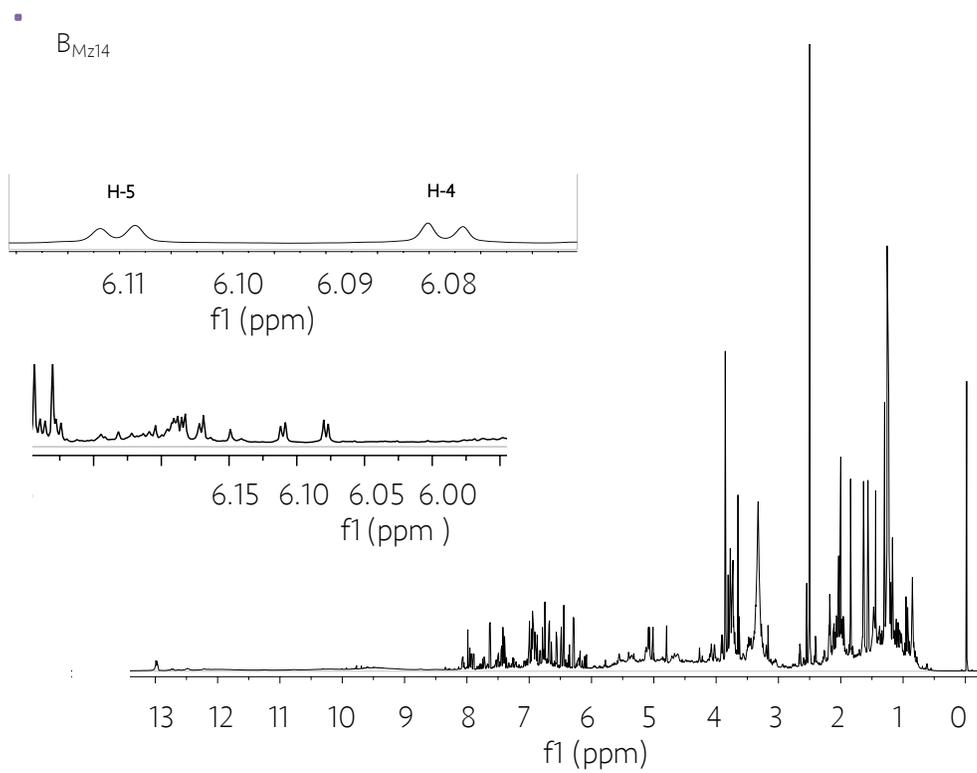


Figura 15. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $B_{Mz14}$ - $B_{Mz15}$ .

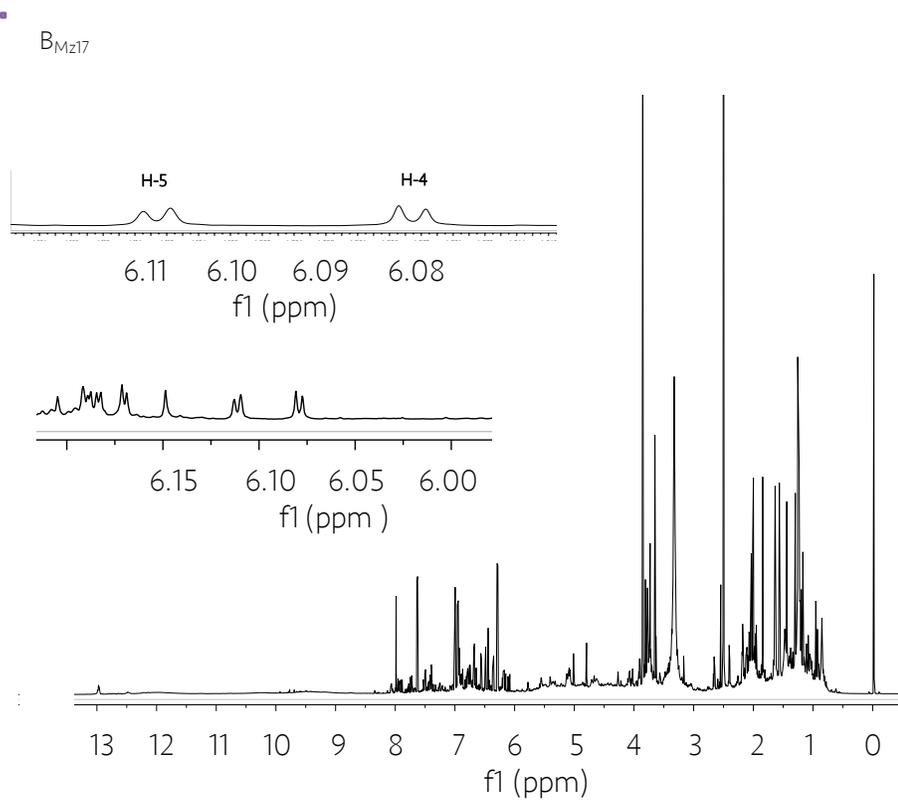
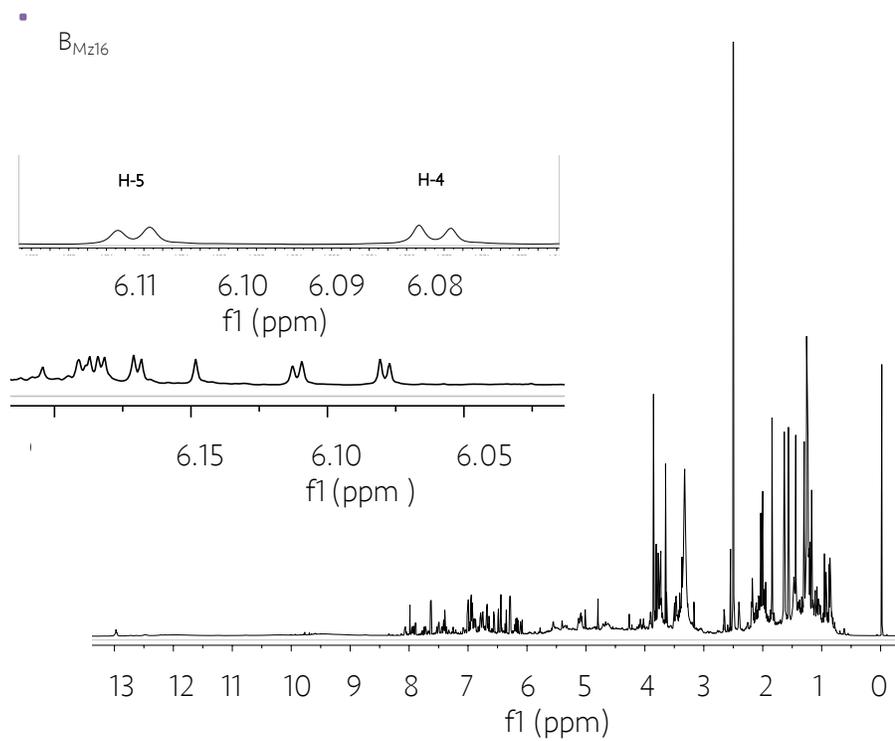


Figura 16. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $B_{Mz16}$ - $B_{Mz17}$ .

ANEXO 3. Espectros de RMN  $^1\text{H}$ -CMPG de las muestras acuosas ( $A_{Mz1}$ - $A_{Mz18}$ ).

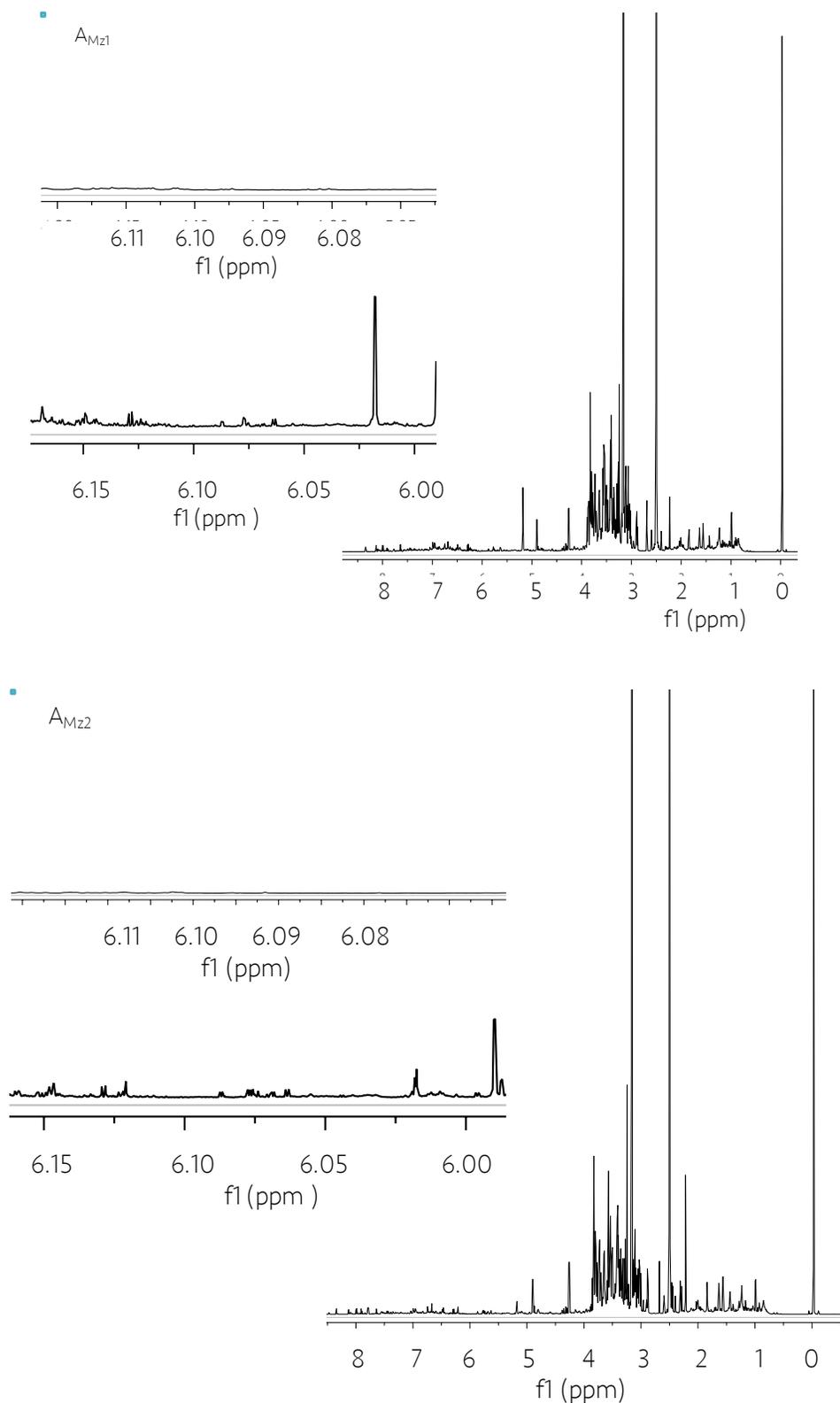


Figura 17. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz1}$ - $A_{Mz2}$ .

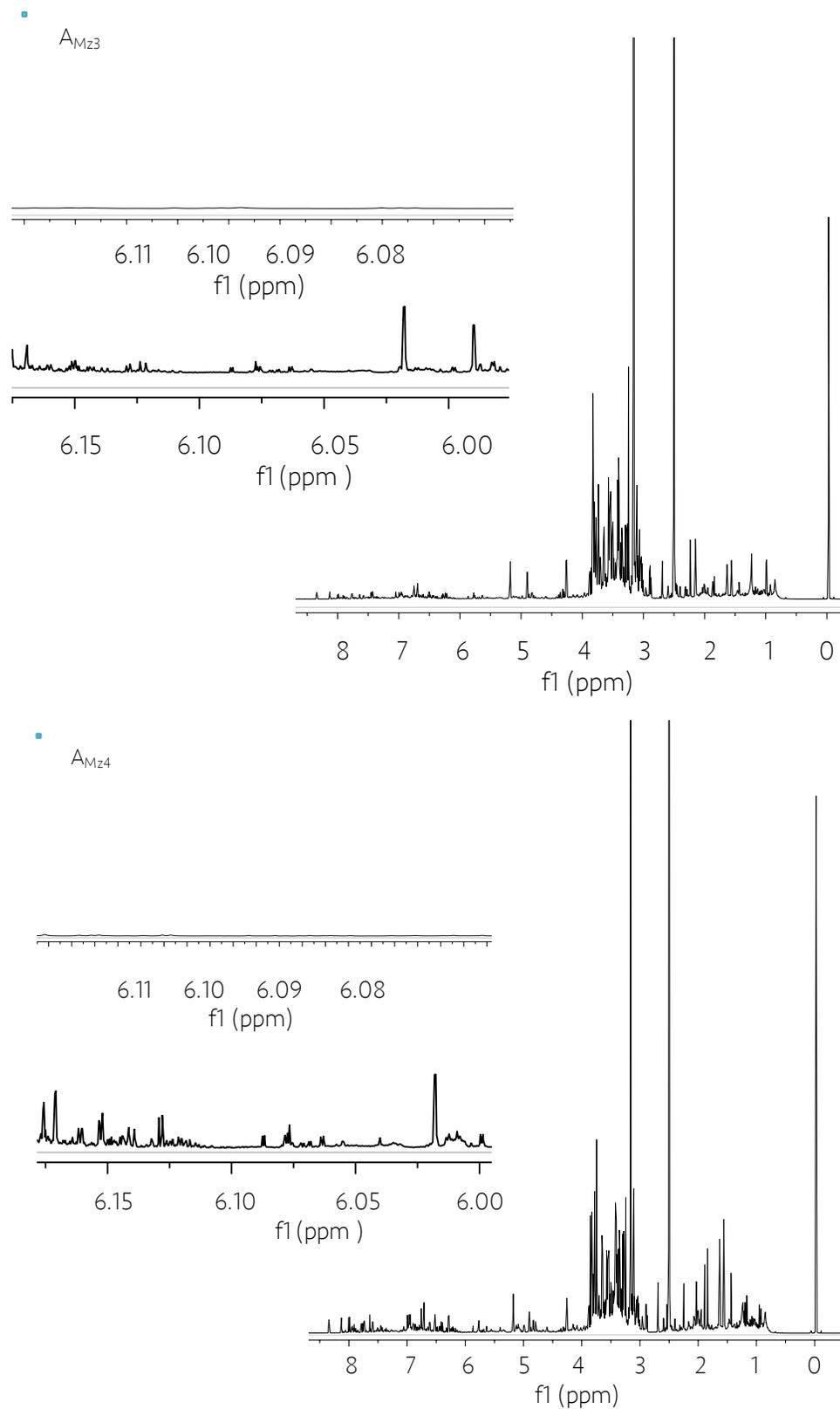


Figura 18. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz3}$ - $A_{Mz4}$ .

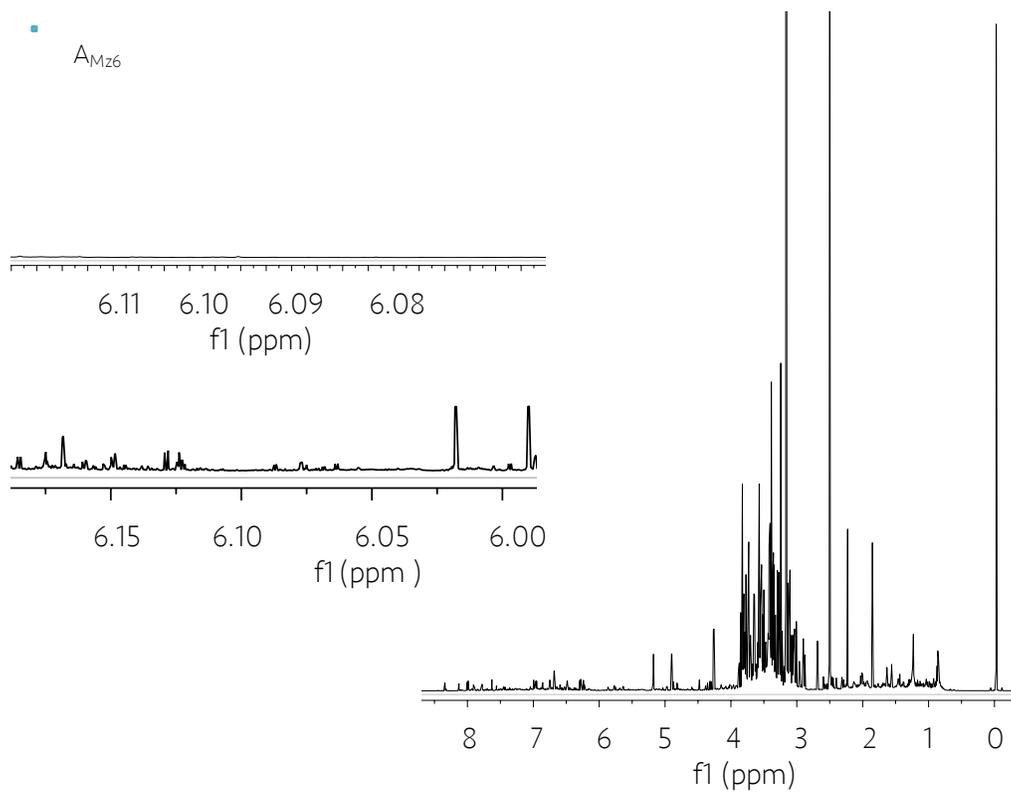
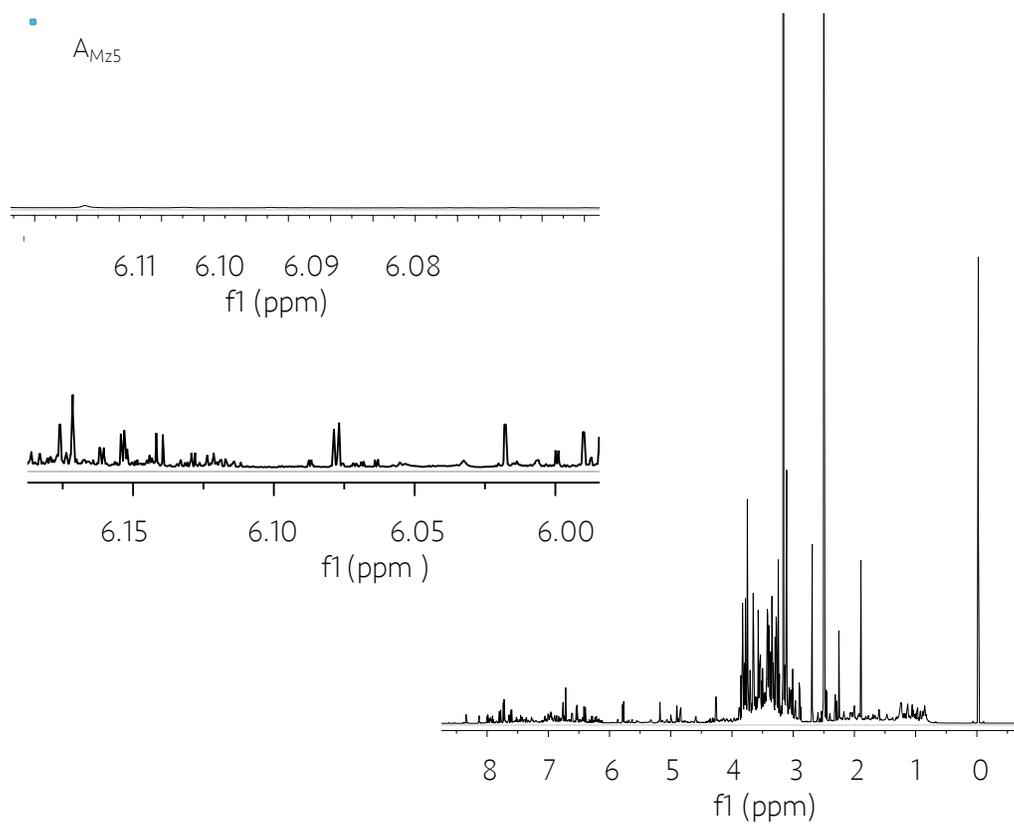


Figura 19. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz5}$ - $A_{Mz6}$ .

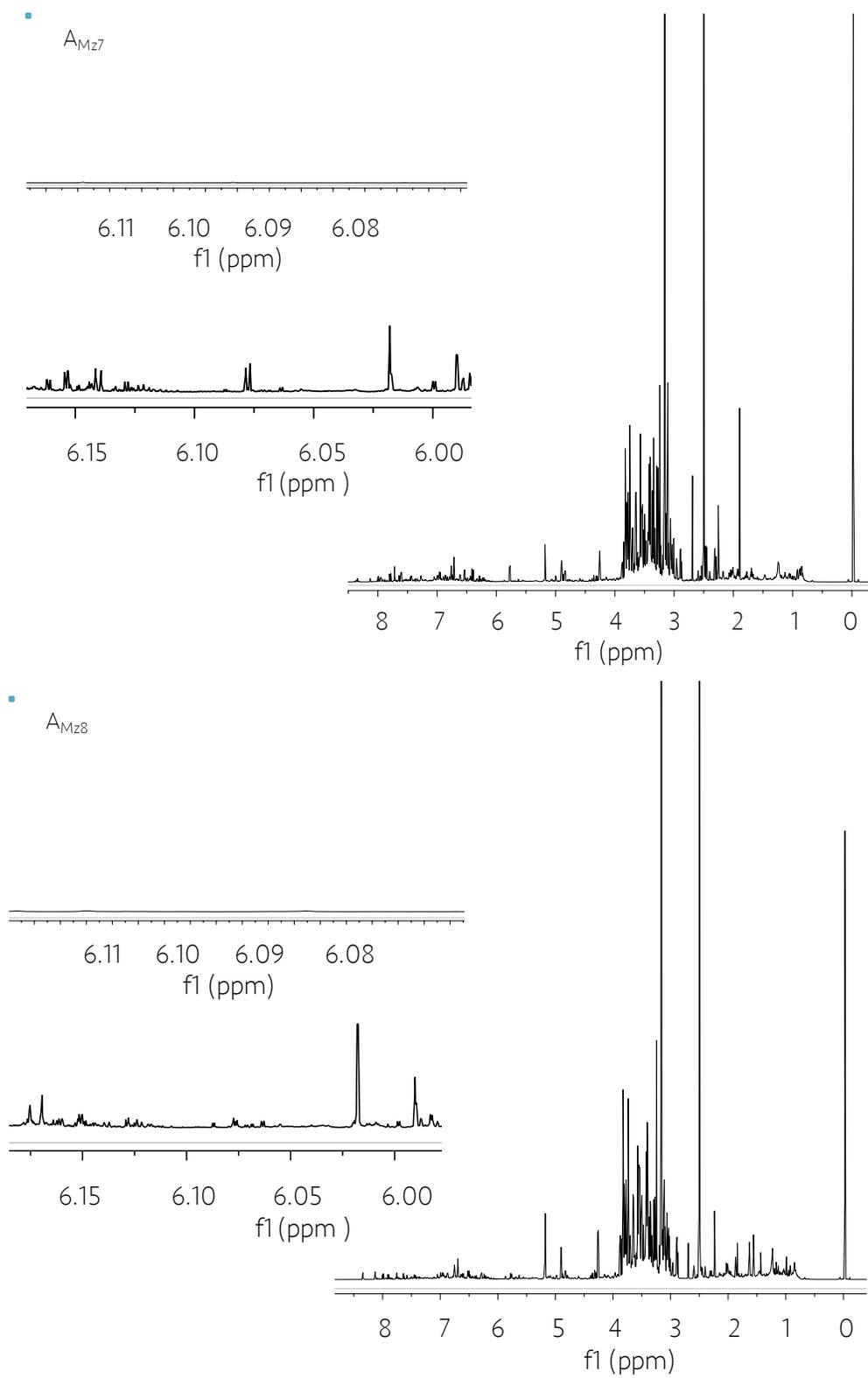


Figura 20. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz7}$ - $A_{Mz8}$ .

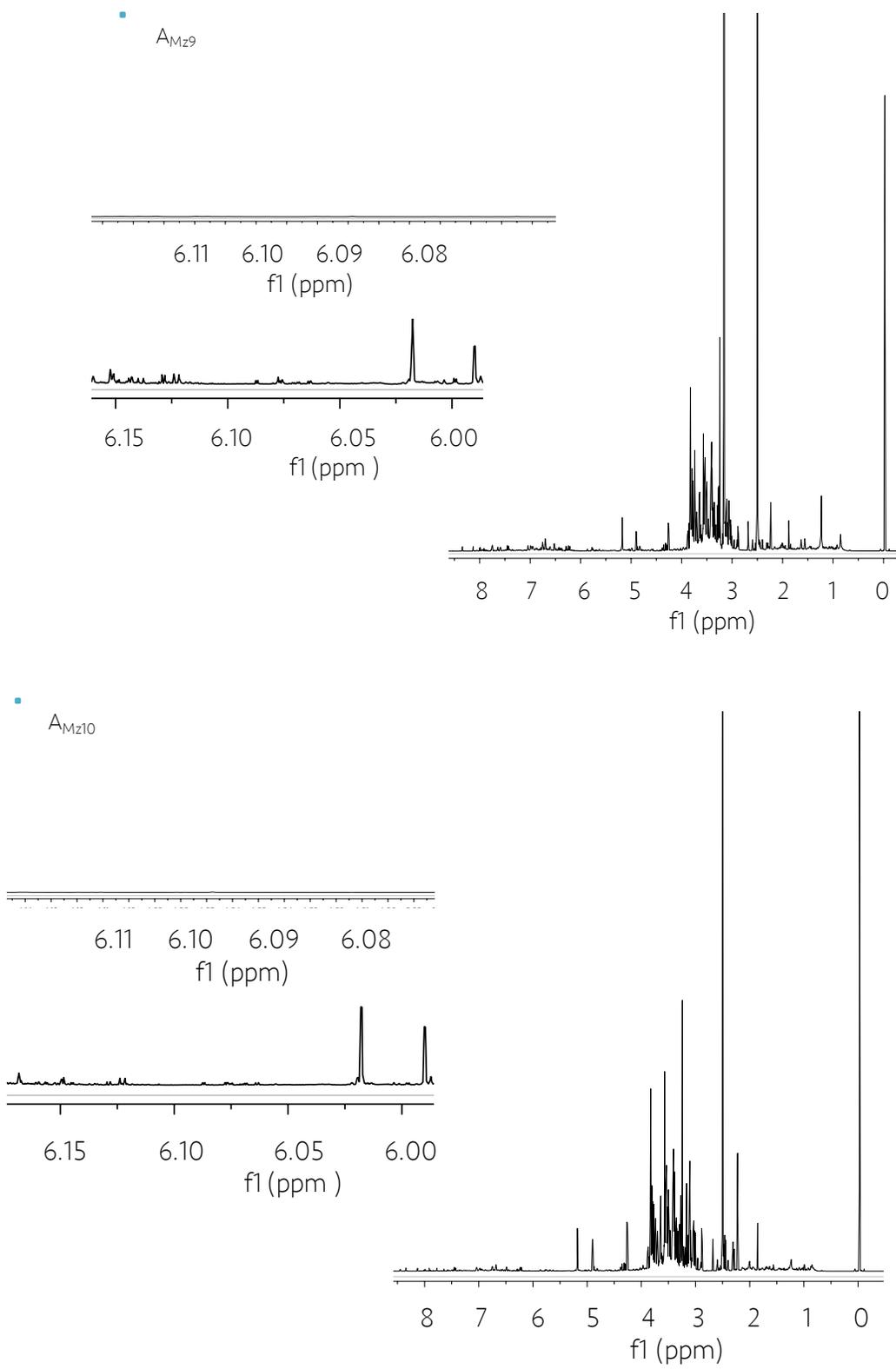


Figura 21. Espectros de  $^1\text{H-RMN}$  (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz9}$ - $A_{Mz10}$ .

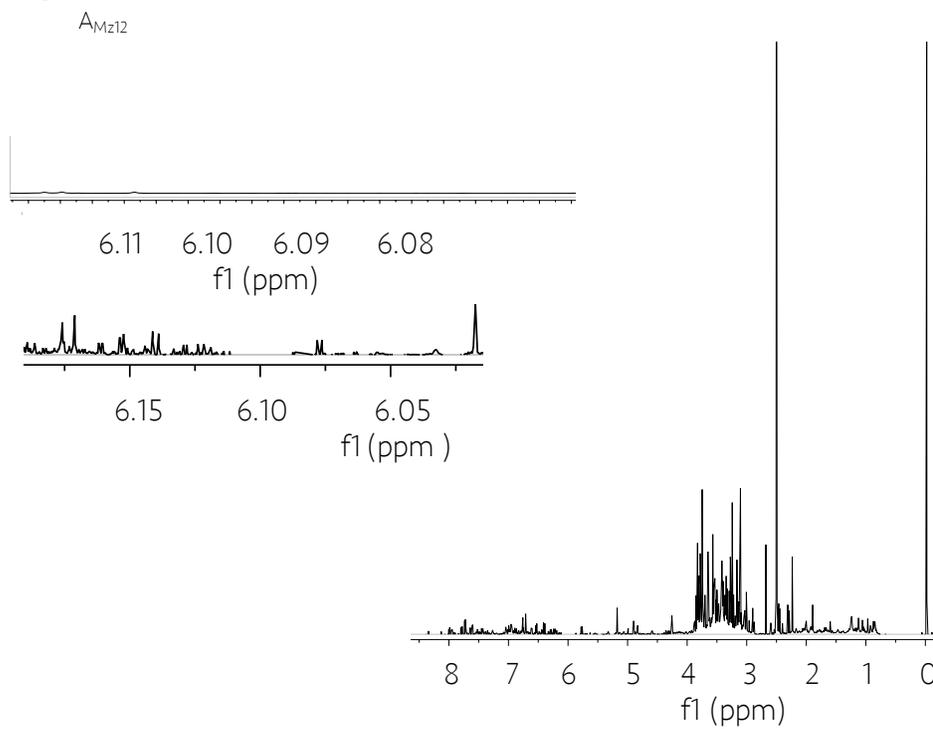
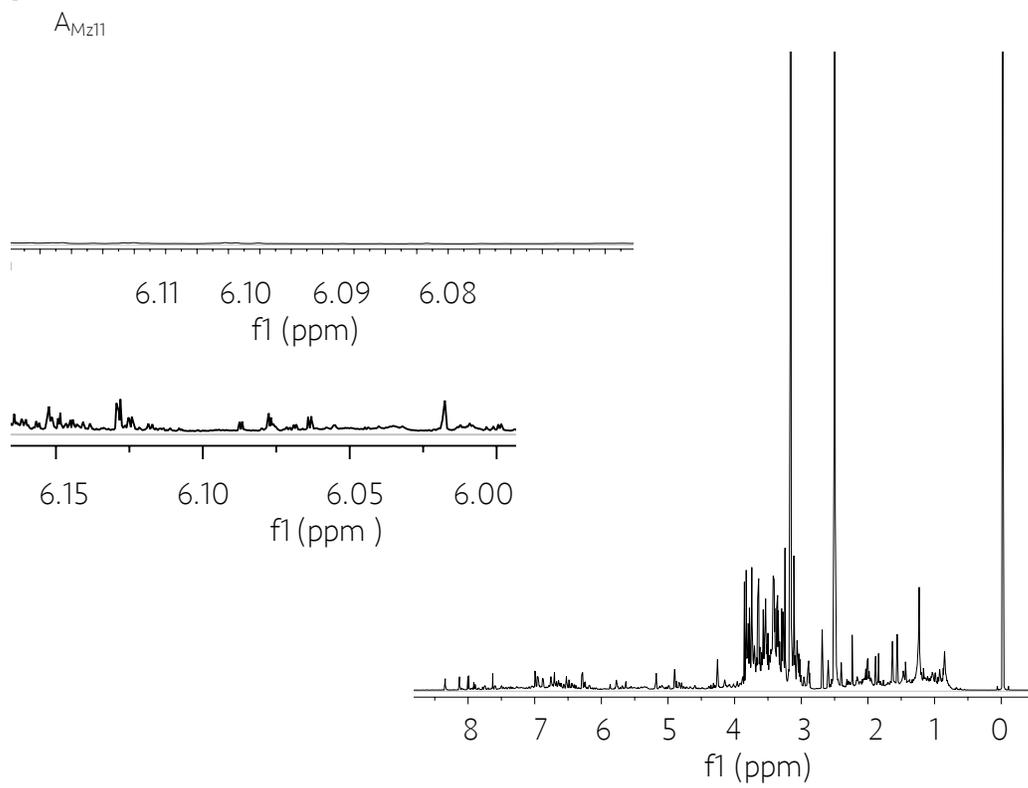


Figura 22. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz11}$ - $A_{Mz12}$ .

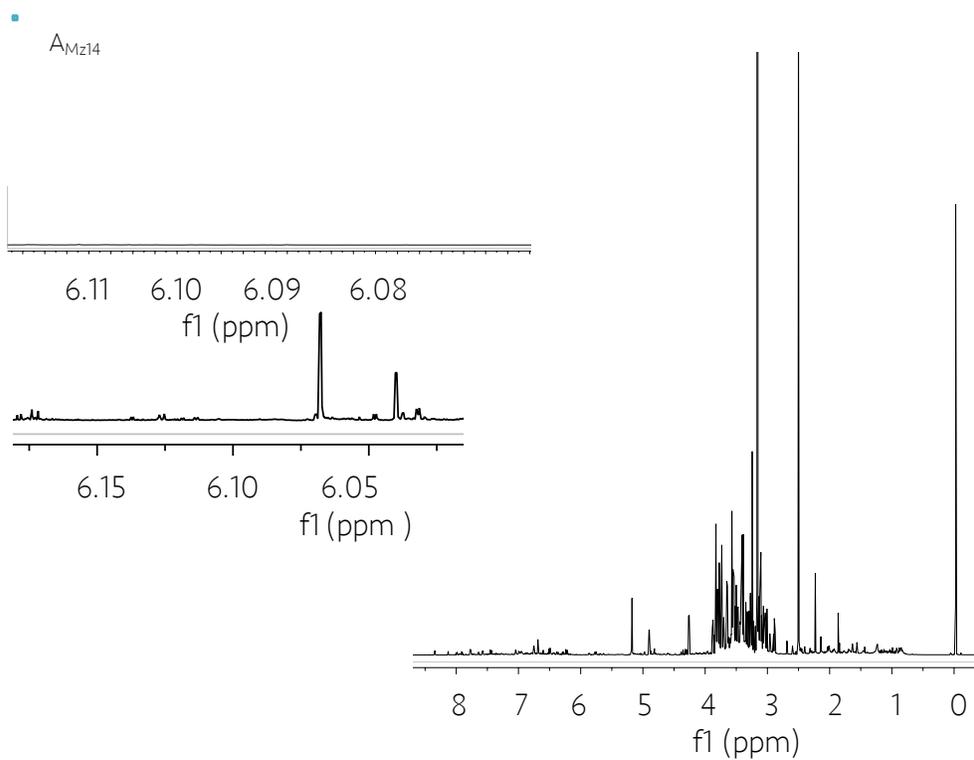
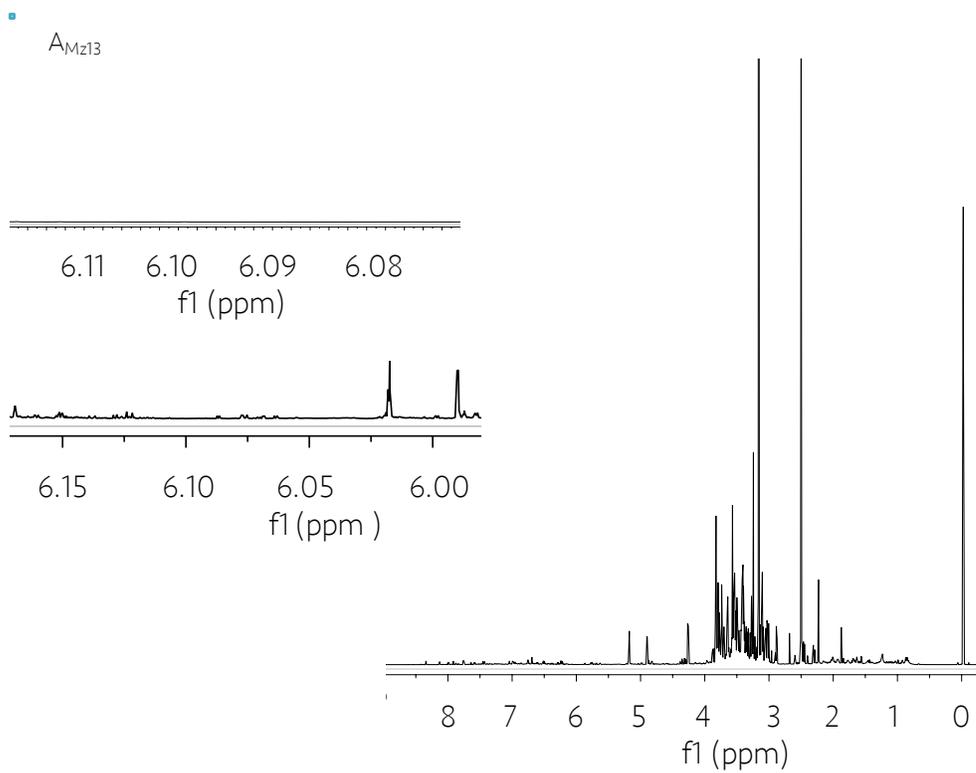


Figura 23. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz13}$ - $A_{Mz14}$ .

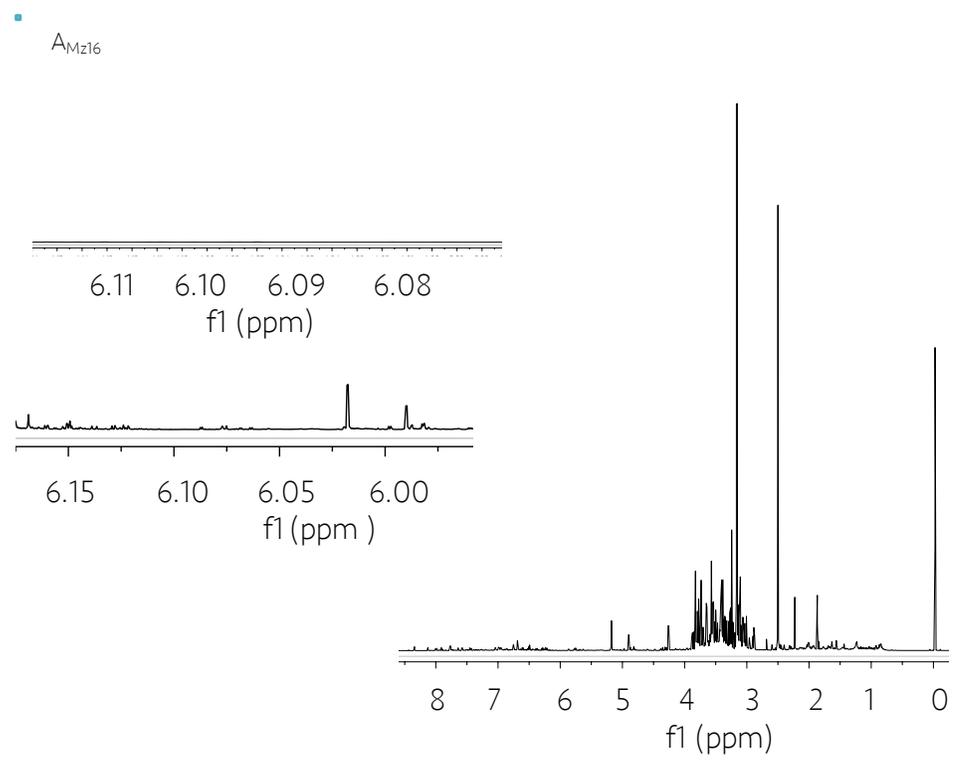
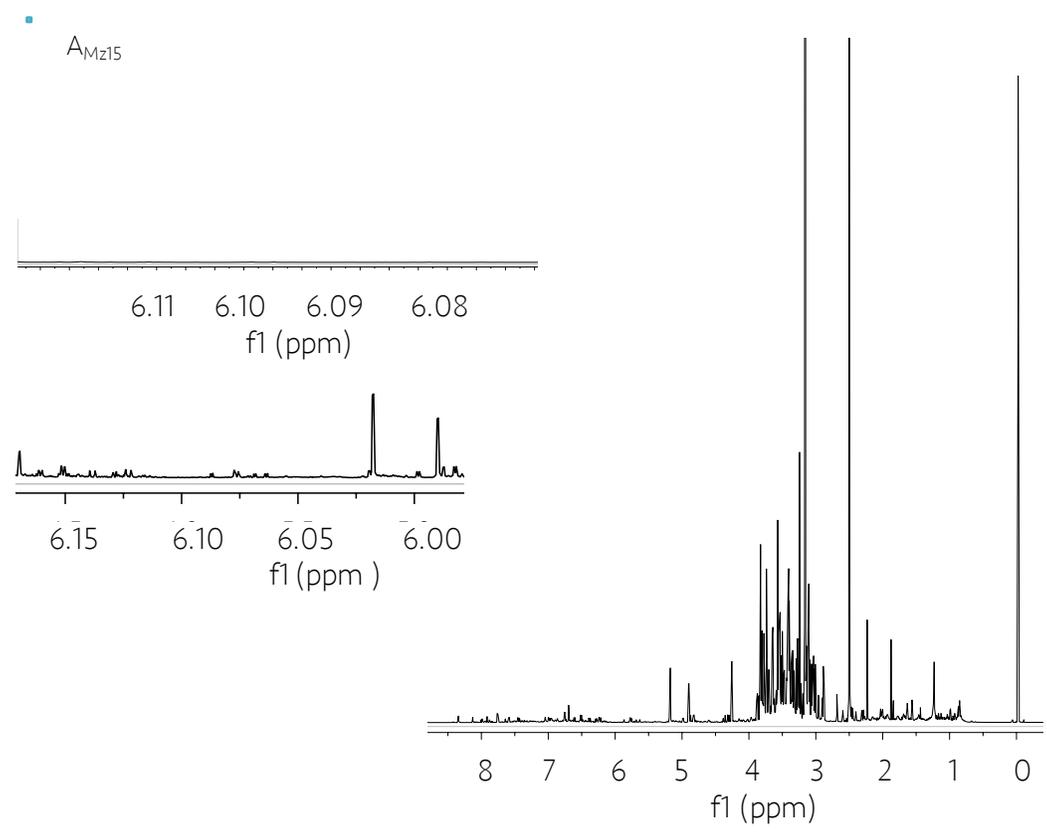


Figura 24. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz15}$ - $A_{Mz16}$ .

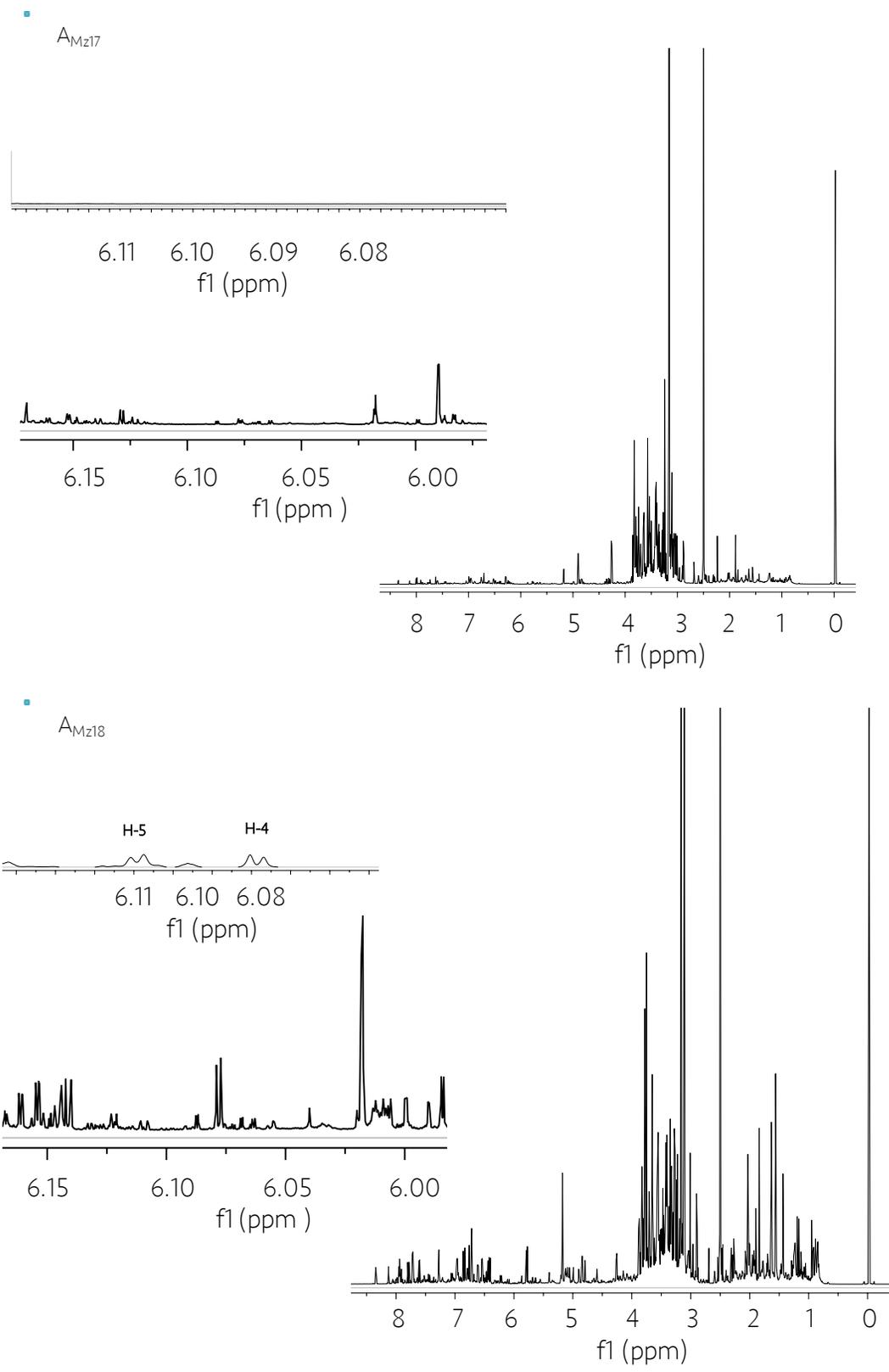


Figura 25. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) de las muestra  $A_{Mz17}$ - $A_{Mz18}$ .