



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE PARÁMETROS DE IDENTIDAD, PUREZA Y
COMPOSICIÓN PARA UTILIZARSE EN UN MÉTODO DE CONTROL
DE CALIDAD DE LA PLANTA MEDICINAL *Santolina*
chamaecyparissus L. (Asteraceae)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ANTONIO GIUSEPPE RODRÍGUEZ CARBALLO

CD. MX.

2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
VOCAL: Profesora: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
SECRETARIO: Profesor: ABRAHAM MADARIAGA MAZON
1er. SUPLENTE: Profesora: BERENICE OVALLE MAGALLANES
2do. SUPLENTE: Profesora: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISIÓN DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

SUSTENTANTE:

ANTONIO GIUSEPPE RODRÍGUEZ CARBALLO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de estudiar en la “Máxima Casa de Estudios”

A los profesores de la UNAM que desde mi bachillerato y durante mis estudios profesionales me han aportado conocimientos valiosos que han sido fundamentales para mi desarrollo académico.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por el apoyo económico otorgado a través de proyecto IN225017, a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

Especialmente agradezco a la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por todo el apoyo brindado y dedicación para la realización de este proyecto.

A los honorables miembros del jurado por sus pertinentes observaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz por el apoyo en la parte analítica y técnica para la realización de las pruebas de identidad por HPLC, así como al Dr. José Fausto Rivero Cruz y a la M. en C. Karen Tatiana Hernández Osorio por el apoyo en las pruebas de composición.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de los análisis espectroscópicos, particularmente a la M. en C. Rosa Isela del Villar, M. en C. Nayelli López Balbiaux y a la Q. Marisela Gutiérrez; a la Q. Georgina Duarte Lisci por los análisis de espectrometría de masas; a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva y a la Dra. Minerva Monroy por los análisis HPLC-MS y al Q. Rafael Iván Puente Lee por el análisis elemental por MEB.

Al M. en C. Alberto Reyes García del Herbario del Instituto de Biología de la UNAM por la ayuda en la determinación botánica del espécimen vegetal.

Especiales agradecimientos a los I.Q. Ramiro del Carmen y Roberto Díaz por la asistencia técnica informática.



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Familia Asteraceae	2
2.2 Características del género <i>Santolina</i>	2
2.2.1 Género <i>Santolina</i>	2
2.2.2 Distribución y hábitat.....	4
2.2.3 Composición química.....	4
2.3 Características de la especie <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.....	9
2.3.1 Clasificación taxonómica	9
2.3.2 Descripción	10
2.3.3 Nombres comunes.....	10
2.3.4 Usos.....	10
2.3.5 Estudios farmacológicos.	11
2.3.5.1 Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora	11
2.3.5.2 Actividad antiespasmódica.	12
2.3.5.2 Actividad analgésica	12
2.4 Métodos analíticos	13
2.4.1 Cromatografía.....	13
2.4.2 Cromatografía en capa fina.	14
2.4.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	15
2.4.4 Espectrofotometría visible y ultravioleta.....	17
2.5 Pruebas de Pureza.	18
2.5.1 Cenizas totales (MGA-FH 0060).....	18
2.5.2 Material extraíble (MGA-FH 0070).....	18
2.5.3 Metales pesados (MGA-FH 0160)	18
2.6 Cuantificación de polifenoles en extractos vegetales.....	19



2.6.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	19
2.6.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método con tricloruro de aluminio	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares.....	21
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
5.1 Material	22
5.1.1 Instrumental de laboratorio	22
5.1.2 Disolventes, soluciones y reactivos	22
5.1.3 Equipo utilizado.....	23
5.2 Recolección e identificación del material vegetal	24
5.3 Extracción	25
5.3.1 Deseccación y fragmentación.....	25
5.3.2 Obtención del extracto de acetona	25
5.4 Pruebas de identidad	25
5.4.1 Determinación estructural de hispidulina (1) por RMN.....	25
5.4.2 Análisis del extracto de acetona por cromatografía en capa fina.....	25
5.4.2.1 Preparación de la muestra.....	25
5.4.2.2 Preparación de las soluciones de referencia	25
5.4.2.3 Condiciones cromatográficas.....	26
5.4.3 Análisis por CLAR del extracto de acetona.....	26
5.4.3.1 Preparación de la muestra.....	26
5.4.3.2 Preparación de las soluciones de referencia	26
5.4.3.3 Condiciones cromatográficas.....	26
5.5 Pruebas de pureza.....	28
5.5.1 Determinación de cenizas totales.	28
5.5.2 Determinación de material extraíble	28
5.5.3 Determinación de Metales pesados (As, Cd, Cu, Hg y Pb)	28
5.6 Pruebas de composición.....	29



5.6.1 Determinación del contenido de fenoles totales.....	29
5.6.1.1 Curva patrón de ácido gálico	29
5.6.1.2 Cuantificación de fenoles totales en el extracto de acetona	29
5.6.2 Determinación del contenido de flavonoides totales	30
5.6.2.1 Curva patrón de quercetina.....	30
5.6.2.2 Cuantificación de flavonoides totales en el extracto de acetona.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1 Extracción	31
6.1.1 Porcentaje de rendimiento del extracto de acetona.....	31
6.2 Prueba de identidad	32
6.2.1 Determinación estructural de la hispidulina (1) por RMN.....	32
6.2.2 Análisis por cromatografía en capa fina del extracto de acetona.....	35
6.2.3 Análisis por HPLC del extracto de acetona.....	36
6.3 Pruebas de pureza.	39
6.3.1 Determinación de cenizas totales.	39
6.3.2 Determinación de material extraíble	40
6.3.3 Determinación de metales pesados.....	41
6.4 Pruebas de valoración	43
6.4.1 Determinación del contenido de fenoles totales.....	43
6.4.2 Determinación del contenido de flavonoides totales	46
7. CONCLUSIONES.....	49
8. PERSPECTIVAS	49
9. REFERENCIAS	50
10. ANEXOS	55



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
As	Arsénico
Cd	Cadmio
C	Carbono
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
cm	Centímetro
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
NaCl	Cloruro de sodio
Cu	Cobre
CV	Coefficiente de variación
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR/HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CG	Cromatografía de gases
δ	Desplazamiento químico
SD	Desviación estándar
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CO ₂	Dióxido de carbono
d	Doblete
EAG	Equivalente a ácido gálico
EQ	Equivalente a quercetina
EM	Espectrometría de masas
HSQC	Espectroscopía bidimensional de correlación única heteronuclear a un enlace (¹ H- ¹³ C)
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (¹ H- ¹ H)



HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a varios enlaces (^1H - ^{13}C)
NOESY	Espectroscopía bidimensional incrementada por el efecto nuclear Overhauser
ext	Extracto
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
°C	Grado centígrado
g	Gramo
H	Hidrógeno
Hz	Hertz
h	Horas
IR	Infrarrojo
Int. rel.	Intensidad relativa
M ⁺	Ion molecular
kg	Kilogramo
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
CD ₃ OD	Metanol deuterado
MGA	Método General de Análisis
Hg	Mercurio
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanómetro
N	Normalidad



OMS	Organización Mundial de la Salud
O	Oxígeno
ppm	Partes por millón
Pb	Plomo
% m/v	Porcentaje masa/volumen
p.f.	Punto de fusión
RA	Reactivo Analítico
R _f	Relación de frentes
m/z	Relación masa/carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ •2H ₂ O	Sulfato cérico amoniacal
T.A.	Temperatura ambiente
t _R	Tiempo de retención
AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
UV	Ultravioleta
Vis	Visible



LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Principales compuestos secundarios aislados del género <i>Santolina</i> .	5
Tabla 2. Clasificación botánica de la especie <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	9
Tabla 3. Tipos de cromatografía y sus mecanismos de separación.	14
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la separación de hispidulina (1) y pectolinarigenina (2) .	27
Tabla 5. Valores de rendimientos obtenidos de las extracciones con acetona para los diferentes análisis.	32
Tabla 6. Datos espectroscópicos de la hispidulina.	33
Tabla 7. Cenizas totales de <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	40
Tabla 8. Material extraíble en <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	41
Tabla 9. Valores de absorbancia y concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de fenoles totales.	44
Tabla 10. Valores de absorbancia y concentración obtenidos de la tres réplicas para el análisis de flavonoides totales	47



LISTA DE FIGURAS

		Pag
Figura 1	Distribución geográfica del género <i>Santolina</i> en el mundo.	4
Figura 2.	Compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de algunas especies del género <i>Santolina</i> .	5
Figura 3.	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L. (Asteraceae)	10
Figura 4.	Componentes de la cromatografía en capa fina	15
Figura 5.	Componentes del sistema de cromatográfico de líquidos	16
Figura 6.	Componentes del sistema de espectrofotometría UV-Vis	17
Figura 7.	Reacción de oxidación entre el reactivo de Folin y el grupo fenol	19
Figura 8.	Complejo formado entre un flavonoide (p. ej. quercetina) y las sales de aluminio	20
Figura 9	Ejemplar de <i>Santolina chamaecyparissus</i> L. colectado y depositado en el Herbario MEXU de la UNAM	24
Figura 10.	Estructura de la 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina) y principales correlaciones observadas en el espectro HMBC	33
Figura 11.	Cromatoplaqueta obtenida del análisis del extracto de acetona, comparado con: 1- pectolinarigenina, 2- hispidulina y E- Extracto de acetona.	35
Figura 12.	Cromatogramas obtenidos con las primeras condiciones isocráticas	37
Figura 13.	Cromatograma obtenido del extracto de acetona a las segundas condiciones isocráticas establecidas.	38
Figura 14.	Cromatograma del extracto de acetona obtenido al modificar el modo de elución al modo de gradiente.	39
Figura 15.	(A) Elementos presentes en la cenizas de <i>Santolina chamaecyparissus</i> (B) Porcentaje representativo de cada uno de los elementos presentes en la muestra.	42



Figura 16.	Curva de calibración para determinar la cantidad total de fenoles utilizando como referencia ácido gálico	43
Figura 17.	Representación gráfica de la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la multiplaca	44
Figura 18.	Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales utilizando como referencia a la quercetina	46
Figura A1.	Espectro en el UV de la hispidulina (1)	55
Figura A2.	Espectro en el IR de la hispidulina (1)	56
Figura A3.	Espectro de masas de la hispidulina (1)	57
Figura A4.	Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de la hispidulina (1)	58
Figura A5.	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de la hispidulina (1)	59
Figura A6.	Espectro HSQC (600 MHz, CD ₃ OD) de la hispidulina (1)	60
Figura A7.	Espectro COSY (600 MHz, CD ₃ OD) de la hispidulina (1)	61
Figura A8.	Espectro HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) de la hispidulina (1)	62
Figura A9.	Espectro NOESY (600 MHz, CD ₃ OD) de la hispidulina (1)	63



1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas medicinales continúan siendo el apoyo principal de la atención médica en países en vías de desarrollo, concurrentemente son utilizadas como medicina complementaria y alternativa en países industrializados. Sin embargo, relativamente pocas especies de plantas que provienen de la medicina herbolaria han sido científicamente evaluadas para su posible aplicación médica. En la mayoría de los países en vías de desarrollo la medicina herbolaria está pobremente regulada. Muchos productos herbolarios no están registrados ni controlados y en el mercado pueden encontrarse varias presentaciones de uno mismo con diferente calidad, por lo que surge la necesidad de efectuar estudios pertinentes sobre las plantas medicinales para asegurar su eficacia, seguridad y calidad. De hecho, la Organización Mundial de la Salud ha promovido diversas recomendaciones que ayuden a la regularización de productos terapéuticos con plantas medicinales. En nuestro país desde el año 2001 los medicamentos o remedios herbolarios se registran ante la Secretaría de Salud (SS); este organismo proporciona una clave alfa numérica para su comercialización. Para este registro es necesario cumplir con varios requisitos que comprueben el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación. Con la publicación de la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos editada por la SS en el 2001, se deja clara la intención de que la industria farmacéutica cuente con un respaldo que le permita introducir nuevos productos de origen vegetal al mercado bajo condiciones de calidad adecuados para el consumo humano. Esto se logra mediante la compilación de la información científica con datos sobre seguridad, eficacia y control de calidad de las plantas de mayor uso en monografías específicas. En el presente trabajo se plantea generar información sobre algunas pruebas de identidad, pureza y composición de *Santolina chamaecyparissus* que sirvan como base para crear una monografía específica de esta planta medicinal.



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae, también conocida como Compositae, es el grupo más amplio de plantas vasculares. Se estima que en el mundo existen alrededor de 1535 géneros en los cuales se agrupan de 23 000 a 32 000 especies (Pruski *et al.*, 2004). El nombre "Asteraceae" deriva del género tipo de la familia Aster, que a su vez proviene del griego *ἀστήρ* que significa estrella y hace alusión a la forma de la inflorescencia la cual se describe como una cabezuela o capítulo; es una estructura formada por un receptáculo basal sobre el que se insertan las flores, y está circundada por brácteas involucreales o filarias (Tapia, 2010, Adedejo *et. al.*, 2008).

Muchas de las especies de la familia Asteraceae son de gran importancia, por ejemplo: la lechuga (*Lactuca sativa* L.) y endivias (*Chicorium intybus* L.) con interés alimenticio; semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) como alimento de oleaginosas; el estragón como condimento (*Artemisia dracunculus* L.); plantas insecticidas como el piretro (*Chrysanthemum cinerariifolium* L.); plantas medicinales como la manzanilla (*Matricaria recutita* L.); para fabricación de licores como la absenta (*Artemisia absinthium*); plantas aromáticas como el abrotano (*Artemisia abrotanum* L.) y ornamentales como la caléndula (*Calendula officinale* L.), la dalia (*Dahlia* spp Cav.) y el crisantemo (*Chrysanthemum* sp. L.).

Una especie de importancia medicinal en la zona mediterránea del mundo es *Santolina chamaecyparissus* L de la familia Asteraceae. Es una planta muy aromática cuyo olor recuerda al de la manzanilla o al del abrotano; de hecho, dos de sus nombres populares son "manzanillera" y "abrotano hembra".

2.2 Características del género *Santolina*

2.2.1 Género *Santolina*

El género *Santolina* es un grupo taxonómicamente complejo de especies de plantas ampliamente distribuidas en la flora mediterránea y utilizada desde la antigüedad en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas. Comprende



especies ampliamente distribuidas; la lista de plantas incluye 103 nombres de las especies de este género. Sin embargo, de acuerdo a Tundis y colaboradores (2017) de éstos, solo 20 son especies aceptadas:

Santolina africana Jord. & Fourr.

Santolina benthamiana Jord. & Fourr.

Santolina canescens Lag.

Santolina chamaecyparissus L.

Santolina corsica Jord. & Fourr.

Santolina decumbens Mill.

Santolina elegans Boiss. ex DC.

Santolina etrusca (Lacaita) Marchi & D'Amato.

Santolina insularis (Gennari ex Fiori) Arrigoni.

Santolina magonica Romo.

Santolina melidensis Rodr.Oubiña & S.Ortiz.

Santolina neapolitana Jord. & Fourr.,

Santolina oblongifolia Boiss.

Santolina pectinata Lag.

Santolina pinnata Viv.

Santolina rosmarinifolia L.

Santolina semidentata Hoffmanns & Link.

Santolina tincloria Molina.

Santolina villosa Mill.

Santolina virens Mill.



2.2.2 Distribución y hábitat

El género *Santolina* pertenece a la región de Europa meridional, crece silvestre en la parte centro-occidental de la región mediterránea; es frecuente en la península Ibérica y en el norte de África. Se desarrolla en laderas pedregosas y arcillosas, en suelos calcáreos y silíceos, desde el nivel del mar hasta los 2000 metros de altitud. Desde el punto de vista ecológico, es un género caméfito, basófilo y subnitrófilo (Giner-Pons *et al.*, 2000; López-Udías *et al.*, 2002). En cultivo se utiliza con fines ornamentales principalmente en América del Norte (Villarino, 1999). En México se ha delimitado a la parte centro y norte (Figura 1).

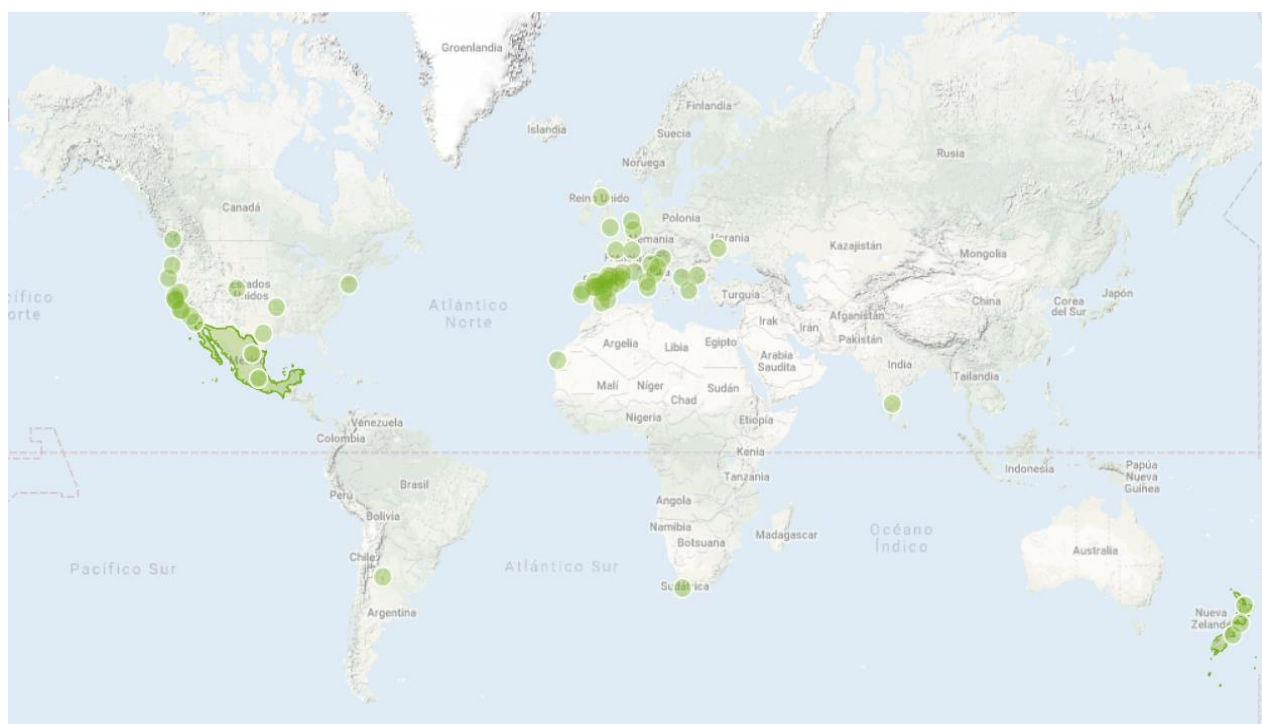


Figura 1. Distribución geográfica del género *Santolina* en el mundo.

[En “Genus *Santolina*” por Naturalista, CONABIO (2018)

<https://www.naturalista.mx/taxa/53780-Santolina>. Recuperado el día 26 de febrero del 2019]

2.2.3 Composición química

Las especies del género *Santolina* poseen una gran cantidad de diferentes tipos de compuestos volátiles en sus acetites esenciales. Entre los compuestos mayoritarios identificados en los aceites esenciales de este género se encuentran



monoterpenos hidrocarbonados y monoterpenos oxigenados como se muestran en la Figura 2 (Teixeria da Silva, 2004; Palá-Paul *et al.*, 2001).

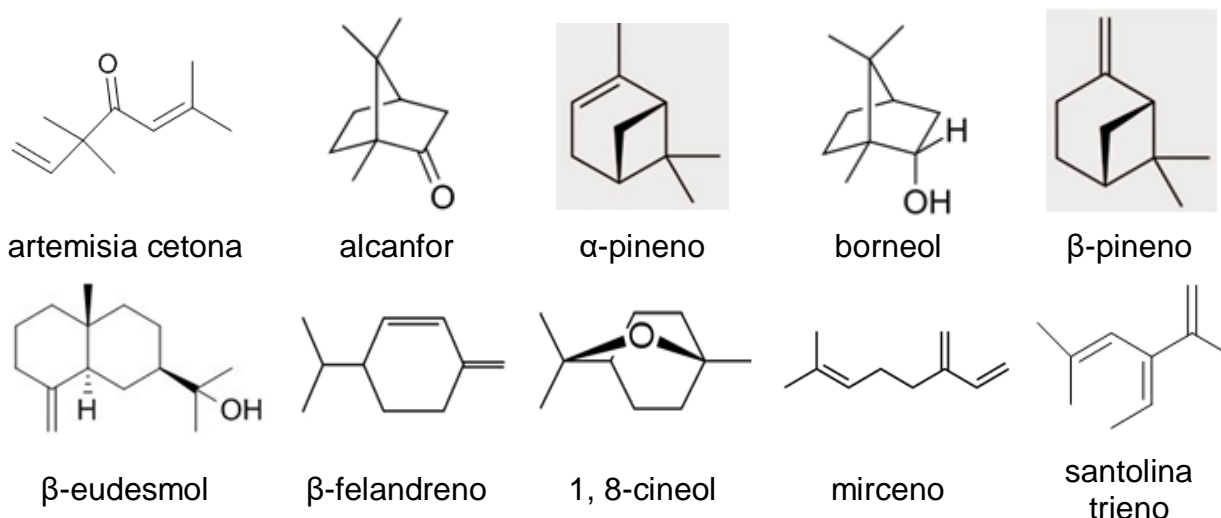


Figura 2. Compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de algunas especies del género *Santolina*

Asimismo, también de estas especies se han logrado aislar compuestos de tipo sesquiterpenoide, flavonoides, cumarinas, compuestos acetilénicos, esteroides y triterpenos. En la Tabla 1 se muestran varios de los compuestos aislados

Tabla 1. Principales compuestos secundarios aislados del género *Santolina*.

SESQUITERPENOS		
Nombre	Estructura	Especie y Referencia
7αH-10βmetil-eudesma-3,5-dien-11ol		<i>S. rosmarinifolia</i> (Barrero <i>et al.</i> , 1999)
7αH-10βmetil-eudesma-4(15)-en-1,6,11-triol		
Chamisellina		

**Tabla 1.** Principales compuestos secundarios aislados del género *Santolina* (cont.)

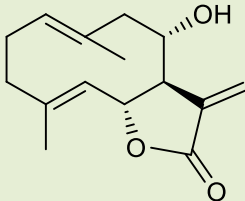
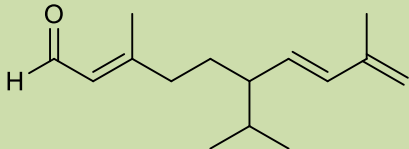
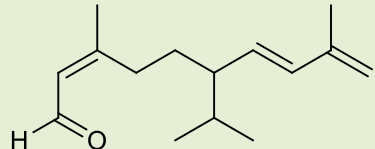
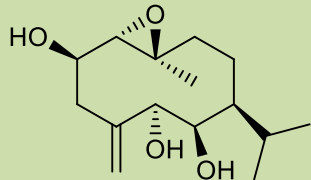
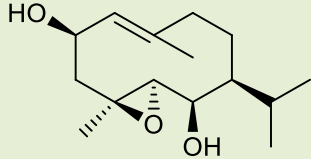
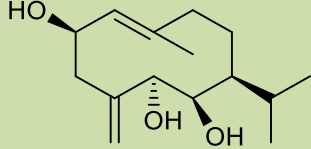
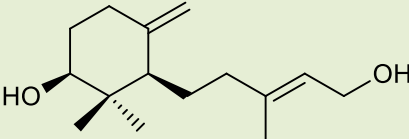
Chamisantina		<i>S. rosmarinifolia</i> (Barrero <i>et al.</i> , 1999)
3,9-dimetil-6 isopropil-2(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-decatrienal		<i>S. corsica</i> (Ferrari <i>et al.</i> , 2005)
3,9-dimetil-6 isopropil-2(<i>Z</i>),7(<i>E</i>)-decatrienal		
1 α ,10 β -epoxi-7 α H-gremacr-4(15)-en-2 β ,5 α ,6 β -triol		<i>S. pinnata</i> (Kiesiel <i>et al.</i> , 2003)
4 β ,5 α -epoxi-7 α H-gremacr-1(10) <i>E</i> -en-2 β ,6 β -diol		<i>S. chamaecyparissus</i> (Alberto <i>et al.</i> , 1993)
7 α H-germacra-1(10) <i>E</i> ,4(15)-dien-2 β ,5 α ,6 β -triol		<i>S. chamaecyparissus</i> (Alberto <i>et al.</i> , 1993)
Elegansidiol		<i>S. elegans</i> (Barrero <i>et al.</i> , 1999)

Tabla 1. Principales compuestos secundarios aislados del género *Santolina* (cont.)

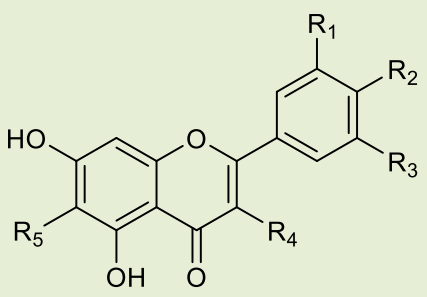
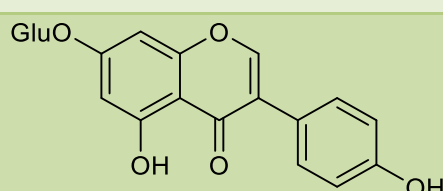
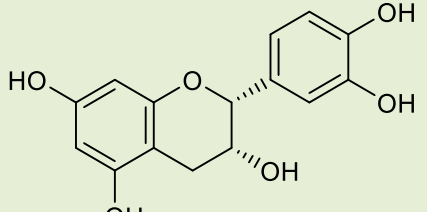
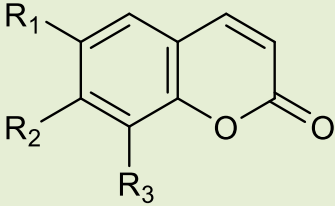
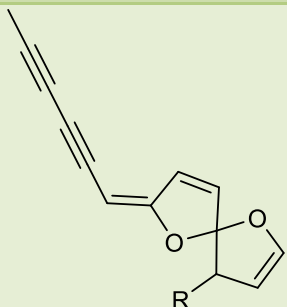
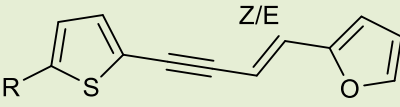
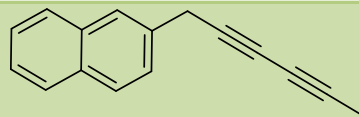
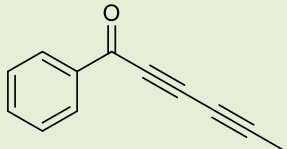
FLAVONOIDES		
Nombre	Estructura	Especie y referencia
Apigenina (R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =H, R ₂ =OH) Criosoeriol (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ =R ₄ =R ₅ =H) Hispidulina (R ₁ =R ₃ =R ₄ =H, R ₂ =OH, R ₅ =OCH ₃) Jaceosidina (R ₁ =R ₅ =OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ =R ₄ =H) Kaempferol (R ₁ =R ₃ =R ₅ =H, R ₂ =R ₄ =OH) Luteolina (R ₁ =R ₂ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₅ =H) Nepetina (R ₁ =R ₄ =H, R ₂ =R ₃ =OH, R ₅ =OCH ₃) Pectolinarigenina (R ₁ =R ₃ =R ₄ =H, R ₂ =R ₅ =OCH ₃) Quercetina (R ₁ =R ₂ =R ₄ = OH, R ₃ =R ₅ =H)		<i>S. chamaecyparissus</i> L (Hurabielle <i>et al.</i> , 1982) (Becchi <i>et al.</i> , 1998) (Sala <i>et al.</i> , 2000) <i>S. oblongifolia</i> (Silván <i>et al.</i> , 1998) <i>S. pinnata</i> (Flamini <i>et al.</i> , 1994)
Genistina		<i>S. corsica</i> Jord. & Fourr (Bonesi <i>et al.</i> , 2018)
(-)-epicatequina		

Tabla 1. Principales compuestos secundarios aislados del género *Santolina* (cont.)

CUMARINAS		
Nombre	Estructura	Especie y Referencia
Fraxetina (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =R ₃ =OH) Hernearina (R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =OCH ₃) Escopoletina (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ =H) Escopolina (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OGlu, R ₃ =H) Esculetina (R ₁ =R ₂ =OH, R ₅ =H)		<i>S. oblongifolia</i> (Silván <i>et al.</i> , 1998) (Silván <i>et al.</i> , 1996) <i>S. pinnata</i> (Flamini <i>et al.</i> , 1994)
ACETILÉNICOS.		
Nombre	Estructura	Especie y Referencia
R=H (<i>E</i>)-7-(2,4-hexadiinilideno)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dieno R=OH (<i>E</i>)-4-hidroxi-7-(2,4-hexadiinilideno)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dieno		<i>S. chamaecyparissus</i> L. (Lam <i>et al.</i> , 1989) <i>S. rosmarinifolia</i> (Barrero <i>et al.</i> , 1999) <i>S. corsica</i> (Ferrari <i>et al.</i> , 2005) <i>S. oblongifolia</i> (De Pascual Teresa <i>et al.</i> , 1986)
2-[(1<i>E</i>)-4-(tiofen-2-il)but-1-en-3-in-1-il]furano R=H R=COH R=CH ₂ OH		<i>S. chamaecyparissus</i> L. (Lam <i>et al.</i> , 1989) <i>S. corsica</i> Jordan & Fourr (Ferrari <i>et al.</i> , 2005) <i>S. oblongifolia</i> (De Pascual Teresa <i>et al.</i> , 1986)
Santolindiacetileno		<i>S. canescens</i> (Utrilla <i>et al.</i> , 1995)
Capillina		<i>S. africana</i> (Derouiche <i>et al.</i> , 2013) <i>S. rosmarinifolia</i> (Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2001)

**Tabla 1.** Principales compuestos secundarios aislados del género *Santolina* (cont.)

ESTEROLES Y TRITERPENOS		
Nombre	Estructura	Especie y Referencia
Friedelina $R_1, R_2=O$ 3-epifriedelinol $R_1=OH$ $R_2=H$		<i>S. corsica</i> Jordan & Fourr (Ferrari <i>et al.</i> , 2005) <i>S. oblongifolia</i> (De Pascual Teresa <i>et al.</i> , 1986)
Dammarandienol		
Daucosterol (3- β -D-glucósido de β -sitosterilo)		<i>S. chamaecyparissus</i> L (Rios <i>et al.</i> , 1989)

2.3 Características de la especie *Santolina chamaecyparissus* L.

2.3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de esta planta se obtuvo de la base de datos www.tropicos.org; esta clasificación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación botánica de la especie *Santolina chamaecyparissus* L.

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
División	Tracheophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Santolina</i>
Especie	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.



2.3.2 Descripción

Santolina chamaecyparissus L. (Figura 3) es una planta perenne, subarborescente altamente aromática con numerosos tallos leñosos rectos con tamaños que pueden ir desde los 20-75 cm de altura, con hojas estrechas (2-3 mm de ancho) de color verde a tomentosas-blanquecinas muy divididas, pinnatífidas con 4 hileras de lóbulos romos carnosos. Los capítulos son terminales, solitarios de forma globular sobre pedúnculos un poco hinchados en el vértice. Las flores son de color amarillo, tabuladas, gamopétalas y pentámeras (Hyde *et al.*, 2018; Navarro, 2018).



Figura 3. *Santolina chamaecyparissus* L. (Asteraceae)

2.3.3 Nombres comunes

S. chamaecyparissus L. es comúnmente denominada en el área mediterránea como: abrotano hembra, camamilla, cipresillo, guardarropa, hierba de San Juan, lombriguera, manzanillera, manzanilla amarga, manzanilla de Mahón, manzanilla del Pirineo entre otras (Giner-Pons, 2000; De Santayana *et al.*, 2006).

2.3.4 Usos

Esta especie es conocida como "Santolina", un nombre que se deriva de la palabra "Santo" que se refiere a las propiedades medicinales de la hierba. De la



planta las partes que son utilizadas como droga cruda son las inflorescencias, así como los tallos y hojas, para preparar infusiones de administración oral, así como de uso tópico (Dermirci *et al*, 2000).

Es usada en la medicina tradicional mediterránea por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antisépticas, antiespasmódicas, bactericidas y digestivas (Akerreta *et al.*, 2007). También, se utiliza en la medicina herbolaria para tratar diferentes tipos de dermatitis (Da Silva, 2004) y contra el nerviosismo (Calvo *et al.*, 2015) y hepatoprotectora (Tundis *et al.* 2017). Los aceites esenciales de las partes aéreas de esta planta tienen propiedades antifúngicas (Suresh *et al.*, 1997) y se utilizan en perfumería y con fines cosméticos. En México no existen datos de uso tradicional sino ornamental.

2.3.5 Estudios farmacológicos.

Se han realizado diferentes estudios farmacológicos de la especie *S. chamaecyparissus* L., que permiten confirmar, experimentalmente, las propiedades medicinales atribuidas a esta planta.

2.3.5.1 Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora

Durante la respuesta inmune innata, los neutrófilos son la principal línea celular de defensa. Una activación descontrolada de la liberación del contenido granular de éstas células puede destruir el tejido provocando la aparición de desórdenes inflamatorios. De acuerdo con Boudoukha y colaboradores (2016), el tratamiento de neutrófilos con el extracto acuoso y el “extracto polifenólico” (extracto de metanol) de las hojas de *S. chamaecyparissus* causan un efecto importante de inhibición en la liberación de elastasa, inducida por la estimulación de los neutrófilos con formil metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Además, los mismos autores mencionan que el extracto acuoso, a una concentración de 50 µg/mL, presenta un 51.97 ±3.2% de inhibición en la degranulación de los neutrófilos y, el “extracto polifenólico” a la misma concentración, la inhibe completamente. También, se observó que a una concentración de 200 µg/mL del extracto acuoso y “polifenólico” se inhibe la migración quimiotáctica de neutrófilos inducidos por fMLP en 56.41 ±7.3% y 57.71 ±7.44%, respectivamente. Debido a esta disminución en la actividad



de los neutrófilos por los extractos de *S. chamaecyparissus*, la especie puede considerarse como una fuente de inmunomoduladores útiles en patologías que involucren una activación descontrolada de neutrófilos (Boudoukha *et. al.*, 2016).

En estudios *in vivo* mediante un modelo experimental de edema en pata de ratón inducido por fosfolipasa A₂ (PLA₂), el extracto de MeOH, inhibió la formación del edema en un 55% a los 30 min y un 60% a los 60 min; el efecto inhibitorio fue similar al producido por la referencia ciproheptadina de 65 y 66%, respectivamente. Además, el extracto de MeOH inhibe la PLA₂ *in vitro* en un 39% (Sala *et. al.*, 2000).

2.3.5.2 Actividad antiespasmódica.

Para evaluar la actividad espasmolítica de la especie *S. chamaecyparissus* se han realizado diversos estudios en músculo liso de órgano aislado (duodeno de rata, íleon de cobayo, útero de rata y vaso deferente de rata). En todos ellos, los extractos de hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol inhiben las contracciones inducidas por acetilcolina, histamina, oxitocina y noradrenalina, de una forma dependiente de la concentración (Giner *et. al.*, 1986).

Por otra parte, los estudios realizados en el laboratorio de Aguilar y colaboradores permitieron comprobar la actividad relajante de músculo liso aislado de tráquea de cobayo de los extractos de acetona y de hexano y del aceite esencial de las partes aéreas de *S. chamaecyparissus* (Navarro, 2018).

2.3.5.2 Actividad analgésica

En modelos de analgesia térmica (estímulos de 55 °C cada 30 min) un grupo de ratones fueron tratados con los extractos de hexano, cloroformo y acetato de etilo a una dosis de 300 mg/Kg. Todos los extractos orgánicos presentaron un incremento significativo en el tiempo de respuesta al estímulo térmico que disminuyó con el tiempo (Giner *et. al.* 1988).



2.3.5.2 Actividad antimicrobiana

El aceite esencial de las flores de *S. chamaecyparissus* inhibió entre el 73 y el 89% el crecimiento de distintos microorganismos fúngicos como *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* y *Aspergillus fumigatus*, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 500 µg/mL. Para el caso de *Candida albicans* la CMI varía entre los 63 y 125 µg/mL. Por otra parte, el aceite esencial inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) así como de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Citribacter freundii*) siendo *E. faecalis* la más sensible con una zona de inhibición de 26 mm y una CMI en un rango de 0.625 a 10 µg/mL (Salah-Fatnassi *et. al*, 2017, Suresh *et. al*, 1997).

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Cromatografía

Es una técnica que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados selectivamente por una fase móvil (gas o líquido) y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo con la naturaleza de las fases estacionarias y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos (Tabla 3) (FEUM, 2013).

**Tabla 3.** Tipos de cromatografía y sus mecanismos de separación

Cromatografía de Gases	Cromatografía Gas-Líquido (partición)	
	Cromatografía Gas-Sólido (adsorción)	
Cromatografía de Líquidos	Cromatografía plana	Cromatografía en capa delgada (adsorción) Cromatografía en papel (partición)
	Cromatografía en columna	Cromatografía Líquido-Sólido (adsorción) Cromatografía Líquido-Sólido (partición) Cromatografía de intercambio iónico Cromatografía de exclusión

2.4.2 Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina es una técnica particularmente valiosa para la determinación cualitativa de pequeñas cantidades de compuestos o impurezas. Esta técnica es utilizada frecuentemente en la evaluación de plantas medicinales y de sus preparaciones (FHEUM, 2013). Es una forma de cromatografía de adsorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido uniformemente sobre una superficie plana, la cual presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente. La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. En la Figura 4 se ilustran los componentes de la cromatografía en capa fina.

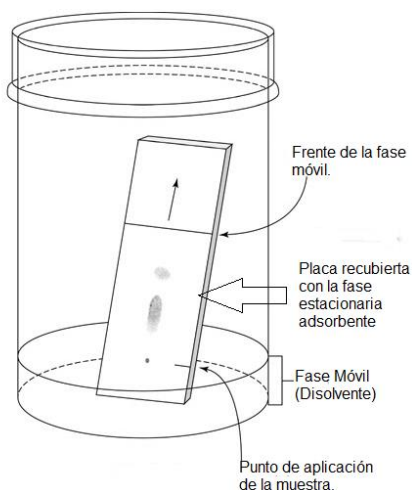


Figura 4. Componentes de la cromatografía en capa fina.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en su identificación. Esta característica se conoce con el nombre de R_F (relación de frentes) y representa la distancia recorrida por el compuesto, con relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilarán entre 0 y 1 (FEUM, 2013). El cálculo de la relación de frentes se muestra a continuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un componente desde su origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

2.4.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o conocida por sus siglas en inglés como HPLC, es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma



de picos simétricos con un tiempo de retención característico (FEUM, 2013). En la Figura 5 se ilustran los componentes de un sistema cromatográfico.

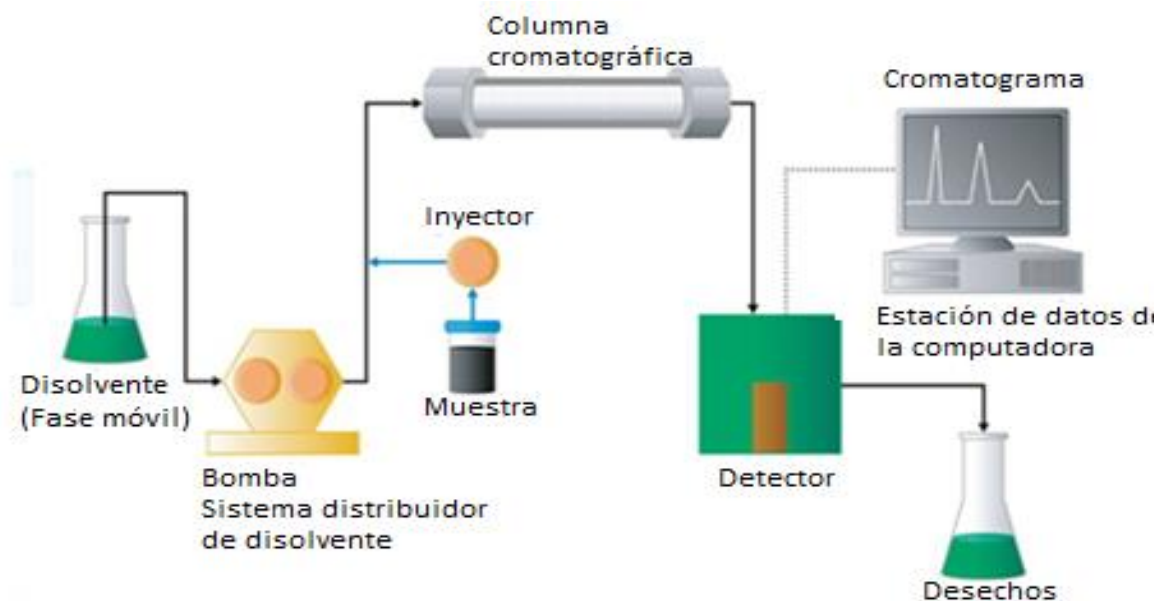


Figura 5. Componentes del sistema cromatográfico de líquidos.

[En “How Does High Performance Liquid Chromatography Work?” por Waters® (2019). http://www.waters.com/waters/en_GB/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_GB. Recuperado el día 4 de diciembre de 2018]

La aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución es la estimación cualitativa y cuantitativa de la composición particular de muestras obtenidas provenientes de diferentes fuentes. Los resultados del análisis cualitativo son evaluados con base en la comparación del tiempo de retención de un estándar de referencia con los tiempos de retención de los compuestos de la muestra analizada. La estimación cuantitativa es realizada empleando una curva estándar generada en un análisis previo, con un estándar de referencia, inyectado a diferentes concentraciones y comparando la relación directa de las respuestas (área o altura del pico) entre el estándar de referencia y la muestra a analizar (Ramesh, 2017; Giambelli *et. al.*, 2018; Tomás, 2010).



2.4.4 Espectrofotometría visible y ultravioleta.

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha esencialmente monocromática. La Ley de Lambert-Beer establece que hay una relación lineal entre la absorción de luz a través de una sustancia y la concentración de la misma. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta del ultravioleta hasta el visible del espectro (200 a 600 nm). En la Figura 6 se ilustran los componentes del sistema de espectrofotometría UV-Vis.

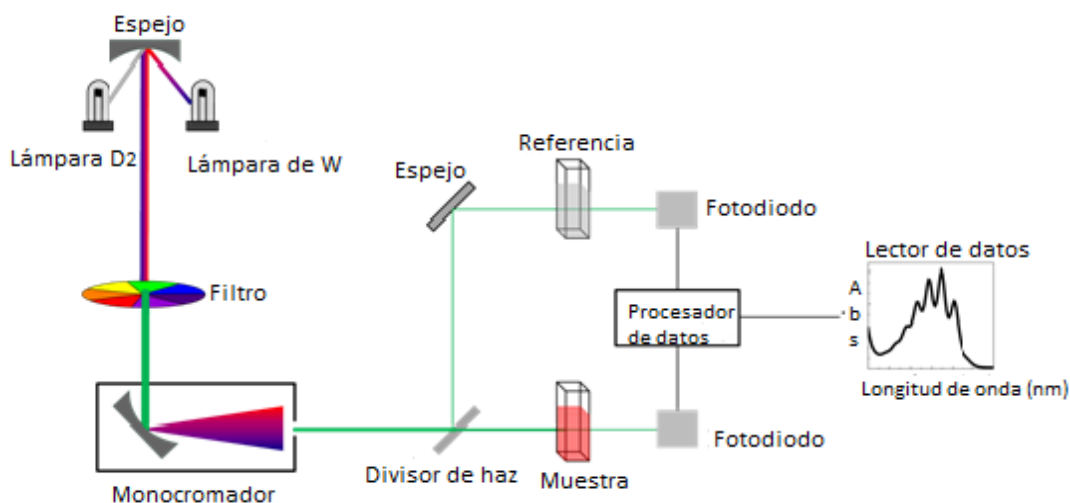


Figura 6. Componentes del sistema de espectrofotometría UV-Vis.

[En “ESPECTROSCOPIA UV-Visible (UV-Vis), por Aguirre, A. (2018).
<https://wordpress.com/2018/01/29/espectroscopia-uv-visible-uv-vis/> .
Recuperado el día 4 de diciembre de 2018]

En general, los espectros ultravioleta y visible de una sustancia, no tienen un alto grado de especificidad, sin embargo, son adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias constituyen un medio útil de identificación. Un criterio útil para las pruebas de identificación en la región ultravioleta consiste en tomar en consideración el cociente de los valores de absorbancia en dos máximos. Las valoraciones cuantitativas requieren normalmente de la comparación de la absorbancia producida por la solución de la



sustancia problema con la absorbancia de una solución de la sustancia de referencia o cuando las valoraciones se hacen con gran frecuencia puede omitirse el uso de una sustancia de referencia y emplear en cambio una curva patrón adecuada preparada con la sustancia de referencia correspondiente (FEUM, 2013).

2.5 Pruebas de Pureza.

Estas pruebas proporcionan información sobre la presencia de contaminantes en una droga cruda de plantas medicinales.

2.5.1 Cenizas totales (MGA-FH 0060)

El método de cenizas totales está diseñado para medir la cantidad total de materia que queda después de la ignición. Esto incluye tanto a las “cenizas fisiológicas”, que proceden del tejido mismo de las plantas, como a las “cenizas no fisiológicas”, que son el residuo de la materia extraña (ejemplo arena y tierra) adherida a la superficie de la planta (FHEUM, 2013).

2.5.2 Material extraíble (MGA-FH 0070)

Este método determina la cantidad de constituyentes activos extraídos con disolventes a partir de una cantidad dada de material de planta medicinal. Se emplea para aquellos materiales que no tengan descritos aún ensayos biológicos o químicos adecuados (FHEUM, 2013).

2.5.3 Metales pesados (MGA-FH 0160)

La contaminación de material de plantas medicinales con arsénico y metales pesados puede ser atribuida a muchas causas, incluyendo la contaminación ambiental y trazas de plaguicidas (FHEUM, 2013).



2.6 Cuantificación de polifenoles en extractos vegetales

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales y desempeñan diversas funciones fisiológicas. El análisis del contenido de compuestos polifenólicos en un extracto obtenido de plantas y/o vegetales es importante debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan (García *et al.*, 2015).

2.6.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

El ensayo de Folin-Ciocalteu se utiliza para cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos vegetales. Se basa en la reacción que ocurre entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul que se puede determinar espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico, en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos origina un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es proporcional al contenido de polifenoles. En la Figura 7 se muestra la reacción (García *et al.*, 2015).

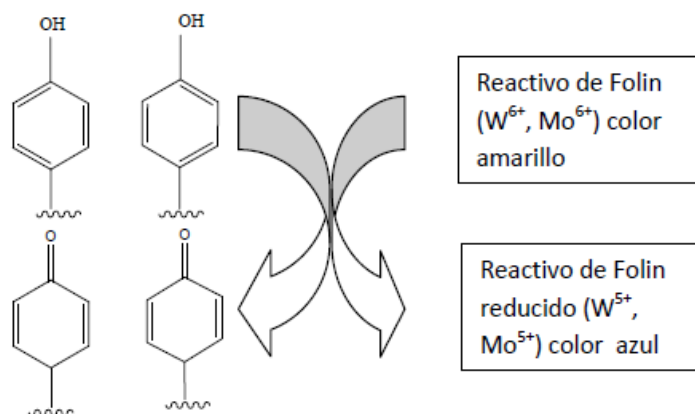


Figura 7. Reacción de oxidación del reactivo de Folin y el grupo fenol.



2.6.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método con tricloruro de aluminio

El ensayo general más empleado para la cuantificación de flavonoides totales en extractos naturales es el método con AlCl_3 (Fernández *et al.*, 2012); este método se basa en la cuantificación espectrofotométrica del complejo que se forma entre el aluminio y los flavonoides presentes. Esta reacción da lugar a una coloración amarilla que es susceptible de ser determinada entre 410-423 nm (Khoddami *et al.*, 2013). En la Figura 8 se muestra la formación del complejo producido.

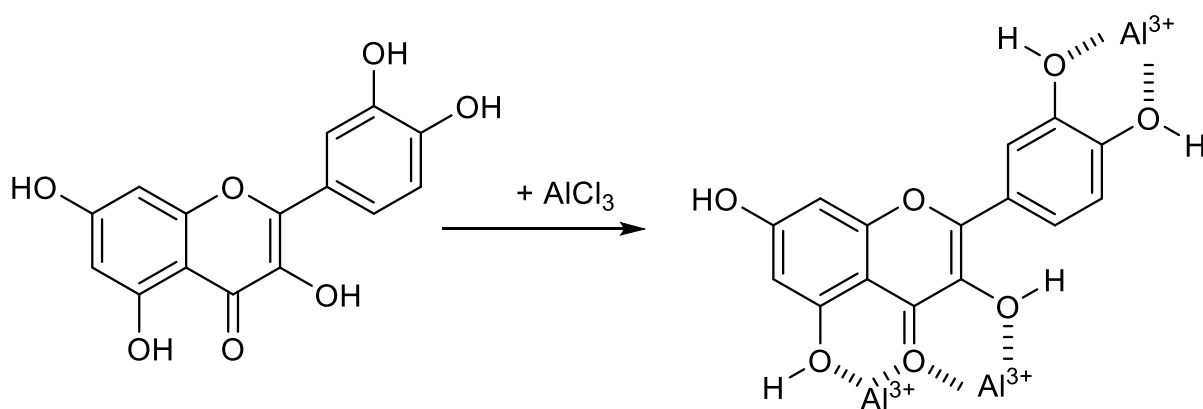


Figura 8. Complejo formado entre un flavonoide (p. ej. quercetina) y las sales de aluminio



3. JUSTIFICACIÓN

Santolina chamaecyparissus L. es una planta utilizada por comunidades de la zona mediterránea en Europa. En nuestro país fue introducida y su delimitación geográfica es amplia en el centro de México, casi siempre como planta ornamental. La historia de uso tradicional de esta planta en la zona mediterránea ha motivado la realización de estudios químicos y farmacológicos con la especie mexicana; por lo tanto, se encuentra justificado el análisis científico que permita compilar la información técnica y científica necesaria para integrar una monografía útil en el desarrollo de productos herbolarios.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar pruebas para establecer parámetros de identidad cromatográfica, de pureza y de valoración para la planta medicinal *Santolina chamaecyparissus* útiles en el control de calidad de la droga cruda.

4.2 Objetivos particulares

- Confirmar la identidad de los compuestos mayoritarios, presentes en los extractos de *Santolina chamaecyparissus* L., con la finalidad de establecer los compuestos marcadores de la planta.
- Desarrollar las condiciones cromatográficas óptimas (CCF y HPLC) para la detección y resolución del contenido metabólico secundario de la especie vegetal.
- Determinar los porcentajes de cenizas totales, material extraíble y metales pesados (As, Cd, Cu, Hg y Pb) en la especie medicinal.
- Determinar el contenido de fenoles y de flavonoides totales



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material

5.1.1 Instrumental de laboratorio

- Matraz bola de 50 mL
- Pipetas graduadas (1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL)
- Pipeta volumétrica (2.0 mL y 5.0 mL)
- Matraz volumétrico (1.0 mL, 10.0 y 1.0 L)
- Tubos Falcon de 15 mL
- Mortero con pistilo
- Crisoles
- Cápsulas de porcelana
- Desecador
- Placas de 96 pozos
- Micropipetas de marca RAININ® Pipet-Lite Magnetic-Assist Pipette (2-20 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L)
- Acrodiscos de GPH con tamaño de poro de 0.45 μ m
- Columna analítica para fase reversa Waters, Symmetry™ C18, tamaño de partícula 5 μ m, de dimensiones 250 x 4.6 mm

5.1.2 Disolventes, soluciones y reactivos

- Acetona grado RA
- Acetonitrilo grado HPLC
- Acetato de etilo grado RA
- Ácido fórmico al 80% m/v
- Agua grado Milli Q
- Diclorometano grado RA
- Hexano grado RA
- Metanol grado RA
- Metanol grado HPLC



- Pectolinaringenina
- Solución reveladora de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ al 1% en H_2SO_4 2N
- Solución reactiva de tricloruro de aluminio (AlCl_3) 2%
- Solución reactiva de Folin-Ciocalteu 1 N
- Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 8%

5.1.3 Equipo utilizado

- Balanza analítica OHAUS Pioneer
- Parrilla de calentamiento
- Baño de ultrasonido marca Sonicor
- Centrífuga marca Labnet modelo HERMLE Z200 A
- Rotaevaporador Büchi RE 111
- Lámpara de luz UV UVMS-38 EL Series 3UV Lamp UVP visualizando a longitudes de onda de 254 y 365 nm
- Cromatógrafo de líquidos compuesto de dos bombas Waters 515 HPLC Pump, con inyector automático Jasco AS-20055 Plus y detector dual de absorbancia UV/Vis Waters 2487
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum RX 1 FTIR para la determinación de los espectros en el UV e IR.
- Espectrómetros de alta resolución Varian Unity Inova, utilizando como disolvente CD_3OD y como referencia interna TMS para el registro de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C a 600 y 125 MHz.
- Espectrómetro de masas con un aditamento Direct Sample Analysis (DSA) marca Perkin-Elmer, Waltham, MA; con un ionizador AxiON TOF 2 Perkin-Elmer utilizando la técnica acoplada CG-EM y de ionización por APCII para la obtención de los espectros de masas.
- Las cuantificaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Epoch (Biotech) UV-Vis para microplacas



5.2 Recolección e identificación del material vegetal

Para este estudio se emplearon las partes aéreas de la planta *Santolina chamaecyparissus* L., colectadas en el Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, UNAM, CDMX, en enero de 2018. La identificación botánica fue realizada por el Dr. J. L. Villaseñor Ríos en el Instituto de Biología de la UNAM. La identificación botánica fue realizada por comparación de la planta en estudio con un espécimen depositado en el Herbario MEXU de la UNAM; el ejemplar colectado también fue depositado en el mismo Herbario con No. de Folio 1500938 (Figura 9). Un ejemplar de referencia se encuentra depositado en el laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química con el número de referencia SC-14-06-16.



Figura 9. Ejemplar de *Santolina chamaecyparissus* L. colectado y depositado en el Herbario MEXU de la UNAM



5.3 Extracción

5.3.1 Deseccación y fragmentación

El material recolectado se sometió a secado al aire libre y a la sombra. Posteriormente, fue molido en un mortero hasta obtener un tamaño de partícula menor a 2 mm.

5.3.2 Obtención del extracto de acetona

En un tubo Falcon de 15 mL se pesaron 300 mg de material vegetal seco y molido. Enseguida, se adicionaron 3 mL de acetona y se sometió a la acción del sonicador durante 15 min; posteriormente, se centrifugó por 15 min a 3500 rpm. El sobrenadante se transfirió a un matraz bola de 50 mL. El procedimiento se repitió 3 veces combinándose los respectivos sobrenadantes y se concentró hasta sequedad.

5.4 Pruebas de identidad

5.4.1 Determinación estructural de hispidulina (1) por RMN

De una fracción de un extracto de acetona de *Santolina chamaecyparissus* obtenida por Navarro en 2018, precipitó un sólido amarillo que no había sido caracterizado (Sca17); en el presente trabajo mediante el análisis de los datos de RMN de ^1H y de ^{13}C de este compuesto, fue identificado como 4',5, 7-trihidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina, 1).

5.4.2 Análisis del extracto de acetona por cromatografía en capa fina

5.4.2.1 Preparación de la muestra

El extracto seco (47 mg) obtenido del punto 5.3.2 se disolvió en 1.0 mL de acetona.

5.4.2.2 Preparación de las soluciones de referencia

Se pesaron por separado, 1 mg de los flavonoides de referencia previamente aislados de la especie (hispidulina, 1 y pectolinarigenina, 2) y se disolvieron independientemente en 1.0 mL de acetona. Estas soluciones se utilizaron en el ensayo por CCF.



5.4.2.3 Condiciones cromatográficas

Para el análisis del extracto de acetona por CCF se utilizó como fase estacionaria una placa cromatográfica TLC Silica gel 60 F254 Merck de 5 x 7 cm; se aplicó un volumen de 20 μ L de la muestra del extracto a analizar y 10 μ L de cada una de las soluciones de referencia a una distancia de 5 mm por encima de la base de la cromatoplaque, en bandas de 8 mm de ancho, con una distancia de separación de 5 mm entre cada una de las bandas. La fase móvil consistió de un sistema binario de hexano:AcOEt (60:40). La detección se realizó con luz UV a 254 nm y con solución reveladora de sulfato cérico amoniacal seguido de calentamiento a 100 °C en parrilla eléctrica.

5.4.3 Análisis por CLAR del extracto de acetona.

5.4.3.1 Preparación de la muestra

El extracto seco obtenido del punto 5.3.2 se disolvió en 2.0 mL de metanol grado HPLC y se sometió a sonicación para su máxima disolución; posteriormente, se filtró a través de un acrodisco de tamaño de poro de 0.45 μ m.

5.4.3.2 Preparación de las soluciones de referencia

Se prepararon de manera independiente soluciones de referencia de **1** y **2** (0.5 mg/mL) en metanol grado HPLC. Se filtraron a través de un acrodisco de tamaño de poro de 0.45 μ m en un tubo de muestra.

5.4.3.3 Condiciones cromatográficas

El análisis por HPLC de los compuestos mayoritarios (**1** y **2**) del extracto de acetona se realizó individualmente para cada uno y posteriormente en forma conjunta. **1** y **2** se consideraron en este trabajo compuestos de referencia. La Tabla 4 contiene las condiciones cromatográficas que se desarrollaron para cada uno de los casos.



Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la separación de **(1)** hispidulina y **(2)** pectolinarigenina

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Individual (1) hispidulina (2) pectolinarigenina	Columna: Columna analítica para fase reversa Symmetry™ C18, tamaño de partícula 5µm, de dimensiones 250 x 4.6 mm. Temperatura de análisis: 20 °C Fase móvil: Sistema binario A= ACN, B= H ₂ O (0.1% de ácido fórmico) Modo de elución: Isocrático (1) : (A= 52% y B= 48%) (2) : (A= 40% y B= 60%) Flujo de la fase móvil: 1 mL/min Volumen de inyección: 20 µL Detección: 315 nm Tiempo de corrida (1) : 30 min (2) : 80 min
Conjunta	Temperatura de análisis: T.A. Fase móvil: Sistema binario A= ACN, B= H ₂ O (0.1% de ácido fórmico) Modo de elución: Gradiente (0-10 min A= 40% y B= 60%, 10-30 min A= 52% y B= 48%) Flujo de la fase móvil: 1 mL/min Volumen de inyección: 20 µL Detección: 315 nm Tiempo de corrida: 30 min



5.5 Pruebas de pureza

5.5.1 Determinación de cenizas totales.

Se utilizaron crisoles puestos a peso constante, con un tiempo de secado en estufa a 100 °C. Se colocaron 3 g de material vegetal seco y molido en cada crisol. El material vegetal fue incinerado con un mechero de bunsen y posteriormente, en una mufla a una temperatura de 550 °C durante una hora y media. Al término de este periodo de incineración se enfriaron los crisoles con la muestra en un desecador y se pesó. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado.

5.5.2 Determinación de material extraíble

Se realizó la extracción empleando una mezcla de disolventes de metanol y diclorometano en una proporción 1:1. Esta prueba se realizó por triplicado.

En un matraz bola de 50 mL se colocaron 4 g de material vegetal seco y molido y se adicionaron 100 mL de la mezcla de disolventes. El proceso de extracción se realizó con agitación constante durante 6 horas seguido de 24 h y de reposo. La solución resultante se filtró. 25 mL del filtrado se transfirieron a una cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante; la solución se evaporó a sequedad en baño de agua y se secó a 105 °C, en una estufa, durante 6 horas. Finalmente, se enfrió en un desecador durante 30 min y se pesó.

5.5.3 Determinación de Metales pesados (As, Cd, Cu, Hg y Pb)

En esta prueba se analizó la presencia de metales pesados indeseables en la droga cruda. Para ello, se utilizó el material obtenido en la prueba de cenizas totales. La determinación se realizó mediante un análisis elemental por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido.



5.6 Pruebas de composición

5.6.1 Determinación del contenido de fenoles totales.

5.6.1.1 Curva patrón de ácido gálico

Para la construcción de la curva patrón se prepararon las siguientes soluciones: Solución stock de ácido gálico (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 16 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich) se disolvieron en 20.0 mL de agua grado MilliQ

Solución acuosa de carbonato de sodio al 8% (m/v). 800 mg de Na_2CO_3 se disolvieron en 10.0 mL de agua grado MilliQ

Solución del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Diluir 5.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma-Aldrich) a un volumen final de 10.0 mL con agua grado MilliQ.

En una multiplaca de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas de la solución stock de ácido gálico para obtener un rango de concentraciones de 0.77 a 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 20 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se mantuvo en la oscuridad durante 8 min. Enseguida, se adicionaron 80 μL de Na_2CO_3 al 8% (m/v) y se mantuvo en reposo, en la oscuridad, por una hora. Finalmente, se determinó la absorbancia a 760 nm.

5.6.1.2 Cuantificación de fenoles totales en el extracto de acetona

En primer lugar, se preparó una disolución del extracto seco de acetona a una concentración de 1 mg/mL en metanol. En una placa de 96 pozos se colocaron 20 μL de la disolución anterior y 80 μL de agua MilliQ; a partir de la mezcla anterior se realizaron diluciones seriadas para ajustar los valores de concentración dentro del intervalo de linealidad de la curva patrón (apartado 5.6.1.1; considerando 5 niveles de concentración). A cada pozo se adicionaron 10 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mantuvo por 8 min en la oscuridad. Enseguida, se adicionaron 80 μL de Na_2CO_3 al 8% (m/v) y se mantuvo en reposo por una hora en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo se determinó la lectura a 760 nm. El análisis de este extracto se realizó por triplicado.



5.6.2 Determinación del contenido de flavonoides totales

5.6.2.1 Curva patrón de quercetina.

Para la elaboración de la curva patrón se prepararon las siguientes soluciones: Solución stock de quercetina a una concentración de 0.2 mg/mL (2 mg de quercetina (Sigma-Aldrich) en 10.0 mL en metanol)

Solución de AlCl_3 al 2% (m/v) (200 mg de AlCl_3 (J.T. Baker) en 10.0 mL de metanol).

En una placa de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas de la solución stock para obtener un rango de concentraciones de 0.0031 a 0.05 mg/mL. 100 μL de la solución de tricloruro de aluminio al 2% (m/v) se adicionó a cada uno de los pozos y se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Finalmente, se registró la absorbancia a 420 nm.

5.6.2.2 Cuantificación de flavonoides totales en el extracto de acetona.

100 μL del extracto de acetona (inciso 5.6.1.2) se diluyeron con 100 μL de metanol. Enseguida, se realizaron diluciones seriadas para asegurar que la concentración de la muestra se encontrara dentro del rango de linealidad de la curva patrón. Finalmente, 80 μL de la dilución seleccionada se colocó en cada pozo y se agregaron 100 μL de solución de AlCl_3 al 2% (m/v). La mezcla de reactivos se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Por último, se registró la absorbancia a 420 nm. El análisis se realizó por triplicado.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cumplir el objetivo general de este trabajo de investigación se siguió la siguiente estrategia: en primer lugar, se realizó la determinación botánica de la especie bajo estudio; a continuación, se obtuvo el extracto de acetona de la materia prima como matriz de trabajo. Posteriormente, se desarrollaron las siguientes pruebas:

- 1) Identidad mediante CCF y HPLC para detectar la presencia de los compuestos marcadores hispidulina (1) y pectolinaringenina (2).
- 2) Pruebas de pureza tales como material extraíble, cenizas totales, metales pesados.
- 3) Pruebas de valoración mediante la cuantificación de fenoles totales y flavonoides por métodos espectrofotométricos. También, se desarrolló un método por HPLC que determina las condiciones analíticas para detectar los dos compuestos considerados como marcadores en la matriz de trabajo.

A continuación, se describen los resultados obtenidos.

6.1 Extracción

6.1.1 Porcentaje de rendimiento del extracto de acetona.

La extracción se realizó utilizando acetona como disolvente. Esta extracción permitió la obtención de los componentes polares y medianamente polares dentro de los cuales se encuentran los compuestos marcadores. Para obtener el rendimiento se tomaron en cuenta las masas de material vegetal seco utilizado para cada una de las determinaciones y se relacionó con el peso obtenido del extracto seco por el procedimiento que se describe en el punto 5.3.2. En la Tabla 5 se muestran los rendimientos promedio obtenidos:



Tabla 5. Valores de rendimientos obtenidos de las extracciones con acetona para los diferentes análisis.

	Peso de material vegetal seco(g)	Peso del extracto seco(g)	% Rendimiento
Análisis por CCF	0.3002	0.0462	15.4
Análisis por HPLC	0.3000	0.0458	15.3
Cuantificación de fenoles y flavonoides totales	0.3001	0.0471	15.7
		Promedio de extracción	15.5
		SD	0.216
		%CV	0.01

El rendimiento promedio obtenido de las tres extracciones es de 15.5%. Para esta especie se han reportado en la literatura rendimientos desde 1.75 %, 9.71%-16.25% utilizando disolventes como metanol y agua, respectivamente (Boudoukha, 2015). Se observó que en el extracto de acetona es posible identificar mediante CCF y HPLC los dos compuestos considerados marcadores (**1** y **2**) para esta especie.

6.2 Prueba de identidad

6.2.1 Determinación estructural de la hispidulina (**1**) por RMN

El compuesto aislado de la fracción Sca 17 (Navarro, 2018), cuya estructura no había sido previamente establecida, es un sólido amarillo con punto de fusión 234-238 °C. Con base en las constantes espectroscópicas indicadas en la Tabla 6 el producto fue caracterizado como la 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina) (Figura 10). A continuación, se describen los detalles más relevantes que permitieron establecer su estructura molecular.

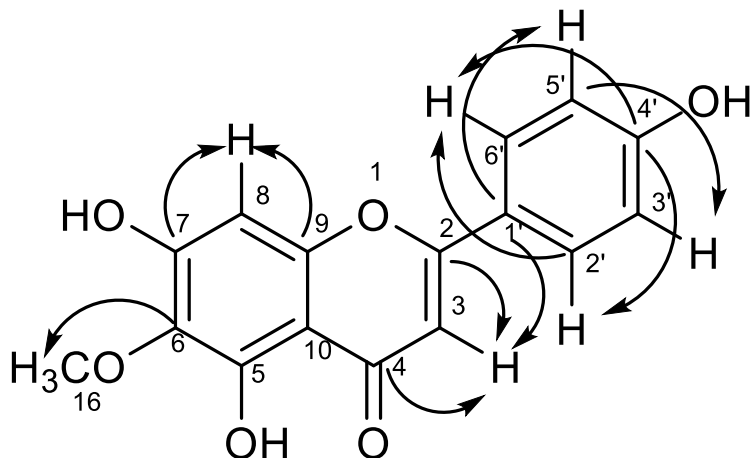


Figura 10. Estructura de la 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina) y principales correlaciones observadas en el espectro HMBC

Tabla 6. Datos espectroscópicos de la hispidulina (1).

Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
UV (Figura A1)	λ _{máx} (nm): 214, 272, 333
IR (Figura A2)	ν _{máx} (pastilla) cm ⁻¹ : 3331, 3090, 2940, 1649, 1606, 1463, 1361, 1226, 1174, 1109, 1090, 997
RMN ¹ H (Figura A4)	600 MHz, CD ₃ OD, δ _H = 7.83 (2H, d, J=8.64 Hz, H-2' y H-6'), 6.89 (2H, d, J= 8.7Hz, H-3' y H-5'), 6.57 (1H, s, H-3), 6.54 (1H, s, H-8), 3.86 (3H, s, H-16).
RMN ¹³ C (Figura A5)	125 MHz, CD ₃ OD, δ _C = 182.3 (C-4), 165.0 (C-2), 161.4 (C-4'), 157.6 (C-7), 153.3 (C-5), 152.7 (C-9), 131.6 (C-6), 128.1 (C-2' y 6'), 121.9 (C-1'), 115.6 (C-3' y C5'), 104.3 (C-3), 102.0 (C-10), 94.0 (C-8), 59.5 (C-16)
EM (Figura A3)	m/z (int.rel): 301 [M ⁺] (4), 300 (8), 290 (14), 286 (6), 260 (8), 195 (33), 149 (27), 139 (5), 138 (68), 123 (30), 121 (13), 110 (19), 94 (14), 83 (25), 80 (4), 69 (8), 67 (20), 56 (8)



El compuesto presentó las siguientes características espectroscópicas y espectrométricas:

1. Tres bandas de absorción intensa en el espectro en el UV (214, 272 y 333 nm) características de los metabolitos de tipo flavona (Figura A1)
2. Absorciones en el IR para grupos -OH en 3331 cm^{-1} , grupos C-H y C-C aromáticos en 3090 y 1606 cm^{-1} , grupos metilo en 2940 y 1463 cm^{-1} , carbonilo de cetona α,β -insaturado en 1649 cm^{-1} y absorciones de C-O en 1174 , 1109 y 997 cm^{-1} (Figura A2).
3. Se observaron 16 señales en el espectro de RMN ^{13}C ; una de ellas corresponde a un grupo metoxilo en $\delta_{\text{C}} 59.5$ (C-16). Las 15 señales restantes fueron asignadas a carbonos sp^2 , 6 agrupadas en la zona de carbonos aromáticos base de oxígeno ($\delta_{\text{C}} 165.0, 153.3, 131.6, 157.6, 152.7, 161.4$ asignados a los carbonos C-2, C-5, C-6, C-7, C-9 y C-4', respectivamente); 6 carbonos aromáticos protonados, dos de ellos con el mismo desplazamiento químico ($\delta_{\text{C}} 104.3, 94.0, 128.1, 128.1, 115.6$ y 115.6 asignados a los carbonos C-3, C-8, C-2', C-6', C-3' y C-5', respectivamente); un carbonilo de cetona α,β -insaturado ($\delta_{\text{C}} 182.3$, C-4) y dos carbonos aromáticos cuaternarios ($\delta_{\text{C}} 121.9$ y 102.0 , C-1' y C-10). En el espectro de RMN ^1H se observaron señales para hidrógenos en carbonos sp^2 de un sistema A_2X_2 ($\delta_{\text{H}} 7.83$ y 6.89 , integrando para dos hidrógenos cada una, asignadas a H-2', H-6' y H-3', H-5', respectivamente) y dos hidrógenos singulete ($\delta_{\text{H}} 6.57$ y 6.54 , asignados a H-3 y H-8, respectivamente); también se observó una señal en $\delta_{\text{H}} 12.82$ correspondiente a un hidrógeno formando un puente con el oxígeno de un carbonilo ($\delta_{\text{C}} 182.3$). La integración de los resultados anteriores concuerda con la estructura de un flavonoide monometoxilado en la posición 6 por las correlaciones observadas en los espectros HSQC, COSY, HMBC y NOESY (Figuras A6 a A9).

La comparación de los datos obtenidos coincidió con los reportados para la estructura de la 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina) (Chacon-Morales *et. al.*, 2013; Osei-Safo *et. al.*, 2009).



6.2.2 Análisis por cromatografía en capa fina del extracto de acetona

Con la finalidad de corroborar la presencia de los flavonoides **1** y **2** aislados del extracto de acetona (uno en un experimento previo, pectolinarigenina (**2**) y otro en el presente trabajo, hispidulina (**1**)) se realizó una cromatografía en capa fina del extracto junto con los productos naturales de referencia. En la Figura 11 se muestra la cromatoplaqa desarrollada para el extracto de acetona vista en el UV y revelada con el agente cromógeno.

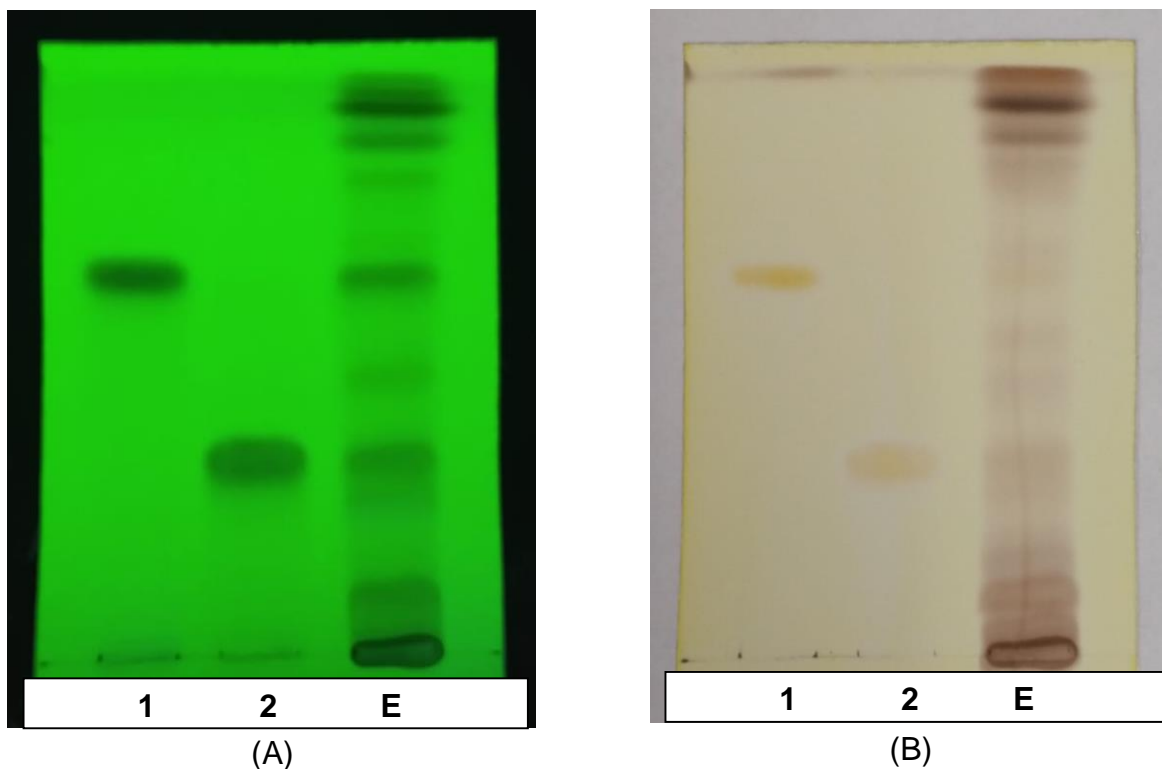


Figura 11. Cromatoplaqa obtenida del análisis del extracto de acetona **E** y de los compuestos **1**- pectolinarigenina y **2**- hispidulina. Sistema de elución [hexano: AcOEt (60:40)]. Reveladores: (A) UV 254 nm y (B) Solución reveladora de sulfato cérico amoniacal.

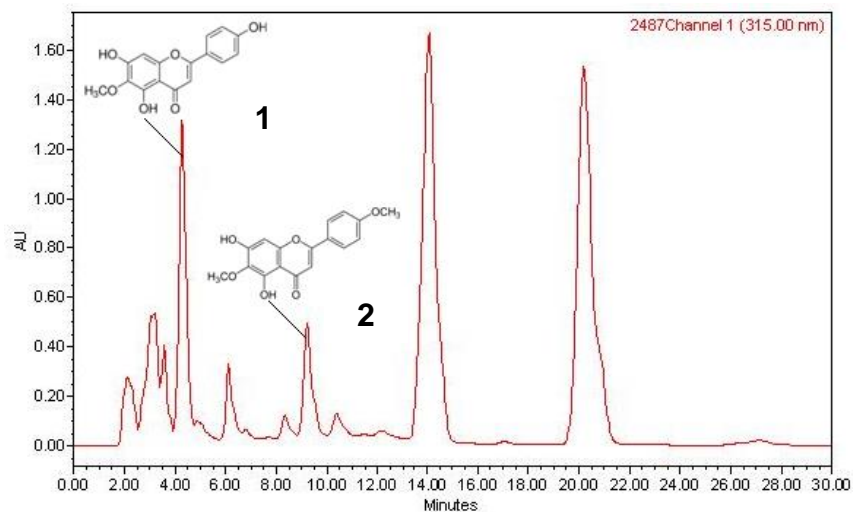
En la placa cromatográfica se observó que el extracto de acetona contiene dentro de su composición química a los dos flavonoides. Se obtuvo la relación de frentes (R_f) para cada uno de ellos, el cual fue de 0.64 para pectolinarigenina (**2**) y 0.31 para hispidulina (**1**). Se ha descrito en la literatura la presencia de diferentes flavonoides en la especie *S. chamaecyparissus* como la nepetina, jaceosidina así



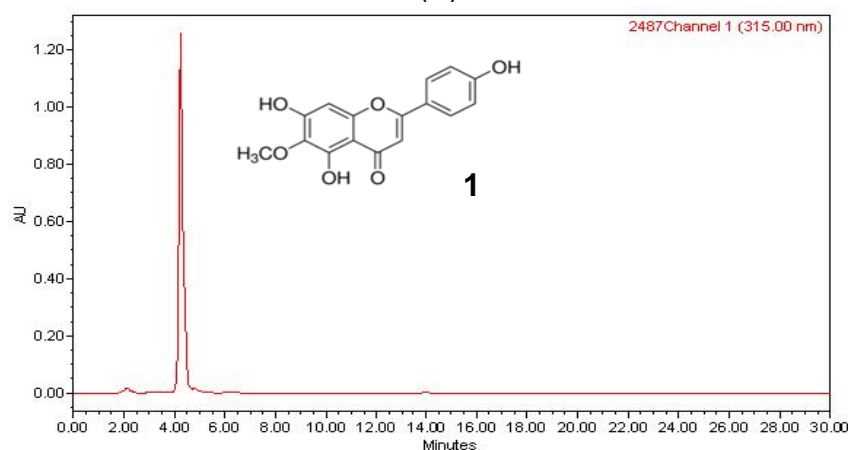
como de pectolinarigenina (**2**) e hispidulina (**1**) (Becchi, 1980), por lo que se confirma la presencia de estos últimos dos flavonoides en la especie analizada.

6.2.3 Análisis por HPLC del extracto de acetona.

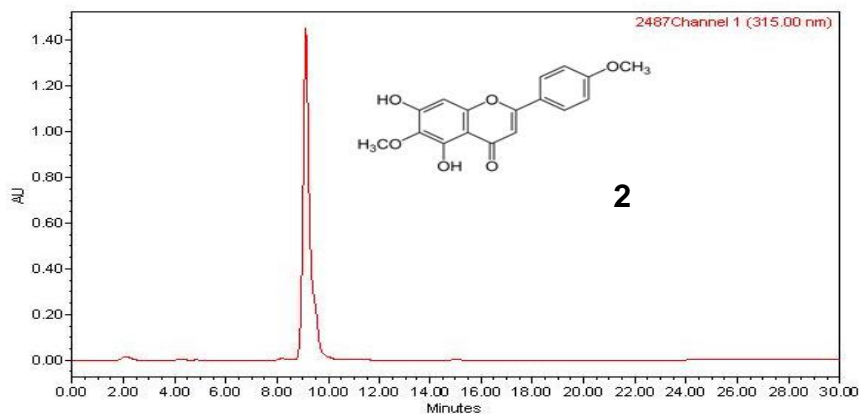
Para establecer los parámetros cromatográficos y determinar los tiempos de retención de la hispidulina y de la pectolinarigenina, se realizaron inyecciones del extracto llevando a cabo modificaciones al gradiente de la fase móvil hasta obtener una condición de elución en la que se observó una separación de picos cromatográficos adecuada. Una vez establecidas estas condiciones se inyectaron los compuestos de referencia (**1** y **2**), se obtuvo su tiempo de retención y se comparó con el de los componentes dentro del perfil cromatográfico obtenido del extracto para identificar el pico característico de cada uno de ellos. En la Figura 12 se muestra el perfil cromatográfico del extracto de acetona y los tiempos de retención de las referencias a estas condiciones, en donde se observa que el pico característico de la pectolinarigenina (**2**) presenta una mejor resolución que el pico de la hispidulina (**1**) en el extracto.



(A)



(B)



(C)

Figura 12. Cromatogramas obtenidos con las primeras condiciones isocráticas predeterminadas: [0-30 min:(A=52% y B=48%)]. (A) Extracto de acetona de *S. chamaecyparissus*. (B) Referencia de **(1)** hispidulina ($t_R=4.2-4.4$ min) y (C) Referencia de **(2)** pectolinarigenina ($t_R=9.3-9.5$ min).



Para mejorar la resolución del pico de la hispidulina (**1**) y obtener su tiempo de retención exacto, se modificó el gradiente de la fase móvil para determinar las condiciones en sistema de elución isocrático. En la Figura 13 se muestra el cromatograma después de las modificaciones realizadas.

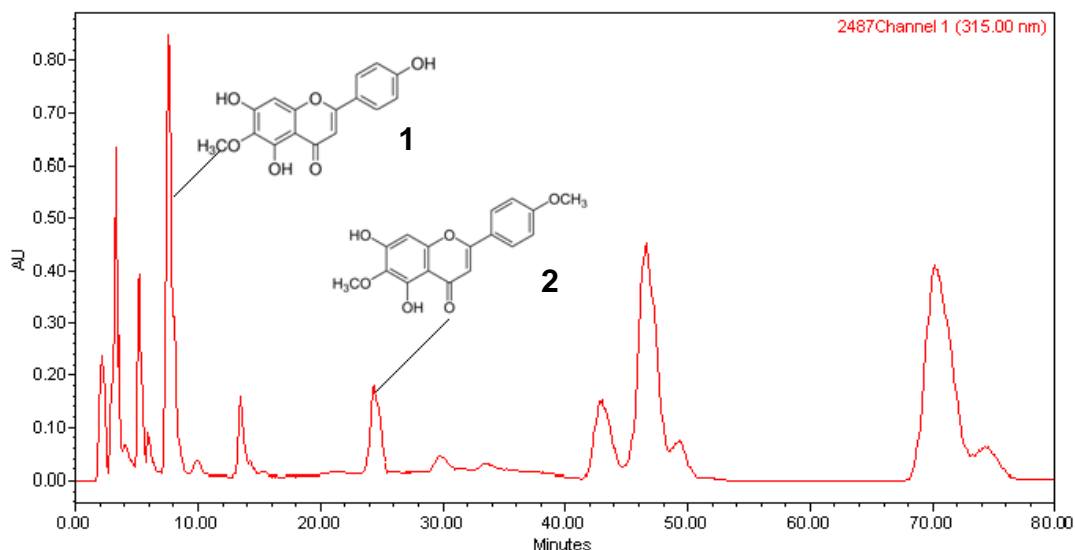


Figura 13. Cromatograma obtenido del extracto de acetona con las segundas condiciones isocráticas establecidas [0-80 min:(A=40% y B=60%)]

Durante este análisis, el tiempo de corrida tuvo que ampliarse debido a que el cambio de polaridad en la fase móvil hizo que algunos componentes requiriesen más tiempo para su elución, detección y registro dentro del cromatograma. Se observó que la resolución de la señal cromatográfica de la hispidulina (**1**) mejora, pero también se observó coleo del pico característico de la pectolinarigenina (**2**).

Finalmente, con el objetivo de disminuir el tiempo de corrida, conservar la resolución de la señal de la hispidulina (**1**) y disminuir el coleo de la señal de la pectolinarigenina (**2**), se optó por utilizar el modo de elución en gradiente. En la Figura 14 se muestra el cromatograma del extracto de acetona con las modificaciones anteriormente descritas.

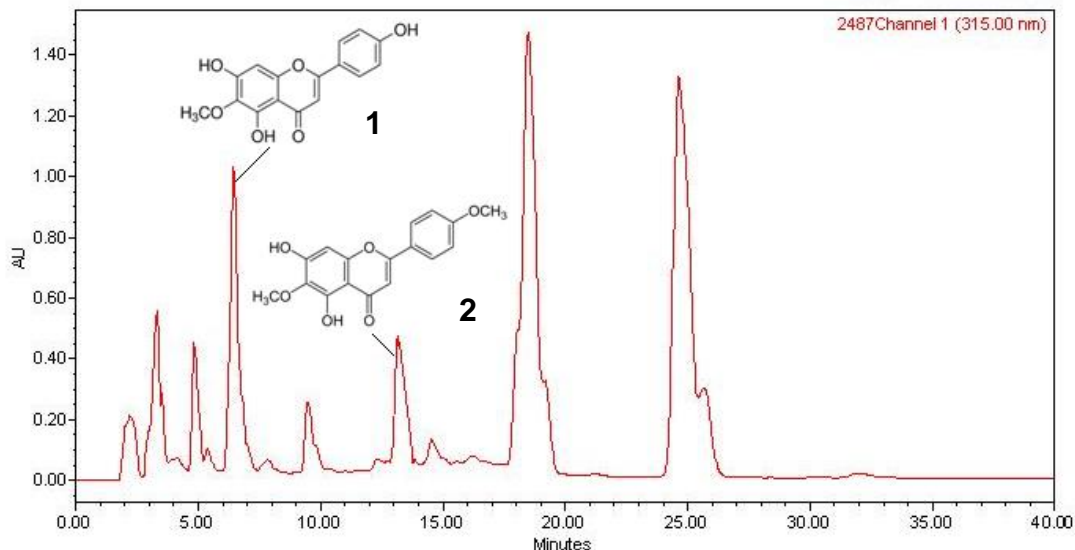


Figura 14. Cromatograma del extracto de acetona obtenido al modificar el modo de elución al modo de gradiente [0-10 min:(A=40% y B=60%), 10-30 min:(A=52% y B=48%)]

Se observó que, con estas condiciones, el tiempo de corrida disminuyó a 30 min (intervalo óptimo en el que aparecían las dos señales características para ambos flavonoides y en el cual se observó que todas las señales eran registradas dentro del cromatograma), la resolución del pico de la hispidulina se mantuvo y el coleo del pico de la pectolinarigenina disminuyó

6.3 Pruebas de pureza.

Los siguientes análisis establecen valores preliminares para algunas pruebas de pureza. No obstante es necesario realizar el análisis con un mayor número de muestras (provenientes de diferentes colectas) que permitan establecer límites estrechos para cada parámetro de calidad.

6.3.1 Determinación de cenizas totales.

Para determinar el porcentaje de cenizas totales se utilizaron las masas del material vegetal seco empleado en cada una de las réplicas; los cálculos se realizan relacionando las masas del material seco y las cenizas obtenidas. En la Tabla 7 se muestran los rendimientos obtenidos:

**Tabla 7.** Cenizas totales de *Santolina chamaecyparissus*

Réplica	Peso de material vegetal seco(g)	Peso de las cenizas(g)	% Cenizas totales
1	3.0002	0.1395	4.65
2	3.0001	0.1419	4.73
3	3.0002	0.1401	4.67
4	3.0000	0.1482	4.94
		Promedio	4.75
		SD	0.132
		%CV	2.7

Con base en estos resultados el límite de cenizas totales para este lote de material vegetal seco es no menor de 4.8%.

6.3.2 Determinación de material extraíble

Con la finalidad de extraer la mayor cantidad de componentes polares y no polares del material vegetal, se utilizó la mezcla de metanol y diclorometano (1:1). Para estimar el porcentaje de material extraíble, se utilizó la masa del material vegetal seco y se relacionó con la masa del material extraído. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Material extraíble de *Santolina chamaecyparissus*

Réplica	Peso de material vegetal seco(g)	Peso del material extraído(g)	% Material extraíble
1	4.0001	0.0926	2.31
2	4.0002	0.0961	2.40
3	4.0001	0.0950	2.37
		Promedio	2.36
		SD	0.045
		%CV	1.9

El porcentaje promedio de material extraíble para esta colecta es de 2.4%.

6.3.3 Determinación de metales pesados.

Debido a que no se encontraba disponible el servicio de espectroscopía de absorción atómica para realizar la determinación cuantitativa de metales pesados, se optó por realizar el análisis elemental por la técnica de microscopía electrónica de barrido que es una técnica con la misma confiabilidad para determinar de manera cualitativa y cuantitativa los elementos presentes en la muestra. En la Figura 15 se muestra el espectro del análisis elemental, así como el porcentaje representativo de cada elemento:

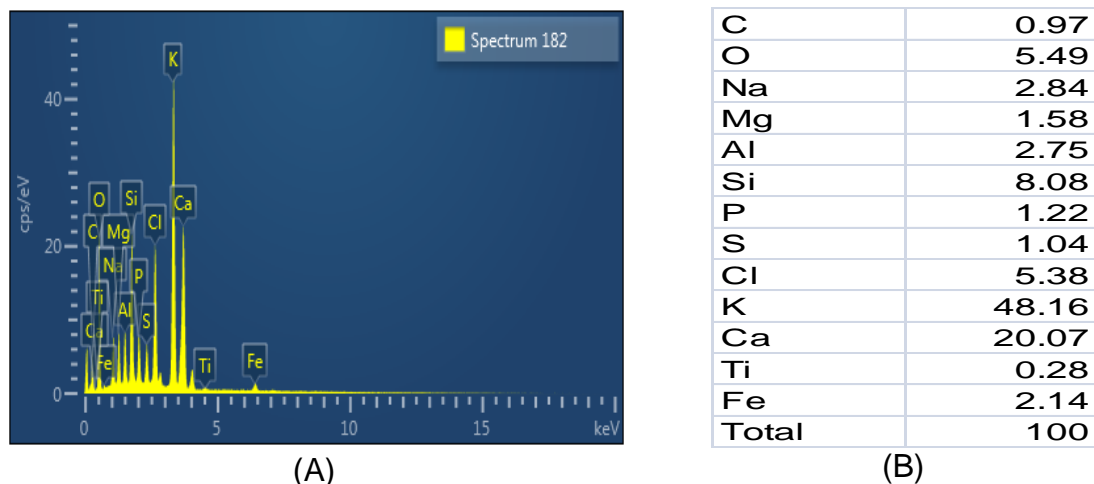


Figura 15. (A) Elementos presentes en las cenizas de *Santolina chamaecyparissus* (B) Porcentaje representativo de cada uno de los elementos presentes en la muestra.

Como se deduce de los resultados obtenidos la muestra vegetal no presentó ninguno de los metales pesados buscados (As, Cd, Cu, Hg y Pb); también se observó que la muestra contiene altos niveles de potasio (48.16%). Este porcentaje podría estar relacionado con la presencia de este elemento en el suelo.

La determinación de metales pesados se realiza para asegurar parte de la inocuidad para el consumidor. Debido a su toxicidad, cuando están presentes los metales pesados no deben superar los límites establecidos por la FHEUM. Los límites permitidos son los siguientes: As= 10 ppm, Pb= 10 ppm, Cd= 0.3 ppm, Cu= 150 ppm y Hg= 0.16 ppm.



6.4 Pruebas de valoración

6.4.1 Determinación del contenido de fenoles totales.

Para estimar la cantidad de fenoles totales en la muestra, se construyó una curva de calibración con ácido gálico y seis niveles de concentración. En la Figura 16 se ilustra la curva y la ecuación de la recta correspondiente:

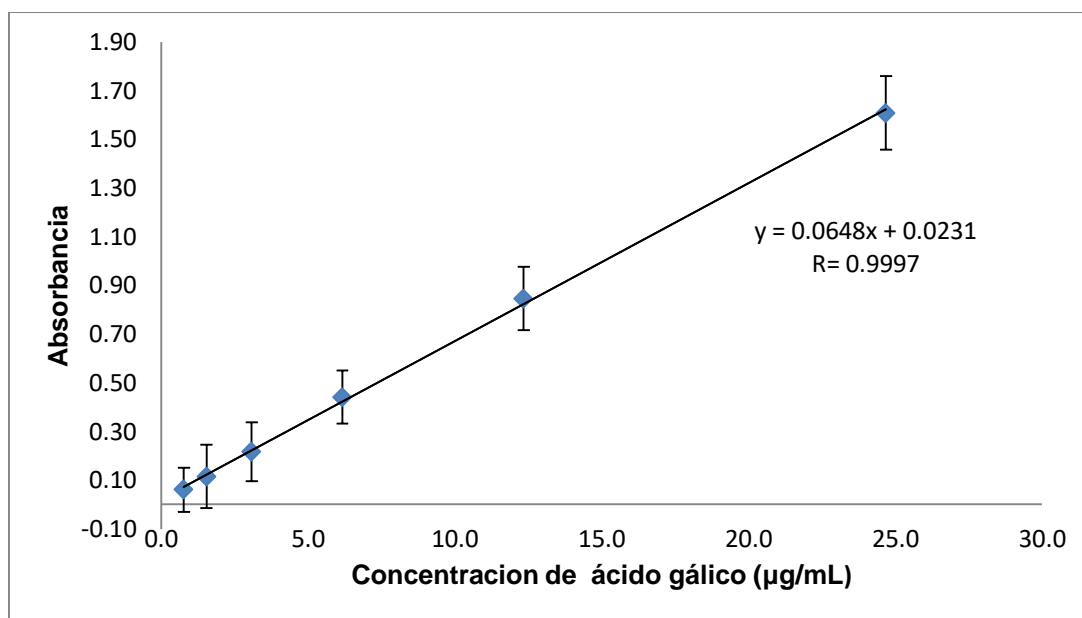


Figura 16. Curva de calibración con ácido gálico.

Debido a la interferencia que generaba, la aparición de un precipitado en las placas de análisis, para esta determinación se evaluaron diferentes proporciones de la disolución del extracto seco de acetona en metanol (1 mg/mL) y de las soluciones reactivo. En todos los casos se consideró el factor de dilución de la muestra.

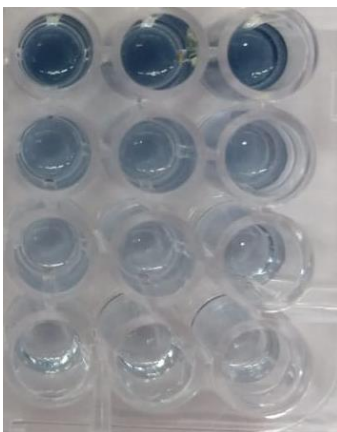


Figura 17. Representación gráfica de la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la multiplaca.

Los datos de absorbancia obtenidos de las tres réplicas realizadas, se interpolaron en la curva (Figura 16). Los cálculos se realizaron estimando la concentración interpolada en la curva y el factor de dilución. Finalmente, el promedio se relacionó con la cantidad de extracto y el valor obtenido se expresó en equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto de acetónico (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de absorbancia y concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de fenoles totales.

Réplica	Absorbancia	Concentración [μg (EAG)/mL de ext]*
1	0.2628	37.00
2	0.2659	37.48
3	0.2649	37.33
	Promedio	37.27
	SD	0.26
	%C.V	0.69

*mg equivalentes a ácido gálico (EAG) / mL de extracto



El cálculo de las concentraciones de cada una de las réplicas se realizó mediante el siguiente algoritmo de cálculo.

$$\frac{\mu g (EAG)}{mL de ext} = \left[\frac{Abs - b}{m} \right] * FD$$

Donde:

Abs= Absorbancia de la réplica

b= ordenada al origen

m= pendiente

FD= Factor de dilución

Cálculo para la Réplica 1.

$$\frac{\mu g (EAG)}{mL de ext} = \left[\frac{0.2628 - 0.0231}{0.0648} \right] * \left(\frac{100 \mu L}{50 \mu L} \right) \left(\frac{100 \mu L}{20 \mu L} \right) = \frac{36.990 \mu g (EAG)}{mL de ext} \sim \frac{37.00 \mu g (EAG)}{mL de ext}$$

Relacionando la concentración promedio obtenida con la cantidad de extracto utilizado:

$$\begin{aligned} 1 mL de ext & \left(\frac{37.27 \mu g (EAG)}{mL de ext} \right) \left(\frac{1}{1 \mu g de ext} \right) \left(\frac{1000 mg de ext}{1 g ext} \right) \left(\frac{1 mg (EAG)}{1000 \mu g (EAG)} \right) \\ & = \frac{37.27 mg(EAG)}{g de extracto de acetona} \end{aligned}$$

Se obtuvo un resultado de 37.27 mg (EAG)/g de extracto de acetona. Se ha reportado en la literatura el contenido de fenoles totales en *Santolina chamaecyparissus* en los extractos de metanol, de hexano y de acetato de etilo con valores de 193, 143 y 373 mg (EAG)/g de extracto respectivamente (Djarmouni *et al.*, 2017) y en extracto acuoso con valor de 132 mg (EAG)/g de extracto



(Boudoukha *et al.*, 2015). Se observa que, en el presente trabajo, el valor obtenido es mucho menor en comparación con los reportados. Es importante mencionar que los experimentos reportados en la literatura fueron realizados en países del mediterráneo, por lo tanto, las condiciones ambientales para el cultivo son diferentes, así como los factores adversos a la planta tales como tipo de suelo, humedad, factores climáticos, etc. que pueden motivar un cambio en la producción de compuestos fenólicos defensores de la planta.

6.4.2 Determinación del contenido de flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales se construyó una curva de calibración con un intervalo de concentraciones de 0.0031 a 0.05 mg/mL y empleando quercetina como estándar. En la Figura 18 se muestra la gráfica y la ecuación de la recta correspondiente.

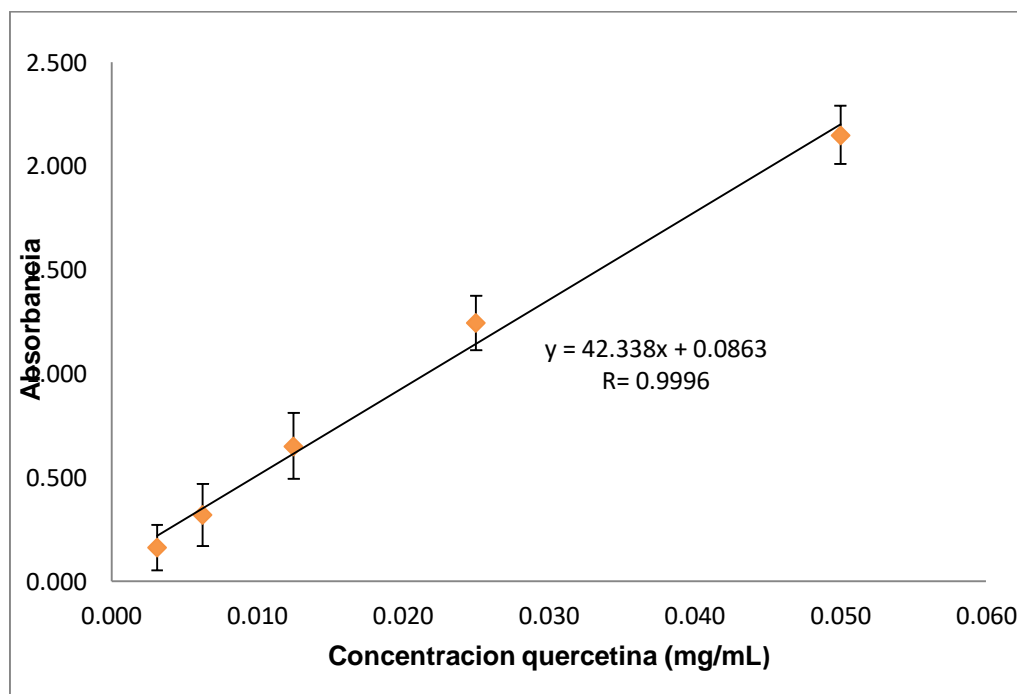


Figura 18. Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales utilizando como referencia a la quercetina

De la misma manera que en el caso de la determinación del contenido de fenoles totales, en este experimento los cálculos se realizaron estimando la concentración



interpolada en la curva y el factor de dilución (Tabla 10). Finalmente, el promedio obtenido se relacionó con la cantidad de extracto y el valor obtenido se expresó en equivalentes de quercetina por gramo de extracto de acetona.

El cálculo de las concentraciones de cada una de las réplicas se realizó mediante el siguiente algoritmo de cálculo.

$$\frac{\mu g (EQ)}{mL \text{ de ext}} = \left[\frac{Abs - b}{m} \right] * FD$$

Donde:

Abs= Absorbancia de la réplica

b= ordenada al origen

m= pendiente

FD= Factor de dilución

Cálculo para la Réplica 1.

$$\frac{\mu g (EQ)}{mL \text{ de ext}} = \left[\frac{0.4233 - 0.0863}{42.338} \right] * \left(\frac{200 \mu L}{100 \mu L} \right) = \frac{0.015919 \mu g (EQ)}{mL \text{ de ext}} \sim \frac{\mathbf{0.01592 \mu g (EQ)}}{\mathbf{mL \text{ de ext}}}$$

Tabla 110. Valores de absorbancia y concentración obtenidos de las tres réplicas para el análisis de flavonoides totales

Réplica	Absorbancia	Concentración [mg (EQ)/mL de ext]*
1	0.4233	0.01592
2	0.4317	0.01594
3	0.4332	0.01601
	Promedio	0.016
	SD	0.38
	%C.V	0.30

*mg equivalentes a quercetina (EQ) /mL de extracto



Relacionando la concentración promedio obtenida con la cantidad de extracto utilizado:

$$1\text{ mL de ext} \left(\frac{0.016 \text{ mg(EQ)}}{\text{mL ext}} \right) \left(\frac{1}{1 \text{ mg de ext}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg de ext}}{1 \text{ g de ext}} \right) = \frac{16.0 \text{ mg(EQ)}}{\text{g de extracto de acetona}}$$

Se obtuvo un resultado de 16.0 mg (EQ)/g de extracto de acetona. En la literatura se han reportado porcentajes de flavonoides totales en extractos de metanol, de hexano y de acetato de etilo de 16.7, 8.9 y 61 mg (EQ)/ g de extracto, respectivamente (Djarmouni *et al.*, 2017). El valor reportado para el extracto acuoso fue de 4.8 mg (EQ)/ g de extracto (Boudoukha *et al.*, 2015). Se observa que el valor obtenido en el extracto de acetona es cercano a lo obtenido para el extracto de metanol reportado en la literatura y mayor en comparación con los reportados para los extractos de hexano y acuoso. Lo anterior es debido probablemente a que el extracto acuoso no solamente está conformado por compuestos fenólicos, sino por otros de naturaleza no fenólica y el extracto de acetona contiene más compuestos de naturaleza fenólica.



7. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto de acetona de *Santolina chamaecyparissus* es adecuado para analizar la presencia de los compuestos marcadores de la especie vegetal: hispidulina (1) y pectolinaringenina (2).
2. Se caracterizó el flavonoide hispidulina (4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona) por métodos espectroscópicos. Este compuesto no había sido aislado con anterioridad de especies de *S. chamaecyparissus* ajenas a su hábitat original.
3. Se logró determinar las condiciones adecuadas para el desarrollo de un método analítico por HPLC para identificar y en su momento poder cuantificar a los flavonoides hispidulina (1) y pectolinaringenina (2) para ser empleados como marcadores de la especie.
4. En este trabajo se establecieron valores de inicio para ciertas pruebas de pureza como cenizas totales, material extraíble y metales pesados que servirán como punto de partida para establecer límites analizando diferentes colectas.
4. De acuerdo a los resultados obtenidos, la planta contiene compuestos fenólicos.

8. PERSPECTIVAS

Utilizar los datos obtenidos en este trabajo para llevar a cabo el desarrollo y la validación del método por CLAR para la determinación de la concentración de los que se consideren compuestos marcadores en extractos de *S. chamaecyparissus*.

Llevar a cabo pruebas biológicas apropiadas con los compuestos aislados de *S. chamaecyparissus* debido a que, en experimentos previos, diferentes extractos mostraron tener actividad en músculo liso de tráquea aislada de cobayo. Por otra parte, se ha reportado la actividad anticonvulsivante de la hispidulina (1) (Patel *et. al.*, 2017), uno de los compuestos mayoritarios identificados, por lo que sería conveniente llevar a cabo pruebas biológicas de ese tipo sobre el extracto de acetona.



9. REFERENCIAS

- Adedejio, O., Jewoola, O.A. (2008). Importance of Lelal Epidermal Characters in the Asteraceae Family. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj-Napoca*. 36 (2): 7-16
- Akerreta S, Cavero SY, López V, et al. (2007). Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. *J Ethnobiol Ethnomed*. 3 (16): 1746-4269
- Alberto, J., Sanz-Cervera, J., Carda, M., Lex, J. (1993). Oxygenated germacranes from *Santolina chamaecyparissus*. *Phytochemistry*. 34: 3339-3342
- Barrero, A.F., Alvarez-Manzaneda, E.J., Mar, Alvarez-Manzaneda R, Quilez, J. Chahboun, R., Linares, P., Rivas, A. (1999). The first route toward oxygenated monocarbocyclic terpenoids: synthesis of elegansidieol, a new sesquiterpene from *Santolina elegans*. *Tetrahedron Lett*. 40: 8273-8276
- Becchi, M., Carrier, M. (1980). 6-methoxyflavones of *Santolina chamaecyparissus*. *Planta Medica*. 38 (3): 267-268
- Bonesi, M., Brindisi, M., Armentano, B., Curcio, A., Sicari, V., Loizzo, M.R., Capello, M.S., Bendini, G., Peruzzi, L., Tundis, R. (2018). Exploring the anti-proliferative, pro-apoptotic and antioxidant properties of *Santolina corsica* Jord. & Fourr. (Asteraceae). *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 107: 967-978
- Boudoukha, C., Bouriche, H., Ortega, E., Senator, A. (2015). immunomodulatory effects of *Santolina chamaecyparissus* L. leaf extracts on human neutrophil functions. *Pharmaceutical Biology*. 54 (4): 667-673
- Calvo, M. I., Cavero, R.Y. (2015). Medicinal plants used for neurological and mental disorders in Navarra and their validation from official sources. *Journal of Ethnopharmacology*. 169: 263-268
- Chacón-Morales, P., Amaro-Luis, J. M., Bahsas, A. (2013). Isolation and characterization of (+)-mellein, the first isocoumarin reported in *Stevia genus*. *Avances en Química*. 8(3): 145-151



- Da Silva JAT. (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr J Biotechnol.* 3: 706–20.
- Dermirci, B., Özek, T., Baser, K.H.C. (2011). Chemical Composition of *Santolina chamaecyparissus* L. Essential oil. *Journal of Essential Oil Research.* 12 (5): 625-627
- Derouiche, K., Zellagui, A., Gherraf, N., Bousetla, A., Dehimat, L., Rhouati, S. (2013). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Santolina africana* flowers, endemic in Algeria. *Journal of BioScience and Biotechnology.* 2 (3): 201-206
- Djarmouni, M., Baghiani, A., Adjadj, M., Arrar, L. (2017). The Algerian aerial part of *Santolina chamaecyparissus* effectively antioxidant properties in vitro and in vivo. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 7 (1): 1612-1630
- De Pascual Teresa, J., Bellido, I. S., González, M. S., Vicente, S. (1986). Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivates from *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry.* 25 (1): 185-190.
- De Santayana, M. P., Morales, R. (2006). Manzanillas ibéricas: historia y usos tradicionales. *Revista de fitoterapia.* 6(2): 143-153
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2013). México D.F.: Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2013). México, Ciudad de México: Secretaria de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
- Fernandez, A.J., Ferreira, M.R., Randau, K.P., De Souza, T.P., Soares, L.A., (2012). Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). *Sci. World J.* 7(1): 1-4.
- Ferrari, B., Tomi, F., Casanova, J. (2005). Terpenes and acetylene derivates from roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology.* 33: 445-449



- Ferrari, B., Tomi, F., Rochomme, P., Casanova, J. (2005) Two irregular acyclic sesquiterpenes aldehydes from *Santolina corsica* essential oil. Magn Reson Chem. 43: 73-74
- Flamini, G., Chelli, G., Pistelli, L., Morelli, I. (1994). Phenolic compounds from *Santolina pinnata*. Planta Med. 60: 97-99
- García, E., Segovia, I., Fuentes, A., (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu [Material de clase]. Universidad Politécnica de Valencia.
- Giambelli., E., D'Antuono., Romero-González., R., Garrido., A. (2018). Identificación and quantification of phenolic compounds in edible wild leafy vegetable by UHPLC/ Orbitrap-MS. Journal of the Science of Food and Agriculture. 98: 945-954
- Giner-Pons, R., Ríos-Cañavate, J. (2000). *Santolina chamaecyparissus*. Revista de fitoterapia, 1 (1): 27-34
- Giner. R. M., Ríos, J. L., Villar, A. (1988) CNS Depressant effects, anti-inflammatory activity and anti-cholinergic actions of *Santolina chamaecyparissus* extracts. Phytotherapy Research. 2 (1): 37-41
- Giner, R., Rios, J., Villar, A., (1986). Pharmacological study of *Santolina chamaecyparissus* L. citotoxicity, antiinflammatory and antiulceractivity. Planta Med. 52: 540–541.
- Hyde, MA, Wursten, BT, Ballings, P. y Coates Palgrave, M. (2018). Flora de Zimbabwe: Información de la especie: *Santolina chamaecyparissus* L. (En línea). Disponible en internet: https://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=160810. Recuperado el 9 de diciembre de 2018
- Hurabielle, M., Eberle, J., Paris, M. (1982). Flavonoids of *Atemisa campestris* ssp. *glutinosa*. Journal of Medicinal Plant Research. 46: 124-128
- Kiesel, W., Dawid-Pac, R. Grabarczyk, H., Nowak, G. (2003). Germacrane derivatives from *Santolina pinnata*. Z Naturforsch C. 58: 793-796
- Khoddami A., Wilkes, M., Roberts, T. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules open access. 18 (1): 2343-2345



- Lam, J., Bildse, H., Christensen, L., Thomasen, T. (1989). Chemical Constituents of *Santolina chamaecyparissus*. Acta Chemica Scandinavica. 43: 799-802
- López-Udías, S., Fabregat-Lluega, C. (2002) El género *Santolina* L: en el Sistema Ibérico. Encuentro Nacional de Estudios sobre la Cordillera Ibérica, 471-479.
- Navarro, L. (2018). Análisis químico de *Santolina chamaecyparissus* L. (Asteraceae) una planta de interés medicinal (Tesis para obtener el grado de Química Farmacéutica Bióloga). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Osei-Safo, D., Chama, M. A., Addae-Mensah, I., Waible, R. (2009). Hispidulin and Other Constituents of *Scoparia dulcis* Linn. Journal of Science and Technology. 29 (2): 7-15
- Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M.J., Velasco- Negueruela, A. (2001). Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia*. Biochemical systematics and ecology. 29: 663-672
- Patel, K., Patel, D. K. (2017). Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 7: 360-366
- Prusky, J., Sancho, G. & Tellería, M. C. (2004). The subfamily Mutisioideae (Asteraceae). Botanical Review. 74: 469 -716
- Ramesh,K. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). Journal Pharmaceutical Analysis 7 (6): 349–364
- Rios, J.L. Giner, R.M., Villar, A. (1989). Isolation and identification on anti-inflammatory principle from *Santolina chamaecyparissus*. Phytotherapy Research. 3 (5): 2012-214
- Sala, A., Recio, M.C., Giner, R.M., Mañez, S., Ríos, J.L. (2000). Anti-phospholipase A_2 and anti-inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus* L. Life Sciences. 66 (2): 212-214
- Salah-Fantassi, K., Hassayoun, F., Cheraif, I., Khan, S., Ben, H., Hammami, M., Aouni, M., Harzallah-Skhiri, F. (2017). Chemical composition,



- antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. Saudi Journal of Biological Sciences. 24: 875-882
- Silván, A.M., Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A. (1998). Effects of compounds extracted from *Santolina oblongifolia* on TBX₂ release in human platelets. Inflammopharmacology. 6: 255-263
 - Silván, A.M., Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A. (1996). Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. Journal of Natural Products. 58 (12): 1183-1185
 - Suresh B, Sriram S, Dhanaraj SA, et al. (1997). Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. Journal of Ethnopharmacology 55: 151–159
 - Tapia, J. L. (2010) Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán: Asteráceas. Centro de investigación científica de Yucatán (en línea), 2 (4). Disponible en internet : <https://www.cicy.mx/sitios/biodiversidad-y-desarrollo-humano-en-yucatan>. Recuperado el 5 de noviembre de 2018
 - Tomás-B. (2001). “HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums”. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49 (2): 4748-4760.
 - Teixeira da Silva, J. (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. African Journal of Biotechnology, 3 (12), 706-720.
 - Tundis, R., Loizzo, R. (2017). A Review of the traditional uses, phytochemistry and biological activities of the genus *Santolina*. Plant Med. 84: 627– 637
 - Utrilla, M.P., Navarro, M.C., Jimenez, J., Montilla, M.P., Martin, A. (1995). Santolindiacetylene, a polyacetylene derivative isolated from the essential oil of *Santolina canescens*. Journal of Natural Products. 58 (11): 1749-1752
 - Venegas, E. A. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. UCV-Scientia. 4 (2): 161-175
 - Villarino, V. (1999). Las plantas de extractos: Bases para un plan de Desarrollo de Sector. Fundación Alfonso Martín Escudero. Pag: 13



10. ANEXOS

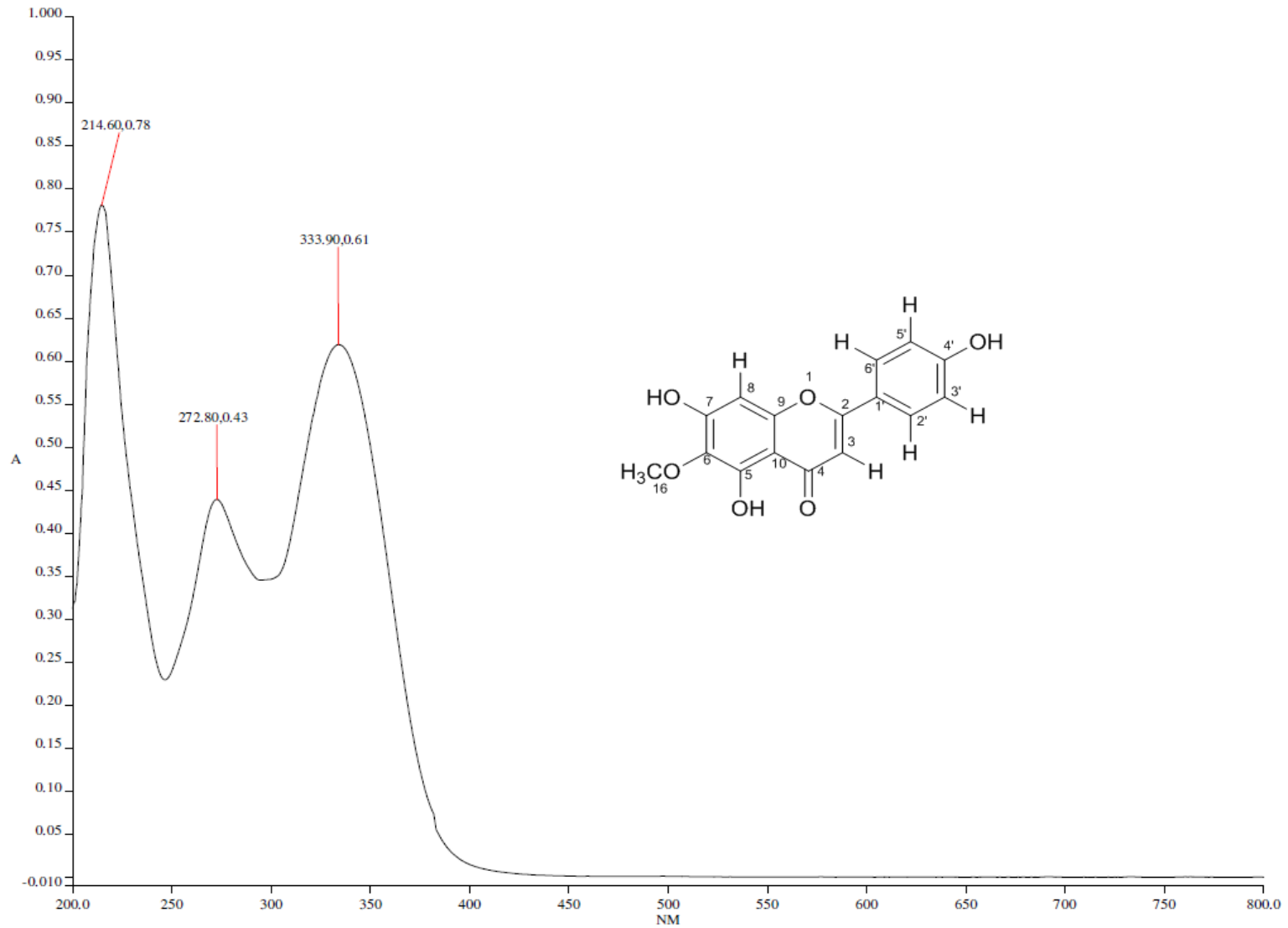


Figura A1. Espectro en el UV de la hispidulina (1).

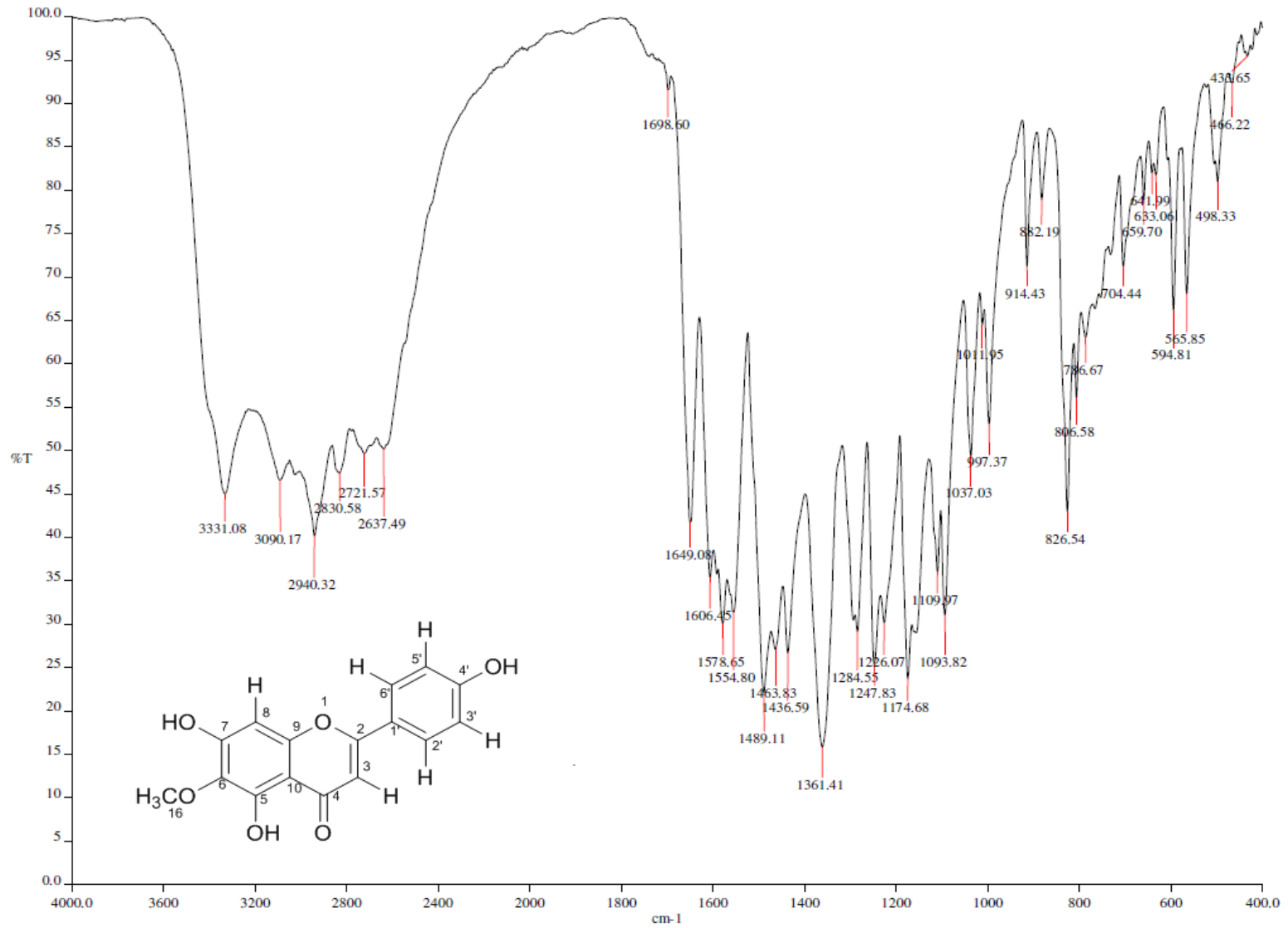


Figura A2. Espectro en el IR de la hispidulina (1).

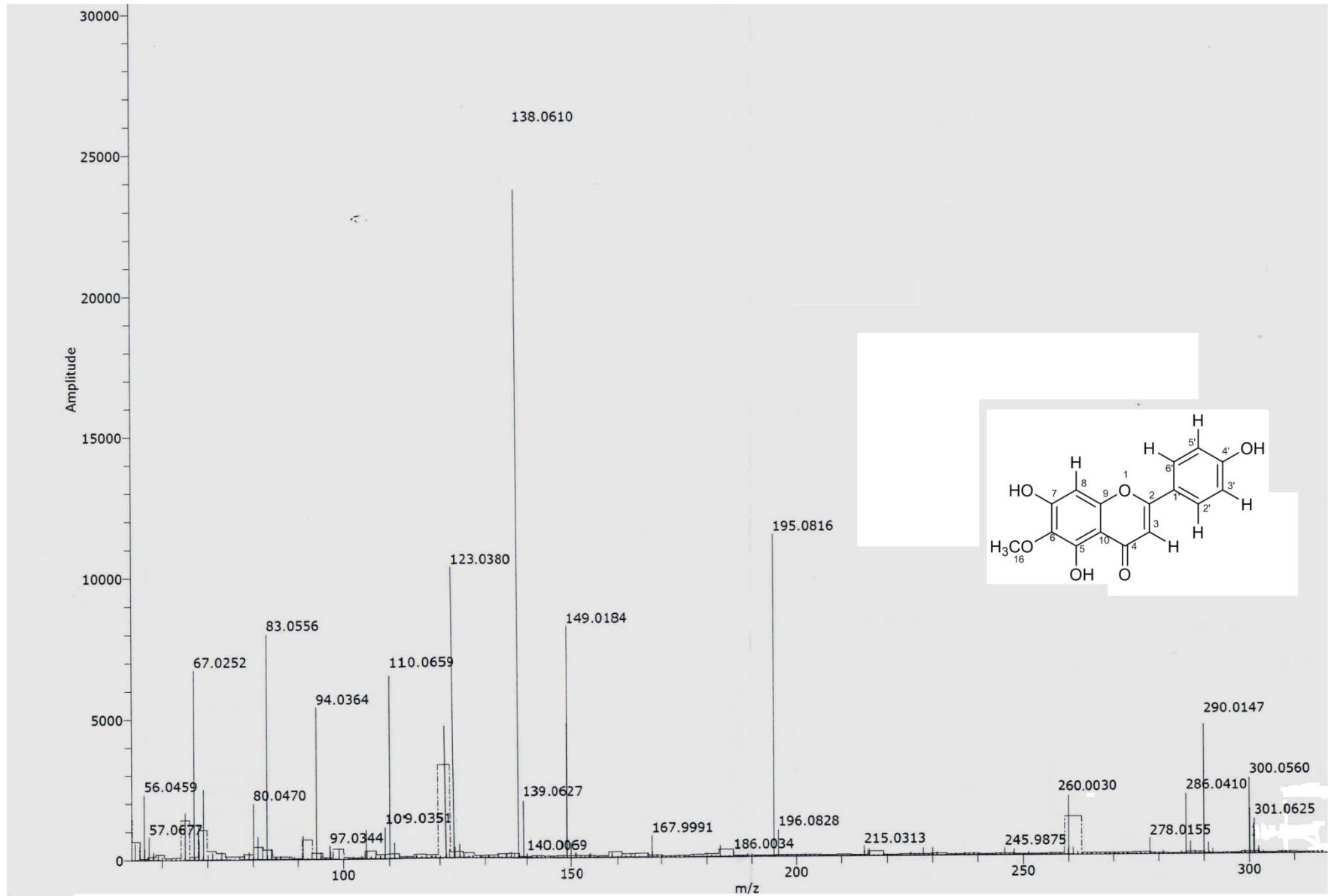


Figura A3. Espectro de masas de la hispidulina (1)

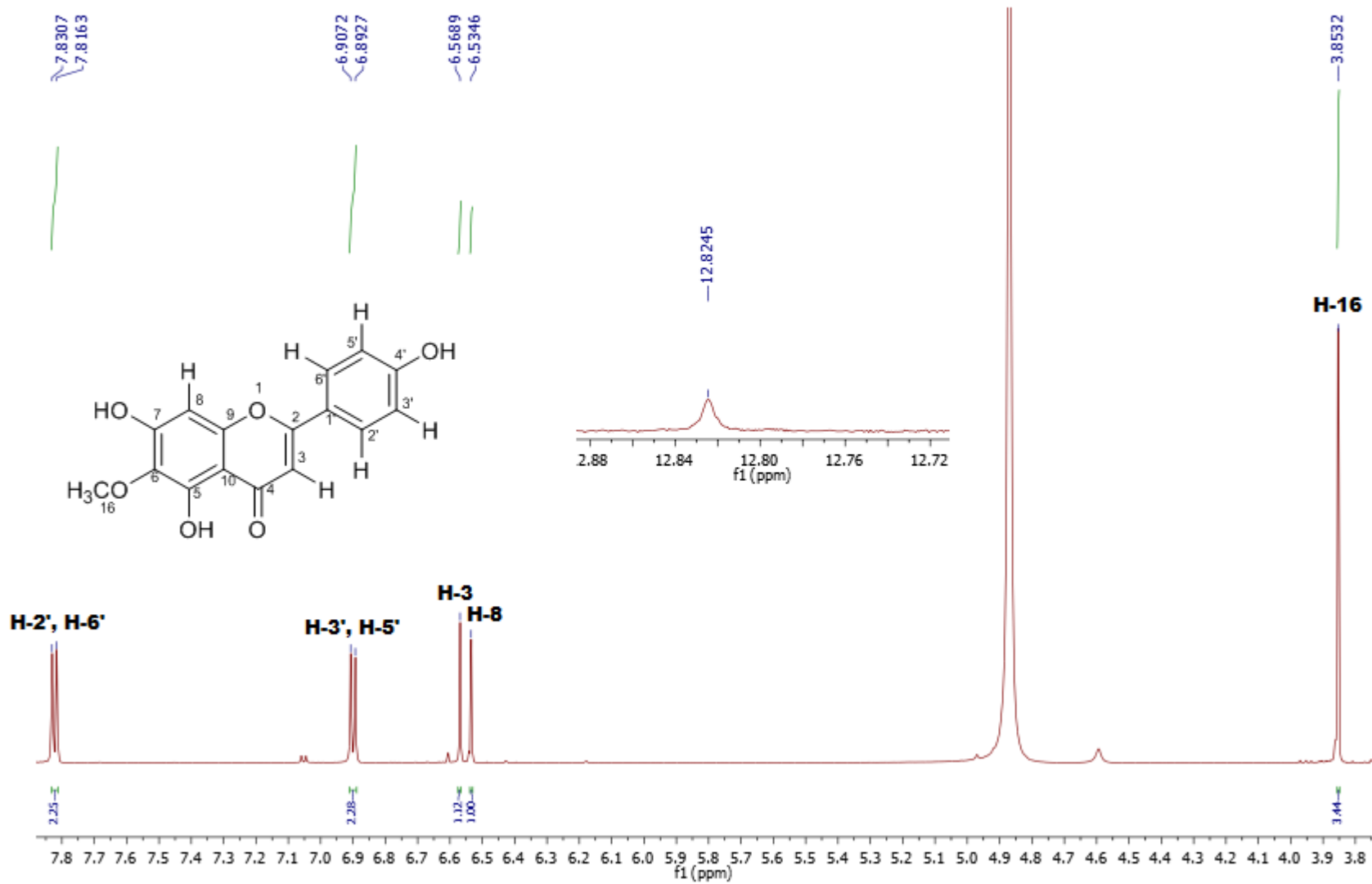


Figura A4. Espectro de RMN- ^1H (600 MHz, CD_3OD) de la hispidulina (1).

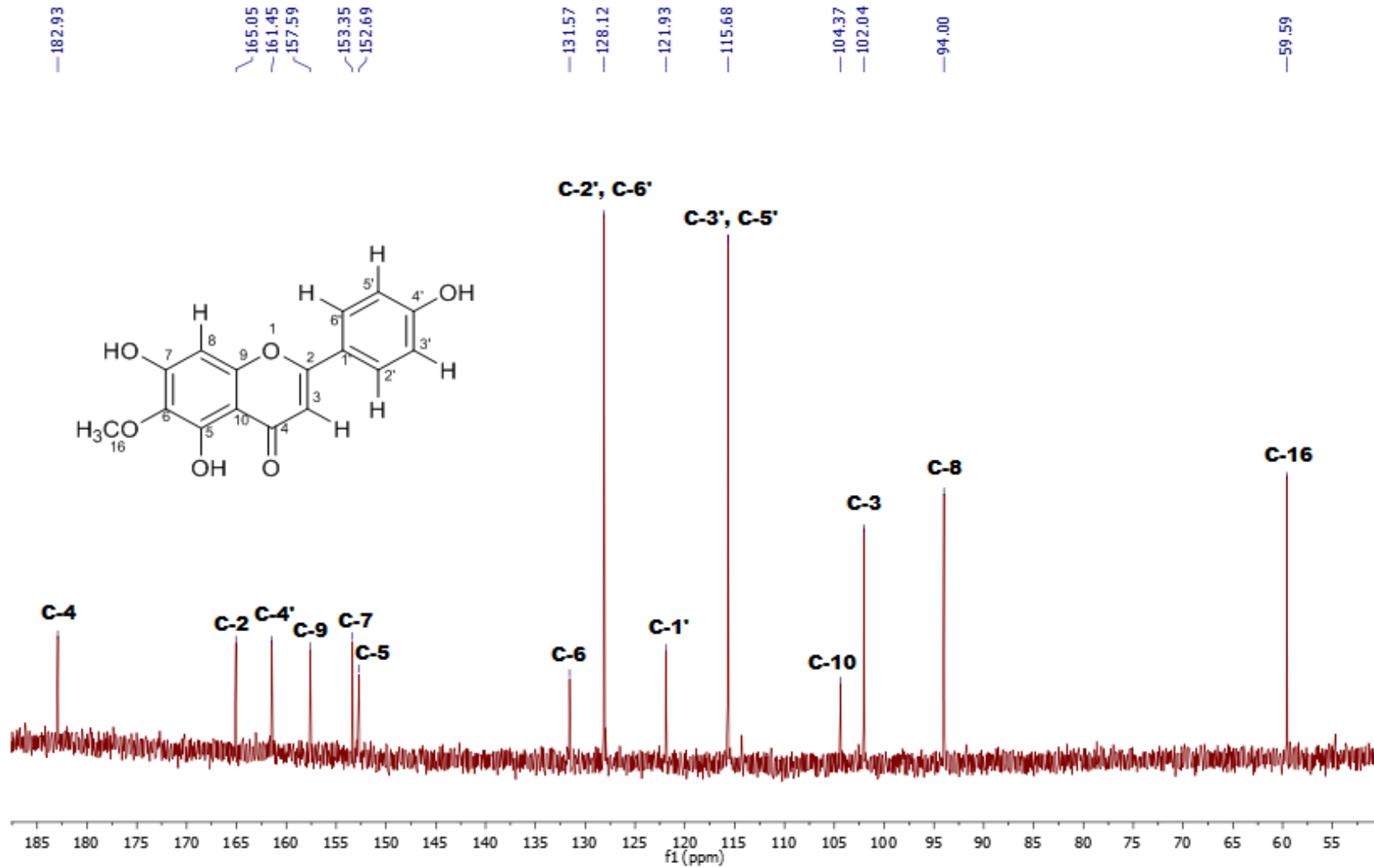


Figura A5. Espectro de RMN- ^{13}C (125-MHz, CD_3OD) de la hispidulina (1).

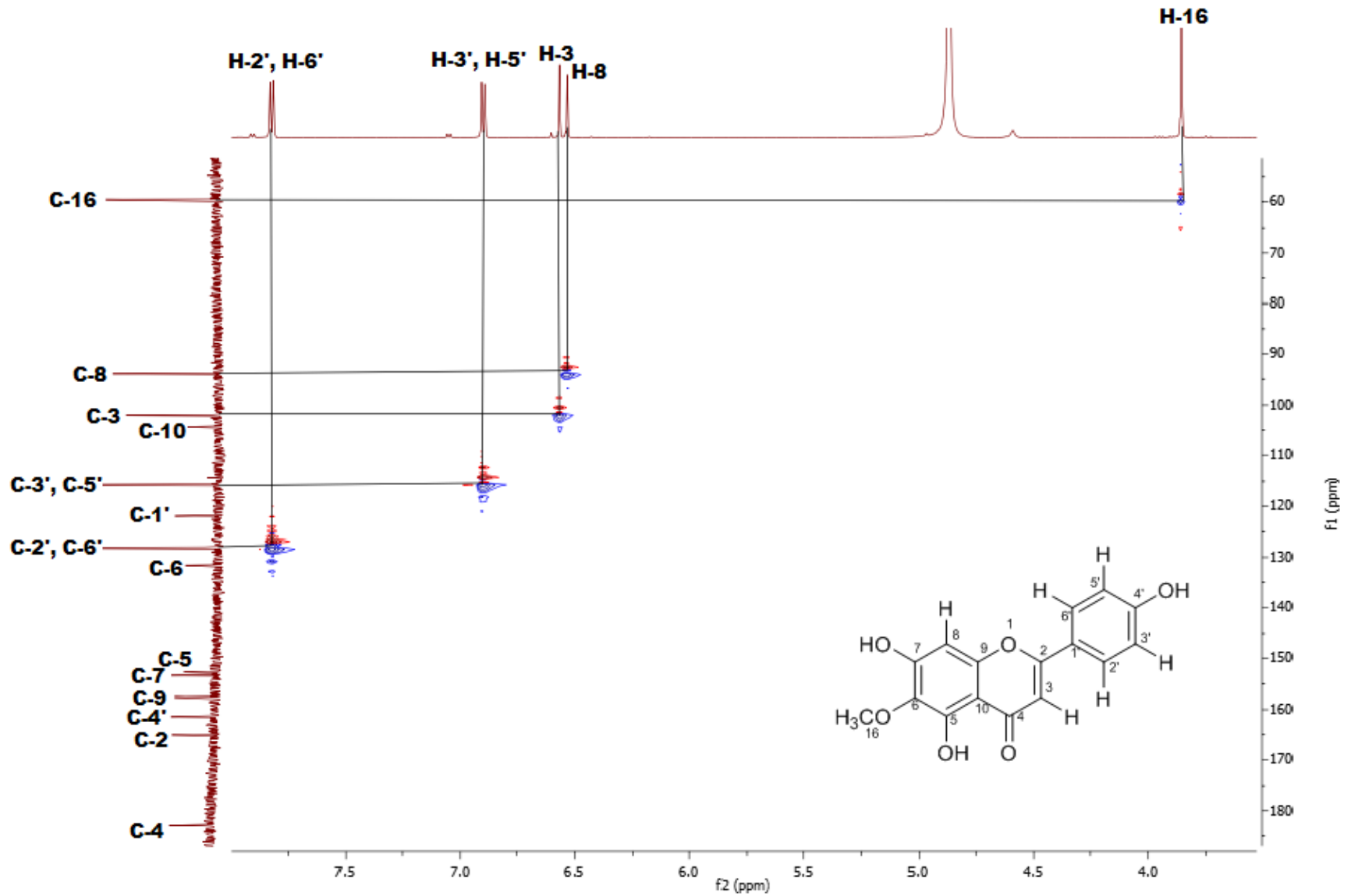


Figura A6. Espectro HSQC (600 MHz, CD₃OD) de la hispidulina (1)

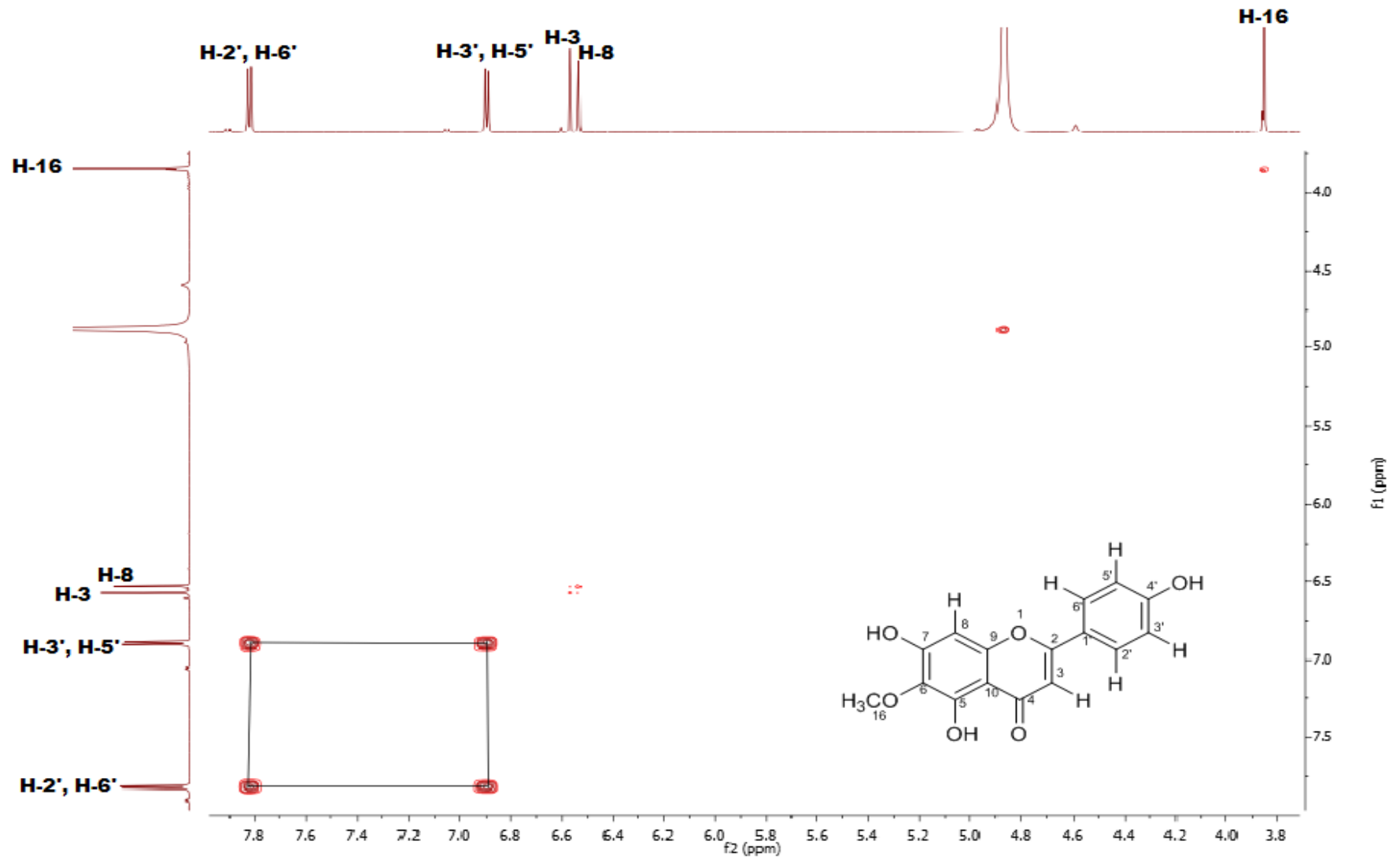


Figura A7. Espectro COSY (600 MHz, CD₃OD) de la hispidulina (1)

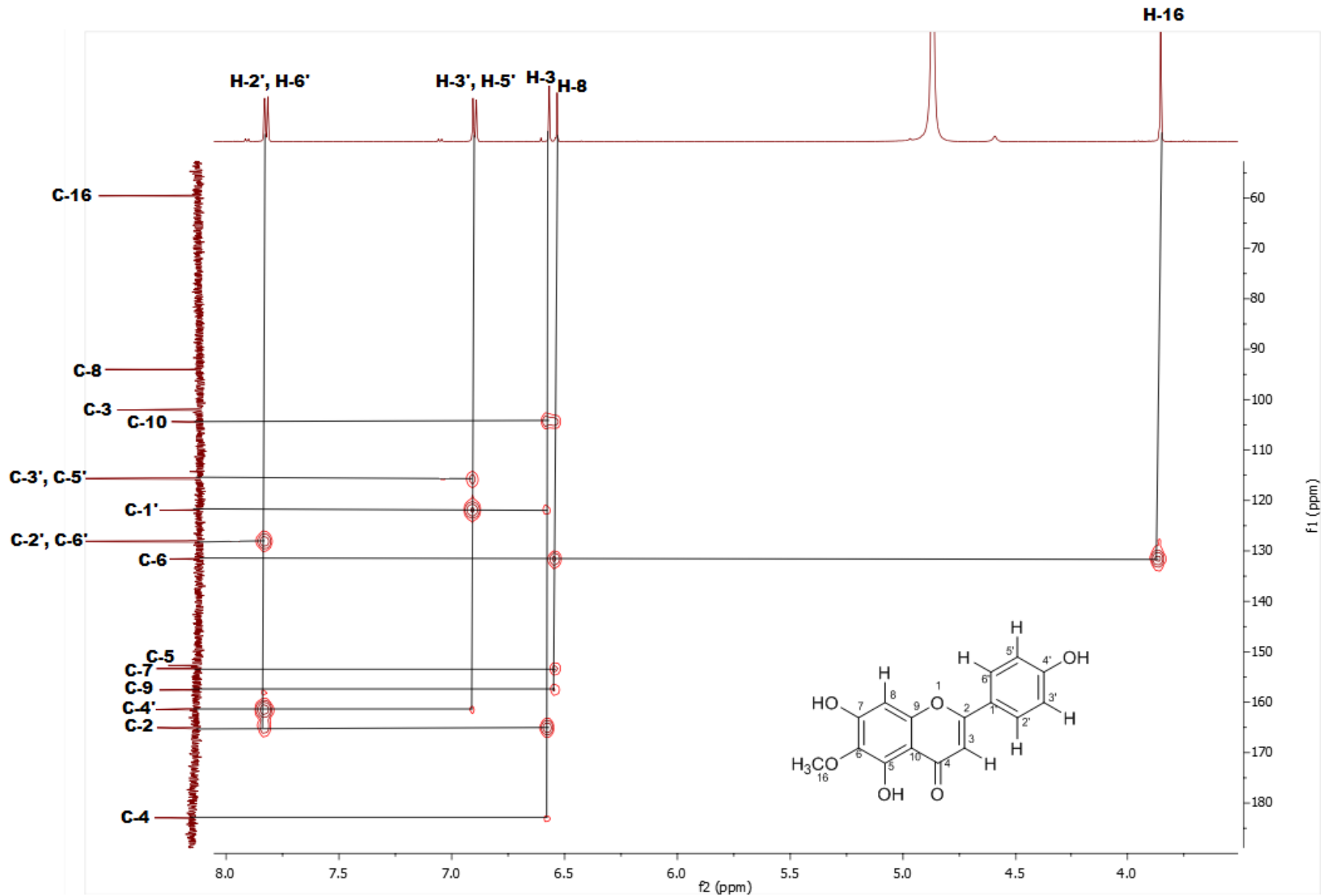


Figura A8. Espectro HMBC (600 MHz, CD₃OD) de la hispidulina (1)

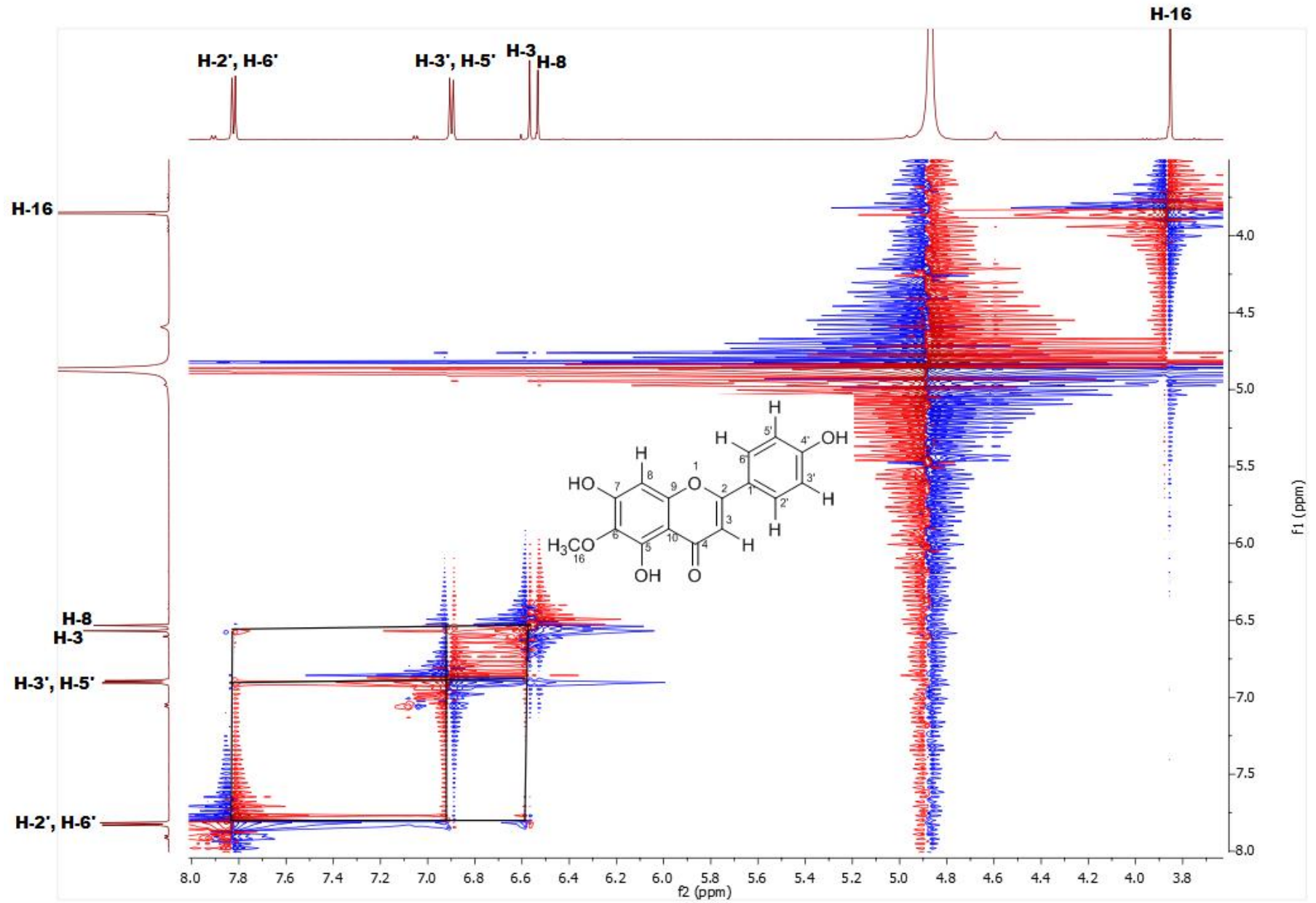


Figura A9. Espectro NOESY (600 MHz, CD₃OD) de la hispidulina (1).