



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Desarrollo de las pruebas de identidad y composición para el control de calidad de la droga cruda de *Achillea millefolium* (Asteraceae) comercializada en México

**TESIS**  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA  
QFB INGRID YADIRA MARTÍNEZ ALDINO

TUTORA  
DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

Presidente: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Vocal: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Secretario: Dr. José Alberto Rivera Chávez

**Sitio donde se desarrolló el trabajo de tesis:**

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

## Congresos

57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA).  
Cartel: Pharmacopeial Identity Parameters for *Achillea millefolium* L. (Asteraceae)  
grown in Mexico. Agosto 2018. San Luis Potosí, México.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México que, a través de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, me proporcionó los recursos para realizar y enriquecer mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. de becario 620953).

Al CONACyT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (CB 219765) y DGAPA-UNAM (IN 217516).

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por aceptarme en su grupo de trabajo y depositar en mí su confianza para realizar este proyecto, por sus valiosas enseñanzas y consejos. Por ser una excelente referencia académica que seguir y una gran persona. Muchas gracias.

A los miembros del jurado asignado, por sus valiosas observaciones que enriquecieron y mejoraron el contenido de la tesis.

A las Dras. Berenice Ovalle Magallanes, Isabel del Carmen Rivero Cruz y Araceli Pérez Vásquez, por su importante asesoría técnica durante el desarrollo de este trabajo, que fueron claves para forjar mis habilidades y conocimientos en el laboratorio. También, gracias por su valiosa amistad.

Quiero agradecer al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química: a la Q. Georgina Duarte Lisci, por su excelente asesoría y apoyo en los análisis microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, así como el registro de los espectros de masas; a las Maestras Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux, por el registro de los espectros de RMN, y a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de IR.

Al M. en C. Rafael Torres Colín, del Instituto de Biología, UNAM por realizar la identificación botánica del material vegetal.

A mis amigos del laboratorio 124. Gracias Oscar, Manuel, Miriam, Erika, Daniela, Valeria, Jenifer, Laura, Erick, Palapa, Mariana, Sofía y Alejandra por hacer amenos los días de trabajo, por su particular alegría y entusiasmo. Por todos sus consejos académicos.

A mis amigos Armando, Emma, Lina, Kate y Pedro que hicieron de esta etapa académica, la mejor.

A mi novio Sergio, por llenar de alegría todos mis días y por su inigualable apoyo en todo momento. Mil gracias.

*A mis padres y hermana, por ser mi motor.*

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABLAS.....	VI
RESUMEN .....	IX
ABSTRACT .....	XI
1. ANTECEDENTES .....	1
1.1 Generalidades sobre <i>Achillea millefolium</i> L. ....	1
1.1.2 Aspectos botánicos y distribución geográfica .....	1
1.1.3 Aspectos etnobotánicos.....	2
1.1.4 Actividades farmacológicas y ensayos clínicos.....	7
1.1.5 Seguridad y toxicología.....	7
1.1.6 Composición química de <i>Achillea millefolium</i> .....	10
1.2 Control de calidad de plantas medicinales.....	15
1.2.1 Control de calidad de <i>Achillea millefolium</i> .....	17
2. JUSTIFICACIÓN .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	20
4.1 Material vegetal.....	20
4.2 Preparación de la muestra .....	20
4.3 Estudio químico.....	21
4.3.1 Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . ....	21
4.3.2 Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico total. ....	22
4.3.3 Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM) cromatografía en capa delgada (CCD). .	24
4.3.4 Análisis de los compuestos volátiles presentes en el material vegetal (seco y fresco) mediante la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME). ....	25
4.3.5 Análisis de los compuestos volátiles presentes en el extracto acuoso obtenidos por hidrodestilación. ....	26



4.4 Ensayos de identidad.....	26
4.4.1 identificación de aquilina (22) por cromatografía en capa delgada (CCD) .....	26
4.4.2 Identificación de aquilina (22), leucodina (26) y matricarina (31) por CLUE-PDA.....	27
4.5 Ensayo de composición .....	28
4.5.1 Validación del método analítico para cuantificar a la leucodina (26) .....	28
4.5.1.1 Linealidad del sistema .....	28
4.5.1.2 Linealidad del método y exactitud.....	29
4.5.1.3 Precisión .....	29
4.6 Cuantificación de leucodina (26) en los diferentes lotes de <i>A. millefolium</i> ...	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
5.1 Obtención y caracterización de los estándares para las pruebas de identidad y composición de <i>A. millefolium</i> .....	31
5.2 Establecimiento de los componentes volátiles de <i>A. millefolium</i> .....	33
5.3 Ensayos de identidad y composición utilizando como matriz la infusión de la planta .....	41
5.3.2 Identificación de aquilina (22) por cromatografía en capa delgada (CCD) .....	42
5.3.3 Identificación de aquilina (22), leucodina (26) y matricarina (31) por CLUE-PDA.....	43
5.3.4 Ensayo de composición .....	45
5.3.4.1 Linealidad del sistema. ....	46
5.3.4.2 Linealidad del método.....	47
5.3.4.3 Exactitud del método .....	49
5.3.4.4 Precisión del sistema.....	50
5.4 Cuantificación de la leucodina (26) en diferentes lotes de <i>A. millefolium</i> por CLUE- PDA .....	51
6. CONCLUSIONES.....	53
7. REFERENCIAS.....	55
ANEXOS .....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Achillea millefolium</i> L. Imagen editada de Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz, 1885. ....	3
Figura 2. Distribución de <i>Achillea millefolium</i> L en México. (Tomado de Global Biodiversity Information Facility).....	4
Figura 3. Ilustración de <i>Achillea millefolium</i> (Editado de An Aztec Herbal: The Classic Codex of 1552. Gates, 1939).....	5
Figura 4. Actividades biológicas comprobadas de <i>Achillea millefolium</i> . ....	9
Figura 5. Compuestos identificados en distintos aceites esenciales de <i>Achillea millefolium</i> . ....	15
Figura 6. Cromatogramas representativos de los aceites esenciales de los lotes analizados de <i>A. millefolium</i> : a) lote 2, b) lote 3, c) lote 4. Asignación de picos: $\alpha$ -tujona (39), $\beta$ -tujona (40) y camazuleno (51), $\alpha$ -pineno (42) canfeno (49) y alcanfor (37).....	36
Figura 7. Cromatogramas representativos de los compuestos volátiles extraídos por microextracción en fase sólida de la planta fresca a) y seca b) de <i>A. millefolium</i> (lote 2). Asignación de picos: $\alpha$ -tujona (39), $\beta$ -tujona (40), alcanfor (37) canfeno (49).....	38
Figura 8. Cromatogramas representativos de los compuestos volátiles obtenidos por hidrodestilación a partir de la infusión de <i>A. millefolium</i> del lote 2 Asignación de picos: $\alpha$ -tujona (39; 56.1%), $\beta$ -tujona (40; 9.2%) y alcanfor (37; 34.7%). ....	39
Figura 9. Cromatogramas en capa delgada de los aceites esenciales de los lotes 2-4. Sistema de elución: a) AcOEt-tolueno (5:95).; b) hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (50:50). $\alpha$ -tujona (39) $f_R$ =0.53. Rev. aldehído anísico al 10% ....	41
Figura 10. Cromatograma en capa delgada ( $\lambda$ =254 nm) de la aquilina (22; $f_R$ =0.41) y las matrices de trabajo obtenidas a partir de los cuatro lotes. Sistema de elución: hexano-AcOEt (30:70).....	43
Figura 11. Perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda$ =285 nm) correspondiente a la fracción de diclorometano derivada de la infusión de <i>A. millefolium</i> (lote 1). Tiempos de retención: aquilina (22) $t_R$ =5.60, leucodina (26), $t_R$ =5.83, matricarina (31) $t_R$ =5.99, casticina (12) $t_R$ =6.01 y artemetina (18) $t_R$ =7.66. ....	44
Figura 12. Perfiles cromatográficos de las fracciones de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> obtenidas a partir de las infusiones de los lotes 1-4 ( $\lambda$ =285 nm). Tiempos de retención: aquilina (22) $t_R$ =5.60, leucodina (26) $t_R$ =5.83, matricarina (31) $t_R$ =5.99. ....	45
Figura 13. Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico.....	47

Figura 14. Gráfica de la linealidad del método para la leucodina (26).....	49
Figura 15. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la leucodina (26). .....	62
Figura 16. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la leucodina (26). .....	63
Figura 17. Espectro de EM $[\text{M} + \text{H}]^+$ de la leucodina (26). .....	64
Figura 18. Espectro IR (FT-IR) de la leucodina (26).....	65
Figura 19. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la aquilina (22). .....	66
Figura 20. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la aquilina (22).....	67
Figura 21. Espectro de EM $[\text{M} + \text{H}]^+$ de la aquilina (22). .....	68
Figura 22. Espectro IR (FT-IR) de la aquilina (22).....	69
Figura 23. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la matricarina (31).....	70
Figura 24. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la matricarina (31). .....	71
Figura 25. Espectro de EM $[\text{M} + \text{H}]^+$ de la matricarina (31).....	72
Figura 26. Espectro IR (FT-IR) de la matricarina (31) .....	73
Figura 27. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la artemetina (18) .....	74
Figura 28. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la artemetina (18). .....	75
Figura 29. Espectro de EM $[\text{M} + \text{H}]^+$ de la artemetina (18).....	76
Figura 30. Espectro IR (FT-IR) de la artemetina (18).....	77
Figura 31. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la casticina (12).....	78
Figura 32. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la casticina (12).....	79
Figura 33. Espectro de EM $[\text{M} + \text{H}]^+$ de la casticina (12).....	80
Figura 34. Espectro IR (FT-IR) de la casticina (12).....	81
Figura 35. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17).....	82
Figura 36. Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17).....	83
Figura 37. Espectro de EM $[\text{M} + \text{H}]^+$ de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17). .....	84

Figura 38. Espectro IR (FT-IR) de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17). ... 85

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Usos tradicionales de <i>Achillea millefolium</i> en México.....	6
Tabla 2. Compuestos aislados en <i>Achillea millefolium</i> .....	12
Tabla 3. Variación de compuestos volátiles del aceite esencial de <i>Achillea millefolium</i> .....	14
Tabla 4. Aislamiento de los productos mayoritarios presentes en el extracto orgánico .....	23
Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la CCD.....	27
Tabla 6. Condiciones cromatográficas para los análisis por CLUE-PDA .....	27
Tabla 7. Gradiente de elución utilizado para el desarrollo del perfil cromatográfico. ....	28
Tabla 8. Constituyentes químicos del aceite esencial de <i>A. millefolium</i> .....	35
Tabla 9. Compuestos volátiles de <i>A. millefolium</i> identificados por CG-EM tras su extracción por microextracción en fase sólida.....	38
Tabla 10. Rendimientos de las fracciones de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> obtenidos a partir de las infusiones de los distintos lotes de <i>A. millefolium</i> .....	42
Tabla 11. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema. ....	47
Tabla 12. Resultados experimentales de la evaluación de la linealidad del método. ....	48
Tabla 13. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.....	49
Tabla 14. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la leucodina (26) con el detector PDA.....	50
Tabla 15. Repetibilidad del sistema.....	51
Tabla 16. Cuantificación de leucodina (26) por CLUE-PDA en varios lotes de <i>A. millefolium</i> . ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AF	Ácido fórmico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
CCD	Cromatografía de capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
cm	Centímetro
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
EM	Espectrometría de masas
EP	European Pharmacopoeia
ESI	Ionización por electrospray
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
f <sub>R</sub>	Factor de retención
g	Gramo
Hx	Hexano
ICH	International Conference on Harmonisation
kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
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 <sup>2</sup>	Coeficiente de determinación
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de Protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
x	Promedio aritmético

$\beta_0$	Ordenada al origen
$\beta_1$	Pendiente
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMEN

*Achillea millefolium* L. (Asteraceae) comúnmente conocida como milenrama, es una de las plantas medicinales más consumidas en México. La monografía farmacopéica actual de la droga cruda de la planta que se cultiva en México es una copia de la publicada en la Farmacopea Europea. Sin embargo, no hay evidencias de que las pruebas allí indicadas sean las apropiadas para el análisis de la calidad de la planta que se cultiva en México. Por lo tanto, el presente trabajo, tras comprobar que las pruebas descritas en la monografía actual no son las mejores, pretende desarrollar las pruebas de identidad y composición para la especie de *A. millefolium* que crece en nuestro país.

En primer lugar, se analizaron los componentes volátiles de *A. millefolium*, encontrándose que, en contraste con las plantas cultivadas alrededor del mundo, el aceite esencial de las plantas adquiridas comercialmente en los mercados de la Ciudad de México tiene elevados contenidos de  $\alpha$ -tujona (**39**), un compuesto neurotóxico. Este resultado permitirá orientar a las autoridades sanitarias sobre el riesgo del consumo de esta planta. Posteriormente se analizó la infusión de las partes aéreas de la planta y las fracciones orgánicas resultantes del reparto de ésta, con el propósito de establecer la naturaleza de sus principales constituyentes. Este estudio permitió demostrar la presencia de metoxiflavonas y lactonas sesquiterpénicas en la misma. Las lactonas se caracterizaron como leucodina (**26**), aquilina (**22**) y matricarina (**31**); en tanto las flavonas como la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**17**), la artemetina (**18**) y la casticina (**12**). La poca complejidad de la fracción de diclorometano obtenida por reparto de la infusión, el rendimiento de ésta y su fácil preparación permitieron sugerirla como matriz de trabajo para los ensayos de identidad y composición de la planta. El perfil cromatográfico generado por CLUE y CCD de esta fracción indicó la presencia de leucodina (**26**), aquilina (**22**) y matricarina (**31**), como compuestos mayoritarios. Estos compuestos representan marcadores apropiados para las pruebas de identidad y composición de la planta. A continuación, se validó un método analítico para la cuantificación de leucodina (**26**) en la matriz de trabajo. El



método propuesto fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen pruebas de identidad química y composición para el control de calidad de la droga cruda de *A. millefolium*, información que será de utilidad para la actualización de la monografía de esta planta en la 3ª edición de la FHEUM.

## ABSTRACT

*Achillea millefolium* L. (Asteraceae), commonly known as milenrama, is nowadays a widely consumed medicinal plant in Mexico. The monograph currently used for quality control of the crude drug of milenrama and its essential oil are not suitable for the plant grown in Mexico. Thus, there is need to develop suitable procedure for quality control of milenrama.

In this work, some identity tests are proposed for the crude drug which were performed with different techniques: thin layer chromatography (TLC), and using ultra performance liquid chromatography (UPLC). The working matrix selected was the organic fraction obtained by partitioning the infusion with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. This fraction contained methoxyflavones and sesquiterpene lactones. The major compounds were the three lactones. The lactones were characterized as leucodin (**26**), achillin (**22**) and matricarin (**31**), while the flavones as 5- hydroxy 3,4',6,7 - methoxyflavone (**17**), artemetin (**18**) and casticin (**12**).

In addition the volatile profile using GCMS analyses of the essential oil obtained by hydrodistillation and the material extracted using solid phase microextraction (SPME). The analyses revealed a high content of  $\alpha$ -tujone, a neurotoxic compound. This finding will allow health authorities advise the population about the risk of consuming this plant.

For the composition test, the UPLC chromatographic profile of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of the infusion was selected; the chromatographic profile of the reference sample revealed the presence of the lactones **22**, **26** and **31**. The method was validated to quantify the content of leucodin (**26**) in all samples; the method was selective, lineal, exact and precise in the range of concentrations evaluated.

The information generated in this work will be useful for updating the monograph of this species in the 3rd edition of the Mexican Herbal Pharmacopoeia.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Generalidades sobre *Achillea millefolium* L.

### 1.1.2 Aspectos botánicos y distribución geográfica

El género *Achillea* es uno de los más grandes de la familia Asteraceae con más de 130 especies distribuidas alrededor del mundo, las cuales son endémicas de algunas regiones del hemisferio norte (Xiao-Tang *et al.*, 2006; Mohammadhosseini *et al* 2017). El género se denominó *Achillea* por Aquiles, héroe de la guerra de Troya que utilizó *Achillea millefolium* L. para detener el sangrado de las heridas de sus soldados.

La especie más conocida de este género es *A. millefolium* que agrupa a uno de los complejos vegetales poliploides más diversos del hemisferio norte (Chandler *et al.*, 1982; Radušiene & Gudaityte, 2005). El análisis de la complejidad de este grupo es el resultado de múltiples procesos de hibridación y evolución en distintos hábitats. El análisis de marcadores genéticos de tipo polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) ha permitido identificar la variabilidad genética de este grupo (Ali *et al.*, 2017). En Europa se reconocen tres subespecies: *A. millefolium* subsp. *millefolium* (posee flores blancas pequeñas), *A. millefolium* subsp. *alpestris*, con flores rosas y, *A. millefolium* subsp. *ceretanum* con flores blancas grandes (Applequist y Moerman, 2011). De acuerdo con el análisis de los marcadores AFLP, la especie americana está relacionada con *A. asiatica* Serg, sin embargo, no hay estudios concluyentes acerca de la especie que crece en América del Norte (Guo *et al.*, 2012). Las poblaciones que crecen en México posiblemente son nativas (Calderón & Rzedowski, 2001).

*Achillea millefolium* es una planta herbácea perenne, aromática y de sabor amargo; llega a medir hasta 1 m de alto. Sus hojas son alternas, lanceoladas, de hasta 20 cm de largo, bi a tripinnatisectas en segmentos finos con pinnas, hasta 35 o más pares. Sus hojas parecen plumas y están tan finamente divididas que parecen tener mil, por esta razón el epíteto específico es millefolium. Asimismo,

dos de sus nombres comunes, milenrama y mil hierbas, derivan de estas características de la planta. Las flores están en cabezuelas, agrupadas en panículas corimbiformes; densas, con pedúnculos de hasta 5 mm de largo; son liguladas, con corolas por lo general blancas de 2 a 3 mm de largo; las flores del disco tienen corolas blancas y miden de 2 a 3 mm de largo. Su aquenio es oblongo a obovado, comprimido y mide aproximadamente 2 mm de largo (Calderón & Rzedowski, 2001) (**Figura 1**).

*Achillea millefolium* se conoce alrededor del mundo con numerosos nombres. Así en los países de habla inglesa se le llama popularmente “yarrow” (Chandler *et al.*, 1982 y referencias ahí citadas). En México se le conoce como milenrama, ciento en rama, alcanfor (**37**), plumajillo, cola de zorra, flor de melón, gordolobo, melones, plumasilla, plumilla, plumerillo, real de oro, tlaliztahyac (náhuatl: tierra blanquecina), tlalquequetza, entre otros (Hernandez, 1943; Argueta, 1994).

La especie milenrama habita en lugares ubicados entre los 260 hasta 3700 m sobre el nivel del mar, en climas cálido, semicálido, semiseco y templado (Argueta, 1994). Crece a menudo en pastizales y bosques abiertos. En México se le encuentra en los estados de Baja California Norte, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, CDMXNH, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998) (**Figura 2**). La planta comúnmente florece durante los meses de mayo a junio y su crecimiento activo es en la primavera (Ali *et al.*, 2017; Calderón & Rzedowski, 2001).

### 1.1.3 Aspectos etnobotánicos

Los registros escritos más antiguos del uso medicinal de *A. millefolium* aparecen en las obras *Naturalis Historia* de Plinio el viejo publicado en el año 77 y, *De Materia Medica* del médico y boticario Griego Dioscórides (Ali *et al.*, 2017). Este último, consigna los siguientes usos: antihemorrágico en casos de heridas y

sangrado menstrual anormal, antiinflamatorio, y para combatir la disentería (Appelquist & Moerman, 2011). A lo largo de la historia son muchas las culturas que han utilizado esta planta con propósitos medicinales; muchos de los usos clásicos persisten hasta nuestros días; una recopilación de los usos históricos fue publicada recientemente (Ali *et al*, 2017).



**Figura 1.** *Achillea millefolium* L. Imagen editada de Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz, 1885.



**Figura 2.** Distribución de *Achillea millefolium* L en México. (Tomado de Global Biodiversity Information Facility).

Una gran variedad de preparaciones (infusiones, decocciones, extractos hidroalcohólicos) de las flores y partes aéreas de *A. millefolium* han sido utilizadas para aliviar casi cualquier dolencia (Applequist & Moerman, 2011). Los usos globales más importantes incluyen el tratamiento de: dolores de cabeza, desórdenes hepatobiliares, inflamaciones de la piel, quemaduras, calambres estomacales, flatulencias, gastritis, enteritis, hemorragias internas y externas (tos con sangre, hemorragia nasal, uterina y hemorroidal y dismenorrea), heridas, llagas, erupciones cutáneas, mordeduras de perro y serpiente, pérdida de apetito, dolores de dientes, diarrea, fiebre, complicaciones reumáticas, venas varicosas, hemorroides, tuberculosis, diabetes, hipercolesterolemia, ansiedad, problemas urinarios, dispepsia, erupciones cutaneas, y problemas relacionados con la menopausia, por mencionar los más importantes (Miraldi *et al.*, 2001; Allen & Hatfield, 2004; Sharma *et al.*, 2004 Bussmann *et al.*, 2007, Baggio *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2009; Applequist & Moerman, 2011).

En el caso de México, el registro más antiguo acerca del uso medicinal de la milenrama se remonta al siglo XVI cuando Martín de la Cruz y Juan Badiano (**Figura 3**) la refieren como útil para el tratamiento de condilomas, sarna y manchas en la cara. Para los condilomas se debía beber el jugo obtenido al moler la planta con agua caliente. Contra la sarna y manchas en la cara, se machacaba

esta planta junto con las hierbas acuahuilitl y ehcapahtli en “agua de sabor agrio” con excremento de paloma. Posteriormente, fray Bernardino de Sahagún en el Códice Florentino describe su uso para los dolores de pecho y espalda, la tos, el altito y las bubas (granos). En el Atlas de Medicina Tradicional publicado por el Instituto Nacional Indigenista se indica textualmente que en el siglo XVI Francisco Hernández en su Historia de las Plantas de la Nueva España describe a la planta como amarga, caliente en segundo grado y útil para combatir el dolor de pecho y demás enfermedades de éste. Vicente Cervantes en el siglo XVIII narra su aplicación para tratar cólicos, casos de atonía nerviosa, leucorreas rebeldes, e hipocondría. José Eleuterio González en el siglo XIX describió sus usos para la hipocondría, hemorroides, expectoración con sangre, heridas y como astringente y vulnerario.



**Figura 3.** Ilustración de *Achillea millefolium* (Editado de An Aztec Herbal: The Classic Codex of 1552. Gates, 1939)

En la Farmacopea Mexicana publicada por la Academia Farmacéutica de México en 1846 la milenrama se señala como tónico y difusivo. En la Nueva Farmacopea Mexicana publicada en 1876 por la Sociedad Farmacéutica

Mexicana, la refieren como astringente y tónico amargo poco usado. En ambas farmacopeas se enlistan varias preparaciones que contienen esta planta.

En el siglo XX Maximino Martínez, en su obra *Las plantas medicinales de México*, refiere los mismos usos que describió Cervantes y los indicados en las Farmacopeas Mexicanas del siglo XIX. Monroy Ortiz y Castillo- España en el siglo XXI describen que la cocción de la planta se da a beber a las parturientas cuando los bebés no pueden nacer. En combinación con *Gentiana spathacea* se usa para tratar parasitosis en niños (albrección). Andrade-Cetto y Henrich (2005) indican que la planta es efectiva contra la diabetes. En la **Tabla 1** se mencionan otros usos medicinales de milenrama citados en estudios etnobotánicos recientes realizados en nuestro país.

**Tabla 1.** Usos tradicionales de *Achillea millefolium* en México

Padecimientos	Parte usada	Preparación /administración	Estados donde la utilizan	Referencia
Dolor de estómago	Partes áreas	Infusión en combinación con ruda ( <i>Ruta chalepensis</i> ), limón agrio ( <i>Citrus aurantifolia</i> ) y nuez moscada ( <i>Myristica fragans</i> )	Querétaro	(Nava et al., 2001)
Dolor de oídos	Hojas	Decocción, macerado/tópica	Hidalgo	(Andrade-cetto, 2009)
Dolor de estómago, diarrea, vómito e infarto	Partes aéreas	Infusión/oral	San Luis Potosí	(Alonso-castro et al., 2012)
Várices, hemorroides, hemorragias internas, problemas de piel, como antiinflamatorio y para activar la circulación	Partes áreas	Infusión	-	(SEMARNAT, 2010)
Várices, hemorroides, hemorragias uterinas, problemas de piel	Partes áreas	Decocción y maceración alcohólica/ Oral, cutáneo y baños	-	(Mendoza Castelán & Lugo Pérez, 2010)



De acuerdo con Barceloux, Becker y colaboradores y a un informe sobre la evaluación de la seguridad del extracto de milenrama publicado en 2001, *A. millefolium* es constituyente de algunas bebidas, cervezas, productos para el cuidado del cabello, lociones para la piel y cosméticos; en 1998, se informó a la FDA que el extracto de propilenglicol de milenrama fue utilizado en 65 formulaciones cosméticas. También se utiliza como alimento

#### 1.1.4 Actividades farmacológicas y ensayos clínicos

Numerosos estudios científicos realizados sobre *A. millefolium* han permitido demostrar que algunos de sus preparados poseen varias propiedades farmacológicas, algunas de las cuales correlacionan con las bondades medicinales que se le atribuyen a la planta alrededor del mundo. Las actividades biológicas comprobadas se resumen en la **Figura 4**. En México se han reportado tres estudios sobre la planta. El primero describe el efecto potencial ansiolítico de la decocción de las flores de *A. millefolium* en ratas hembras durante las fases del ciclo estral (Molina-Hernandez *et al.*, 2004), mientras que los dos restantes reportan el efecto inhibidor de las  $\alpha$ -glucosidasas y antidiabético del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de esta planta, respectivamente (Chávez-Silva *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2012).

#### 1.1.5 Seguridad y toxicología

El contacto directo con el material vegetal de *A. millefolium* o con sus preparados puede causar reacciones de hipersensibilidad en la piel; como dermatitis, erupción cutánea, formación de vesículas y prurito en individuos sensibles (WHO, 2006). La causa de la dermatitis en algunas personas se debe a la presencia de ciertas lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianólidas, especialmente la  $\alpha$ -peroxiachifolida (**28**), la cual se encuentra en el material

vegetal fresco en concentraciones variables; cerca del 0.6% en flores y 0.05% en hojas (Hausen *et al.*, 1991; Becker *et al.*, 2016).

Los riesgos para la salud debido al uso a largo plazo de los preparados de *A. millefolium* no están bien establecidos. Sin embargo, se han reportado algunos efectos tóxicos en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Ali *et al.*, 2017). De tal forma, que el extracto acuoso de *Achillea millefolium* mostró una alta toxicidad para *Artemia salina*, con una dosis letal media (CL<sub>50</sub>) de 34 µg/mL en (Busmann *et al.*, 2011). Mientras que De Santanna y colaboradores en el 2009 reportaron que el aceite esencial de esta planta tiene un efecto genotóxico en una cepa diploide heterocigótica de *Aspergillus nidulans* a las concentraciones de 0.13, 0.19 y 0.25 µl/mL. De igual forma, en 1996 se reportó un efecto débilmente genotóxico del extracto acuoso de *A. millefolium* evaluado mediante un ensayo de mutación y recombinación somática en larvas de *Drosophila melanogaster* (Graft *et al.*, 1996).



**Figura 4.** Actividades biológicas comprobadas de *Achillea millefolium*.

### 1.1.6 Composición química de *Achillea millefolium*

Desde el siglo XIX se han realizado estudios químicos sobre la droga cruda de *A. millefolium*. De tal forma que a la fecha se han identificado más de 100 constituyentes químicos, incluyendo 23 compuestos aromáticos simples, 37 flavonoides y 45 terpenoides. En la **Tabla 2** se muestran ejemplos selectos de los diferentes tipos de compuestos aislados de *A. millefolium*. Del grupo de los terpenoides, las lactonas sesquiterpénicas son consideradas como los marcadores quimiotaxonómicos de la especie (Ali *et al.*, 2017; Chávez-Silva *et al.*, 2018). Aquilina (**22**) y leucodina (**26**) fueron las primeras lactonas de tipo guianólidas reportadas en esta planta (Romo de Vivar y Olmos, 1968).

También se ha constatado que la planta es rica en un aceite esencial constituido principalmente por monoterpenoides los cuales constituyen el 90% de la esencia en relación con los sesquiterpenoides. La composición química de la esencia (**Tabla 3; Figura 5**) de diferentes regiones ha sido estudiada y consistentemente los volátiles característicos son el 1,8-cineol (**36**), alcanfor (**37**), sabineno (**46**),  $\alpha$ -pineno (**42**) y  $\beta$ -pineno (**43**) (Becker *et al.*, 2016). También se ha comprobado que la composición del aceite varía por diversos factores relacionados con la distribución geográfica, tipo de suelo donde crece, la altitud, temperatura, relación de humedad y hasta el grado de radiación; también se ha encontrado que la composición de la esencia cambia en función del número de cromosomas presentes en la planta (Ali *et al.*, 2017); así el aceite esencial de una planta diploide contiene camazuleno (**51**) (hasta 25%) y otros constituyentes mayoritarios como el  $\beta$ -pineno (**43**) (23%),  $\alpha$ -pineno (**42**) (5%) y cariofileno (**45**) (10-22%). Mientras que una planta hexaploide no tiene azulenos y contiene aproximadamente 50% de mono y sesquiterpenoides, muchos de ellos oxidados, como el alcanfor (**37**) (18%), sabineno (**46**) (12%), 1,8-cineol (**36**) (10%) y  $\beta$ -pineno (**43**) (9%) (WHO, 2005). En relación con la variación geográfica, el aceite de regiones europeas contiene  $\alpha$ -tujona hasta en un 26 % (Orav, *et al.*, 2006); el aceite de Chile tiene un alto contenido de  $\beta$ -tujona (**40**) pero el de  $\alpha$ -tujona (**39**) es muy bajo (Tampe *et al.*, 2015).

El rendimiento del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de las partes aéreas de *A. millefolium* oscila entre 0.2 y 1.0 % (WHO, 2005).

**Tabla 2.** Compuestos aislados en *Achillea millefolium*

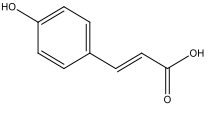
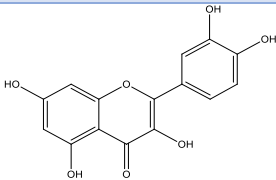
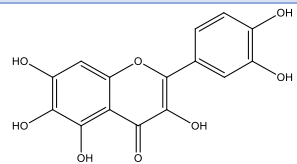
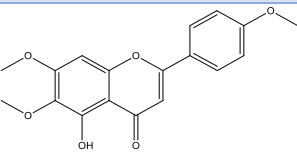
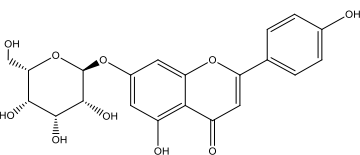
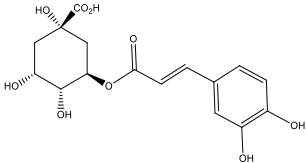
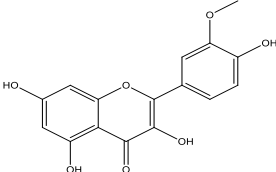
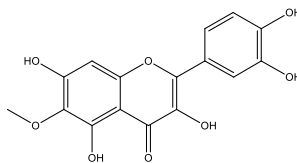
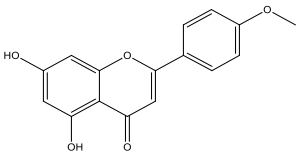
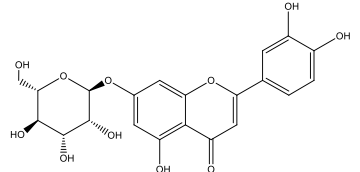
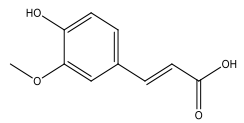
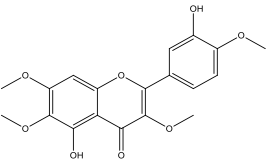
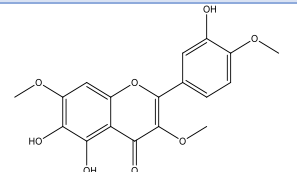
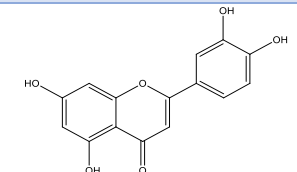
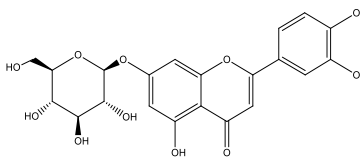
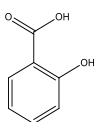
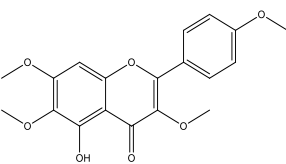
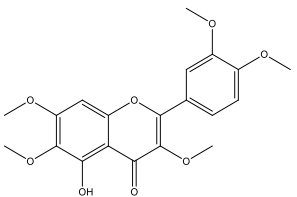
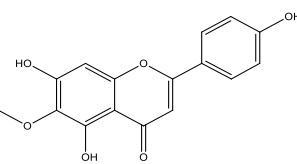
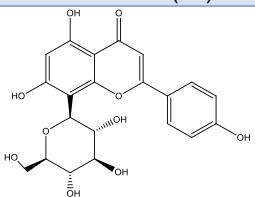
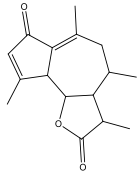
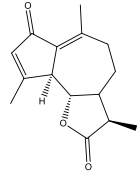
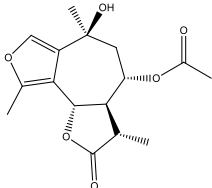
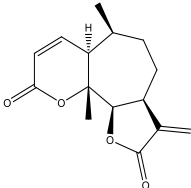
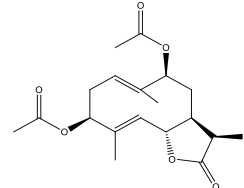
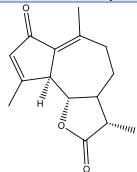
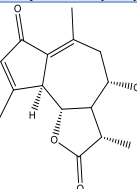
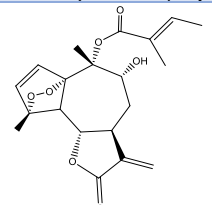
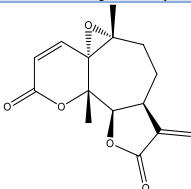
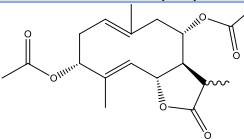
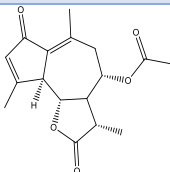
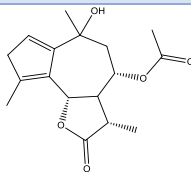
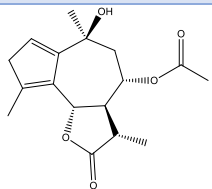
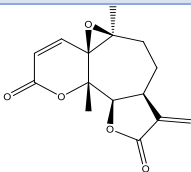
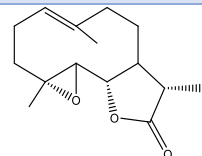
Aromáticos simples	Flavonoides			
	Flavonoles	Flavonas	Flavonas O-glicosiladas	
				
ácido <i>p</i> cumárico. (1)	quercetina (2)	quercetagenina (3)	salvigenina (4)	7-O-glucósido de apigenina (5)
				
ácido clorogénico (6)	isoramnetina (7)	nepetina (8)	acacetina (9)	7-O-glucósido de luteolina (10)
				
ácido ferúlico (11)	casticina (12)	centaureidina (13)	luteolina (14)	cinarósido (15)
				
ácido salicílico (16)	5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17)	artemetina (18)	hispidulina (19)	vitexina (20)

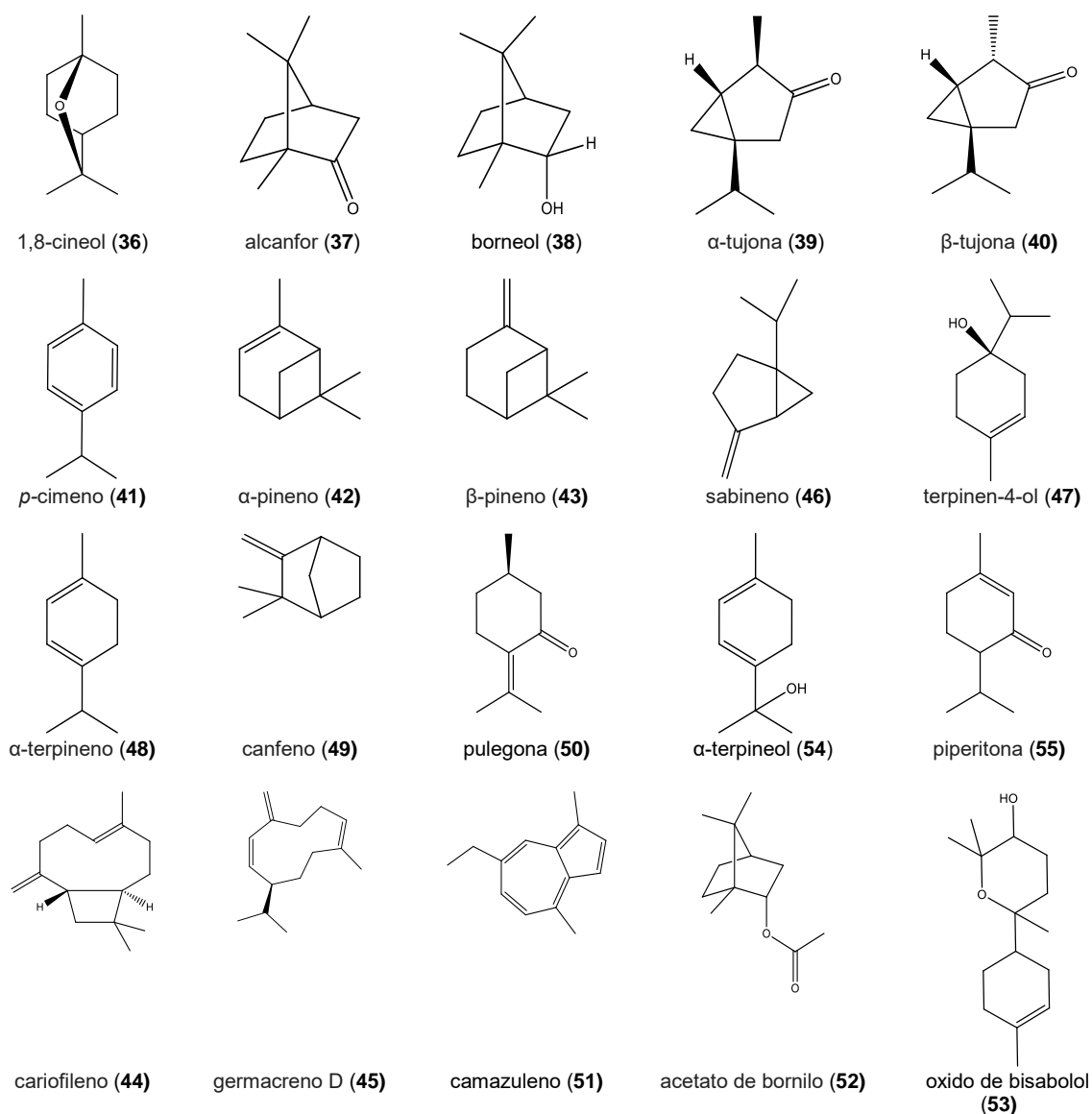
Tabla 2. Continuación.

<b>Terpenoides (sesquiterpenolactonas)</b>				
<b>Guaianólidas</b>		<b>Pseudoguaianólidas</b>		<b>Germacranólidas</b>
				
<b>austricina (21)</b>	<b>aquilina (22)</b>	<b>oxo-aquilina (23)</b>	<b>psilostachyin C (24)</b>	<b>sistenina (25)</b>
				
<b>leucodina (26)</b>	<b>desacetilmatricarina (27)</b>	<b><math>\alpha</math>-peroxiachifolida (28)</b>	<b>paulitina (29)</b>	<b>milefina (30)</b>
				
<b>matricarina (31)</b>	<b>8-acetoxi-artabsina (32)</b>	<b>aquilicina (33)</b>	<b>iso paulitina (34)</b>	<b>dihidropartenolida (35)</b>

**Tabla 3.** Variación de compuestos volátiles del aceite esencial de *Achillea millefolium*

Compuestos	Porcentaje relativo de cada compuesto (%)										
	(Suleimenov <i>et al.</i> , 2001)	(Shawl <i>et al.</i> , 2002)	(Candan <i>et al.</i> , 2003)	(Anna <i>et al.</i> , 2009)	(Haziri <i>et al.</i> , 2010)	(Nadim <i>et al.</i> , 2011)	(Raal, Orav, & Arak, 2012)	(Chou <i>et al.</i> , 2013)	(Tampe <i>et al.</i> , 2015)	(Vidic <i>et al.</i> , 2016)	(Ebadollahi <i>et al.</i> , 2016)
1,8-cineol (36)	8.7	11.5	24.6	3.1	22	13.0	-	10.1	0.4	12.3	7.7
alcanfor (37)	16	28.4	16.7	-	21	-	0.1	11.6	-	19.2	-
borneol (38)	6.2	2.9	4.0	1.9	7.6	12.4	1.4	-	-	15.1	3.5
$\alpha$ -tujona (39)	0.4	0.1	-	-	0.6	1.0	-	-	1.2	2.0	-
$\beta$ -tujona (40)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	96.2	0.5	-
<i>p</i> -cimeno (41)	1.1	0.5	-	0.2	1.6	1.1	-	-	0.4	-	10.6
$\alpha$ -pineno (42)	0.6	0.7	2.4	0.5	1.3	6.3	-	1.2	-	-	3.1
$\beta$ -pineno (43)	2.1	0.5	4.2	.7	5.3	6.5	0.1	2.4	-	-	1.6
cariofileno (44)	2.1	1.1	0.4	4.4	2.6	2.3	2.5	1.8	-	-	-
germacreno D(45)	2.4	11.5	-	-	-	1.4	0.6	2.7	-	-	0.4
sabineno (46)	1.3	2.0	2.8	19.7	1.2	17.5	-	-	-	-	1.2
terpinen-4-ol (47)	3.1	1.9	2.8	5.2	2.9	6.2	1.2	3.7	-	3.2	1.7
$\alpha$ -terpineno (48)	5.9	-	0.5	-	2.8	-	-	-	0.1	-	2.3
canfeno (49)	-	1.2	2.4	0.2	0.6	2.0	-	-	-	-	2.5
pulegona (50)	-	4.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
camazuleno (51)	-	-	-	42.1	-	5.2	44	-	-	-	-
acetato de bornilo (52)	-	-	-	-	-	8	7.3	0.1	-	3.9	8.5
óxido de bisabolol(53)	-	-	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -terpineol (54)	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	5.1	-
piperitona (55)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	12.8





**Figura 5.** Compuestos identificados en distintos aceites esenciales de *Achillea millefolium*.

## 1.2 Control de calidad de plantas medicinales

En la actualidad, los productos herbolarios se comercializan bajo diferentes formas de dosificación (tabletas, cápsulas, polvos, extractos) o bien como drogas frescas o crudas. El aumento en el uso de estos productos ha propiciado su adulteración o sustitución (Kunle, 2012; Srivastava, 2018). En este escenario, el control de calidad de las drogas vegetales y de los medicamentos a base de hierbas es importante y cuestión esencial a

considerar para asegurar su eficacia terapéutica y seguridad (Bandaranayake, 2006).

Las farmacopeas son los textos oficiales que contienen las especificaciones de calidad para principios activos, drogas vegetales, productos a base de hierbas (Kn & Council, 2016; OMS, 2013). Así, una farmacopea herbolaria establece los métodos de análisis y especificaciones técnicas (descritos en monografías) que deberán cumplir las drogas y sus derivados destinados a la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios (FHEUM, 2013).

En términos generales, el control de calidad de las plantas medicinales debe contestar tres preguntas fundamentales: ¿Es la hierba la que debe ser? ¿Contiene contaminantes, por ejemplo, algún material vegetal que no debería estar presente? y, ¿El contenido de los componentes activos está dentro de los límites definidos? Para responder estas preguntas, entonces es necesario establecer sus parámetros de identidad, pureza, y composición, respectivamente (Bandaranayake, 2006; Kunle, 2012).

Las pruebas de pureza deben garantizar que la droga se encuentre libre de contaminantes (metales pesados, aflatoxinas, radiactividad, residuos de pesticidas, material vegetal extraño, mohos, insectos, y otros residuos químicos) (Bandaranayake, 2006; OMS, 2011; Ahmad *et al.*, 2014).

El propósito de los ensayos de identidad es garantizar la autenticidad del material vegetal. Para este fin, existen las pruebas de identidad botánicas, químicas y genéticas. Las primeras, se realizan a nivel macroscópico (un comparativo confiable suele hacerse con las muestras de referencias depositados en los herbarios) y microscópico. Las pruebas de identidad química se llevan a cabo empleando reacciones colorimétricas, procedimientos espectroscópicos (UV e IR) y análisis cromatográficos (CL, CLAE, CLUE, CCF, CG) mediante la generación de perfiles cromatográficos (huellas dactilares) que hacen una representación integral de los diversos componentes químicos de las hierbas medicinales o bien mediante la detección de compuestos marcadores (Kunle, 2012; OMS 2017; Liang *et al.*, 2004).

Finalmente, las pruebas de composición consisten en aplicar métodos analíticos validados para cuantificar los compuestos relacionados o no (marcadores) con la actividad farmacológica. Los compuestos marcadores se definen como productos químicamente definidos que son de interés analítico, independientemente de si tienen alguna actividad terapéutica (Kunle, 2012).

### **1.2.1 Control de calidad de *Achillea millefolium***

Debido al amplio uso medicinal de esta especie a nivel global, los parámetros de control de calidad de la droga cruda de *A. millefolium* y su aceite esencial se encuentran incluidos en varias monografías oficiales, incluyendo aquellas de las Farmacopeas Europea, Española, Alemana, Francesa, Suiza, India, y Mexicana, entre otras (Feizpour *et al.*, 2013). También los criterios de calidad de la droga cruda y aceite esencial están plasmados en monografías no oficiales como Farmacopea Herbolaria Americana (AHP por sus siglas en inglés) y en las monografías de la OMS, volumen 4.

De acuerdo con las monografías de la Farmacopea Europea y las otras mencionadas, las sumidades floridas de *A. millefolium* deben contener al menos 0.2% de aceite esencial y no menos de 0.02% de camazuleno (**51**). El ensayo de identidad consiste en detectar la presencia de cineol (**36**) en la droga cruda por cromatografía en capa fina (CCF). Mientras que la prueba de composición está dirigida a la cuantificación de camazuleno (**51**) en la esencia mediante un método espectrofotométrico (FHEUM,2013; EP, 2017). La monografía publicada en la segunda edición de la Farmacopea Herbolaria de México es una fiel copia de la publicada en la Farmacopea Española. Sin embargo, se han descrito esencias que no contienen cineol (**36**) (Raal *et al.*, 2012), y muchas más que no contienen camazuleno (**51**) (ver Tabla 3). Por estas razones es necesario establecer las pruebas de identidad y composición idóneas para la planta que se cultiva en México.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El aumento en el uso de productos a base de plantas medicinales ha dado lugar a diversas formas de abuso y adulteraciones. Razón por la cual, garantizar la seguridad, la calidad y eficacia del material vegetal y de los productos herbolarios se ha convertido en una prioridad para las autoridades sanitarias alrededor del mundo (OMS, 2013). Las especificaciones que deben tener estos recursos en cuanto a calidad se encuentran especificados en documentos no oficiales y oficiales como las Farmacopeas. En nuestro país, estas especificaciones se indican en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos que a la fecha cuenta con dos ediciones que incluyen las monografías de plantas introducidas y algunas autóctonas (FHEUM, 2013).

Las monografías de algunas especies introducidas o de consumo mundial son una copia de las publicadas en las Farmacopeas Española y Europea, como es el caso de la de *A. millefolium*, una planta medicinal muy comercializada a nivel global. A la fecha no se ha comprobado si la monografía de las Farmacopeas antes mencionadas es adecuada para la especie que se cultiva y comercializa en México.

Entonces, el presente trabajo de tesis pretende comprobar si la monografía de la especie *A. millefolium* presente en la segunda edición de la FHEUM es apropiada para la especie mexicana, y en caso negativo, generar la información científica necesaria para establecer los parámetros de calidad de la especie con el propósito de sustituir la monografía publicada en ediciones anteriores de la FHEUM. El trabajo forma parte de un estudio sistemático encaminado a la generación de parámetros de calidad, eficacia y seguridad de especies de amplio uso en las prácticas fitoterápicas de México a fin de garantizar el uso racional de las mismas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Establecer las pruebas de identidad química y composición de la droga cruda de *A. millefolium* comercializada en 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.

#### 3.2 Objetivos específicos

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

- Obtener el perfil cromatográfico del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía en capa delgada (CCD).
- Desarrollar una nueva estrategia experimental para la preparación de muestra (matriz de trabajo) más sencilla que la descrita en la FHEUM 2ª Edición.
- Identificar los constituyentes presentes en la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión mediante un estudio fitoquímico convencional a fin de generar su perfil cromatográfico mediante la aplicación de distintas técnicas cromatográficas incluyendo la cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a un detecto de arreglo de diodos (CLUE-PDA).
- Desarrollar y validar un método analítico por (CLUE-PDA) que permita la cuantificación del compuesto marcador de la droga cruda.

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 4.1 Material vegetal.

El material vegetal de *Achillea millefolium* L. se adquirió comercialmente en el mercado de “La Bola” alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, en abril de 2017, junio 2018 y agosto 2018 (lotes 1-3, respectivamente). La identificación botánica de la especie la realizó el M. en C. Rafael Torres Colín (No. de referencia 1468650) [Herbario Nacional de México (MEXU), Instituto de Biología, UNAM]. Un cuarto lote de *A. millefolium*, fue una donación proveniente de la comunidad de Tres Marías, Huitzilac, Estado de Morelos, en el mes de julio de 2018 (lote 4, No. de referencia 34332) [Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIBIS)].

Las partes aéreas de todos los lotes adquiridos fueron desecadas al aire libre y a temperatura ambiente durante 20 días; transcurrido este tiempo, el material vegetal seco se pulverizó en un molino de cuchillas Thomas Wiley Model 4 (Laboratory Mill, Thomas Scientific, USA).

### 4.2 Preparación de la muestra

Los extractos acuosos se prepararon mediante la técnica de infusión a partir de 5 g del material vegetal seco y molido en 250 mL de agua destilada a ebullición (78-84°C) durante 30 min. Al finalizar el tiempo de la extracción, el infuso resultante se filtró y se sometió a sucesivas particiones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 100 mL). La fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad.

### 4.3 Estudio químico.

#### 4.3.1 Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Para el aislamiento y la purificación de los metabolitos secundarios de *A. millefolium* se utilizó el lote 1.

El procedimiento descrito en el inciso 4.2 se repitió tantas veces fue necesario hasta obtener 2.29 gr de dicha fracción. Esta fracción, fue sometida a un fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta (CCA) sobre gel de sílice (298.5 gr; Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063–0.200 μm, malla de 70–230 mm ASTM, NJ, EE. UU.), y como fase móvil mezclas en orden creciente de polaridad de Hex-AcOEt [100:0→0:100]. Se colectaron eluatos de 50 mL, los cuales fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica en un conjunto de 22 fracciones secundarias (A<sub>1</sub>-A<sub>22</sub>).

A partir de las fracciones A<sub>10</sub>, A<sub>11</sub> y A<sub>13</sub> [Hex-AcOEt (86:14)] cristalizaron de manera espontánea tres sólidos, que al ser recristalizados con la mezcla de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (99.5:0.5) permitieron el aislamiento de tres lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianólida identificadas como la aquilina (**22**; 48.8 mg), la leucodina (**26**; 64 mg) y la matricarina (**31**; 135 mg), respectivamente.

Leucodina (**26**): Sólido vítreo; p.f. 200-202°C. [M + H]<sup>+</sup> (*m/z*) 247.13. IR (FTIR)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2943, 1769, 1680, 1635, 1615, 1178 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 6.16 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-3), 3.62 (1H, t, *J* = 10.0 Hz, H-6), 3.41 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-5), 2.43 (1H, m, H-9 $\alpha$ ), 2.33 (1H, m, H-9 $\beta$ ), 2.29 (3H, s, H-15), 2.25 (1H, dq, *J* = 13.6, 7.0 Hz, H-11), 1.99 (1H, m, H-8 $\alpha$ ), 1.95 (1H, ddd, *J* = 12.7, 9.8, 3.1 Hz, H-7), 1.35 (1H, q, *J* = 13.4, 13.0 Hz, H-8 $\beta$ ), 1.26 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-13). <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 195.9 (C-2), 177.6 (C-12), 170. (C-4), 152.1 (C-10), 135.6 (C-3), 131.9 (C-1), 84.2 (C-6), 56.4 (C-7), 52.6 (C-5), 41.1 (C-11), 37.6 (C-9), 26.0 (C-8), 21.6 (C-14), 19.8 (C-15), 12.3 (C-13).

Aquilina (**22**): Sólido vítreo; p.f. 135-137°C. [M + H]<sup>+</sup> (*m/z*) 247.13. IR (FTIR)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2933, 1771, 1679, 1634, 1617 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$

(ppm): 6.16 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-3), 6.16 (1H t,  $J = 10.3$  Hz, H-6), 3.42 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-5), 2.70 (1H, q,  $J = 7.5$  Hz, H-11), 2.47 (1H, m, H-7), 2.44 (1H, m, H-9 $\alpha$ ), 2.43 (s, 3H, H-14), 2.32 (2H, ddd,  $J = 14.5, 6.4, 1.7$  Hz, H-9 $\beta$ ), 2.29 (3H, s, H-15), 1.86 (1H, ddt,  $J = 13.7, 5.1, 2.2$  Hz, H-8 $\alpha$ ), 1.42 (1H, q,  $J = 12.7$  Hz, H-8 $\beta$ ), 1.14 (3H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-13).  $^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 195.9 (C-2), 178.5 (C-12), 170.1 (C-4), 152.2 (C-10), 135.5 (C-3), 131.8 (C-1), 83.5 (C-6), 53.0 (C-5), 52.0 (C-7), 39.4 (C-11), 37.6 (C-9), 23.6 (C-8), 21.6 (C-14), 19.8 (C-15), 10.0 (C-13).

Matricarina (**31**): Sólido vítreo; p.f. 193-195°C.  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $m/z$ ) 305.12. IR (FTIR)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2951, 1784, 1741, 1681, 1635, 1617, 1217  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 6.19 (1H, q,  $J = 1.3$  Hz, H-3), 4.84 (1H, td,  $J = 10.6, 2.0$  Hz, H-8 $\beta$ ), 3.72 (1H, t,  $J = 10.1$  Hz, H-6), 3.40 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-5), 2.72 (1H, dd,  $J = 13.6, 10.8$  Hz, H-9 $\alpha$ ), 2.49 (1H, dq,  $J = 12.2, 6.9$  Hz, H-11), 2.45 (3H, s, H-14), 2.39 (1H, dd,  $J = 13.7, 2.1$  Hz, H-9 $\beta$ ), 2.34 (1H, m, H-7), 2.30 (3H, s, H-15), 2.12 (3H, s, H-17).  $^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 195.1 (C-2), 176.7 (C-12), 169.7 (C-16), 169.5 (C-4), 145.0 (C-10), 135.9 (C-3), 133.2 (C-1), 81.1 (C-6), 70.3 (C-8), 59.1 (C-7), 51.6 (C-5), 44.736 (C-9), 40.7 (C-11), 21.4 (C-17), 21.1 (C-14), 19.9 (C-15), 15.0 (C-13).

#### 4.3.2 Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico total.

El extracto orgánico en mediana escala se preparó por un proceso de maceración a partir de material vegetal seco y molido (2 Kg, lote 1) utilizando una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1; 15 L) como disolvente de extracción, durante 21 días. Al término del período de extracción, el extracto orgánico se separó del material vegetal por filtración y se concentró a sequedad obteniéndose 263.8 g de un residuo verde oscuro.

El extracto orgánico total se sometió a un fraccionamiento primario (100 g) utilizando una CCA sobre gel de sílice (1.656 Kg) y como fase móvil un gradiente de elución con las mezclas de Hex-AcOEt (100:0  $\rightarrow$  55:45). Este proceso generó un conjunto de siete fracciones primarias (EO<sub>1</sub>-EO<sub>7</sub>).



De las fracciones primarias EO<sub>3</sub>, EO<sub>4</sub> y EO<sub>6</sub> [Hex-AcOEt (15:85)] precipitaron 44, 392 y 151 mg de las metoxiflavonas identificadas como la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**17**), la artemetina (**18**) y la casticina (**12**), en conjunto con la leucodina (**26**) y la matricarina (**31**). Los datos del aislamiento de estos compuestos se indican en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Aislamiento de los productos mayoritarios presentes en el extracto orgánico

Compuesto	Fracción	Mezcla de elución (Hex-AcOEt)	Cantidad (mg)
5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona ( <b>17</b> )	EO <sub>3</sub>	90:10	44
Leucodina ( <b>26</b> )	EO <sub>4</sub>	85:15	266
Matricarina ( <b>31</b> )	EO <sub>4</sub>	85:15	105
Artemetina ( <b>18</b> )	EO <sub>6</sub>	82:18	392
Casticina ( <b>12</b> )	EO <sub>6</sub>	72:28	151

5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**17**): Sólido amarillo cristalino; p.f. 171-173°C.  $[M + H]^+$  ( $m/z$ ) 359.10. IR (FTIR)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2917, 1660, 1606, 1460, 1125, 803  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 12.62 (1H, s, OH), 8.08 (2H, m, H-2'/H-6'), 7.02 (2H, m, H-3'/H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 3.96 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 179.0 (C-4), 161.7 (C-4'), 158.8 (C-7), 156.0 (C-2), 152.8 (C-9), 152.4 (C-5), 138.8 (C-3), 132.3 (C-6), 130.2 (C-2'/C-6'), 122.8 (C-1'), 114.1 (C-3'/C-5'), 106.6 (C-10), 90.3 (C-8), 60.9 (OCH<sub>3</sub>), 60.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 55.5 (OCH<sub>3</sub>).

Artemetina (**18**): Sólido amarillo cristalino; p.f. 160-161°C.  $[M + H]^+$  ( $m/z$ ) 389.11. IR (FTIR)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2932, 1644, 1586, 1508, 1470, 1353, 1262, 801  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7.73 (1H, dd,  $J = 8.3, 2.2$  Hz, H-6'), 7.69 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.00 (1H, d,  $J = 8.6$ , H-5'), 6.51 (1H, s, H-8), 3.98 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.97 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 178.9 (C-4), 158.8 (C-7), 155.9 (C-2), 152.8 (C-5),

152.3 (C-9), 151.4 (C-4'), 148.8 (C-3'), 138.9 (C-3), 132.4 (C-6), 123.0 (C-1'), 122.2 (C-6'), 111.35 (C-3'), 110.9 (C-5'), 106.6 (C-10), 90.4 (C-8), 60.9 (OCH<sub>3</sub>), 60.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>).

Casticina (**12**): Sólido amarillo cristalino; p.f. 186-187°C. [M + H]<sup>+</sup> (*m/z*) 375.10. IR (FT-IR)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3432, 1654, 1586, 1436, 1361, 1265, 1216, 791 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 12.59 (1H, s, OH), 7.73 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H-6'), 7.68 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.97 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 5.73 (1H, s, OH), 3.99 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.96 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 179.0 (C-4), 158.8 (C-7), 155.6 (C-2), 152.7 (C-5), 152.3 (C-9), 148.8 (C-4'), 145.6 (C-3'), 139.0 (C-3), 132.3 (C-6), 123.6 (C-1'), 121.6 (C-6'), 114.3 (C-2'), 110.4 (C-5'), 106.6 (C-10), 90.3 (C-8), 60.9 (OCH<sub>3</sub>), 60.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>).

#### **4.3.3 Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM) cromatografía en capa delgada (CCD).**

La preparación del aceite esencial de los lotes 2, 3 y 4 se realizó mediante la técnica de hidrodestilación a partir del material vegetal fresco (260 g) y agua destilada (2 L) a una temperatura de 60°C durante 4 horas. Al término de la extracción, la esencia se separó del destilado, mediante un proceso de partición con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. Este proceso permitió obtener 1.0 y 1.2 g de un aceite azul intenso (lotes 2 y 3, respectivamente) y 0.8 g de un aceite azul tenue (lote 4).

Todas las esencias preparadas fueron analizadas en un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO tiempo de vuelo (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, CA, EE.UU.) utilizando una columna capilar DB-5 (10 m × 0.18 mm) con un gradiente de temperatura desde 40°C hasta 300°C (4°C/min; 40 min). El helio (1 mL/min) se utilizó como gas acarreador. La identificación de los compuestos volátiles presentes en las muestras analizadas se llevó a cabo comparando los

espectros de masas generados con aquellos reportados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) y mediante el cálculo de los índices de retención (Índice de Kováts, IK) aplicando la metodología descrita por Kóvats que describe el uso de una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) inyectada en las mismas condiciones cromatográficas. La presencia de  $\alpha$ -tujona (**39**) y  $\beta$ -tujona (**40**) se confirmó mediante la coelución de una muestra de referencia (~10%  $\beta$ -tujona y ~70%  $\alpha$ -tujona) disponible comercialmente. Finalmente, la cuantificación de cada constituyente se realizó midiendo el área bajo la curva de cada pico en el cromatograma correspondiente.

Adicionalmente, se analizó el perfil cromatográfico de los aceites esenciales preparados (lotes 2-4) por cromatografía en capa delgada (CCD). Para ello se utilizó gel de sílice GF254 como soporte, la fase móvil fue una mezcla binaria de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y aldehído anísico al 10% como agente revelador.

#### **4.3.4 Análisis de los compuestos volátiles presentes en el material vegetal (seco y fresco) mediante la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME).**

El análisis de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de *A. millefolium* se realizó por la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME por sus siglas en inglés) (Hinshaw, 2003). Para ello, se utilizó la fibra de divinilbenceno-carboxeno-poli (dimetilsiloxano) (DVB/CAR/PDMS).

La extracción de los compuestos volátiles se realizó a partir del material vegetal seco (30mg) y fresco (15mg) del lote 2. Se colocaron en un vial con 75mg de NaCl y una barra de agitación magnética. Al vial con el material vegetal seco se agregó agua grado HPLC (13mL) y fue montado sobre un agitador magnético a 600 rpm. La fibra se introdujo a través del septum del vial y fue expuesta a la fase de vapor durante 20 min. Al vial con el material vegetal fresco se añadió 9mL de agua grado HPLC y las revoluciones necesarias del agitador magnético fueron 280 rpm. Se introdujo la fibra través del septum del

vial y fue expuesta a la fase de vapor por 7 min a 39°C. Transcurrido el tiempo de adsorción, la desorción térmica de los componentes de la fibra se realizó por CG-EM empleando las mismas condiciones de análisis e identificación de los compuestos indicadas en el inciso anterior.

#### **4.3.5 Análisis de los compuestos volátiles presentes en el extracto acuoso obtenidos por hidrodestilación.**

Para el estudio de los compuestos volátiles presentes en el extracto acuoso de *A. millefolium* (lote 3), en primer lugar, se realizó la preparación de la infusión como se indica en el inciso **4.2**. Posteriormente, el infuso fue sometido a un proceso de hidrodestilación, para así obtener una esencia con los compuestos volátiles. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura de 60°C durante 1 hora. La esencia obtenida se separó del producto de destilación mediante un proceso de reparto utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío.

El análisis de la esencia preparada se realizó por CG-EM empleando las mismas condiciones de análisis indicadas en el inciso **4.3.3**.

### **4.4 Ensayos de identidad**

#### **4.4.1 identificación de aquilina (22) por cromatografía en capa delgada (CCD)**

La identificación del compuesto **22** en las fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> derivadas de la infusión de *A. millefolium* designada como matriz de trabajo (lote 1), se realizó mediante CCD utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la **Tabla 5**. La solución de referencia 1, y de las matrices (lotes 1-4) se aplicaron en el cromatofolio en forma de banda. La cromatoplaque se desarrolló permitiendo que el frente de elución recorriera el 90 por ciento de su longitud. Posteriormente, las cromatoplaques se observaron bajo una lámpara de luz UV a la longitud de onda de 254 nm.

**Tabla 5.** Condiciones cromatográficas para la CCD

<b>Soporte</b>	Gel de sílice GF <sub>254</sub>
<b>Fase móvil</b>	Hex-AcOEt (3:7)
<b>Preparación de referencia 1</b>	Disolver 1 mg de aquilina ( <b>22</b> ) en 100 $\mu$ L de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>Preparación de las muestras</b>	Disolver 5 mg de muestra (fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; lotes 1-4) en 100 $\mu$ L de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

#### 4.4.2 Identificación de aquilina (**22**), leucodina (**26**) y matricarina (**31**) por CLUE-PDA

El análisis cromatográfico cualitativo se realizó a partir de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> derivada de la infusión de *A. millefolium* utilizando 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 el detector de arreglo de diodos (PDA). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa MassLynx® versión 4.1 (Waters). Todos los análisis se realizaron en una columna BEH Phenyl (2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m) (Waters). En las **Tablas 6** y **7** se resumen las condiciones del equipo y de análisis empleadas.

**Tabla 6.** Condiciones cromatográficas para los análisis por CLUE-PDA

<b>Fase móvil</b>	<b>A:</b> Agua (0.1% AF) <b>B:</b> CH <sub>3</sub> CN (0.1% AF)
<b>Temperatura</b>	40°C
<b>Volumen de inyección</b>	3 $\mu$ L
<b>Flujo</b>	0.3 mL/min
<b>Longitud de onda de detección (nm)</b>	285

**Tabla 7.** Gradiente de elución utilizado para el desarrollo del perfil cromatográfico.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	85	15
3	65	35
5	55	45
8	35	65
10	20	80
11	0.0	100
12	0.0	100
12.5	85	15
15	85	15

## **4.5 Ensayo de composición**

### **4.5.1 Validación del método analítico para cuantificar a la leucodina (26)**

Para cuantificar al compuesto **26** se utilizaron las condiciones cromatográficas descritas en el inciso **4.4.2**. La validación del método se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la International Conference on Harmonisation (ICH; Q2 (R1) 2005). Los parámetros de calidad evaluados se describen en los siguientes puntos.

#### **4.5.1.1 Linealidad del sistema**

La linealidad del sistema se evaluó con siete curvas de calibración de la leucodina (**26**) a las concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . Cada curva se preparó mediante diluciones independientes a partir de una solución de referencia (1  $\text{mg/mL}$ ) y con pesadas independientes. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre las variables concentración ( $x$ ) y área bajo la curva ( $y$ ). Los parámetros estadísticos calculados fueron: ordenada al origen ( $\beta_0$ ), pendiente de la recta ( $\beta_1$ ),

coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ). Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.999$  (ICH; Q2 (R1) 2005).

#### 4.5.1.2 Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método se determinó mediante la preparación por sextuplicado, de diferentes curvas enriqueciendo a la matriz de trabajo (100  $\mu\text{g/mL}$ ) con tres concentraciones de leucodina (**26**) (2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ). 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).

#### 4.5.1.3 Precisión

La precisión del sistema se determinó en términos de repetibilidad mediante el análisis por octuplicado de una solución del estándar a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . 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).

#### **4.6 Cuantificación de leucodina (26) en los diferentes lotes de *A. millefolium***

La cuantificación del compuesto **26** en los diferentes lotes 1-4 estudiados, se realizó a partir del análisis de cada muestra disuelta en una mezcla de dioxano-MeOH (1:1) a la concentración final de 100 µg/mL (lotes 1 y 4) y 25 µg/mL (lotes 2 y 3) registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso **4.4.2**.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

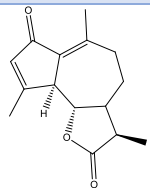
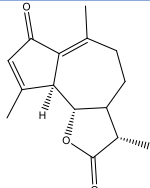
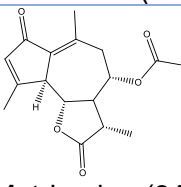
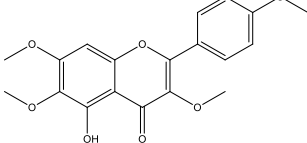
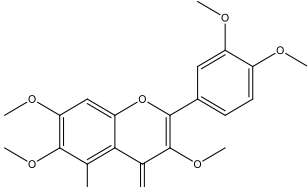
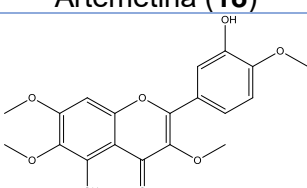
Para cumplir el objetivo general de este trabajo de investigación se siguió la siguiente estrategia: en primer lugar, se realizó la identificación botánica de la especie bajo estudio que se utilizaría como referencia. A continuación, se analizaron los volátiles presentes en tres lotes de la planta. Posteriormente, se preparó la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión obtenida de cuatro lotes diferentes de *A. millefolium*; esta fracción se propone como matriz de trabajo en el presente estudio; también se aislaron y caracterizaron los productos conocidos de la planta, haciendo énfasis en las lactonas sesquiterpénicas mayoritarias, designadas como compuestos marcadores en este estudio con el propósito de utilizarlas como estándares. Así mismo, se desarrollaron las pruebas de identidad mediante CCD y CLUE con el propósito de detectar la presencia de aquilina (**22**), y de las lactonas **22**, **26** y **31**, respectivamente. Finalmente, se desarrolló un método analítico por CLUE-PDA para cuantificar el marcador en las muestras objeto de estudio. En los siguientes puntos se describen los resultados obtenidos.

### 5.1 Obtención y caracterización de los estándares para las pruebas de identidad y composición de *A. millefolium*

Empleando la cromatografía en columna abierta se logró la separación, purificación e identificación de tres lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianólidas mayoritarias de la planta, matricarina (**31**), aquilina (**22**) y leucodina (**26**), a partir de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> derivada de la infusión de la planta. Éste es el preparado que se usa en las prácticas médicas populares (SEMARNAT, 2010; Alonso-Castro *et al.*, 2012). También se detectó en esta fracción la presencia de las metoxiflavonas; 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**17**), artemetina (**18**) y casticina (**12**). Estos metabolitos también fueron aislados del extracto orgánico de la droga cruda. Los compuestos aislados se resumen en la **Tabla 8**, los cuales fueron caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos, comparando la información obtenida de los diferentes espectros generados en este estudio

(ANEXOS 1, 2, 3, 4, 5 y 6) con los descritos previamente en la literatura. Con base en los espectros obtenidos se garantiza que los estándares cumplen con un grado de pureza adecuado.

**Tabla 8.** Metabolitos secundarios aislados en la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión de *A. millefolium*

Compuestos aislados	Rendimiento (%)		Referencias
	Fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de la infusión	Extracto orgánico	
 <p><b>Aquilina (22)</b></p>	2.13	-	(Romo de Vivar y Olmos, 1968)
 <p><b>Leucodina (26)</b></p>	2.80	0.27	(Romo de Vivar y Olmos, 1968;
 <p><b>Matricarina (31)</b></p>	5.90	0.11	(Martínez <i>et al.</i> , 1988)
 <p><b>5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17)</b></p>	-	0.04	(Paula <i>et al.</i> , 2006)
 <p><b>Artemetina (18)</b></p>	-	0.39	Huo <i>et al.</i> , 2013;
 <p><b>Caticina (12)</b></p>	-	0.15	(Eshbakova <i>et al.</i> , 2018)

## 5.2 Establecimiento de los componentes volátiles de *A. millefolium*

Con la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) se realizó un estudio de los constituyentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación (lotes 2, 3 y 4) de los compuestos volátiles de la planta extraídos mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (lote 2), y finalmente, de los volátiles de la infusión obtenidos por hidrodestilación de ésta (lote 2). De igual manera, las esencias se analizaron mediante cromatografía en capa delgada (CCD) con las condiciones que se indican en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) y otras.

El análisis de aceites esenciales por CG/EM tiene una serie de ventajas: En primer lugar, el cromatograma de la esencia proporciona una "huella dactilar" que puede utilizarse para identificar a la planta. La composición y la concentración relativa de los compuestos orgánicos presentes en el aceite esencial son característicos de la planta cuando éstas se recolectan en un mismo lugar y una misma época. De manera adicional, la extracción del aceite esencial es relativamente sencilla y de fácil estandarización, y sus componentes pueden ser fácilmente identificados mediante el análisis de CG/EM (Liang *et al.*, 2004).

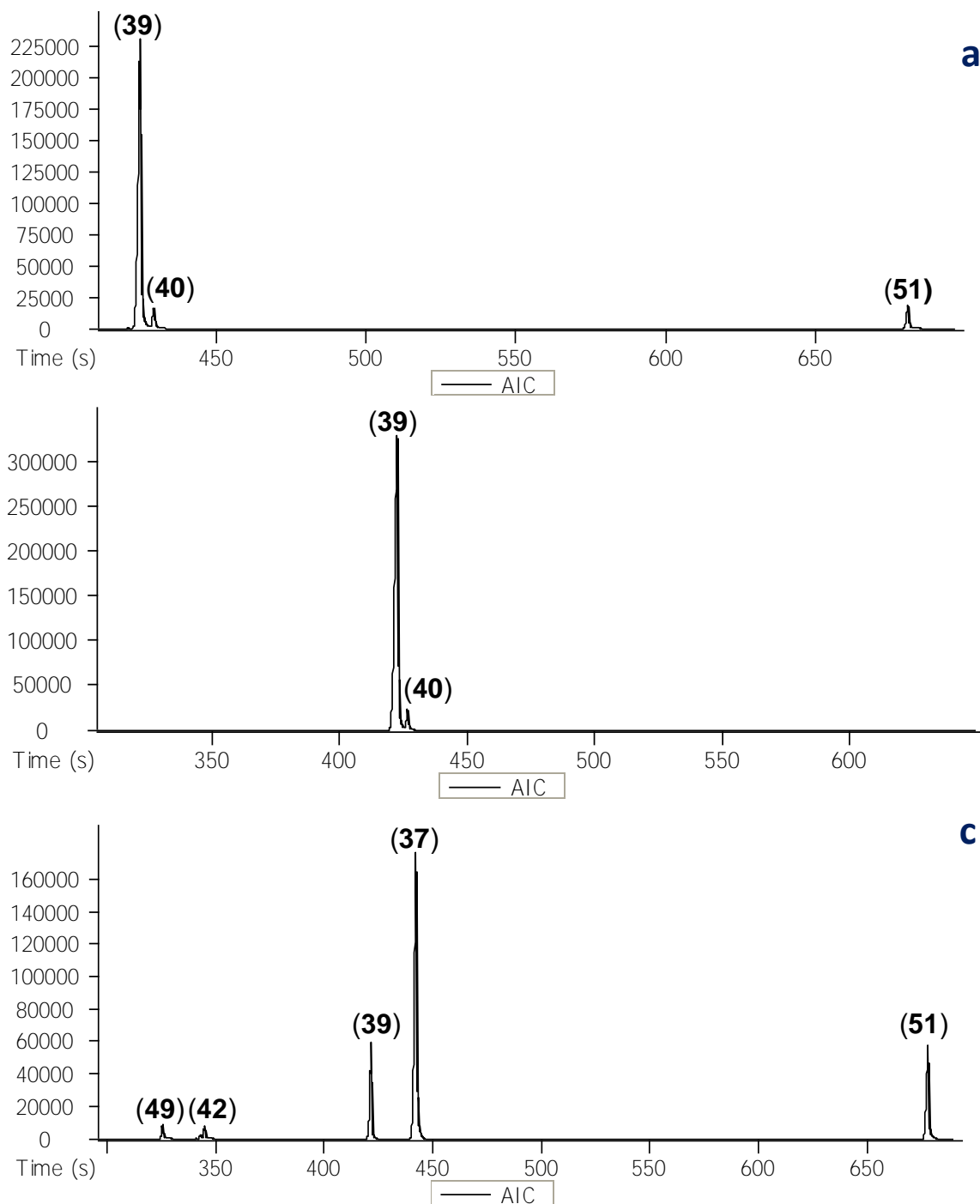
En la monografía de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2013) se indica que el aceite esencial de *A. millefolium* debe contener no menos de 0.02 % de aceite esencial. Así, las esencias realizadas en este estudio, mismas que fueron obtenidas por hidrodestilación a partir de los lotes 2, 3 y 4 (0.39%, 0.32% y 0.31 %, respectivamente) cumplen con este requisito. Mediante el análisis por CG/EM de los aceites esenciales obtenidos en este estudio, se identificaron seis compuestos volátiles mayoritarios, cinco de ellos monoterpenoides y el sexto, fue el camazuleno (51). En ninguno de los aceites se detectó guayazuleno, compuesto utilizado en la prueba de identidad del aceite esencial en la monografía que se describe en la FHEUM. En la **Tabla 8** se muestra la composición relativa de cada compuesto identificado y en la **Figura 6** los cromatogramas obtenidos de los aceites esenciales analizados. Todos los constituyentes identificados en las

esencias coinciden con los reportes previos (**Tabla 3**). El compuesto mayoritario en todos los casos fue la  $\alpha$ -tujona (**39**). En estos lotes también se encuentra la  $\beta$ -tujona (**40**). La esencia del lote 2 contiene 8 % de camazuleno (**51**), sin embargo, en el lote 3 no se alcanza a detectar. En lo que respecta al lote 4, la  $\alpha$ -tujona (**39**) sigue estando presente en una alta proporción, no obstante, el compuesto mayoritario es el alcanfor (**37**); el camazuleno (**51**), y los compuestos minoritarios son el  $\alpha$ -pineno (**42**) y el canfeno (**49**). Estas diferencias entre lotes evidentemente pueden obedecer a variaciones geográficas y estacionales. El contenido de  $\alpha$ -tujona (**39**) es mucho mayor en los lotes 2 y 3, adquiridos comercialmente en un mercado en la CDMX, que el del lote 4 recolectado en el Estado de Morelos. Cabe mencionar que la complejidad de las esencias de *A. millefolium* analizadas previamente es mayor que la encontrada en este trabajo (Suleimenov *et al.*, 2001; Shawl *et al.*, 2002; Candan *et al.*, 2003; Anna *et al.*, 2009; Haziri *et al.*, 2010; Nadim *et al.*, 2011; Raal, Orav y Arak, 2012; Chou *et al.*, 2013; Tampe *et al.*, 2015; Vidic *et al.*, 2016; Ebadollahi *et al.*, 2016). También es de destacar que se han definido varios quimiotipos de la especie con base en el metabolito mayoritario; de tal forma que algunas esencias se caracterizan por un alto contenido de camazuleno (**51**), 1,8-cineol (**36**), sabineno (**46**),  $\alpha$  (**42**) y  $\beta$  pineno (**43**) (Orav *et al.*, 2006). En este caso los aceites esenciales de los lotes 2 y 3 pareciesen que definen un quimiotipo rico en  $\alpha$ -tujona (**39**); y el lote 4 parecería otro rico en alcanfor (**37**).

Tabla 8. **Constituyentes químicos del aceite esencial de *A. millefolium*.**

	Compuesto	Índice de retención		Área %		
		Experimental	Literatura	Lote 2	Lote 3	Lote 4
1	$\alpha$ -tujona ( <b>39</b> )	1109	1112	84.7	94.6	25.7
2	$\beta$ -tujona ( <b>40</b> )	1117	1122	7.3	5.6	
3	camazuleno ( <b>51</b> )	1739	1742	8	-	15.6
4	canfeno ( <b>49</b> )	944	953	-	-	1.2
5	$\alpha$ -pineno ( <b>42</b> )	971	940	-	-	2.6
6	alcanfor ( <b>37</b> )	1145	1147	-	-	54.6

Respecto al contenido elevado de  $\alpha$ -tujona (**39**) en el aceite esencial de los lotes 2 y 3, no existen estudios en la literatura que indiquen un porcentaje similar del monoterpenoide en la esencia de esta especie. El mayor contenido de  $\alpha$ -tujona (**39**) que se ha reportado en *A. millefolium* es de 26% en los aceites esenciales de plantas de Estonia y otros Países Europeos (Orav *et al.*, 2006). Este valor es similar al contenido encontrado en el aceite de la planta recolectada en el Estado de Morelos. No obstante, existen ciertas similitudes entre la composición de los aceites esenciales de los lotes 2 y 3 con aquellos de otras especies de *Achillea*. Así, en *A. multifida* (DC.) Griseb los metabolitos principales son  $\alpha$ -tujona (**39**) (60.9%) y  $\beta$ -tujona (**40**) (9.1%) (Baser *et al.*, 2012). En *A. kellalensis* Boiss también predomina la  $\alpha$ -tujona (**39**) (70.8%) (Saeidi *et al.*, 2016). Cabe destacar que en las esencias de esas especies el camazuleno (**51**) no está presente. En relación con el contenido elevado de alcanfor (**37**) del lote 4 (54.6%) tampoco tiene precedente; el dato más parecido se refiere a una esencia de *A. millefolium* cultivada en India que contiene un 28.4% del producto (Shawl *et al.*, 2002).



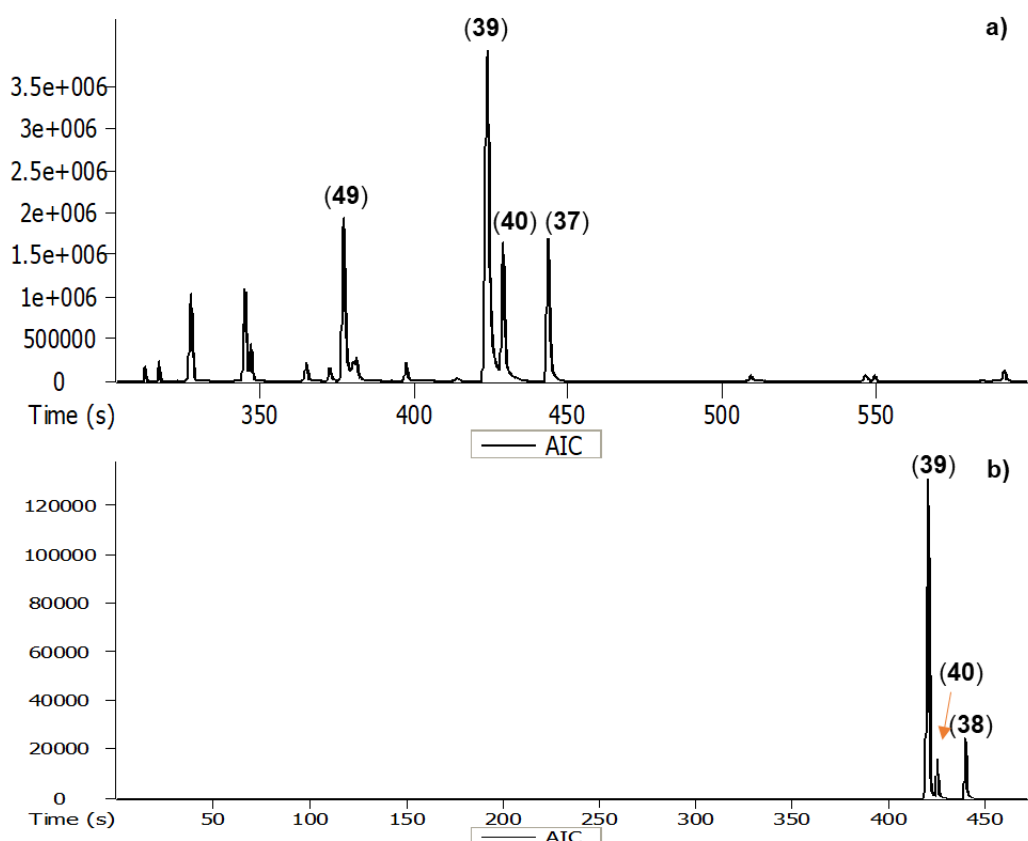
**Figura 6.** Cromatogramas representativos de los aceites esenciales de los lotes analizados de *A. millefolium*: **a)** lote 2, **b)** lote 3, **c)** lote 4. Asignación de picos:  $\alpha$ -tujona (39),  $\beta$ -tujona (40) y camazuleno (51),  $\alpha$ -pineno (42) canfeno (49) y alcanfor (37).

Los volátiles de *A. millefolium* se analizaron también mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), técnica que demanda mucho menor tiempo para un control de calidad de rutina, y requiere una pequeña cantidad de muestra (50 mg, aproximadamente) (Belliardo *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010). Así, dos muestras del lote 2 (una seca y otra fresca), se analizaron con una fibra de divinilbenceno-carboxeno-poli-(dimetilsiloxano) (DVB/CAR/PDMS) que logra extraer de manera eficiente los metabolitos volátiles de plantas (García-Esteban, *et al.*, 2004; Perestrelo *et al.*, 2016). Al proceso de microextracción le siguió un análisis por CG-EM; los cromatogramas obtenidos se muestran en la **Figura 7** y los resultados se ilustran en la **Tabla 9**. Al menos 12 constituyentes volátiles se identificaron en el material vegetal fresco de *A. millefolium* del lote 2, en contraste con los tres compuestos obtenidos con el aceite esencial. La  $\alpha$ -tujona (**39**) fue el compuesto volátil mayoritario tanto en el material vegetal fresco (26.2%) como en el seco (80.3%). En la planta fresca, la composición relativa del alcanfor (**37**) fue similar al de la planta seca (7.7 vs 9.1%). Por otro lado, se detectó la presencia de otro compuesto mayoritario (26.3%) en el material vegetal fresco que no pudo ser identificado.

Resulta sorprendente la diferencia en el contenido de volátiles obtenidos por hidrodestilación y microextracción en fase sólida del material vegetal fresco. Esta diferencia podría atribuirse a que los productos mayoritarios se encuentran conjugados en la planta, de tal manera que no se extraen del hidrodestilado al momento de hacer el reparto. En la literatura se han descrito varios casos en que el contenido de los productos mayoritarios es mayor al utilizar la microextracción en fase sólida. Así, en un estudio reciente el contenido de mentol en *Menta piperita* L. resulta mucho mayor cuando el análisis se realiza por HS-SPME; la misma situación se observó con la especie *Syzygium aromaticum*, cuyo contenido de eugenol es menor en el aceite esencial que en el material analizado por HS-SPME (Sgorbini, *et al.*, 2015a; 2015b)

**Tabla 9.** Compuestos volátiles de *A. millefolium* identificados por CG-EM tras su extracción por microextracción en fase sólida

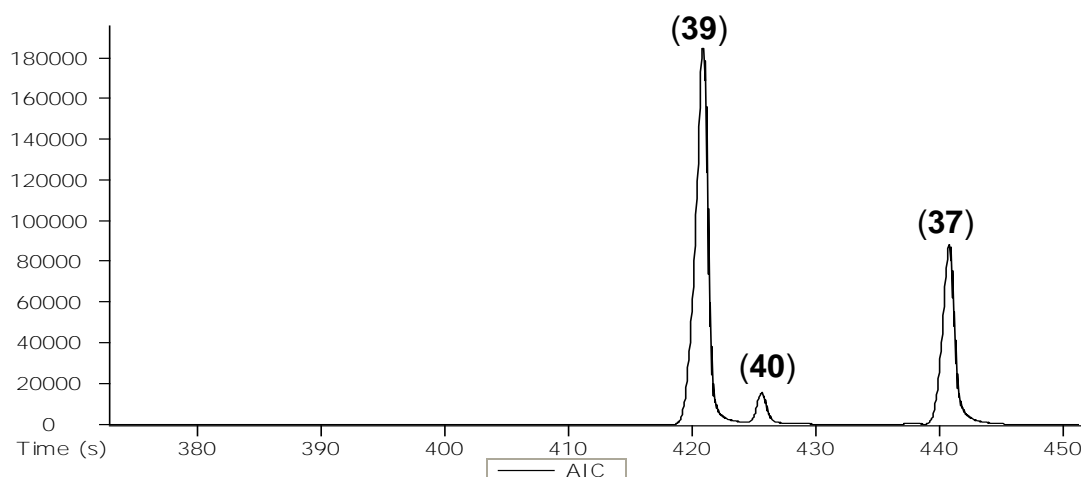
	Compuesto	Índice de retención		Área %	
		Experimental	Literatura	Planta fresca	Planta seca
1	$\alpha$ -tujona ( <b>39</b> )	1109	1112	26.2	80.3
2	$\beta$ -tujona ( <b>40</b> )	1117	1122	9.2	10.6
3	$\alpha$ -tujeno	923	925	1.7	-
4	canfeno ( <b>49</b> )	944	953	6.5	-
5	sabineno ( <b>46</b> )	969	974	4.1	-
6	$\alpha$ -pineno ( <b>42</b> )	971	940	1.4	-
7	<i>o</i> -cimeno	1019	1021	6.4	-
8	1-8-cineol ( <b>36</b> )	1027	1031	3.2	-
9	4-careno	1057	1014	1.3	-
10	NI	1109	NR	26.3	-
11	alcanfor ( <b>37</b> )	1145	1147	7.7	9.1
12	formiato de isobornilo	1285	1244	0.7	-



**Figura 7.** Cromatogramas representativos de los compuestos volátiles extraídos por microextracción en fase sólida de la planta fresca **a)** y seca **b)** de *A. millefolium* (lote 2). Asignación de picos:  $\alpha$ -tujona (**39**),  $\beta$ -tujona (**40**), alcanfor (**37**) canfeno (**49**).



Considerando el alto contenido de  $\alpha$ -tujona (**39**) en los aceites esenciales estudiados se decidió analizar los compuestos volátiles de la infusión de *A. millefolium*. Estos se obtuvieron por hidrodestilación de la infusión. El análisis por CG-EM del hidrodestilado indicó que éste contiene primordialmente  $\alpha$  (**39**) y  $\beta$  tujona (**40**) y alcanfor (**37**) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Cromatogramas representativos de los compuestos volátiles obtenidos por hidrodestilación a partir de la infusión de *A. millefolium* del lote 2. Asignación de picos:  $\alpha$ -tujona (**39**; 56.1%),  $\beta$ -tujona (**40**; 9.2%) y alcanfor (**37**; 34.7%).

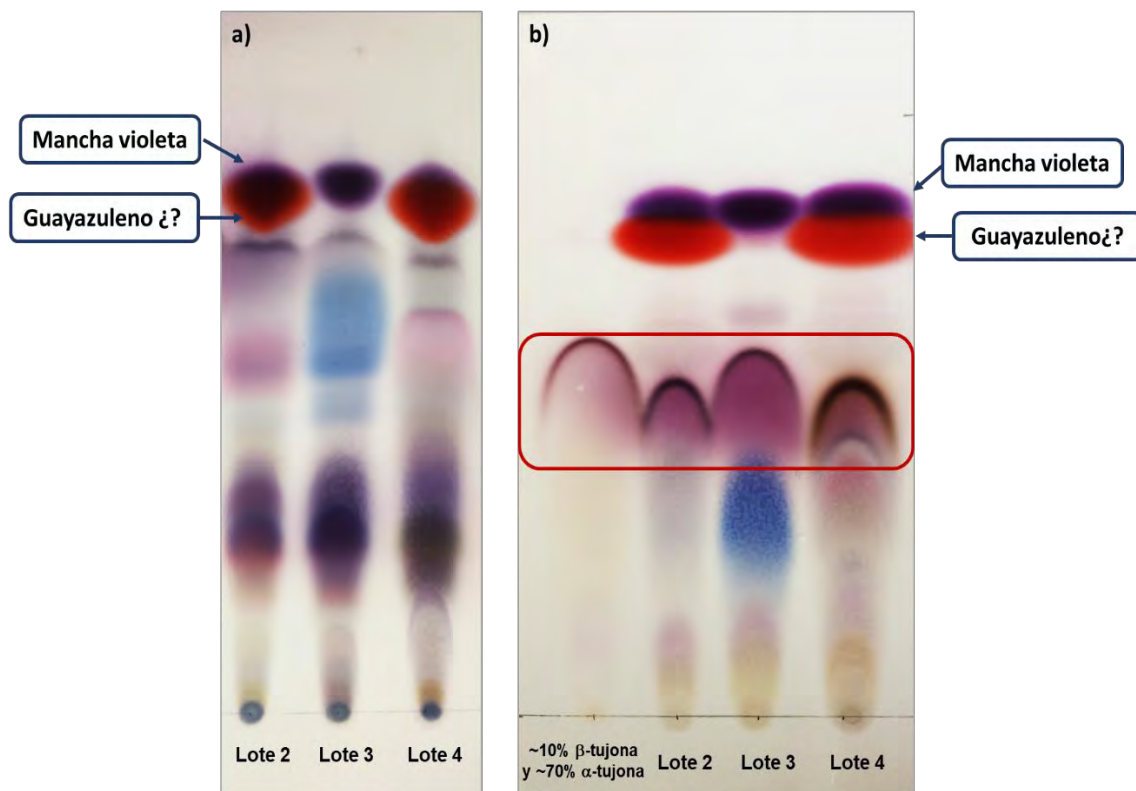
Los resultados recién descritos, aunque muy variables, dejan en claro el alto contenido de  $\alpha$ -tujona (**39**) de la especie que se cultiva en México. Aunque la planta se considera como una especie es factible que los diferentes lotes analizados sean quimotipos de la misma o hasta subespecies.

La  $\alpha$ -tujona (**39**) es un monoterpenoide oxigenado neurotóxico. Diferentes estudios han demostrado su neurotoxicidad en humanos y animales de experimentación (Millet *et al.*, 1981; Weisbord *et al.*, 1997). La  $\alpha$ -tujona (**39**) actúa bloqueando el receptor gamma-aminobutírico tipo A (GABA tipo A) en ratones a una dosis letal media de 45 mg/kg; dosis mayores (60 mg/kg) a esta provocaron convulsiones en ratones y finalmente la muerte. En el mismo estudio se observó que la administración de fenobarbital (100 mg/kg) 15 minutos antes del tratamiento con  $\alpha$ -tujona (**39**) indujo un efecto protector en los ratones tratados con dosis letales de  $\alpha$ -tujona (**39**). El abuso en el consumo

de la esencia de ajeno, rica en  $\alpha$ -tujona (**39**), provoca alucinaciones, convulsiones, tremor, manía y sicosis en humanos.

Uno de los ensayos de identidad para el aceite esencial de *A. millefolium* que describe la monografía de la segunda edición de la FHEUM consiste en detectar la presencia en la esencia de guayazuleno y cineol (**36**) mediante cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice. El sistema de elución consiste en AcOEt-tolueno (5:95). Como solución reveladora debe usarse aldehído anísico al 10%. Una vez desarrollada y reveladas las placas deben mostrar un cromóforo rojo en la parte superior que corresponde al guayazuleno y una mancha intermedia de color azul-gris que correspondería al 1,8-cineol (**36**). Cuando se realizó este experimento fue posible detectar las manchas rojas en los lotes 2-4 aunque en el tercero se observó en trazas. En ningún caso se detectó un cromóforo azul grisáceo, sino uno azul en el lote 3 (**Figura 9a**). Por lo tanto, es importante replantear el uso de estos compuestos como sustancias de referencia en el ensayo de identidad de la monografía de la FHEUM para la droga cruda de *A. millefolium*. Será necesario identificar el compuesto correspondiente al cromóforo violeta, que se aprecia en la cromatoplaaca sobre la mancha correspondiente al supuesto guayazuleno y que se encontró en todos los lotes.

Cuando se utilizó un sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexano 1:1 y el mismo agente revelador, en todos los casos se detectó la presencia de  $\alpha$ -tujona (**39**) (Señalado con el rectángulo rojo; **Figura 9b**). Por lo tanto, esta podría ser un mejor marcador para la esencia de la planta cultivada en México. Además, en este sistema, sí se separan bien los cromóforos rojos y violeta que se detectaron en el otro sistema de elución. El problema con la  $\alpha$ -tujona (**39**) es su neurotoxicidad (Albert-Puleo, 1978; Hold, Sirisoma, *et al.*, 2000), por lo que la exposición a este compuesto debe evitarse. Por lo tanto, si se utilizara como estándar sería necesario manipular las muestras con la debida precaución.



**Figura 9.** Cromatogramas en capa delgada de los aceites esenciales de los lotes 2-4. Sistema de elución: **a)** AcOEt-tolueno (5:95).; **b)** hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50). α-tujona (**39**)  $f_R = 0.53$ . Rev. aldehído anísico al 10%

### 5.3 Ensayos de identidad y composición utilizando como matriz la infusión de la planta

#### 5.3.1 Preparación de la muestra

Para los ensayos de identidad y composición se propuso una matriz de trabajo de fácil preparación obtenida por reparto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión de la planta. En la **Tabla 10** se resumen los rendimientos por gramo de la droga cruda y los porcentuales de las muestras elaboradas con todos los lotes analizados (1-4).

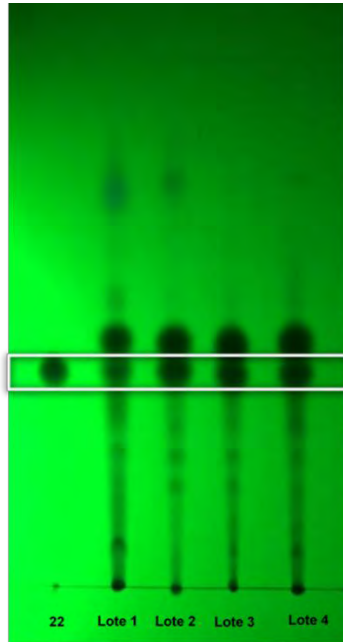
**Tabla 10.** Rendimientos de las fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtenidos a partir de las infusiones de los distintos lotes de *A. millefolium*

Lote	Peso de la droga cruda (g)	Peso del reparto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (mg)	% Rendimiento (g/g de la droga cruda)
1	5.0085	62.6	1.25
2	5.0018	66.6	1.33
3	5.0075	64.3	1.25
4	5.0093	64.3	1.28

### 5.3.2 Identificación de aquilina (22) por cromatografía en capa delgada (CCD)

En la actualidad, la cromatografía de capa delgada sigue siendo una herramienta valiosa para construir huellas dactilares (fingerprints) de extractos de plantas. Se utiliza como ensayo de identidad en la mayoría de las farmacopeas herbolarias, ya que además de ser una técnica sencilla y rápida, ayuda a proporcionar una evaluación inicial acerca de la muestra vegetal (Cieśła & Waksmundzka-Hajnos, 2010; Liang *et al.*, 2004).

Para realizar el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) no se utilizó a la leucodina (26) como compuesto de referencia debido a que su factor de retención en todas las fases móviles analizadas fue similar al de la matricarina (31). Lo que ocasionó que éste no se diferenciara en la matriz de trabajo. Sin embargo, con la fase móvil hexano–AcOEt (3:7), la aquilina (22) sí pudo resolverse entre los compuestos 26 y 31. Como puede observarse en el cromatograma obtenido de este ensayo (Figura 10), la aquilina (22) se detectó en todos los lotes de *A. millefolium* analizados.



**Figura 10.** Cromatograma en capa delgada ( $\lambda=254$  nm) de la aquilina (**22**;  $f_R=0.41$ ) y las matrices de trabajo obtenidas a partir de los cuatro lotes. Sistema de elución: hexano-AcOEt (30:70).

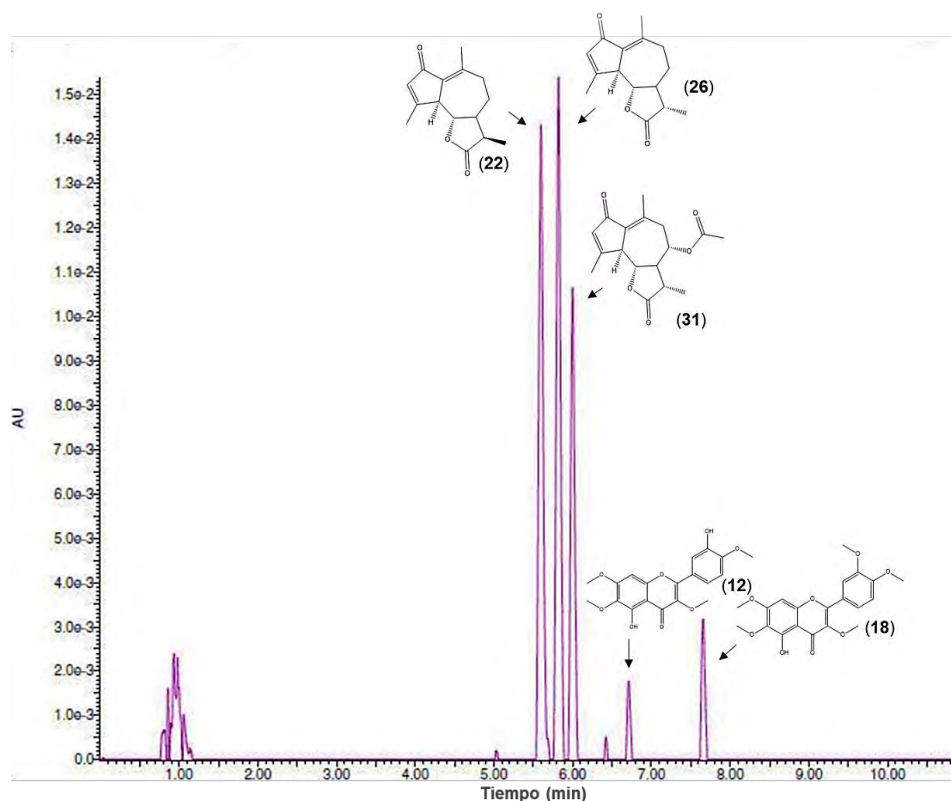
### 5.3.3 Identificación de aquilina (**22**), leucodina (**26**) y matricarina (**31**) por CLUE-PDA

También se estableció el perfil de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por CLUE mediante ensayo y error. Esta técnica es muy utilizada debido al menor tiempo de análisis que implica su uso, así como su mayor sensibilidad y resolución en comparación con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) (Lemos, 2015). Además, dado que los extractos de hierbas contienen una gran variedad de componentes químicos, las técnicas con alta sensibilidad y selectividad son mejores para realizar un adecuado control de calidad.

Las mejores condiciones establecidas para el perfil fueron las siguientes: un detector UV (PDA), un sistema binario de disolvente (agua y acetonitrilo) en gradiente y una columna BEH Phenyl Waters®, la cual tiene como fase estacionaria un grupo fenilo unido a una cadena alquílica C6 que ofrece una selectividad complementaria a la fase estacionaria C18. Las

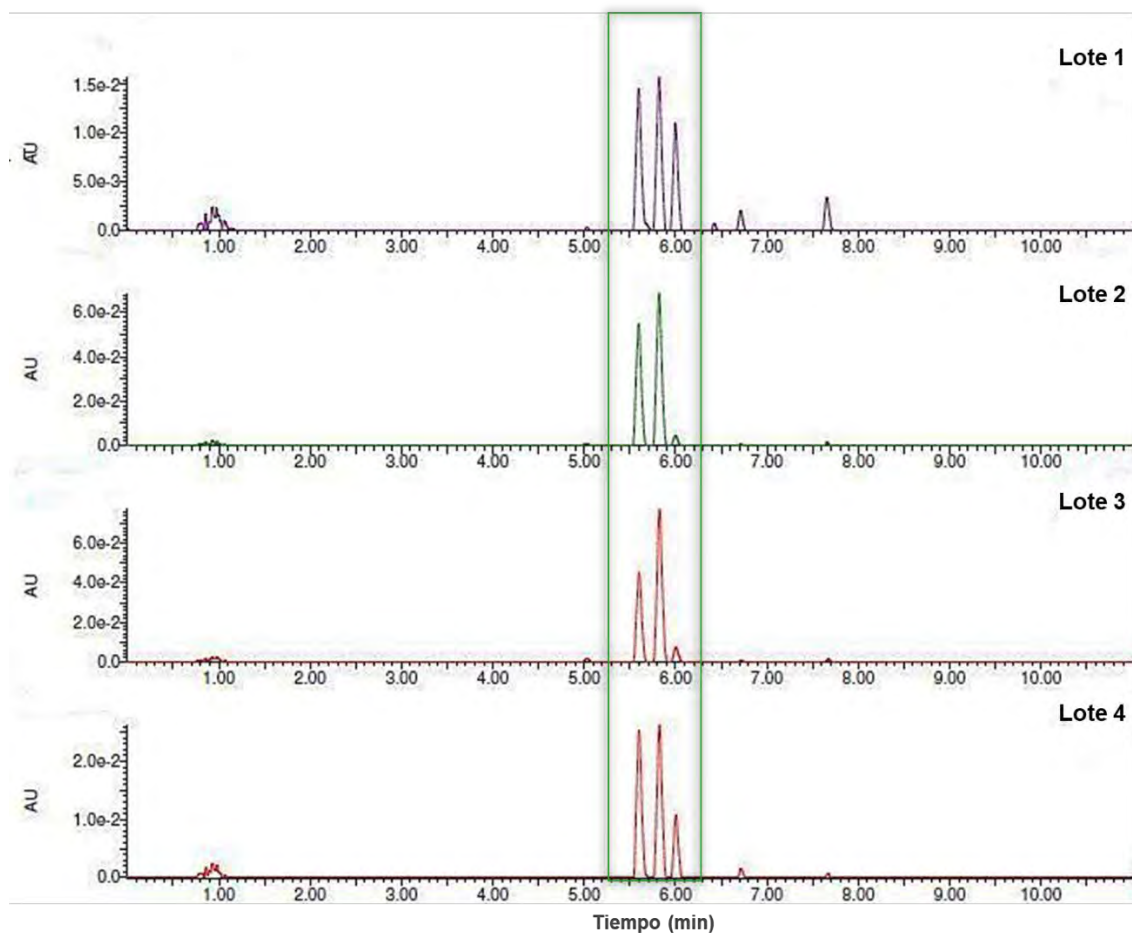
condiciones cromatográficas seleccionadas se describieron en las **Tablas 6 y 7** de la sección experimental.

En el perfil cromatográfico obtenido a partir de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión de *A. millefolium* del lote 1 (matriz de trabajo) se observan tres picos mayoritarios; correspondientes a las tres lactonas, aquilina (**22**), leucodina (**26**) y matricarina (**31**), y otros dos minoritarios, las metoxiflavonas casticina (**12**) y artemetina (**18**) (**Figura 11**). Cabe destacar que en todos los casos los picos se asignaron mediante la técnica de coelución del estándar.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda=285$  nm) correspondiente a la fracción de diclorometano derivada de la infusión de *A. millefolium* (lote 1). Tiempos de retención: aquilina (**22**)  $t_R=5.60$ , leucodina (**26**),  $t_R=5.83$ , matricarina (**31**)  $t_R=5.99$ , casticina (**12**)  $t_R=6.01$  y artemetina (**18**)  $t_R=7.66$ .

Al realizar el análisis cromatográfico por CLUE-PDA de la fracción de diclorometano derivada de la infusión de todos los lotes, se detectó la presencia de las tres lactonas aquilina (**22**), leucodina (**26**) y matricarina (**31**) en todos los perfiles (**Figura 12**).



**Figura 12.** Perfiles cromatográficos de las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenidas a partir de las infusiones de los lotes 1-4 ( $\lambda=285$  nm). Tiempos de retención: aquilina (**22**)  $t_R=5.60$ , leucodina (**26**)  $t_R=5.83$ , matricarina (**31**)  $t_R=5.99$ .

### 5.3.4 Ensayo de composición

El ensayo de composición indicado en la FHEUM 2ª Edición para *A. millefolium* consiste en cuantificar el contenido de proazulenos, expresados como camazuleno (**51**) en el aceite esencial mediante un método espectrofotométrico. Sin embargo, como se explicó anteriormente (Sección 5.2) el aceite esencial de la especie que se cultiva en México tiene altos contenido de  $\alpha$ -tujona (**39**), razón por lo cual es mejor utilizar un método que no implique la manipulación de la esencia. De manera adicional, es factible utilizar métodos modernos y con matrices más sencillas de preparar.

En este trabajo se propone la utilización de un método por CLUE para cuantificar la cantidad de leucodina (**26**) presente en la droga cruda. Para ello

se utilizó el mismo perfil cromatográfico desarrollado para el ensayo de identidad (inciso 4.4.2), el cual se validó de acuerdo con las Guías de Validación de la FDA (ICH Q2 (R1), 2005).

La validación es el proceso de comprobar que un método analítico es aceptable para un propósito específico. De esta manera, el proceso de validar consiste en generar la información que demuestre desde punto de vista analítico, que dicho método es adecuado para el propósito deseado. Las pautas de la Farmacopea de los Estados Unidos (USPC, 1994 a 2001), la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) proporcionan un marco para esta validación (Kunle, 2012). El método CLUE-PDA generado en este estudio fue validado en término de los siguientes parámetros de desempeño: linealidad del sistema, exactitud, linealidad y precisión del método [(ICH; Q2 (R1), 2005)].

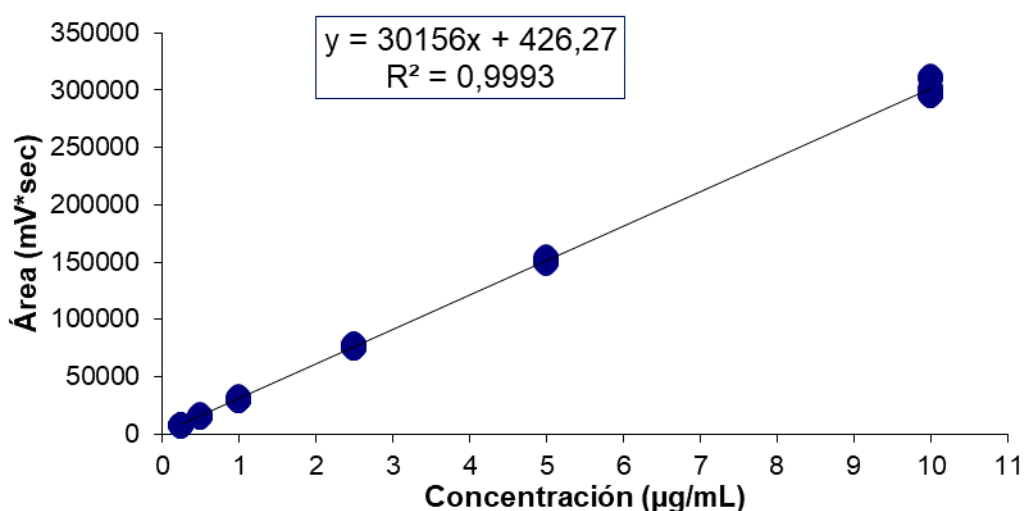
#### **5.3.4.1 Linealidad del sistema.**

La linealidad del sistema es la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración de un analito en la muestra en un intervalo de concentraciones determinadas (como mínimo 5) (ICH Q2 (R1), 2005). Para el sistema desarrollado en este estudio, la linealidad se estableció con una curva de calibración a base de seis concentraciones de la leucodina (**26**) (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ). La respuesta analítica se determinó con el detector de PDA considerando el área bajo la curva del pico de interés y fue evaluada mediante un análisis de regresión lineal simple (**Tabla 11** y **Figura 13**). Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.9$ ;  $r \geq 0.99$ ;  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  (ICH; Q2 (R1) 2005).



**Tabla 11.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.

$\beta_1$	30156	
$\beta_0$	426.27	
r	0.9996	
$r^2$	0.9993	
IC ( $\beta_1$ ) al 95%	IC inferior	IC superior
	29889.46	30422.03
IC ( $\beta_0$ ) al 95%	IC inferior	IC superior
	-839.85	1692.39



**Figura 13.** Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico.

Los valores de  $\beta_1$ ,  $\beta_0$ , r y  $r^2$  obtenidos de la curva de calibración se encuentran dentro de los límites establecidos por la ICH, por lo que se concluye que la linealidad del sistema cromatográfico es adecuada para la leucodina (**26**) en el intervalo de concentraciones analizadas.

#### 5.3.4.2 Linealidad del método.

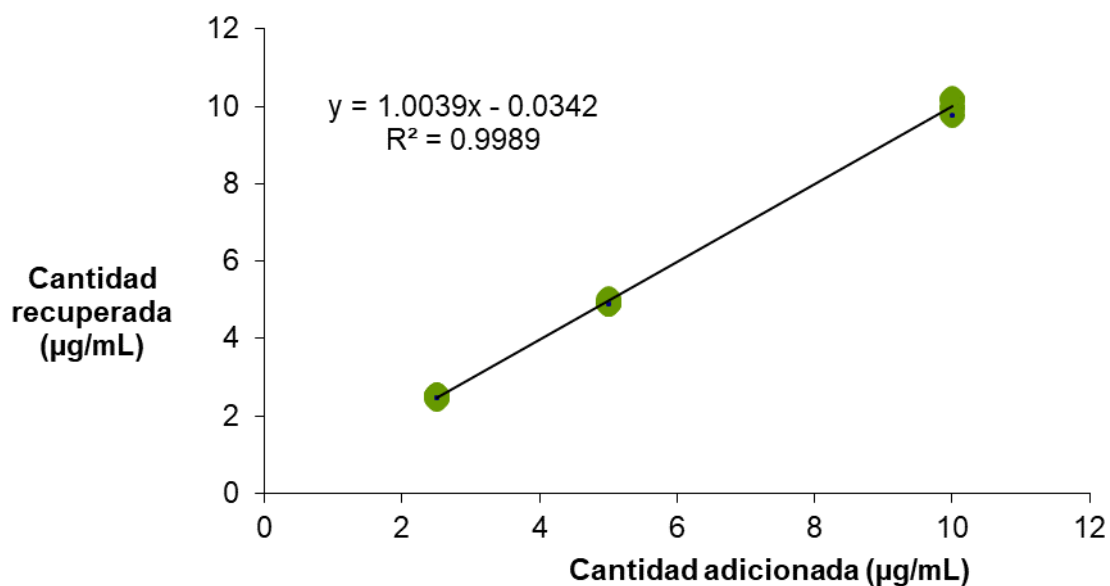
Para evaluar la linealidad del método se realizó una curva de calibración con las concentraciones del estándar **26** recuperadas a partir del análisis con la matriz. Se adicionaron 2.5, 5 y 10 µg/mL del compuesto **26** a la matriz de trabajo. Finalmente, la respuesta de la cantidad recuperada del

estándar se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz sin adicionar y el marcador analítico. El ajuste de los datos obtenidos (**Tabla 12**) se realizó mediante una regresión lineal simple. En la **Figura 14** se muestra la gráfica correspondiente a la linealidad del método.

El método se considera lineal si el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) tiene un valor mayor de 98 y el de correlación es mayor a 0.99, así mismo si  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  (ICH Q2 (R1), 2005). Así los parámetros estadísticos obtenidos (**Tabla 13.**) de este análisis demuestran que el método realizado es lineal

**Tabla 12.** Resultados experimentales de la evaluación de la linealidad del método.

Concentración de leucodina ( <b>26</b> ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración de leucodina ( <b>26</b> ) adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Detector PDA	
		Área bajo la curva	Concentración de leucodina ( <b>26</b> ) recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
2.5	2.5	74267	2.45
2.5	2.5	76996	2.54
2.5	2.5	76604	2.53
2.5	2.5	76695	2.53
2.5	2.5	74961	2.47
5	5	147483.8	4.88
5	5	149170.8	4.93
5	5	152292.8	5.04
5	5	150315.8	4.97
5	5	148311.8	4.90
10	10	299694.8	9.92
10	10	308075.8	10.20
10	10	307490.8	10.18
10	10	301863.8	10.00
10	10	295537.8	9.79



**Figura 14.** Gráfica de la linealidad del método para la leucodina (26).

**Tabla 13.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.

$\beta_1$	1.0038	
$\beta_0$	-0.0342	
$r$	0.9993	
$r^2$	0.9988	
IC ( $\beta_1$ ) al 95%	IC superior	IC inferior
	0.9840	1.0236
IC ( $\beta_0$ ) al 95%	IC superior	IC inferior
	-0.1650	0.0967

#### 5.3.4.3 Exactitud del método

La exactitud de un método analítico expresa la concordancia entre el valor de la concentración del estándar en la matriz enriquecida y el valor de referencia. En este estudio se evaluó este parámetro de desempeño mediante el análisis de los porcentajes de recobro; la guía de la ICH para métodos cromatográficos indica que el método analítico es exacto si los porcentajes de recobro se encuentran entre el 98-102% y el coeficiente de variación no es mayor del 2% (ICH; Q2 (R1) 2005). Así, los resultados obtenidos (**Tabla 14**) cumplen con las especificaciones anteriores lo que indica que el método

desarrollado es exacto para cuantificar a la leucodina (**26**) en el intervalo de concentraciones propuestas.

**Tabla 14.** Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la leucodina (**26**) con el detector PDA.

Concentración de leucodina ( <b>26</b> ) adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recobro (%)	$\bar{x}$	DE	CV (%)
2.5	97.9			
2.5	101.6			
2.5	101.0			
2.5	101.2			
2.5	98.9	100.1	1.6	1.6
5	97.5			
5	98.6			
5	100.7			
5	99.4			
5	98.1	98.9	1.2	1.3
10	198.5			
10	102.0			
10	101.8			
10	100.0			
10	97.9	100.0	1.6	1.6

#### 5.3.4.4 Precisión del sistema.

La precisión del sistema es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo repetido de una muestra homogénea del producto o de una muestra de referencia; expresado como la desviación estándar y el coeficiente de variación (ICH; Q2 (R1) 2005: OMS; QAS/16.671,2016). En este trabajo se evaluó la precisión del sistema en términos de repetibilidad mediante el análisis de la respuesta analítica obtenida de ocho réplicas del estándar (**26**) a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Este parámetro fue evaluado por un analista distinto, durante el mismo día. Finalmente, el CV de variación obtenido (**Tabla**

15) no fue mayor al 2.0% (criterio de aceptación establecido), con lo que se demuestra que el sistema es preciso.

**Tabla 15.** Repetibilidad del sistema.

Réplica	Concentración de leucodina (26) (µg/mL)	Área bajo la curva
1	10	420711
2	10	417847
3	10	417925
4	10	416568
5	10	418012
6	10	419688
7	10	419854
8	10	420498
	$\bar{x}$	418887.88
	DE	1495.20
	CV (%)	0.36

#### 5.4 Cuantificación de la leucodina (26) en diferentes lotes de *A. millefolium* por CLUE- PDA

Finalmente, utilizando el método analítico validado, se cuantificó el contenido de leucodina (26) en los repartos de diclorometano obtenidos a partir de la infusión de todos los lotes (1-4). Las concentraciones de las muestras derivadas de los lotes 2 y 3 tuvieron que ser diluidas (25 µg/mL), debido a que la cantidad del compuesto 26 en estos lotes sobrepasó el rango de concentraciones evaluadas en este estudio. Este análisis se llevó a cabo utilizando la ecuación de la recta descrita para la linealidad del sistema  $y = 30156 x + 426.7$ . Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Cuantificación de leucodina (**26**) por CLUE-PDA en varios lotes de *A. millefolium*.

	<b>Concentración de la matriz (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Área bajo la curva</b>	<b>Cantidad de leucodina (<b>26</b>) (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>% de leucodina (<b>26</b>)</b>
<b>Lote 1</b>	100	157935.5	5.2	5.2
<b>Lote 4</b>	100	264584.5	8.8	8.8
<b>Lote 2</b>	25	173314.9	5.7	23
<b>Lote 3</b>	25	194464.4	6.4	25.8

## 6. CONCLUSIONES

- El análisis de los componentes volátiles extraídos mediante dos técnicas distintas a partir de *A. millefolium* cultivada en México, permitió identificar como compuestos mayoritarios a los monoterpenos oxigenados;  $\alpha$ -tujona (**39**) y alcanfor (**37**). Respecto al primer compuesto, este fue detectado en cantidades considerables en todas las muestras analizadas. Este hallazgo será útil para orientar a las autoridades sanitarias en la necesidad de regular la venta y consumo de esta planta.
- Se desarrolló un procedimiento experimental para la preparación de muestra más sencillo que el descrito en la monografía de la FHEUM (2ª Edición) para el ensayo de composición de la droga cruda de *A. millefolium*. Se propuso como matriz de trabajo la fracción de diclorometano obtenida a partir de infusión de la planta.
- Los perfiles cromatográficos de la matriz de trabajo derivadas de *A. millefolium* fueron desarrollados por CCD y CLUE-PDA. En el primero, se identificó la presencia de leucodina (**26**); compuesto seleccionado como marcador en el presente trabajo para la planta de *A. millefolium* cultivada en México. Por otro lado, en el perfil cromatográfico obtenido por CLUE-PDA, se detectó la presencia de los terpenoides leucodina (**26**), matricarina (**31**) y aquilina (**22**) y de los flavonoides artemetina (**18**) y casticina (**12**).
- Se validó un método analítico por CLUE-PDA para cuantificar el contenido de leucodina (**26**) en la matriz de trabajo. El método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas. Al analizar los cuatro lotes de *A. millefolium* de este estudio, se encontró que el contenido del compuesto **26** fue mucho mayor en los lotes 2 y 3 adquiridos comercialmente.
- Los resultados generados constituyen pruebas de identidad química y composición para el control de calidad de la droga cruda de *A.*

*millefolium* y será de utilidad para la actualización de la monografía de la droga cruda en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. La generación de este documento permitirá establecer el control de calidad adecuado de la especie cultivada en México.



## 7. REFERENCIAS

- Academia Farmacéutica, México. (1846). Farmacopea mexicana formada y publicada por la academia farmacéutica de la capital de la república. México. Imprenta a cargo de Manuel N. De la Vega, 229, 263, 266 pp.
- Ahmad, I., Ahmad Khan, M. S., & Cameotra, S. S. (2014). Quality Assessment of Herbal Drugs and Medicinal Plant Products. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–17.
- Albert-Puleo, M. (1978). Mythobotany, pharmacology, and chemistry of thujone-containing plants and derivatives. *Economic Botany*, 32(1), 65–74.
- Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2017). Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. *Phytotherapy Research*, 31(8), 1140–1161.
- Alonso-Castro, A. J., Maldonado-Miranda, J. J., Zarate-martinez, A., Jacobosalcedo, R., Fernández-Galicia, C., Figueroa-Zuñiga, L. A., Rios-Reyes N. A., de León-Rubio, M. A., Medellín-Castillo, N. A., Reyes-Munguia, A., Méndez-Martínez, R., Carranza-Alvarez, C. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina , Me, 143, 292–298.
- Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325–348.
- Andrade-cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol , Hidalgo , México, 122, 163–171.
- Sant' Anna, J. R., da Silva Franco, C. C., Miyamoto, C. T., Cunico, M. M., Gomes-Miguel, O., Côcco, L. C., Yamamoto, C. I., Junior, C. C., Alves de Castro-Prado, M. A. (2009). Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential. *Phytotherapy research*, 23, 231–235.
- Applequist, W. L., & Moerman, D. E. (2018). Yarrow ( *Achillea millefolium* L .): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivityc , and Biomedical Research Author ( s ): Wendy L . Applequist and Daniel E . Moerman Published by : Springer on behalf of New York Botanical Garden Press Stable, 65(2), 209–225.
- Argueta, V. A., Cano, A. L. M., y Rodarte, M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. tomo II. México D. F. Instituto Nacional Indigenista. 1004-1005 p.
- Atta-ur-Rahman, Ahmed, D., Asif, E., Ahmad, S., Sener, B., & Turkoz, S. (1991). Chemical constituents of *buxus sempervirens*. *Journal of Natural Products*, 54(1), 79–82.
- Baggio HC, Otofujii GDM, Freitas CS, Torres LMB, Marques MCA, Vela SM. (2008). Brazilian medicinal plants in gastrointestinal therapy. *Botanical*

*Medicine in Clinical Practice*. Oxon, United Kingdom; 46-51.

- Bandaranayake, W. M. (2006). *Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*.
- Baser KHC, Demirci B, Demirci F, Kocak S, Akinci C, Malyer H, Guleryuz G. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential of *Achillea multifida*. *Planta Medica*. 68(10): 941-943
- Becker, L. C., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., James G. M., Ronald C. S, Thomas J. S., Paul W. S. (2016). Safety assessment of *Achillea millefolium* as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 35(3\_suppl), 5S–15S.
- Belliardo, F., Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., & Sgorbini, B. (2006). Headspace-solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatographic Science*, 44(7), 416–429.
- Busmann RW, Sharon D, Vandebroek I, Jones A, Revene Z. (2007). Health for sale: the medicinal plant markets in Trujillo and Chiclayo, Northern Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 3: 37.
- Busmann, R. W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., ... Townesmith, A. (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 121–140.
- Calderón, G., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C.*
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, Akpulat HA. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 87(2-3):215-20.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2–3), 215–220.
- Cervantes, V. (1889) *Ensayo a la materia médico-vegetal de México. Estudio. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.*
- Chandler, R. F., Hooper, S. N., & Harvey, M. J. (1982). Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, compositae. *Economic Botany*, 36(2), 203–223.
- Chávez-Silva, F., Cerón-Romero, L., Arias-Durán, L., Navarrete-Vázquez, G., Almanza-Pérez, J., Román-Ramos, R., Ramírez-Ávila, G., Perea-Arango, I., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. (2018). Antidiabetic effect of

*Achillea millefolium* through multitarget interactions:  $\alpha$ -glucosidases inhibition, insulin sensitization and insulin secretagogue activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 1–7.

- Chou, S. T., Peng, H. Y., Hsu, J. C., Lin, C. C., & Shih, Y. (2013). *Achillea millefolium* L. essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 12978–12993.
- Cieśła, Ł. M., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2010). Application of thin-layer chromatography for the quality control and screening the free radical scavenging activity of selected pharmaceutical preparations containing *salvia officinalis* L. extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(5), 481–485.
- De la Cruz, M. (1991). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis: Manuscrito Azteca de 1552 Según Traducción Latina de Juan Badiano*. Editorial Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 258 pp.
- Ebadollahi, A., Jalali-Sendi, J., & Razmjou, J. (2016). Toxicity and phytochemical profile of essential oil from Iranian *Achillea mellifolium* L. against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Toxin Reviews*, 35(1–2), 24–28.
- Eshbakova, K. A., Khasanova, K. I., Komilov, B. D., Melieva, S. O., & Aisa, H. A. (2018). Diterpenoids and Flavonoids from *Pulicaria gnaphalodes*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(2), 360–361.
- Feizpour, A., Boskabady, M., Byrami, G., Golamnezhad, Z., & Shafei, M. (2013). The effect of hydro-ethanolic extract of *Achillea millefolium* on muscarinic receptors of guinea pig tracheal smooth muscle. *Indian Journal of Pharmacology*, 45(1), 13.
- FHEUM (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos segunda edición*, Secretaría de Salud, CDMX pp 236
- Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Ruiz, J. (2004). Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*, 64(2), 458–466.
- Gates W. (2000). *An aztec herbal the classic codex of 1552*. Dover Publications. Baltimore, Maryland. p. 39.
- Han, X., Ma, X., Zhang, T., Zhang, Y., Liu, Q., & Ito, Y. (2007). Isolation of high-purity casticin from *Artemisia annua* L. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1151(1–2), 180–182.
- Hausen BM, Breuer J, Weglewski J, Rücker G. (1991).  $\alpha$ -Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (*Achillea millefolium* L., Compositae). *Contact dermatitis*. 24(4):274-80.

- Haziri, A. I., Aliaga, N., Ismaili, M., Govori-odai, S., Leci, O., Faiku, F., Arapi, V., Haziri, I. (2010). Secondary metabolites in essential oil of *Achillea millefolium* ( L .) growing wild in east part of kosova. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 10, 6(1), 32–34.
- Hernandez, F. (1943). HISTORIA DE LAS PLANTAS DE NUEVA ESPAÑA. México. Imprenta universitaria, pp 338.
- Hold, K. M., Sirisoma, N. S., Ikeda, T., Narahashi, T., & Casida, J. E. (2000). alpha -Thujone (the active component of absinthe): gamma -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 3826–3831.
- Huo, C. H., Li, Y., Zhang, M. L., Wang, Y. F., Zhang, Q., Qin, F., ... Kiyota, H. (2013). Cytotoxic flavonoids from the flowers of *Achillea millefolium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(6), 958–962.
- International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- Final report on the safety assessment of Yarrow (*Achillea millefolium*) (2001). Extract. *Int J Toxicol*, 20 Suppl 2, 79–84.
- Jiang, Y., David, B., Tu, P., & Barbin, Y. (2010). Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines-A review. *Analytica Chimica Acta*, 657(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.024>
- Kn, S. K., & Council, C. (2016). Herbal Pharmacopoeias – an overview of international and Indian representation Herbal Pharmacopoeias – an overview of international and Indian representation, (January).
- Kunle. (2012). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101–112.
- Lead, G., Lead, G., Assurance, M. Q., Standards, T., & Products, H. (2017). Draft chapter on monographs on herbal medicines ( DISCUSSED during the 8th international meeting of world pharmacopoeias ), (July), 1–12.
- Liang, Y. Z., Xie, P., & Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812(1–2 SPEC. ISS.), 53–70.
- Martínez V, M., Muñoz-Zamora, A., & Joseph-nathan, P. (1988). Conformational analysis of achillin and leukodin, 51(2), 221–228.
- Meeting, I. (2013). The International Pharmacopoeia, 27(2).
- Mendoza Castelán, G., & Lugo Pérez, R. (2010). Farmacia viviente. Edición conmemorativa. México 2010.

- Mesaik, M. A., Murad, A. S., Khalid Mohammed Khan, R. B. T., Ahmed, A., Atta-ur-Rahman, Choudhary, & Iqbal, and M. (2009). Isolation and Immunomodulatory Properties of a Flavonoid, Casticin from *Vitex agnus-castus* M. *Phytotherapy Research*, 23, 1516–1520.
- Millet, Y., Jouglard, J., Steinmetz, M. D., Tognetti, P., Joanny, P., & Arditti, J. (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clinical Toxicology*, 18 (12), 1485–1498.
- Mohammadhosseinia, M., Sarkerb, S. D., Akbarzadehc, A. (2017). Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 257-315.
- Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara NP, Diaz MA, Perez Garcia J, Olivera Lopez JI, Jaramillo MT. (2004). Anticonflict actions of aqueous extracts of flowers of *Achillea millefolium* L. vary according to the estrous cycle phases in Wistar rat. *Phytotherapy Research*. 18(11):915-20.
- Nadim, M. M., Malik, A. A., Ahmad, J., & Bakshi, S. K. (2011). The Essential Oil Composition of *Achillea millefolium* L . Cultivated under Tropical Condition in India. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(5), 561–565.
- Nava, R. F., Zamora, D. R., Nacional, E., Biológicas, D. C., Postal, A., Michoacán, P., & Edd, B. (2001). Prolongación de Carpio y Plan de Ayala Centro Regional del Bajío.
- Orav, A., Arak, E., Raal, A. (2006). Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European countries. *Natural Product Research*, 20(12), 1082–1088.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). WHO Drug Information [archivo PDF]. Recuperado de: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20286en/s20286en.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud. (2017). GOOD PHARMACOPOEIAL PRACTICES, Draft chapter on monographs on herbal medicines [archivo PDF]. Recuperado de: [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/GPhP-HerbalsChapter\\_QAS15-621\\_Rev4-07\\_09\\_2017.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/GPhP-HerbalsChapter_QAS15-621_Rev4-07_09_2017.pdf).
- Paula, V. F., Cruz, M. P., & Barbosa, L. C. de A. (2006). Constituintes químicos de *Bombacopsis glabra* (bombacaceae). *Química Nova*, 29(2), 213–215.
- Perestrelo, R., Silva, C. L., Rodrigues, F., Caldeira, M., & Câmara, J. S. (2016). A powerful approach to explore the potential of medicinal plants as a natural source of odor and antioxidant compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 132–144.
- Ph. Eur. (2017) The European Pharmacopoeia.
- Pires JM, Mendes FR, Negri G, Duarte-Almeida JM, Carlini EA. (2009).

- Antinoceptive peripheral effect of *A. millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. *Phytotherapy Research*. 23: 212-219.
- Raal, A., Orav, A., & Arak, E. (2012). Essential oil content and composition in commercial *Achillea millefolium* L. herbs from different countries. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 15(1), 22–31.
- Radušienė, J., & Gudaitytė, O. (2005). Distribution of proazulenes in *Achillea millefolium* s.l. wild populations in relation to phytosociological dependence and morphological characters. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(02), 136–143.
- Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., & Zamilpa, A. (2012). In vitro screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Romo de Vivar A & Olmos F. (1968). Estudio químico de *Achillea millefolium* L. *Revista de la Sociedad Química de México*. 12(5): 212-213.
- Saeidi K, Shirmaridi HA, Bastan MR. (2016). Essential oil content and composition of *Achillea kellalensis* Boiss, an endemic plant in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 19(2): 516-518.
- SEMARNAT. (2010). Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del CEFOFOR: usos terapéuticos y dosificación [archivo PDF]. Recuperado de: [http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas\\_medicinales\\_de\\_la\\_farmacia\\_viviente-conafor.pdf](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas_medicinales_de_la_farmacia_viviente-conafor.pdf).
- Sgorbini B., Bicchi C., Cagliero C., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P. (2015a). Herbs and spices: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis. *Journal of Chromatography A*. 1376: 9–17.
- Sgorbini B., Cagliero C., Pagani A., Sganzerla M., Boggia L. (2015b). Determination of free and glucosidically-bound volatiles in plants. Two case studies: *L*-menthol in peppermint (*Mentha x piperita* L.) and eugenol in clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry). *Phytochemistry*. 117 : 296–305
- Sharma PK, Chauhan NS, Lal B. (2004). Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parati valley in western Himalaya, India. *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 167-176.
- Shawl, A. S., Srivastava, S. K., Syamasundar, K. V., Tripathi, S., & Raina, V. K. (2002). Essential oil composition of *Achillea millefolium* L. growing wild in Kashmir, India. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(3), 165–168.
- Srivastava, A. K. (2018). *Significance of medicinal plants in human life*.

- Suleimenov YM, Atazhanova GA, Ozek T, Demirci B, Kulyjasov AT, Adekenov SM, Baser KHC. (2001). Essential oil composition of three species of *Achillea* from Kazakhstan. *Chemistry of Natural Compounds*. 37(5): 447-450.
- Suleimenov, Y. M., Atazhanova, G. a, Ozek, T., Demirci, B., Kulyyasov, a T., & Adekenov, S. M. (2001). *Achillea* FROM KAZAKHSTAN, 37(5), 381–384.
- Sunil, KN. (2015). Herbal Pharmacopoeias—an overview of international and Indian representation. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*. 1(3): 59-60.
- Tampe, J., Parra, L., Huaiquil, K., Mutis, A., & Quiroz, A. (2015). Repellent Effect and Metabolite Volatile Profile of the Essential Oil of *Achillea millefolium* Against *Aegorhinus nodipennis* (Hope) (Coleoptera: Curculionidae). *Neotropical Entomology*, 44(3), 279–285.
- Vidic, D., Čavar Zeljković, S., Dizdar, M., & Maksimović, M. (2016). Essential oil composition and antioxidant activity of four Asteraceae species from Bosnia. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 445–457.
- OMS (2013). Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional.
- OMS (2011) guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.
- OMS (2011). Quality control methods for herbal materials. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*, pp 187.
- OMS. (2005). Selected Medicinal Plants Vol. 4. *Essential Medicines and Health Products Information Portal A World Health Organization resource*, 4, 381–399.
- Weisbord S: D., Soule J. B., Kimmel M.D. (1997). Poison on line acute renal failure caused by oil of wormwood purchased through the internet. *The new England Journal of Medicine*. 337: 825: 827.
- Xiao-Tang, S., Man-Li, Z., Qing-Wen, S., Hiromasa, K., (2006). Chemical Constituents of the Plants in the Genus *Achillea*, 3, 1163-1180
- Yoshioka, T., Inokuchi, T., Fujioka, S., & Kimura, Y. (2004). Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 59(7–8), 509–514.
- Zapata-Martínez, J., Sánchez-Toranzo, G., Chaín, F., Catalán, C. A. N., & Bühler, M. I. (2017). Effect of guaianolides in the meiosis reinitiation of amphibian oocytes. *Zygote*, 25(1), 10–16.

## ANEXOS

### ANEXO 1

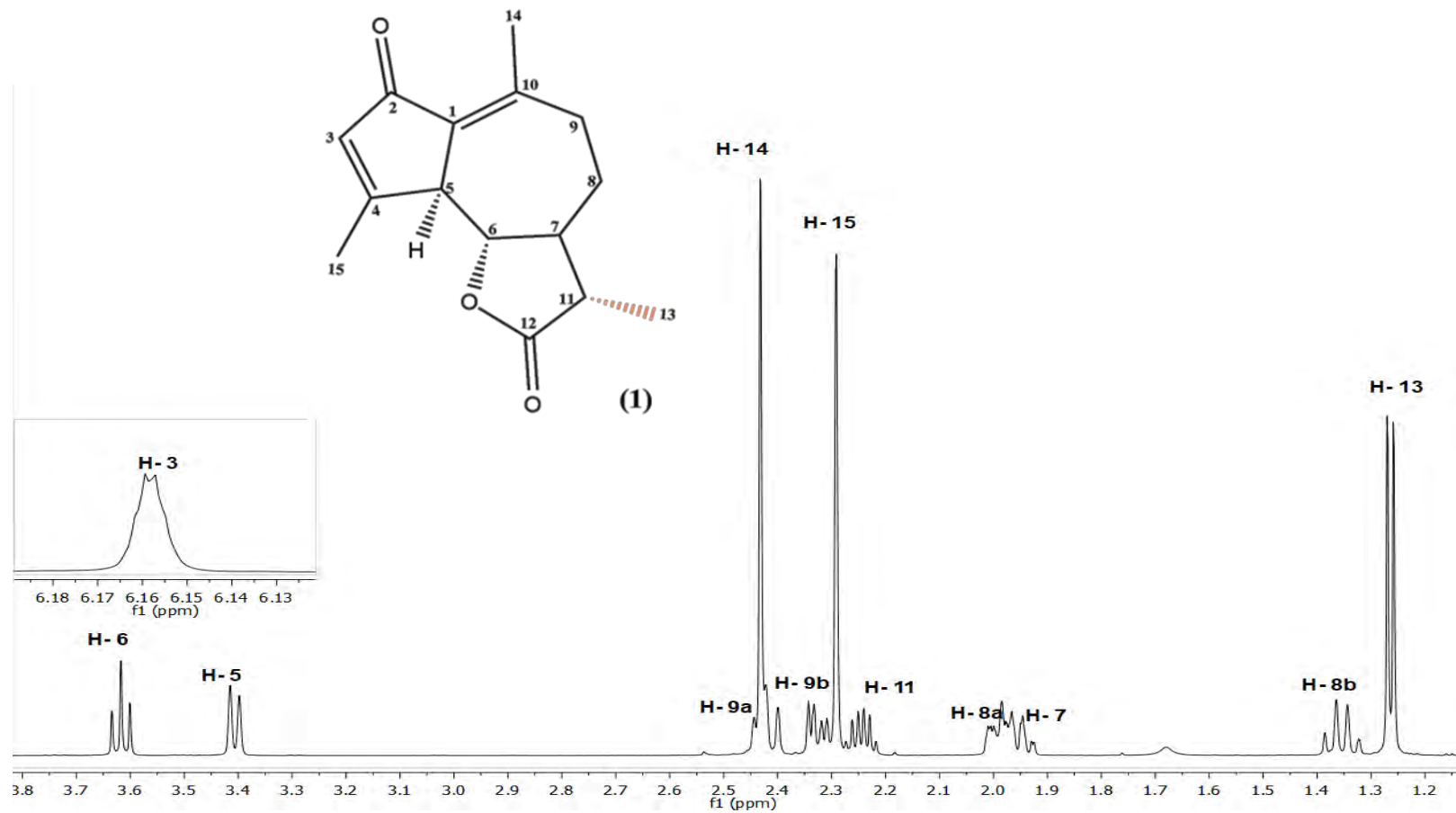


Figura 15. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la leucodina (26).



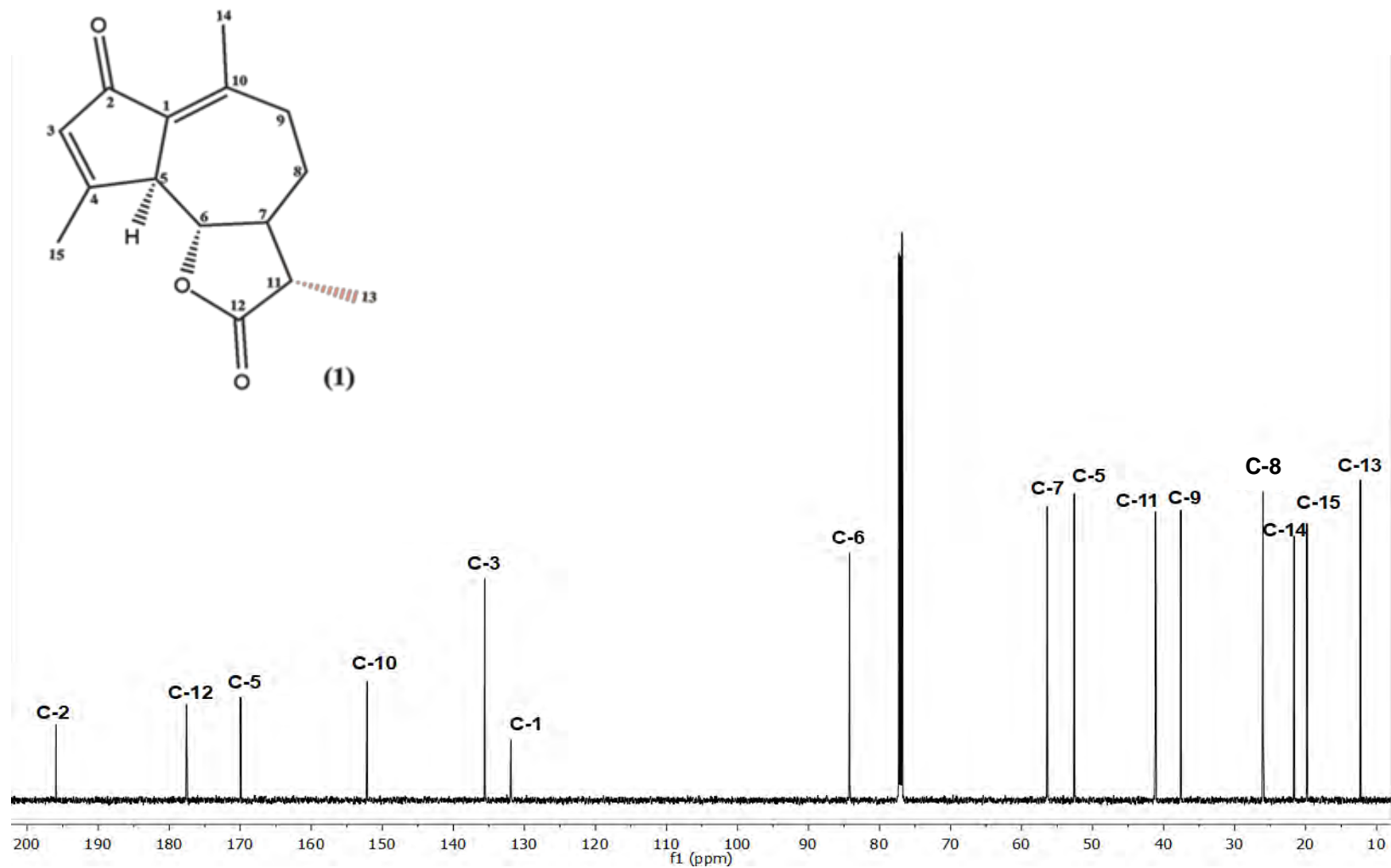


Figura 16. Espectro de <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la leucodina (26).

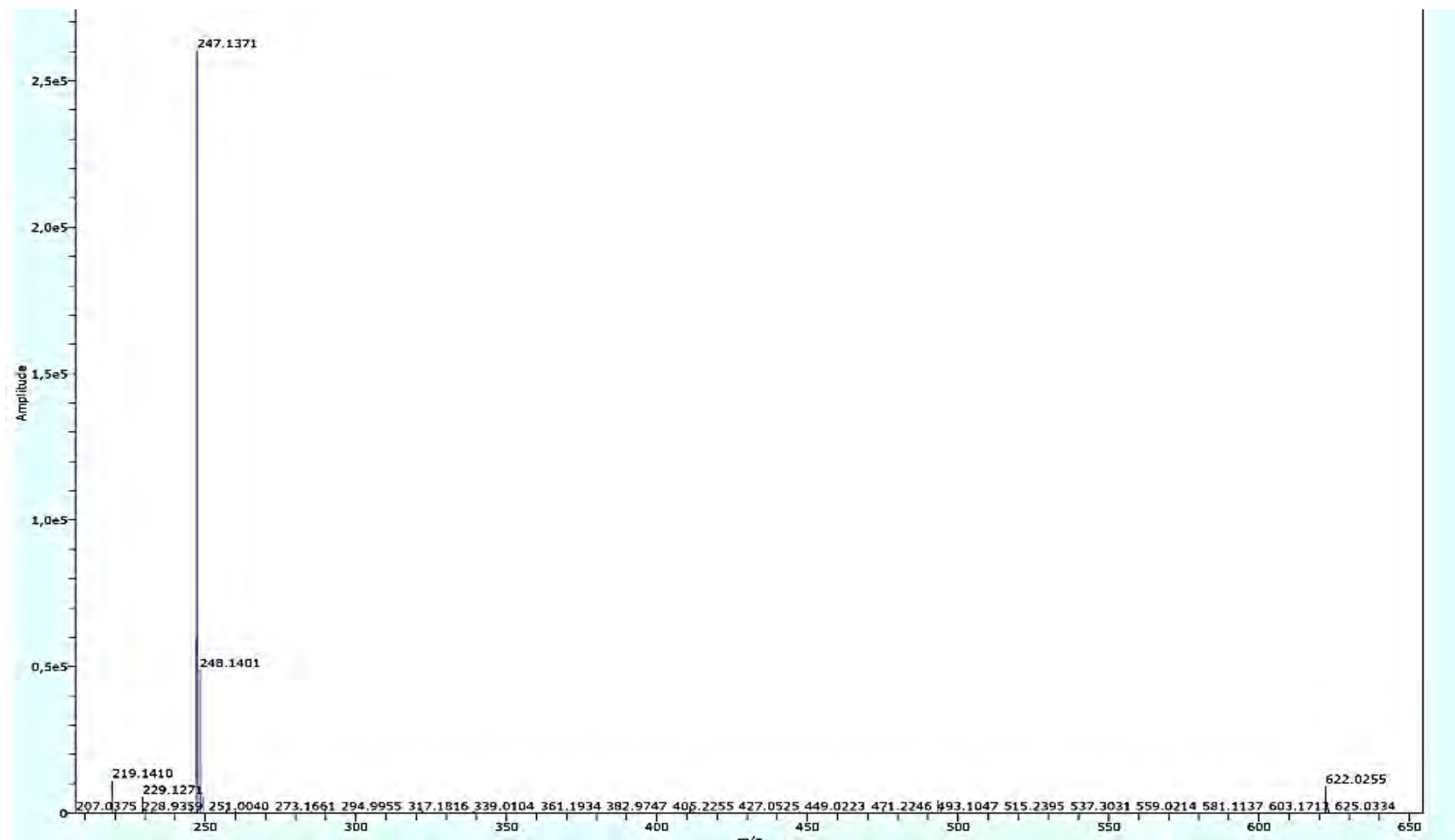


Figura 17. Espectro de EM  $[M + H]^+$  de la leucodina (26).

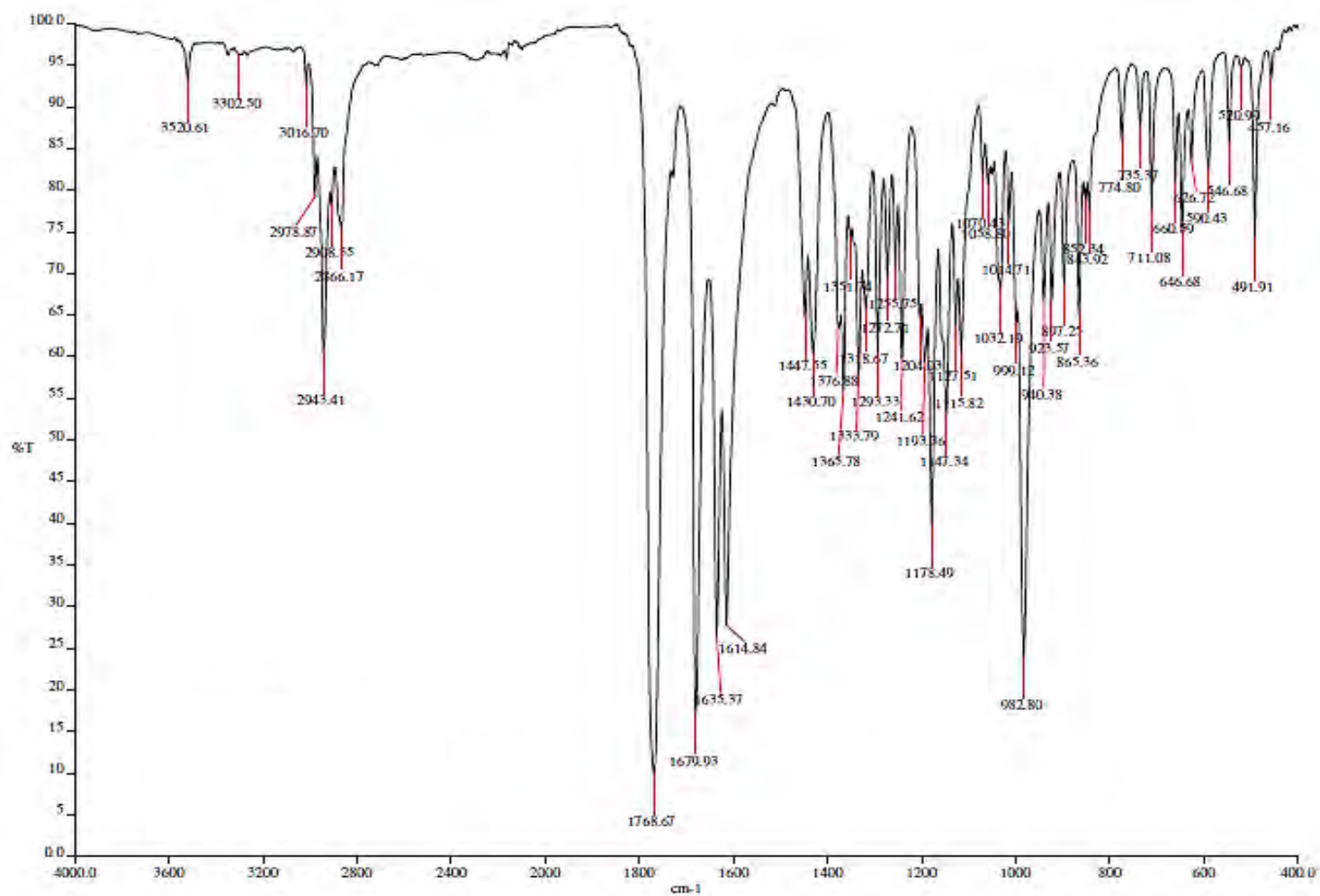


Figura 18. Espectro IR (FT-IR) de la leucodina (26).

## ANEXO 2

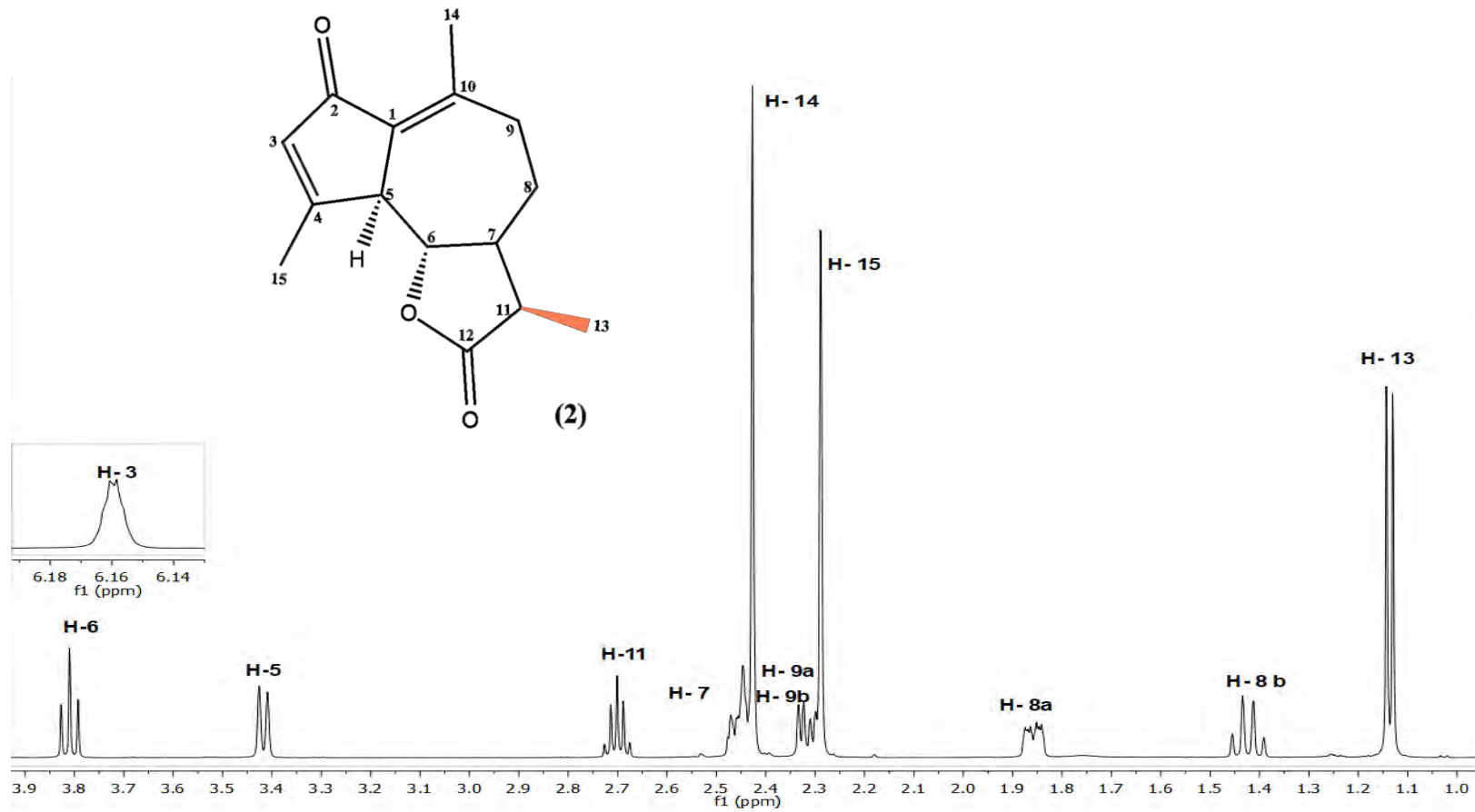


Figura 19. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la aquilina (22).

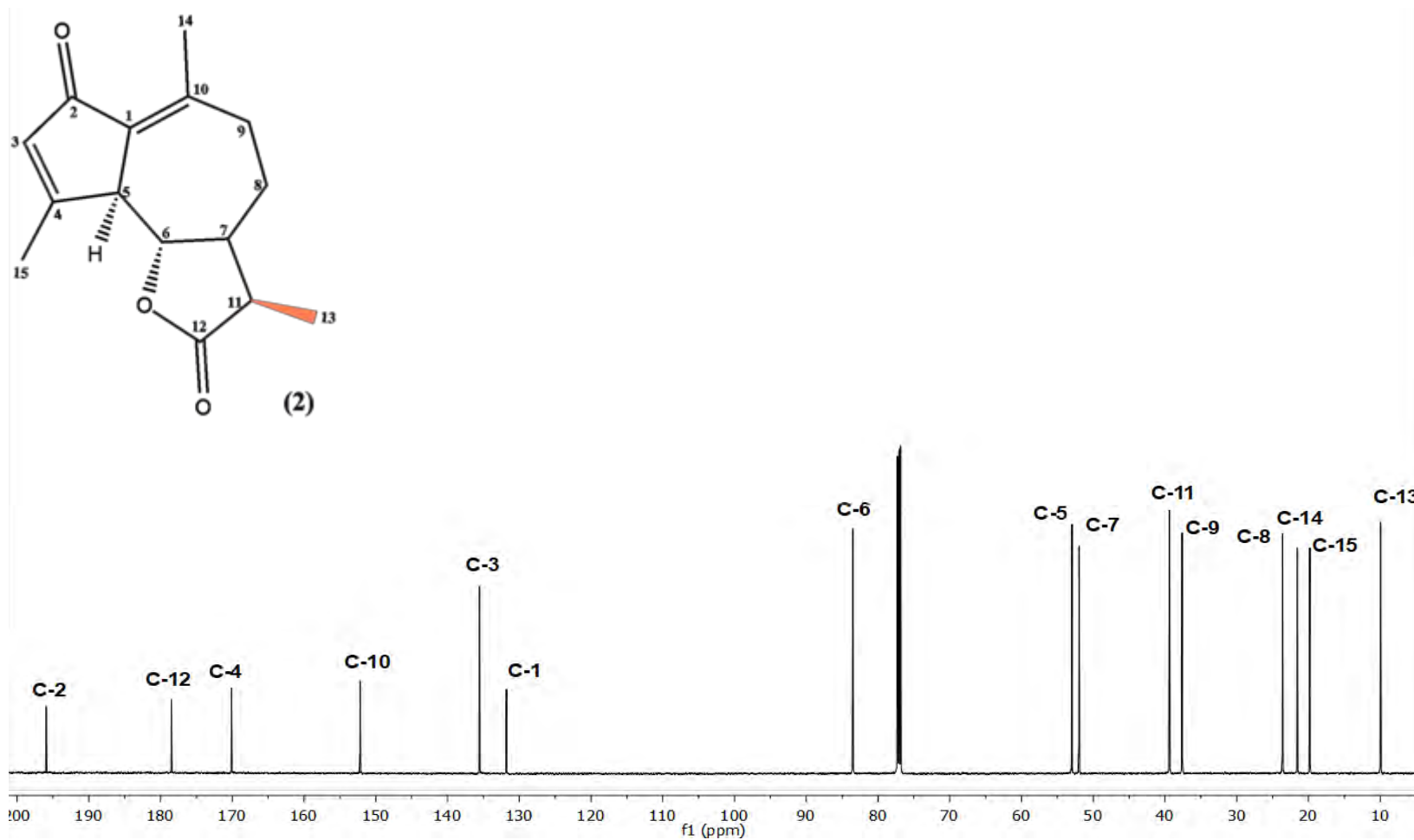


Figura 20. Espectro de <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la aquilina (22).

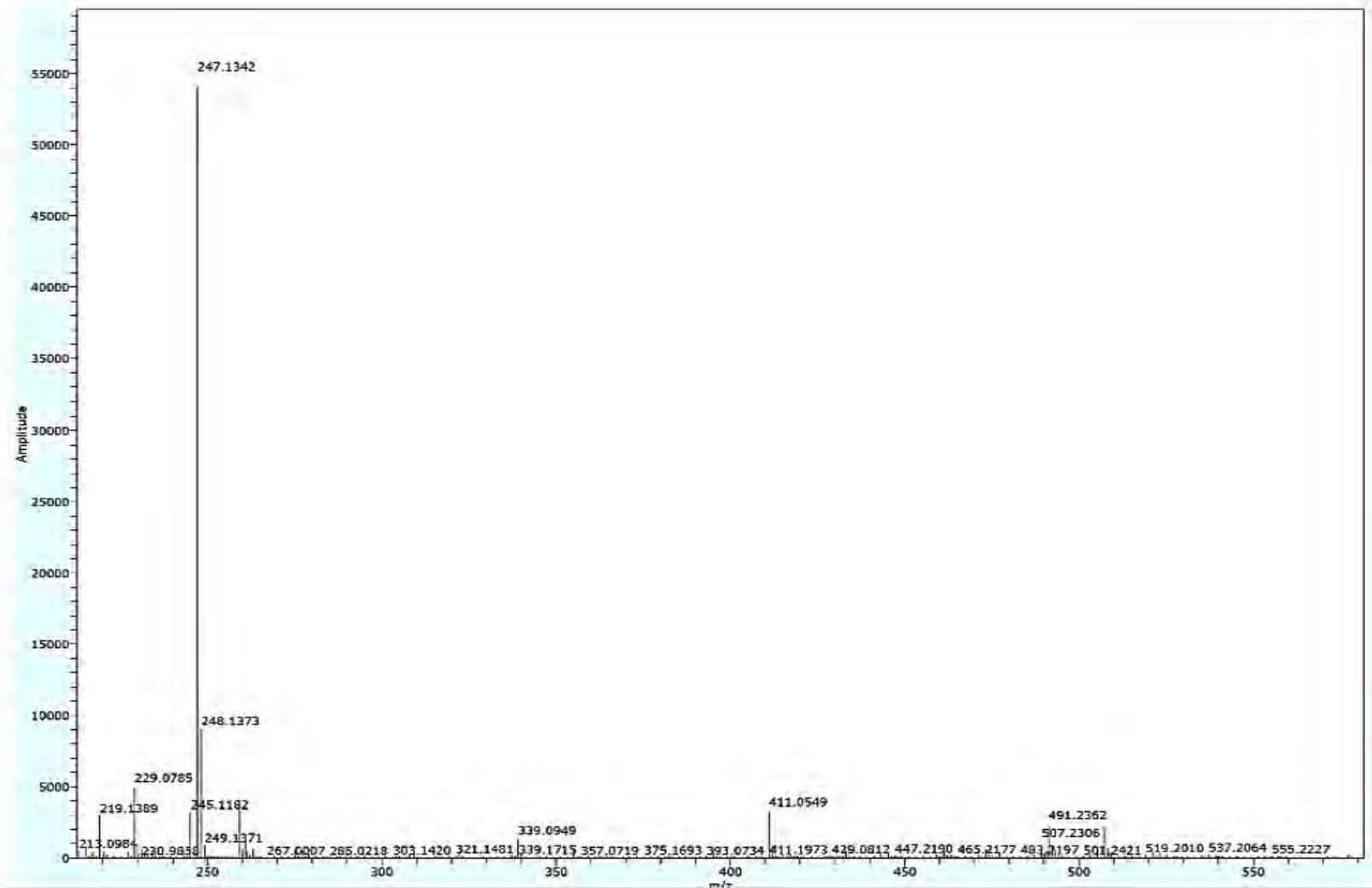


Figura 21. Espectro de EM [M + H]<sup>+</sup> de la aquilina (22).

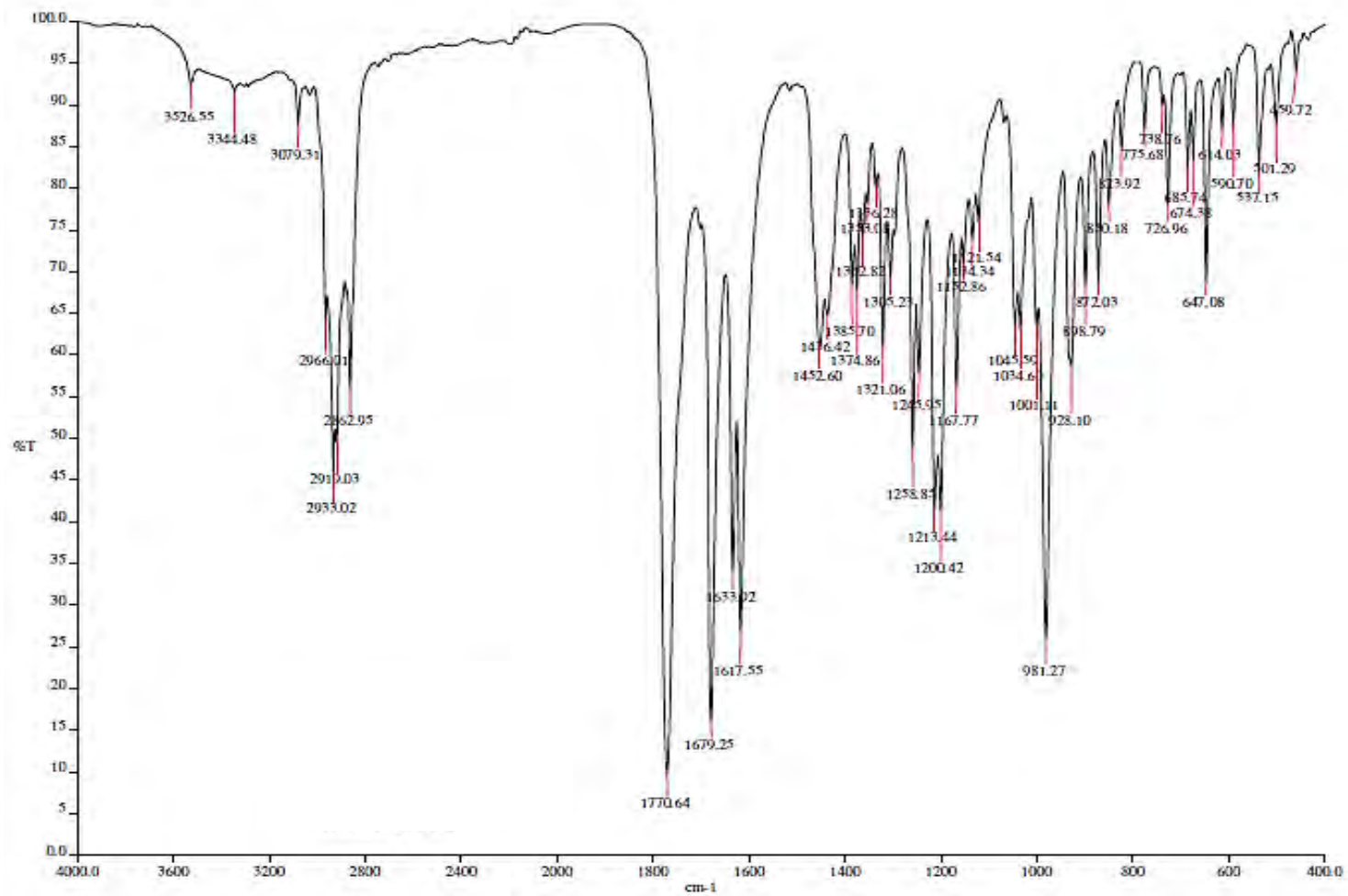


Figura 22. Espectro IR (FT-IR) de la aquilina (22).

### ANEXO 3

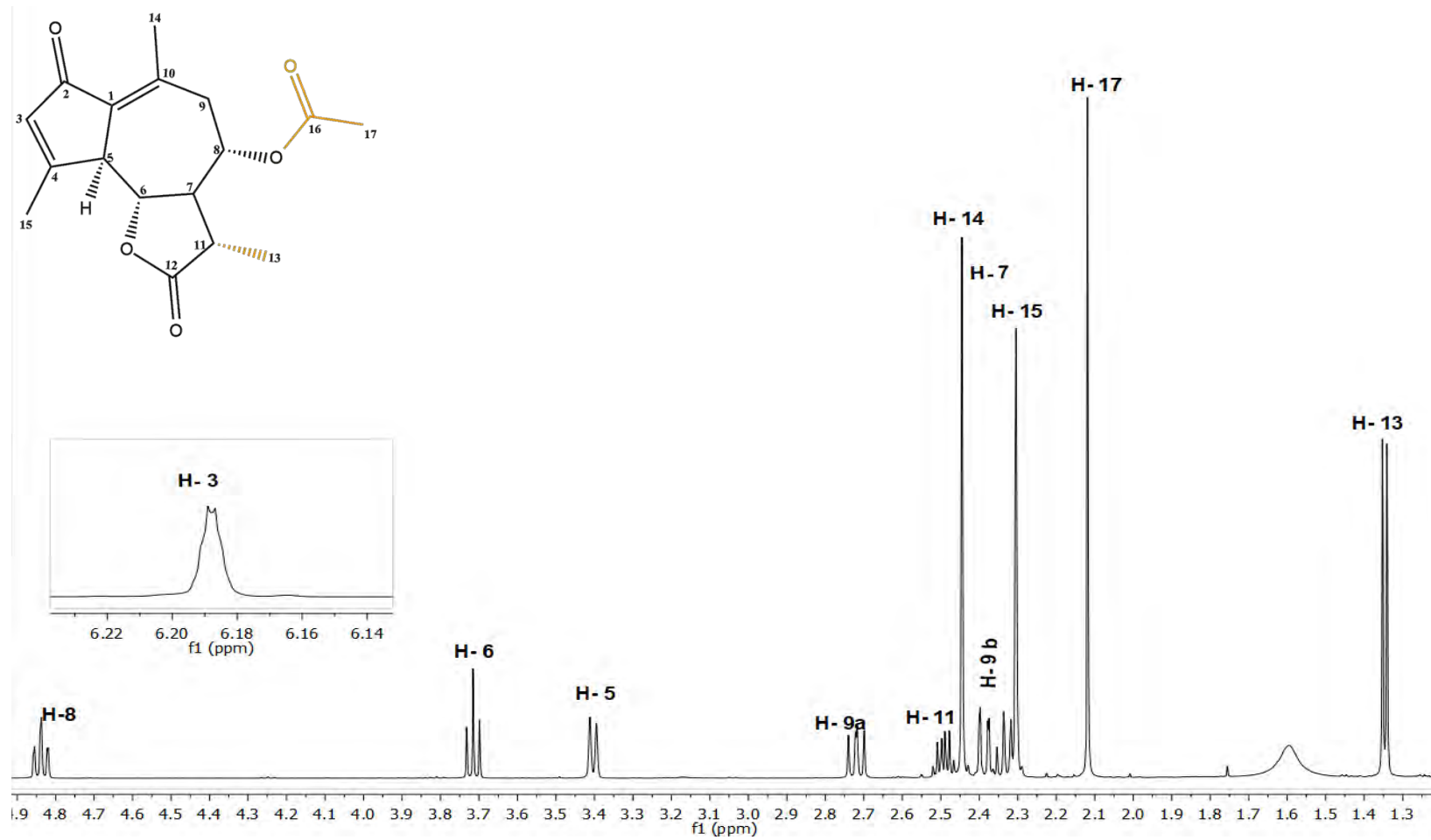


Figura 23. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la matricarina (31).



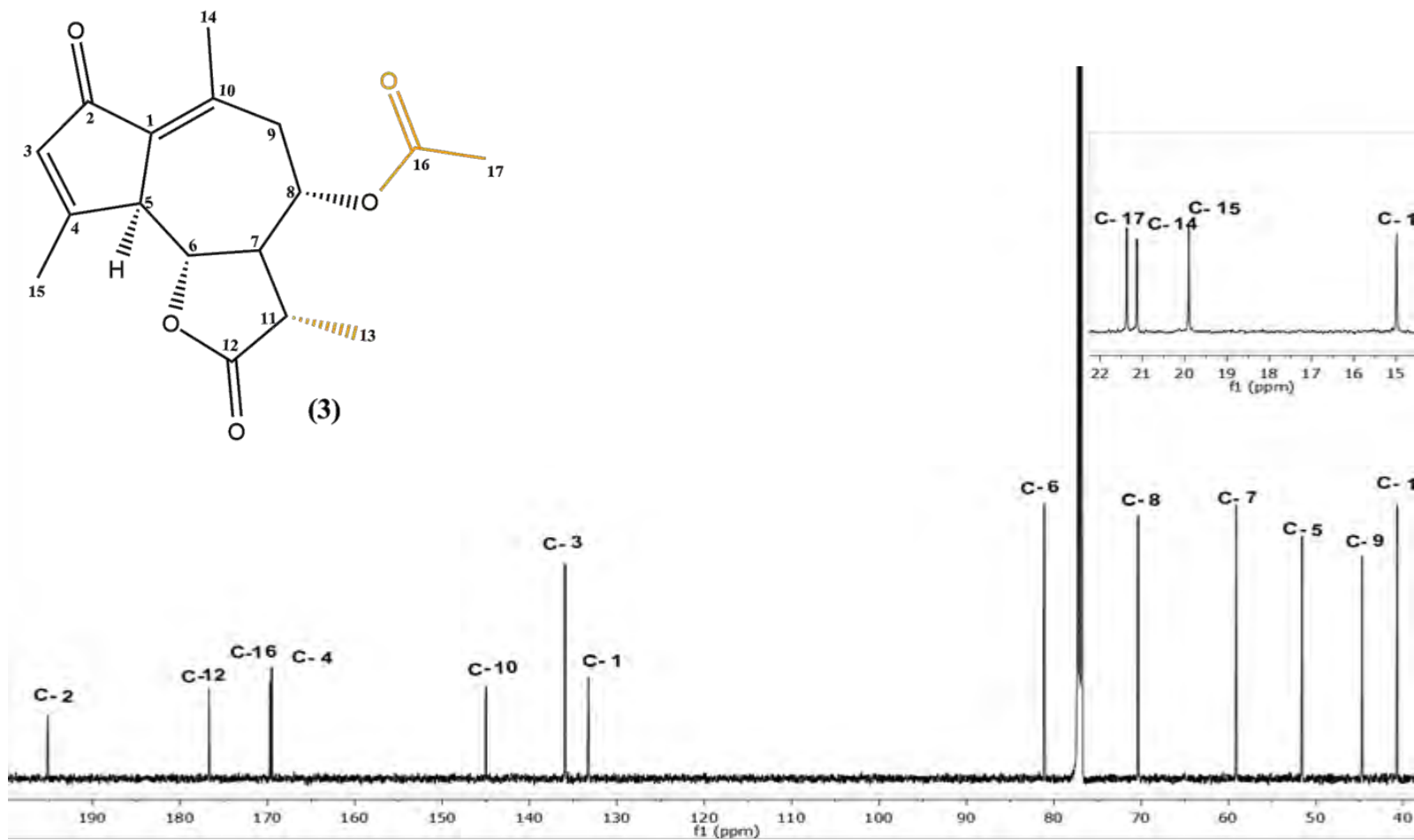
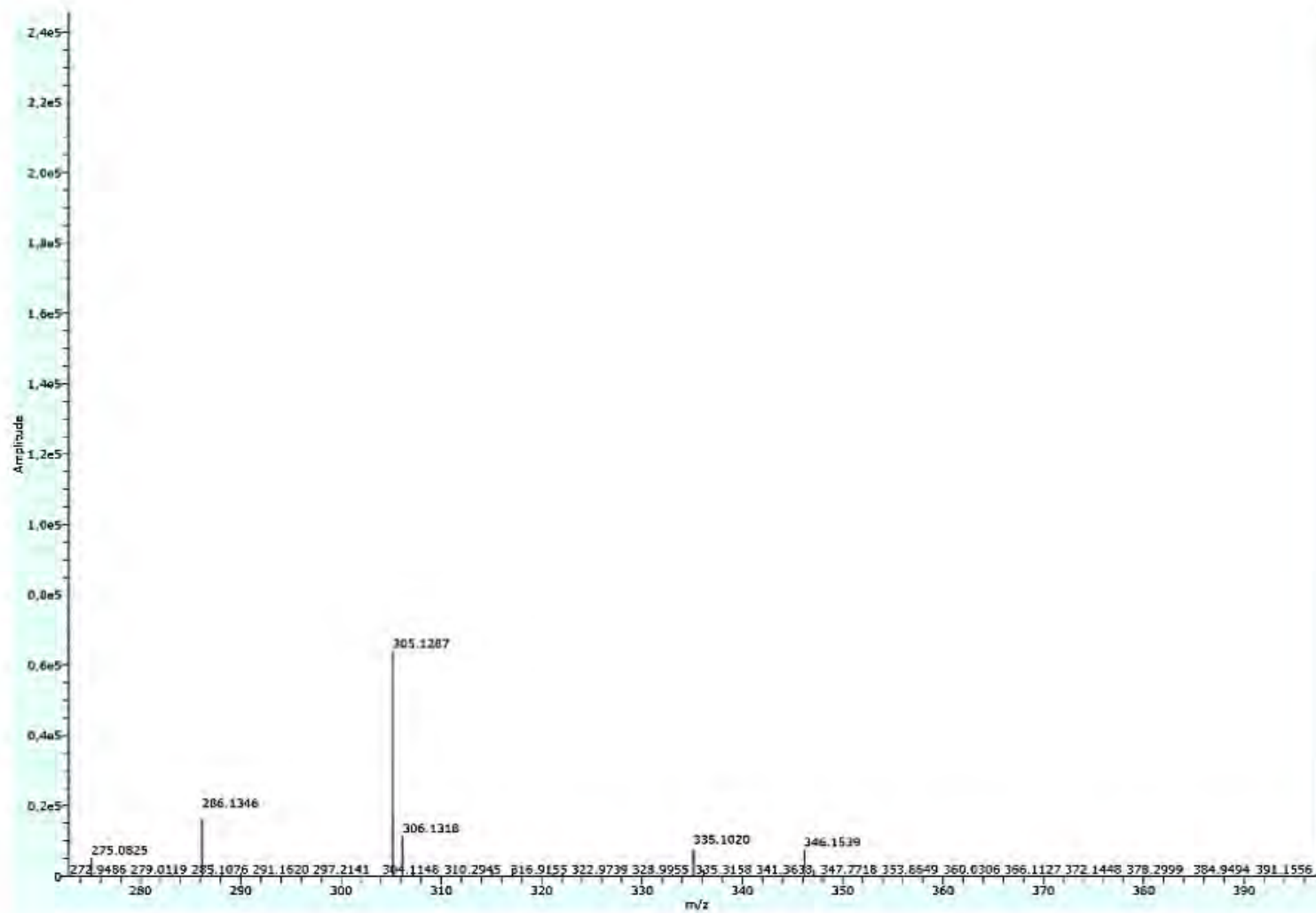


Figura 24. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la matricarina (31).



**Figura 25.** Espectro de EM  $[M + H]^+$  de la matricarina (**31**).

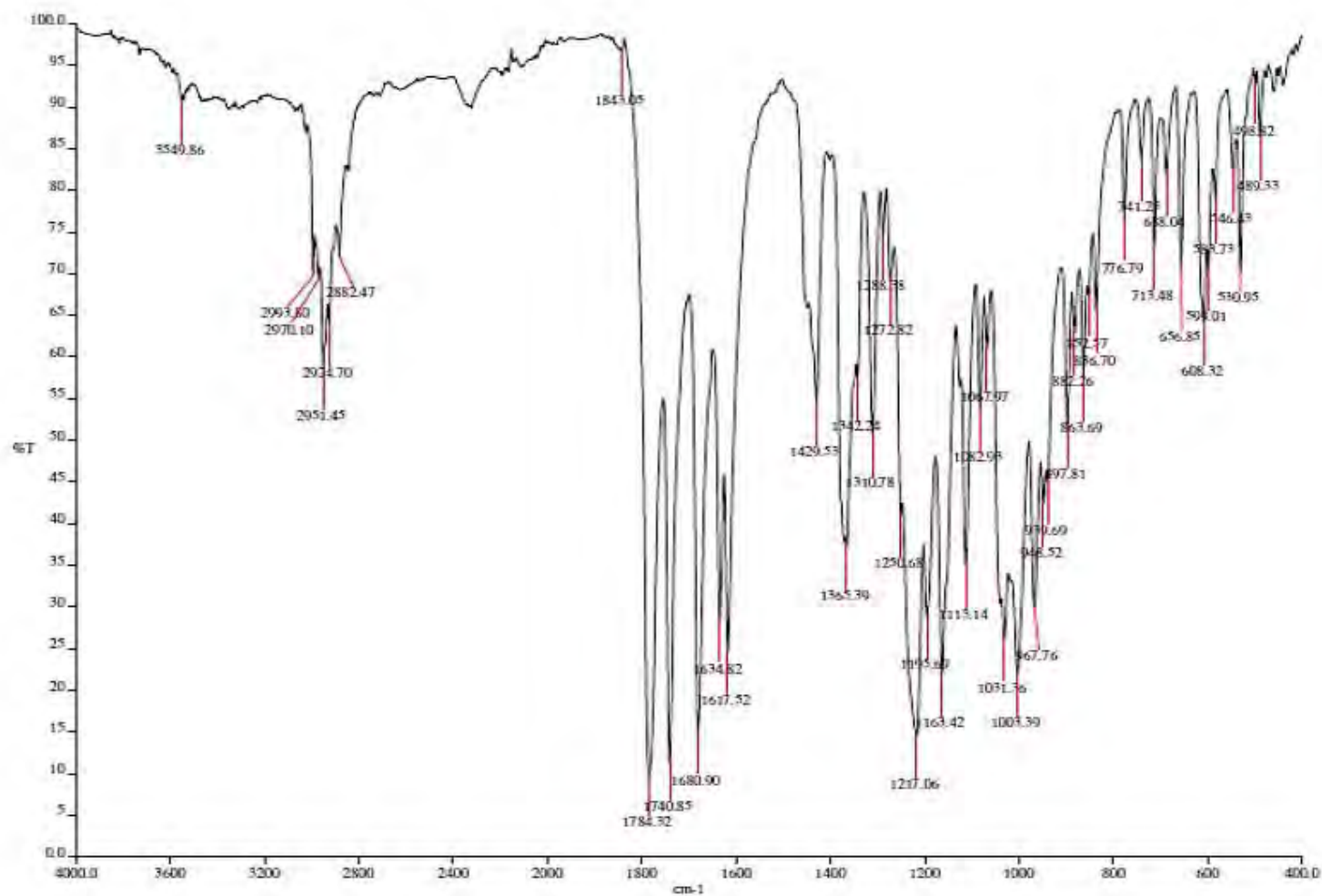


Figura 26. Espectro IR (FT-IR) de la matricarina (31)

ANEXO 4

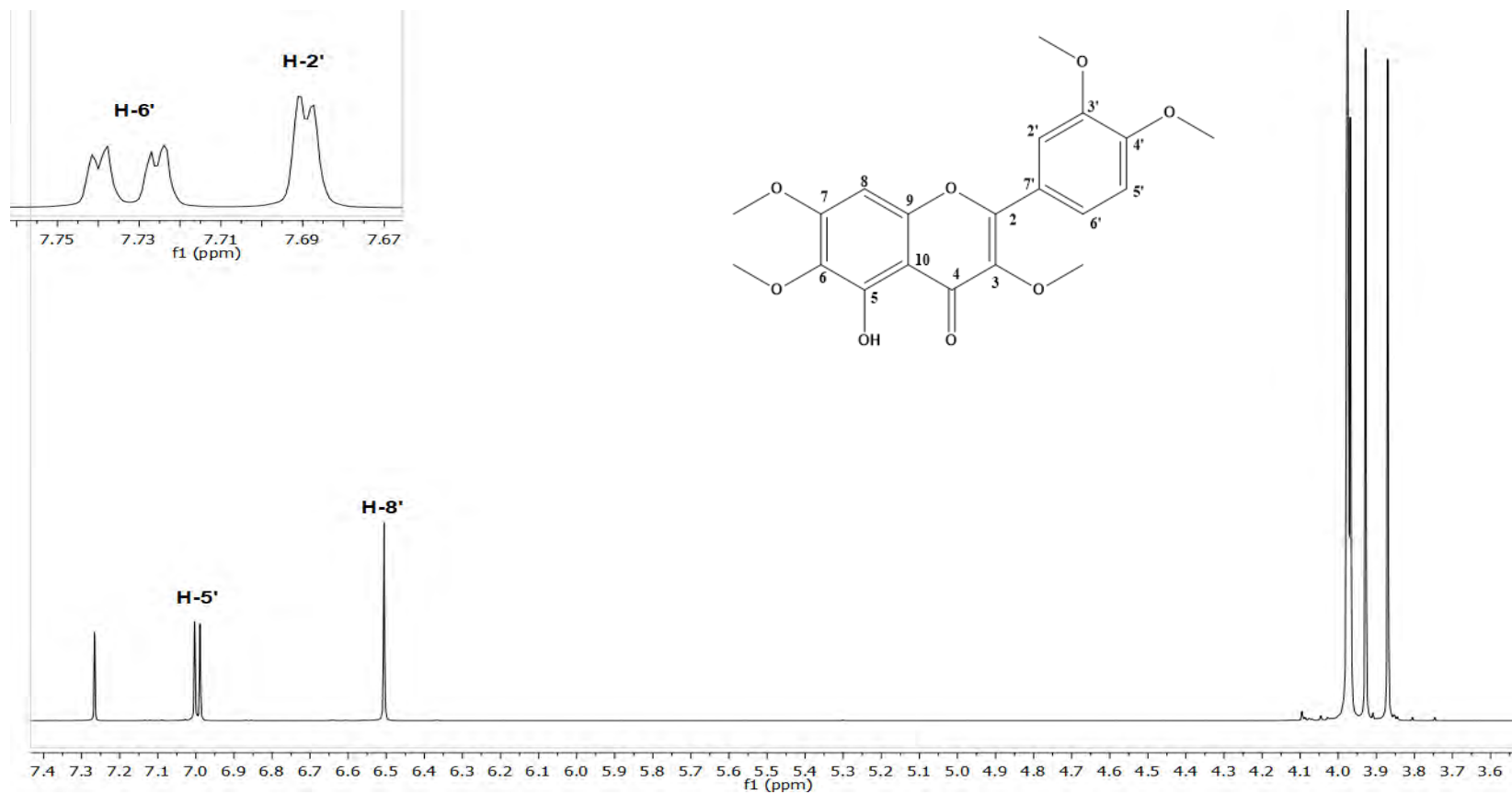


Figura 27. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la artemetina (18)

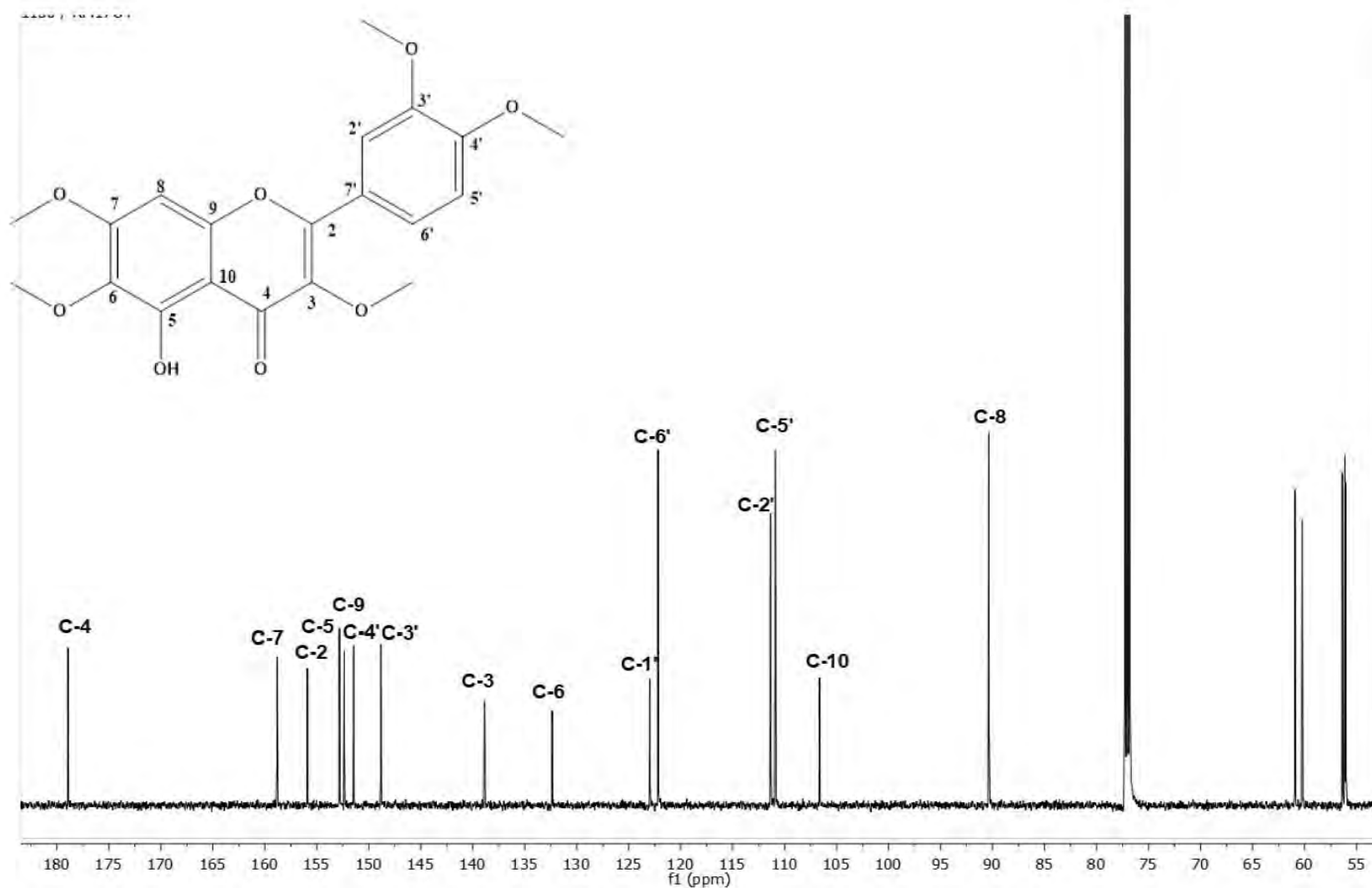
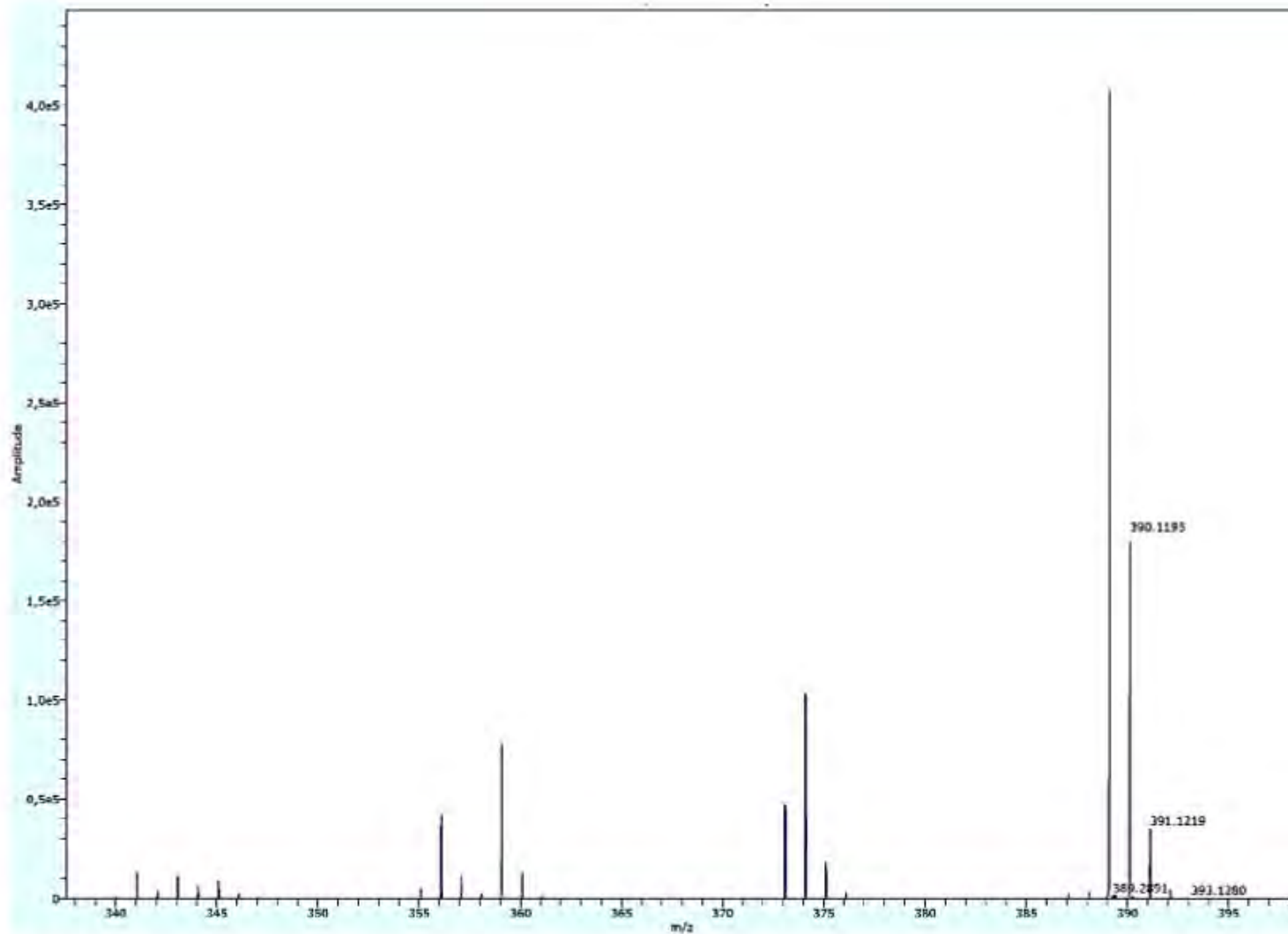


Figura 28. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la artemetina (18).



**Figura 29.** Espectro de EM  $[M + H]^+$  de la artemetina (**18**)

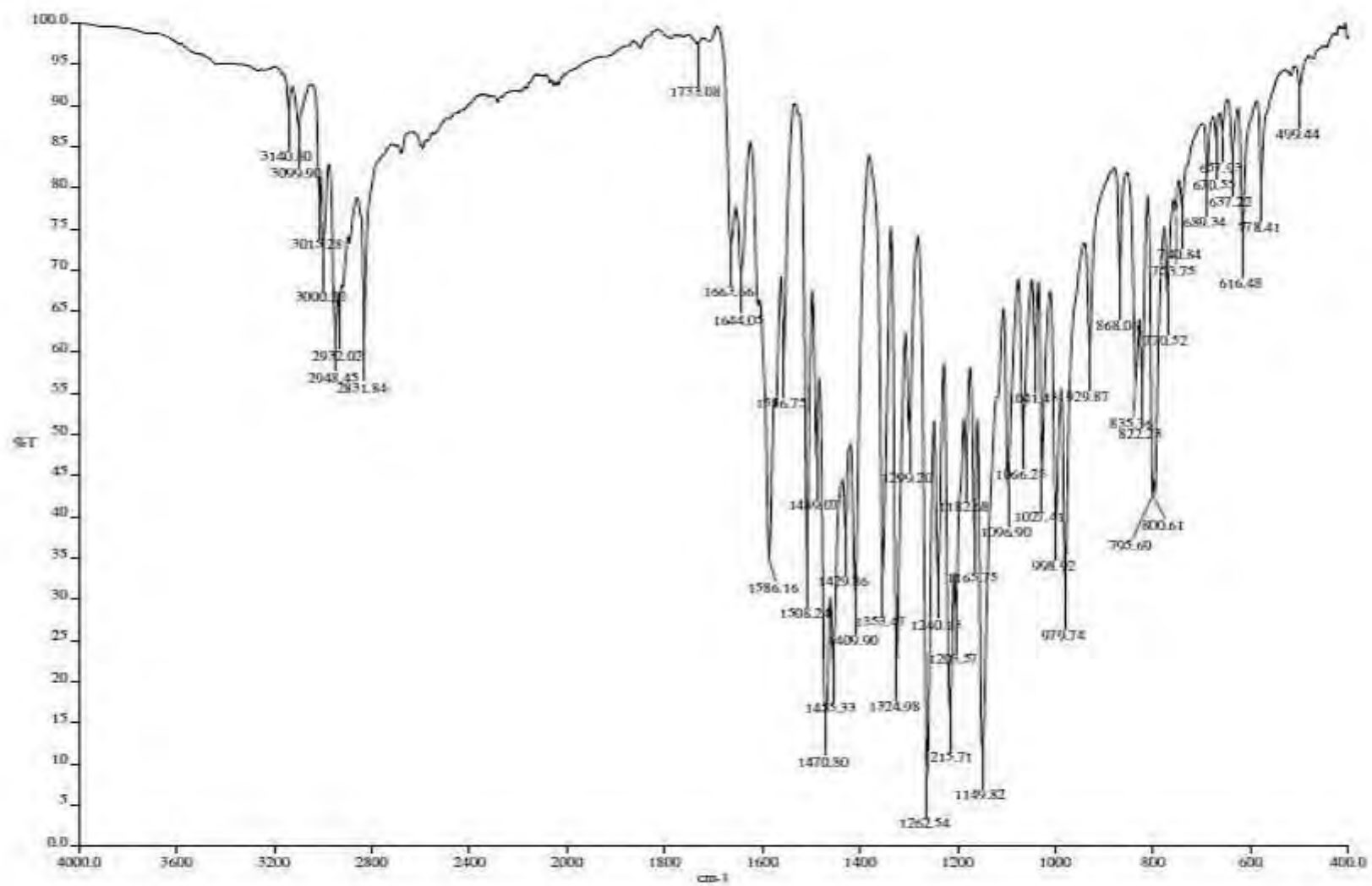


Figura 30. Espectro IR (FT-IR) de la artemetina (18)

## ANEXO 5

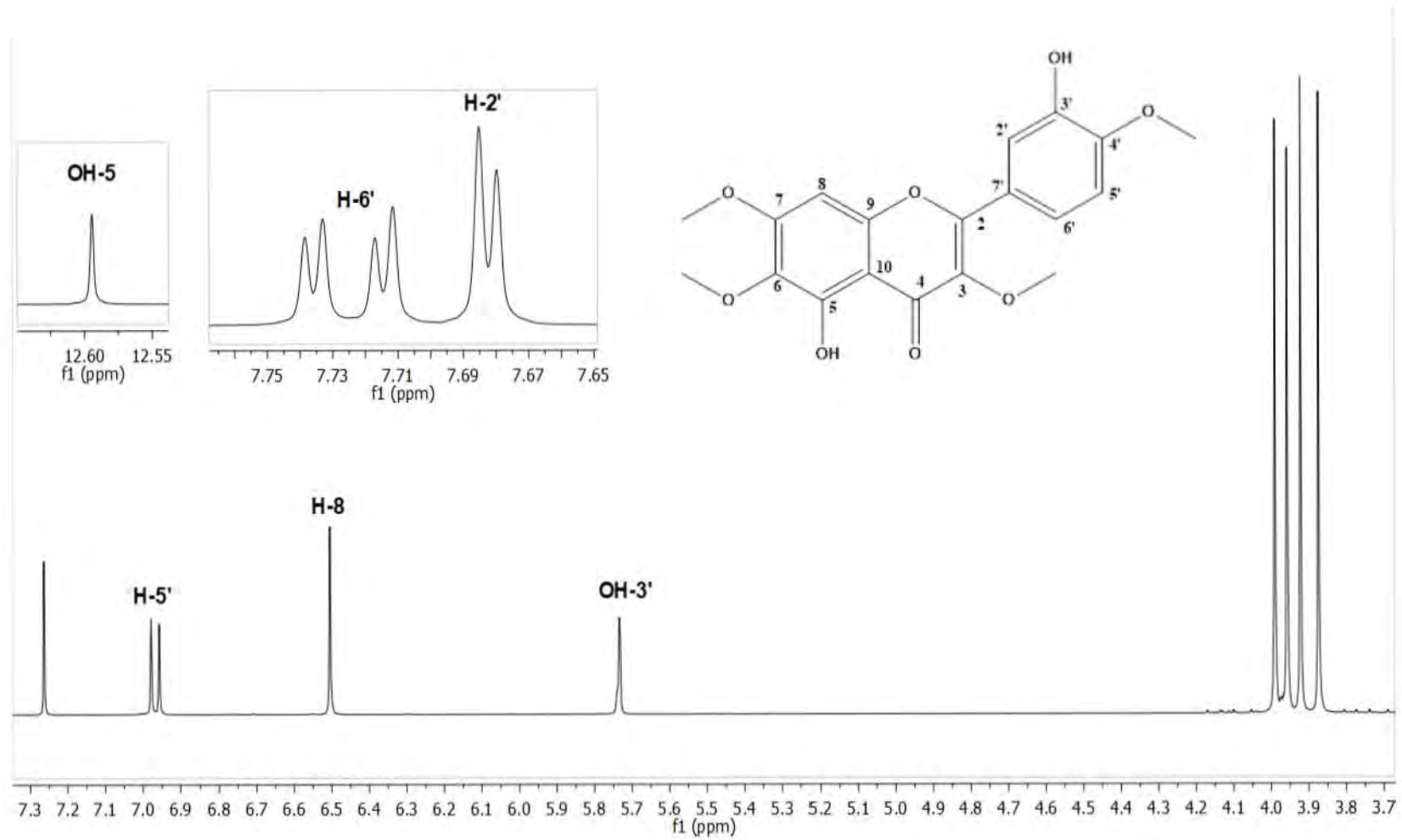
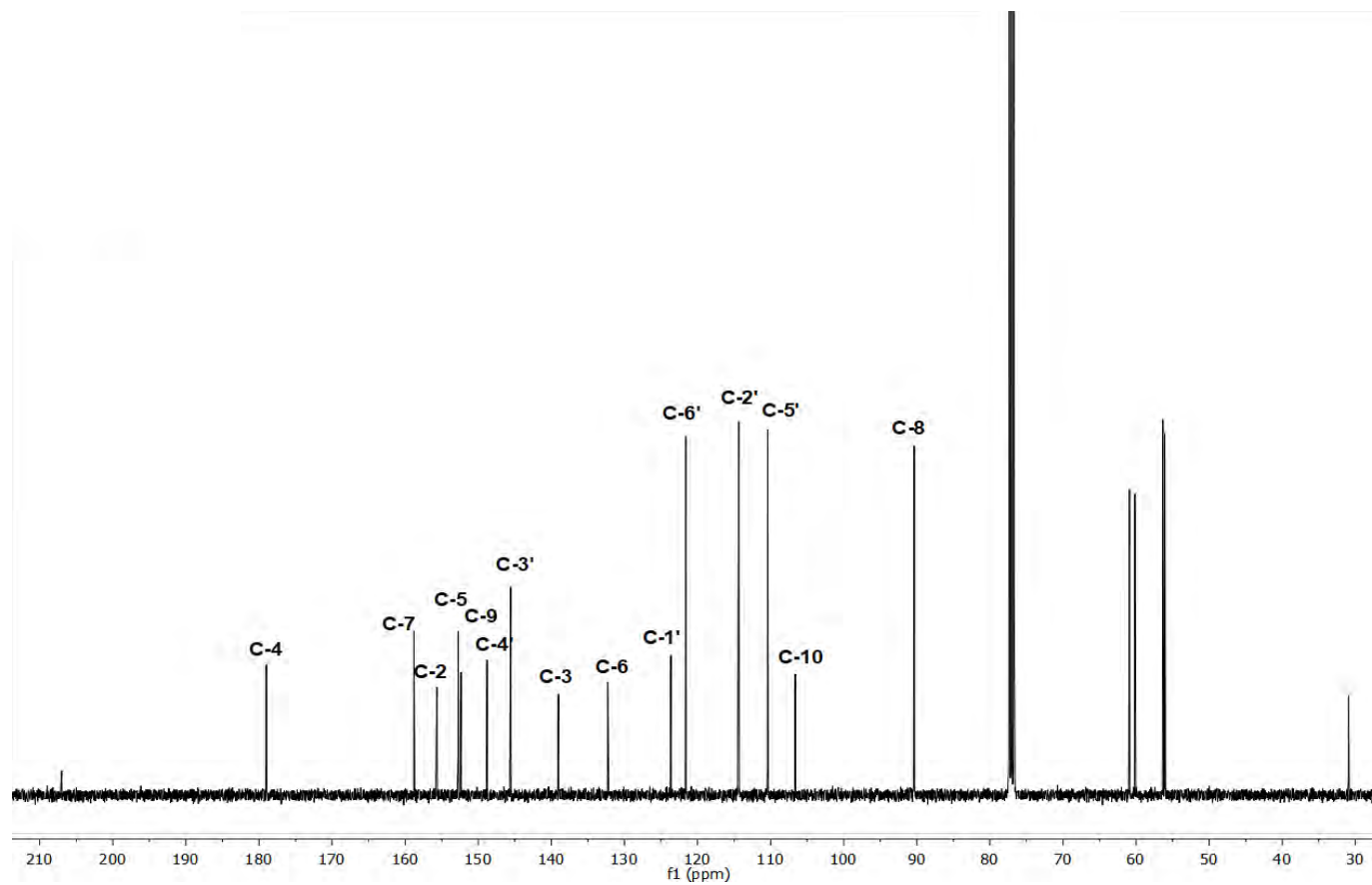
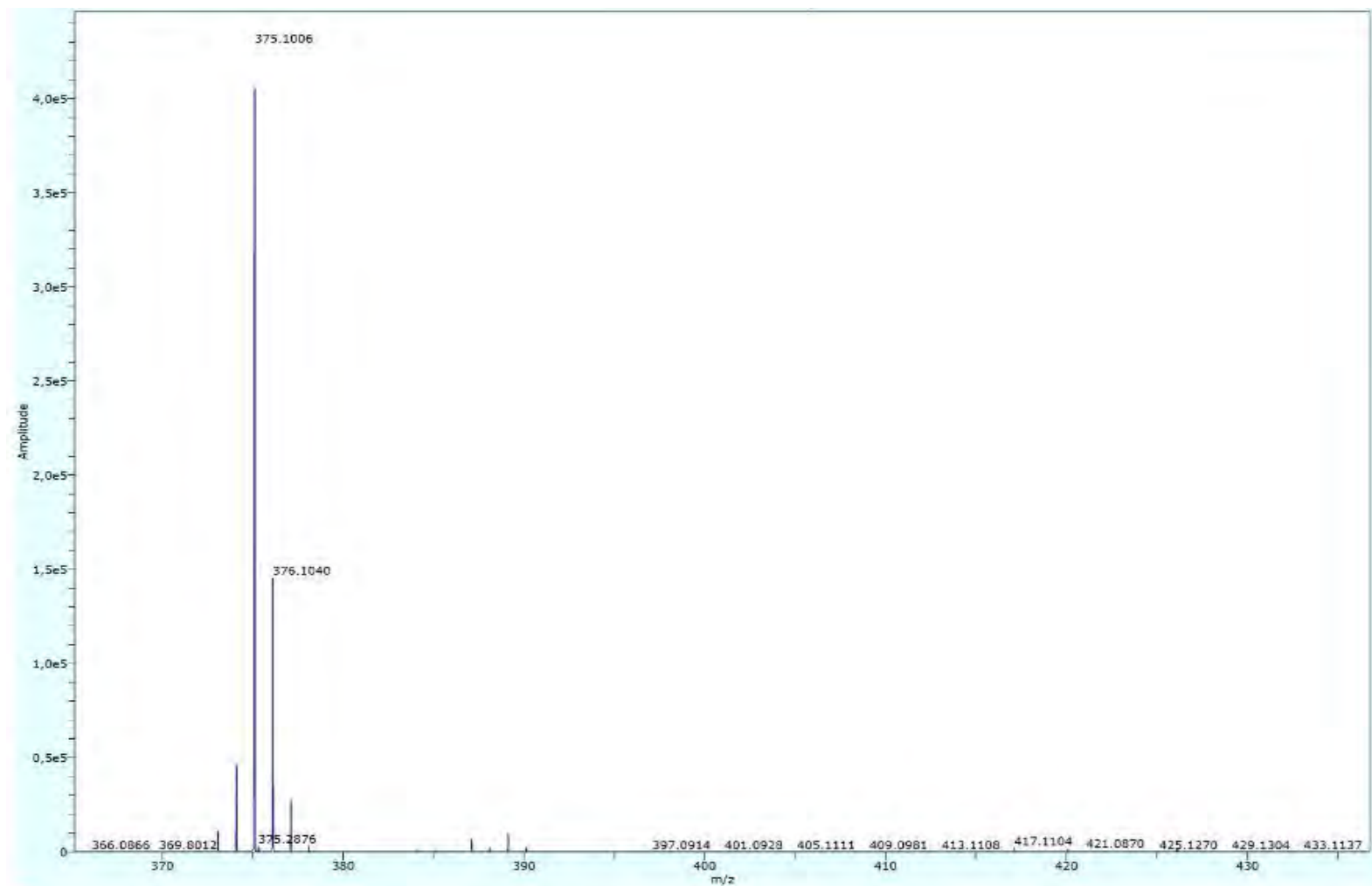


Figura 31. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la casticina (12).





**Figura 32.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la casticina (12).



**Figura 33.** Espectro de EM  $[M + H]^+$  de la casticina (12).

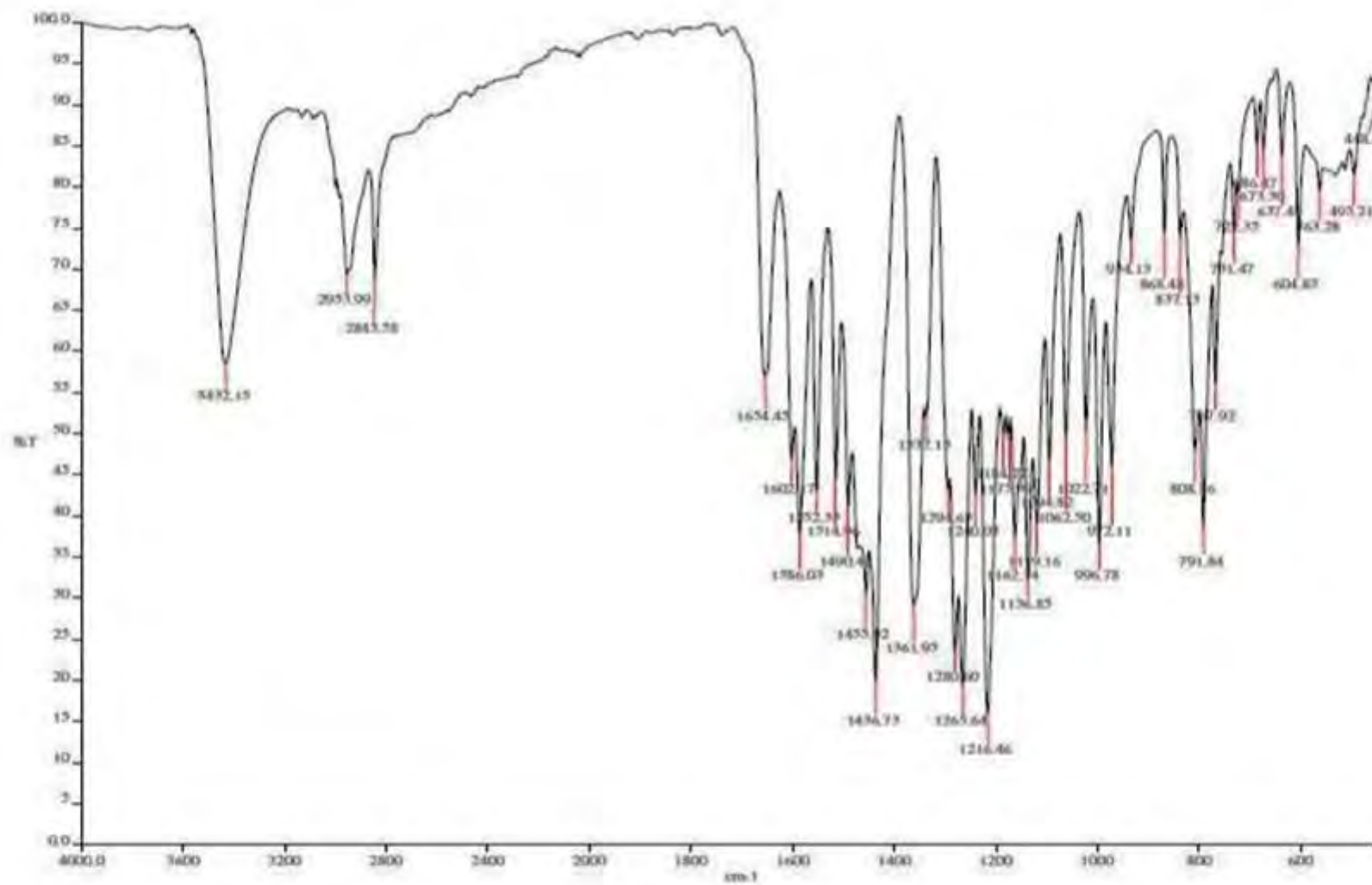
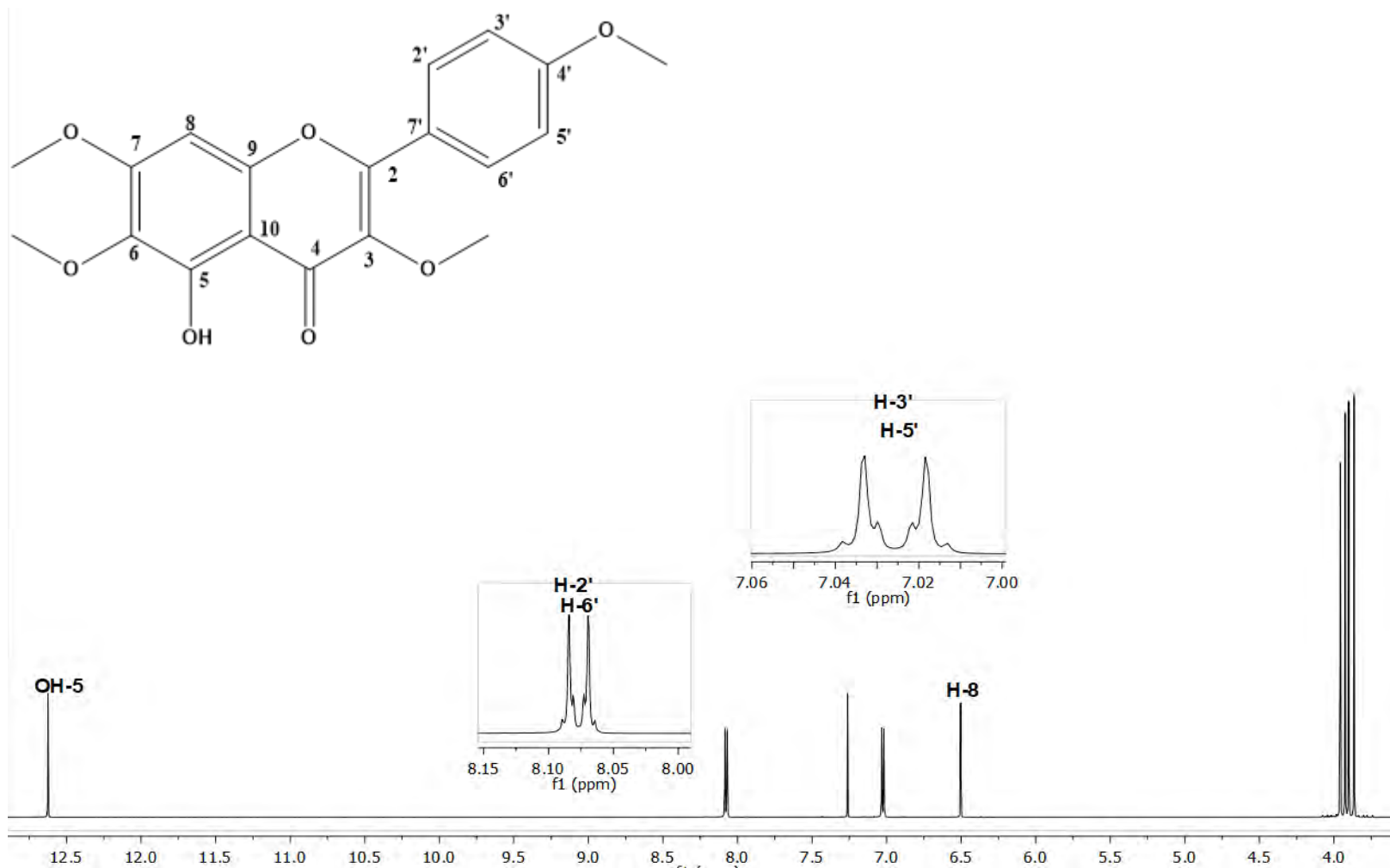


Figura 34. Espectro IR (FT-IR) de la casticina (12).



**Figura 35.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**17**).

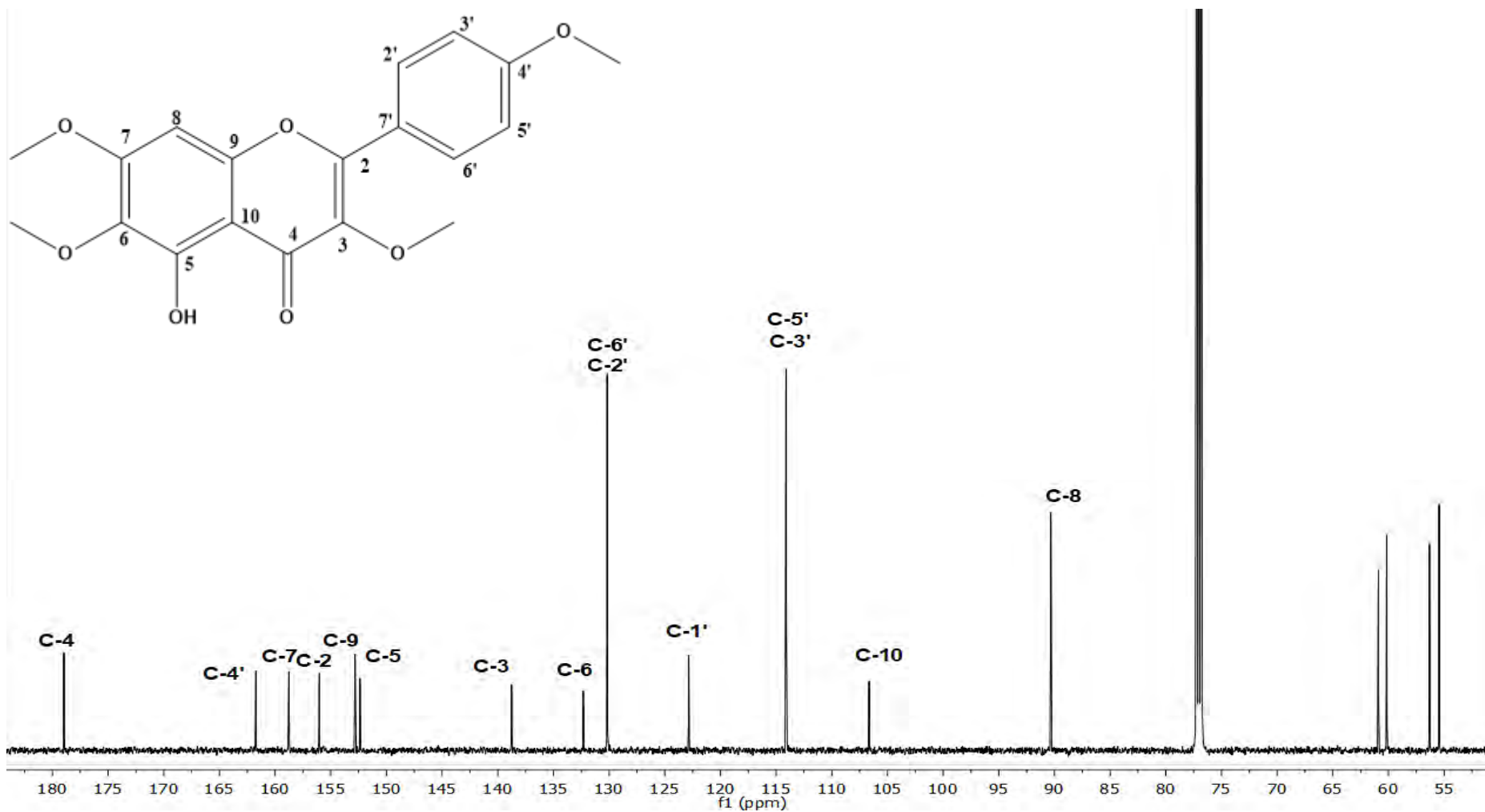
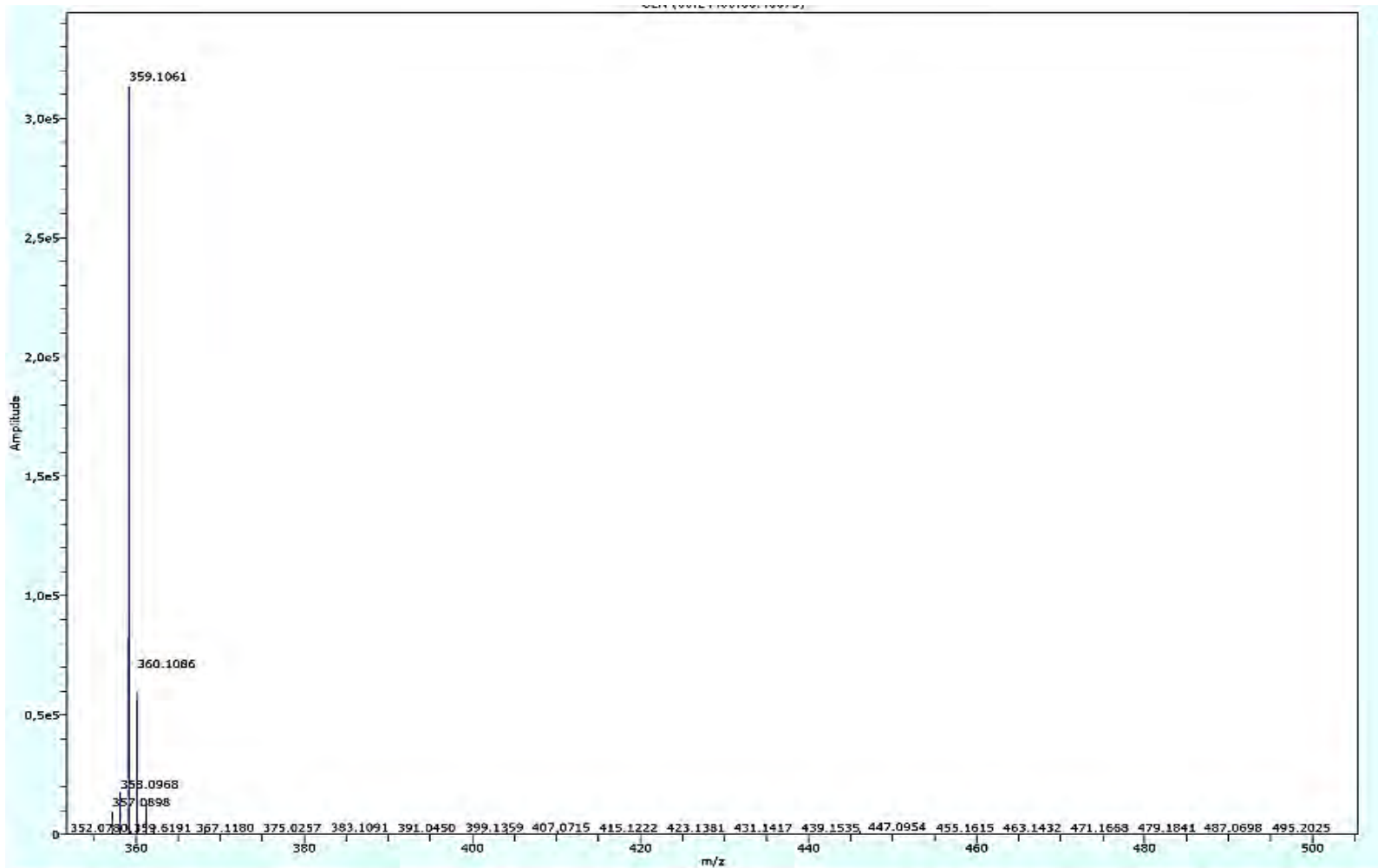
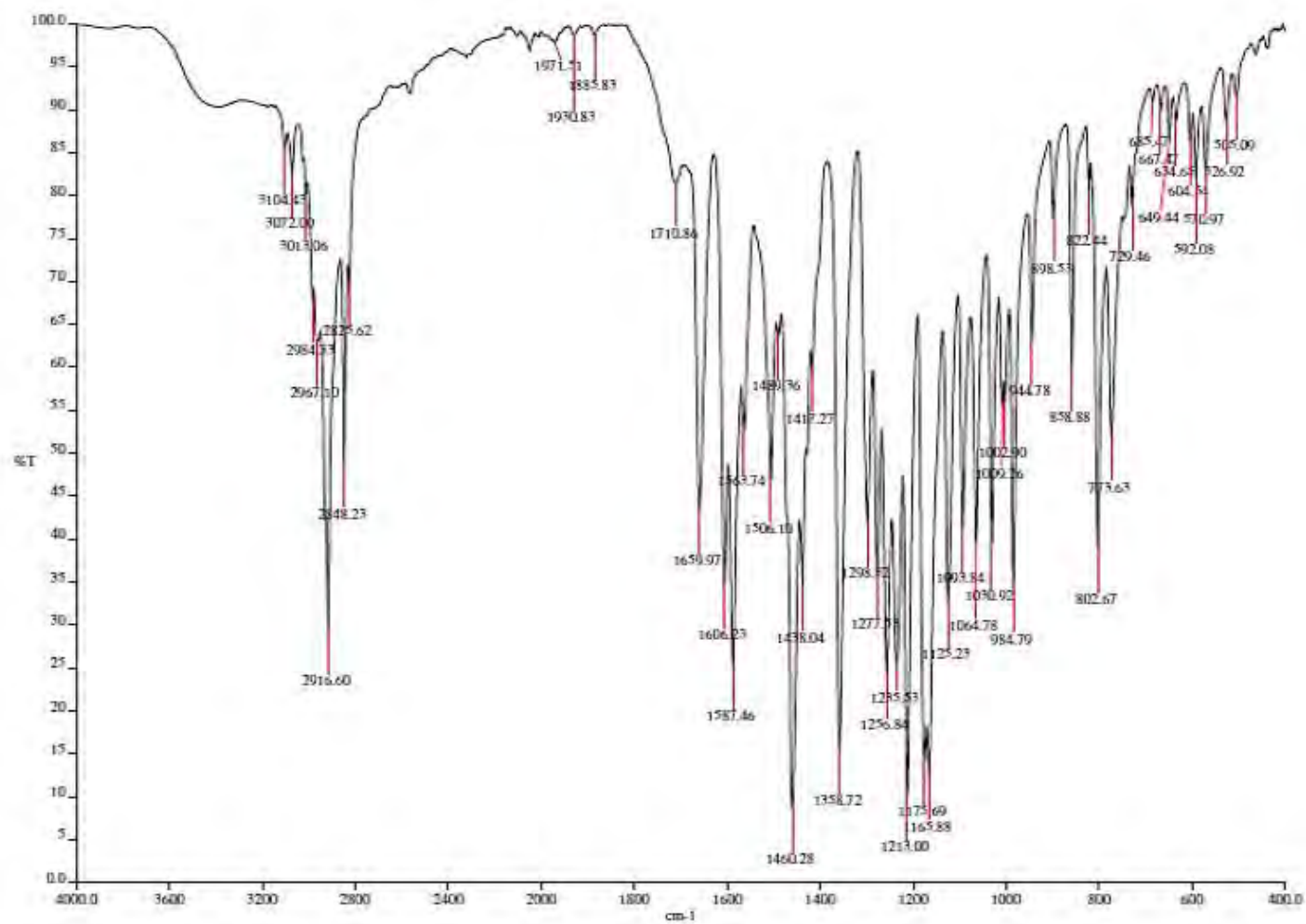


Figura 36. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17).



**Figura 37.** Espectro de EM  $[M + H]^+$  de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (**17**).



**Figura 38.** Espectro IR (FT-IR) de la 5-hidroxi-3,4',6,7-tetrametoxiflavona (17).