



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**Prototipo de monografía farmacopeica: Pureza e identificación química de la  
Flor de *Leptocarpa rivularis* DC.**

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

**JAVIERA COSMELLI BUSTAMANTE**

Director(a): Marcela Escobar P.  
Co-director(a): María Isabel Chávez C.

JULIO 2024

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar el presente trabajo a mi familia, quienes estuvieron al pie del cañón a lo largo de todo este proceso, entregándome su amor incondicional, apoyo y dedicación, y por sobre todo tenerme paciencia. Sin ustedes nada de esto podría haber sido posible. Este logro no es solo mío, sino de ustedes también. Los amo.

Y a mi padre, gracias por enviarme fuerzas desde donde quieras que estés. Aunque no estés físicamente tu amor siempre me acompaña. Te llevo en mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre,

Este es el resultado de todo tu sacrificio, de tu amor y apoyo incondicional. Gracias por cada palabra de aliento, por cada llamada a distancia, por ser mi ejemplo de fortaleza y valentía, es un orgullo ser tu hija. Te amo con todo mi corazón.

A mi hermano José Ignacio,

Gracias por alegrarme la vida, por ser un rayo de sol en mis días nublados. Tu presencia ha sido fundamental para alcanzar este logro. Sigamos creciendo juntos.

A mis abuelos Blanca y Guillermo,

Gracias por todo su amor y apoyo entregado no sólo en este viaje académico, sino que también durante toda la vida, gracias por su crianza y por ser en muchas ocasiones mis segundos papás.

A mis amigas,

Mis hermanas que me regaló la vida, agradecida por todo el apoyo y el amor entregado durante años bastantes difíciles. Por cada mensaje o llamada impulsándome a seguir adelante y darme la mano cuando no encontraba salida o sentía que el mundo se me caía. Las amo.

A mis profesoras guías,

Gracias profesoras Marcela y María Isabel por entregarme los conocimientos necesarios, por el apoyo y dedicación para lograr culminar esta investigación.

## RESUMEN

Chile, alberga una amplia variedad de plantas medicinales, como lo es la *Leptocarpha rivularis*, conocida como "palo negro". Este estudio tuvo como objetivo desarrollar un prototipo de monografía farmacopeica de las flores de "Palo negro", realizando pruebas farmacopeicas generales de pureza y además de la identificación química de ácidos fenólicos y sesquiterpenlactonas.

Las flores secas de *Leptocarpha rivularis* se sometieron a ensayos de pureza como pérdida por secado, cenizas totales e insolubles en ácido y materias extrañas. Además, se desarrollaron extractos metanólicos de las flores para la identificación química de ácidos fenólicos y lactonas sesquiterpénicas por medio de una cromatografía en capa fina (CCF) y la identificación de Leptocarpina por medio de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) y Fluorescencia.

Como resultado, se identificaron en extractos metanólicos dos ácidos fenólicos, los ácidos cafeico y clorogénico, por medio de un método en CCF, y la posible identificación de Leptocarpina por HPLC. Además, se obtuvieron los valores límites para los parámetros de pureza, así para la pérdida por secado se determinó un valor no mayor a 13%, cenizas totales no más de 9%, cenizas insolubles en ácido no más de 0,5% y de materias extrañas no más de 2%.

En conclusión, se logró el desarrollo de métodos para la identificación de compuestos marcadores de las flores de *Leptocarpha rivularis* que dan bases para una segunda etapa de este estudio, que permita generar métodos más específicos y selectivos de identificación. Por otro lado, tanto para la identificación como para los parámetros de pureza es recomendable considerar un amplio muestreo a lo largo del país para obtener resultados representativos de la especie.

## ABSTRACT

Chile hosts a wide variety of medicinal plants, such as *Leptocarpha rivularis*, known as "palo negro". This study aimed to develop a prototype pharmacopoeial monograph for the flowers of "palo negro", conducting general pharmacopoeial purity tests as well as chemical identification of phenolic acids and sesquiterpenolactones.

The dried flowers of *Leptocarpha rivularis* underwent purity assays including loss on drying, total ash, acid-insoluble ash, and foreign matter. Additionally, methanolic extracts of the flowers were prepared for chemical identification of phenolic acids and sesquiterpenic lactones using thin-layer chromatography (TLC) and identification of leptocarpin through high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection (DAD) and fluorescence.

As a result, two phenolic acids, caffeic and chlorogenic acids, were identified in methanolic extracts using TLC, along with potential identification of Leptocarpin by HPLC. Furthermore, limit values were obtained for purity parameters: loss on drying not exceeding 13%, total ash not more than 9%, acid-insoluble ash not more than 0.5%, and foreign matter not more than 2%.

In conclusion, methods were successfully developed for identifying marker compounds in the flowers of *Leptocarpha rivularis*, laying the groundwork for the next phase of this study aimed at developing more specific and selective identification methods. It is recommended to conduct extensive sampling throughout the country for both identification and purity parameters to obtain representative results of the species.

## GLOSARIO

**Aquenio:** Fruto seco indehiscente cuya semilla no se encuentra soldada al pericarpio.

**Droga vegetal:** Planta o sus partes sin procesar, usadas con un propósito medicinal o farmacéutico.

**Extracto:** Preparación de consistencia líquida (extracto fluido y tintura), semisólida (extracto blando) o sólida (extracto seco) obtenido de material de origen vegetal o animal.

**Extracto seco:** Preparación sólida obtenida por evaporación del solvente utilizado en la extracción.

**Fitofármaco:** Aquellas especialidades farmacéuticas cuyos ingredientes activos provienen de las partes aéreas o subterráneas de plantas u otro vegetal y están debidamente estandarizados.

**Ligulada:** Con semejanza de lengua.

**Medicamentos herbarios tradicionales:** Aquellos constituidos por plantas o partes de éstas, frescas o desecadas, enteras o trituradas, envasadas y etiquetadas artesanalmente y rotuladas con la denominación utilizada por la costumbre popular en el ámbito de las tradiciones culturales chilenas, que hayan sido reconocidos en la respectiva norma técnica aprobada por el Ministerio de Salud de Chile.

**Plantas medicinales:** Plantas completas o sus fragmentos, partes o exudados de plantas, algas, hongos y líquenes, en estado no procesado, por lo general secas y ocasionalmente al estado fresco. Las plantas medicinales están definidas por su nombre científico botánico de acuerdo al sistema binominal (género, especie, variedad y autor).

## ABREVIACIONES

cm	centímetro
CCF	cromatografía en capa fina
°C	grados celsius
g	gramo
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPTLC	cromatografía capa fina de alta resolución
h	hora
L	Litro
mg	miligramos
mg/min	miligramos por minuto
min	minutos
mL	mililitro
nm	nanómetro
%	por ciento
PA	Pureza analítica
PDA	Matriz de fotodiodos
Rf	factor de retención
RT	tiempo de retención
µL	microlitro
µm	micrómetro

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1. Material vegetal.....	22
4.2. Acondicionamiento del material vegetal.....	22
4.3. Ensayos farmacopeicos generales de pureza para las flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> .....	23
4.3.1. Pérdida por secado.....	23
4.3.2. Cenizas totales.....	23
4.3.3. Cenizas insolubles en ácido.....	24
4.3.4. Materias extrañas.....	25
4.3.5 Análisis estadístico.....	25
4.4. Identificación química de las flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	25
4.4.1 Cromatografía en capa fina.....	25
a) Determinación del solvente para preparación de extractos.....	25
b) Cromatografía en capa fina para ácidos fenólicos.....	26
c) Cromatografía en capa fina para sesquiterpenlactonas.....	27
4.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD).....	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
5.1. Ensayos de pureza.....	29
5.2. Identificación química.....	31
5.2.1. Elección del solvente de extracción de la muestra para CCF.....	31
5.2.2. Identificación de ácidos fenólicos en CCF.....	33
5.2.3. Identificación de sesquiterpenlactonas por CCF.....	35
5.2.4. Identificación de <i>Leptocarpina</i> por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	37
5.3 Prototipo de monografía farmacopeica.....	40
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>42</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una monografía.....	12
Figura 2. Esquema y fórmula para calcular el factor de retención (Rf).....	13
Figura 3. Flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC (A-B).....	15
Figura 4. Estructura química de Leptocarpina.....	16
Figura 5. Pasos para la obtención de muestra molida y tamizada de las flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	22
Figura 6. Cromatografía en capa fina de extractos de M1 para elección del solvente.....	32
Figura 7. Cromatografía en capa fina de ácidos fenólicos de extractos de M1 y M2 de las flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	34
Figura 8. Cromatografía en capa fina de sesquiterpenlactonas de extractos de M1 y M2 de flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	36
Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD del extracto M1 metanólico de flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> ..	37
Figura 10. Espectro de absorción de Leptocarpina a una longitud de onda de 218 nm.....	39
Figura 11. Cromatograma HPLC con detector de fluorescencia de extracto M1 metanólico.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Equipos utilizados para la identificación química y pureza de la flor de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	19
Tabla 2: Materiales utilizados para la identificación química y pureza de la flor de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	20
Tabla 3: Reactivos líquidos utilizados para la identificación química y pureza de la flor de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	20
Tabla 4: Reactivos sólidos utilizados para la identificación química y pureza de la flor de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC.....	21
Tabla 5: Muestras de las flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC y su ubicación geográfica.....	22
Tabla 6: Sistema de gradientes de fase móvil de A y B.....	28
Tabla 7: Valores de pérdida por secado, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido para las flores de <i>Leptocarpha rivularis</i> DC para las muestras M1 y M2.....	29
Tabla 8: Valores de ensayos de pureza para flores de Crisantemo silvestre y Palo negro.....	30
Tabla 9: Factores de retención obtenidos de la cromatografía de ácidos fenólicos.....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas medicinales ha desempeñado un papel crucial en el tratamiento de diversas enfermedades, basándose en el conocimiento que ha dejado el paso de las generaciones (Carrasco *et al.*, 2023). Este legado ha contribuido significativamente a lo que hoy conocemos como medicina herbolaria o fitoterapia, la que se caracteriza por la aplicación de la botánica en la medicina, distinguiéndose por el empleo de semillas, flores y raíces de plantas o extractos de ellas para fines terapéuticos (Ortega-Chavarría, 2022).

Para la correcta utilización de estas plantas medicinales poseemos en la actualidad las farmacopeas, la cual es una normativa oficial que define las especificaciones, criterios y métodos de prueba estándar necesarios para asegurar adecuadamente la calidad, la eficacia y la seguridad de la planta (Cañigüeral, 2006).

Numerosas iniciativas internacionales consolidadas son valiosas fuentes de información científica sobre la química, farmacología, toxicología y aspectos clínicos relacionados con las drogas vegetales y sus derivados, una de estas es la Farmacopea Europea, que se ha convertido en una referencia a nivel global (Cañigüeral, 2006).

Las farmacopeas se componen de monografías que simplifican la creación de registros de medicamentos a base de plantas, estas ofrecen información precisa y confiable al profesional de la salud, facilitando el uso adecuado de los productos derivados de plantas medicinales (Gómez *et al.*, 2016). En las monografías podemos encontrar variadas secciones, entre ellas las características botánicas, identificación, valoración de la especie, y cada una de estas tienen pruebas de laboratorio, las cuales se pueden apreciar en la figura 1.

La primera farmacopea oficial en Chile fue la Farmacopea Chilena la cual fue promulgada en 1882 por Adolfo Murillo y Carlos Middleton, siendo el Código Oficial de Medicamentos hasta 1905 con un total de 100 monografías de especies vegetales. Posterior a esto surgieron diversas farmacopeas hasta el año 2007-2011 que surge el proyecto de Farmacopea Chilena con el fin de crear la conocida Institución Farmacopea Chilena, para mejorar y actualizar la versión oficial de la Farmacopea Chilena (Gómez *et al.*, 2016).

1. Definición
2. Producción
3. Características
4. Identificación - Macroscópica, microscópica - Perfil cromatográfico. - Otros.
5. Ensayos generales - Elementos extraños - Cenizas totales - Constantes fisicoquímicas - Materia extraíble - Pérdida por secado
6. Valoración - Métodos cromatográficos cuantitativos - Métodos espectroscópicos cuantitativos - Otros
7. Posibles contaminantes - Pesticidas - Aflatoxinas - Metales pesados - Contaminantes microbianos
8. Conservación y etiquetado

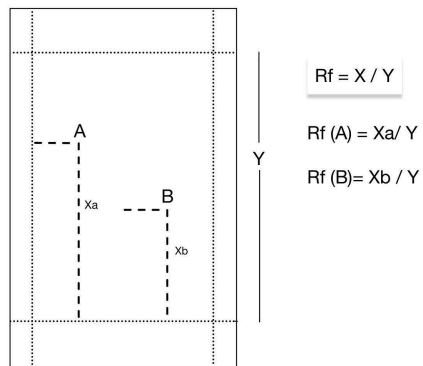
**Figura 1. Esquema de una monografía.**

**Nota:** Tomado de Historia, presente y proyecciones de la Farmacopea. (Gómez *et al.*, 2016).

En el apartado de identificación se realizan pruebas microscópicas, macroscópicas, cromatografías en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución, entre otras. Estos ensayos se realizan para confirmar que el producto se ajuste a la descripción dada en la etiqueta (Gómez *et al.*, 2016).

La cromatografía en capa fina (CCF) también llamada TLC por las siglas en inglés, consiste en una técnica analítica que sirve para separar de una muestra las moléculas orgánicas, y compararlas de acuerdo a su estructura química, su liposolubilidad, su hidrosolubilidad y determinar el grado de pureza de un compuesto (Ruiz Benítez, 2020).

La CCF se caracteriza por tener una fase estacionaria de material absorbente que tiene contacto con las muestras en estudio y una fase móvil compuesta por un eluyente o disolvente, cuya función es arrastrar los componentes de la muestra y lograr la separación de compuestos deseada (Ruiz Benítez, 2020). Para la obtención e interpretación de los resultados de una CCF se debe de calcular el factor de retención (RT) como se demuestra en la figura 2.



**Figura 2.** Esquema y fórmula para calcular el factor de retención (*Rf*).

**Nota:** A y B son los puntos de máxima recorrido que los componentes alcanzan al eluir.

También existe la cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), la cual es una técnica reconocida y utilizada en farmacopeas oficiales y se caracteriza por optimizar los distintos pasos del proceso de separación (Poole, 2014), debido a que los procedimientos tienden a ser automatizados para el desarrollo de placas y para el sembrado de la muestra, en comparación con la CCF tradicional (Srivastava M., 2010).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una prueba de identificación que permite separar y determinar analitos orgánicos e inorgánicos en muestras de cualquier naturaleza disueltas en un solvente, mejorando la sensibilidad y selectividad en la detección, provocando una mayor rapidez en los análisis (García *et al.*, 2016).

Por otro lado, los ensayos generales como materias extrañas, pérdida por secado, cenizas totales e insolubles en ácido, se realizan para complementar la información con patrones de identificación y evitar adulteraciones en las drogas de origen vegetal (Gómez *et al.*, 2016).

La prueba de pérdida por secado determina la cantidad de material volátil de cualquier tipo que se elimina en condiciones específicas (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2024). Es importante saber los límites del contenido de agua para cada material herbario, debido a que un exceso de humedad fomentará el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o de insectos y el deterioro de la muestra (World Health Organization, 2011).

Las cenizas totales es una prueba para medir la cantidad total de material restante después de la ignición, incluyendo las cenizas del mismo tejido vegetal y residuos de materias extrañas como, por ejemplo, tierra adheridas a la superficie de la planta (World Health Organization, 2011).

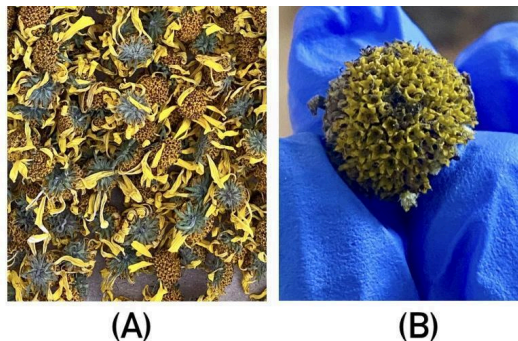
Las cenizas insolubles en ácido es un método que mide la cantidad de sílice presente, que puede presentarse en forma de arena y tierra silíceas, para obtener este resultado se debe de agregar ácido clorhídrico diluido a las cenizas totales obtenidas y hervirlas, para posteriormente ser calcinadas (World Health Organization, 2011).

En Chile podemos encontrar una gran diversidad de plantas medicinales a lo largo del país, debido a sus variadas zonas climáticas (González-Garrido *et al.*, 2022). Una de ellas es la *Leptocarpha rivularis* DC, más conocida como “palo negro” o Cüdu-mamëll en mapudungun (*Botánica Indígena de Chile*,

2014), que ha sido estudiada por sus características fisicoquímicas y su potente uso en variadas patologías de gran importancia en la actualidad, como lo es el cáncer (Carrasco *et al.*, 2023).

La *Leptocarpha rivularis* DC es una especie monotípico, dioica y endémica que pertenece a la familia *Asteraceae*, la cual crece en lugares húmedos y expuestos al sol, junto a cursos de agua y en las orillas de los bosques en la parte sur de Chile, entre las regiones del Maule y Los Lagos (Rubio *et al.*, 2022).

Esta especie corresponde a un arbusto ramoso de aproximadamente de uno a dos metros de altura, compuesta por ramas delgadas de corteza de color oscura, casi negra, con hojas alternadas y opuestas de color verde oscuro. Las flores se pueden apreciar en la figura 3, las cuales tiene un color amarillo intenso, de forma liguadas en el borde y tubulosas en el centro, su periodo de floración es desde octubre a mayo. Además, se aprecia el crecimiento de un fruto aquenio negro el cual en su estructura posee dos pequeñas púas (Instituto de Salud Pública, 2021).



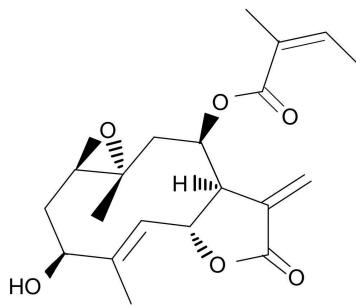
**Figura 3.** Flores de *Leptocarpha rivularis* DC (A-B).

El palo negro ha sido utilizado de manera ancestral por el pueblo mapuche, ya que lo utilizaban para tratar dolencias gastrointestinales (Obando, 2020). Además, existen estudios fitoquímicos que han demostrado que esta especie posee efectos antioxidante, hipoglicemiante y anticancerígeno (Jiménez-González *et al.*, 2018).

Las flores de *Leptocarpha rivularis* DC se caracteriza por tener una variada cantidad de metabolitos secundarios, en los que podemos encontrar acetilenos, sesquiterpenos y sesquiterpenlactonas, además de aceites esenciales, flavonoides, ácidos fenólicos y triterpenos (Montenegro *et al.*, 2020).

Las sesquiterpenlactonas se distinguen por poseer en su estructura un anillo lactónico y un núcleo sesquiterpénico constituido por 15 átomos de carbono (PubChem, s. f.). Existen variados tipos de sesquiterpenos según su estructura en las especies vegetales, podemos encontrar sesquiterpenos con esqueleto de germacrano, eudesmano y guayano, produciendo un catión germacrolido, el cual es la base para la biosíntesis de sesquiterpenlactonas (Lactonas Sesquiterpénicas, 2015).

La Leptocarpina cuya estructura se aprecia en la figura 4, es una lactona sesquiterpénica que se puede encontrar en las flores del *Leptocarpha rivularis* DC (Montenegro *et al.*, 2020). Estudios han demostrado que la Leptocarpina produce los efectos citotóxicos y apoptóticos, debido a su efecto inhibidor del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B (Bosio *et al.*, 2015 ).



**Figura 4.** Estructura química de Leptocarpina.

En el país existe una regulación para utilizar plantas medicinales como materia prima para medicamentos y su fiscalización está a cargo del Instituto de Salud Pública (ISP) y el Ministerio de Salud (Minsal). Esta reglamentación se observa en el decreto 3; *Reglamento del sistema nacional de control de los productos farmacéuticos de uso humano* del año 2010, en la cual definen como

fitofármaco “*aquellas especialidades farmacéuticas cuyos ingredientes activos provienen de las partes aéreas o subterráneas de plantas u otro vegetal y están debidamente estandarizados*” (Instituto de Salud Pública, 2022).

Es de gran importancia que los fitofármacos utilizados tengan un registro sanitario, es por ende que existe la *Guía de requisitos para el registro sanitario de fitofármacos* realizada por el ISP, la que tiene como fin entregar lineamientos claros en aspectos de calidad, seguridad y eficacia tanto para la solicitud del registro como en el de la evaluación de este (Instituto de Salud Pública, 2022).

Los medicamentos herbarios tradicionales, son aquellos constituidos por las plantas o partes de plantas, frescas o desecadas, enteras o trituradas, envasadas y etiquetadas artesanalmente y rotuladas con la denominación utilizada por la costumbre popular en el ámbito de las tradiciones culturales chilenas, que hayan sido reconocidos en la respectiva norma técnica aprobada por decreto supremo del Ministerio (Ministerio de Salud, 2020), sin embargo la especie Palo Negro no se encuentra descrita en el listado aprobado por la resolución Exenta N°548 del 27 de junio de 2009 del Minsal.

La Resolución Exenta N°4970 del 15 de noviembre del 2022, del ISP, determinó que el ingrediente vegetal Palo Negro y los productos que lo contengan corresponde a un medicamento, cumpliendo con la definición señalada en el Decreto Supremo N°3/10, art.5°, número 18 y art.14° (Ministerio de Salud, 2020), siendo lo antes indicado motivo para desarrollar este presente trabajo con el objetivo de generar un prototipo de monografía farmacopeica oficial de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC, enfocado en la identificación y en las pruebas de pureza de esta droga vegetal.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo general

Desarrollar un prototipo de monografía farmacopeica destinada a la identificación química y pureza de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC.

### Objetivos específicos

- Definir un método de cromatografía en capa fina o líquida de alta resolución para la identificación química de ácidos fenólicos y sesquiterpenlactonas en la flor de *Leptocarpha rivularis* DC.
- Determinar parámetros farmacopeicos de pureza: pérdida por secado, cenizas totales , cenizas insolubles en ácido y materias extrañas para la especie vegetal en estudio.
- Generar el prototipo de estándar documental, bajo criterios farmacopeicos, de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC.

### 3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Los equipos, materiales, reactivos líquidos y sólidos utilizados para la identificación química y para la obtención de los valores de los parámetros de pureza se presentan en las tablas N° 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

**Tabla 1:** Equipos utilizados para la identificación química y pureza de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC.

Equipos	Características
Molinillo	Marca: IKA. Modelo: A11 Basic
Estufa	Marca: Binder. Modelo: ED 53
Mufla	Marca: Dentsply, Modelo: Vulcan 3-550
Baño ultrasónico	Marca: Elma. Modelo: E30H
Balanza analítica	Marca: Radwag
Rotavapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baño calefactor B-491</li> <li>- Rotavapor R-210</li> <li>- Controlador de bomba V-850</li> </ul> Marca: Büchi
Lampara UV	Marca: Spectroline. Modelo: ENF-240C
Refrigerador -80	Marca: Haier
Refrigerador	Marca: LG
Purificador de agua	Marca: Elga
Placa calefactora	Marca: Thermo scientific
Cámara digital	Marca: Nikon. Modelo: D 7500
Bomba de vacío	Marca: Rocker. Modelo: Chemker 400
Cromatógrafo líquido de alta resolución	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Autosampler modelo SIL20AC</li> <li>- Horno de columna modelo CTO20AC</li> <li>- Desgasificador modelo DGU20A5</li> <li>- Bomba modelo LC-20AD</li> <li>- Detector de diodo SPD M20A</li> </ul> Marca: Shimadzu

**Tabla 2:** Materiales utilizados para la identificación química y pureza de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC.

<b>Materiales</b>
Materiales fungibles de laboratorio
Placa silica gel 60 F254 10x10 cm
Cámara cromatográfica
Tamiz 45 ASTM
Filtro de Nylon 0,22 µm; 13mm

**Tabla 3:** Reactivos líquidos utilizados para la identificación química y pureza de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC.

<b>Reactivos</b>	<b>Marca</b>
Metanol PA	Merck
Etanol PA	Merck
Agua ultrapura	-
Tolueno PA	Lab-Tec
Acetato de etilo PA	Tedia MSDS
Ácido acético glacial PA	Merck
Ciclohexano PA	Merck
Ácido fórmico PA	Merck
Ácido sulfúrico PA	Merck
Anisaldehído 98%	Sigma-Aldrich
PEG 400 PA	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico 37%	Merck
Acetonitrilo HPLC	Merck
Metanol HPLC	Merck

**Tabla 4:** *Reactivos sólidos utilizados para la identificación química y pureza de la flor de Leptocarpha rivularis DC.*

<b>Reactivos</b>	<b>Marca</b>
2-aminoetilfenil borato PA	Merck
Ácido clorogénico 99%	Sigma-Aldrich
Ácido cafeico 99%	Sigma-Aldrich

## 4. MÉTODOS.

### 4.1. Material vegetal.

Se recibieron en el Laboratorio de la Farmacopea Chilena flores adultas, caracterizadas por su color amarillo intenso y que fueron identificadas botánicamente. Las zonas de recolección de la flor comprendieron desde la región de la Araucanía hasta la de los Ríos, como se muestra en la tabla 5.

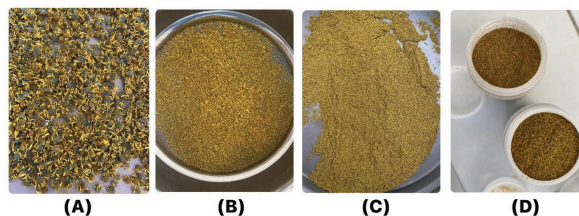
**Tabla 5:** Muestras de las flores de *Leptocarpha rivularis* DC y su ubicación geográfica.

Muestra	Localidad
M1	IX Región de la Araucanía
M2	XIV Región de los Ríos

### 4.2. Acondicionamiento del material vegetal.

Se seleccionaron las flores que tuvieran una mejor coloración para tener un material de buena calidad para realizar los ensayos. Posteriormente, se realizó el secado de las muestras en una estufa a una temperatura de 40 °C hasta alcanzar una humedad menor al 14%.

Para realizar los ensayos correspondientes, se realizó una molienda de la muestra vegetal seca con un molinillo y luego un tamizaje con un tamiz Mesh #45 (354 µm), como se aprecia en la figura 5 (A-D), para ser almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz para su posterior utilización.



**Figura 5.** Pasos para la obtención de muestra molida y tamizada de las flores de *L. rivularis*.

Nota: (A) Flores enteras de *Leptocarpha rivularis* DC. (B) Flores molidas por molinillo. (C) Muestra tamizada. (D) Almacenamiento de la muestra.

### **4.3. Ensayos farmacopeicos generales de pureza para las flores de *Leptocarpha rivularis***

Los ensayos que se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita por la Farmacopea Chilena del año 2015 (Farmacopea Chilena, 2015).

#### **4.3.1. Pérdida por secado**

Se pesó 1 g de la muestra en un crisol, previamente seco y tarado, y se secaron en una estufa entre 100-105°C por 1 hora. Luego se llevó a enfriar en un desecador a temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el secado y pesado con intervalos de 1 hora hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no fuera mayor al 0,25% del peso de la muestra.

Se calculó la pérdida por secado, en porcentaje, con la siguiente expresión:

$$\% \text{ pérdida por secado} = ( P_i - P_f ) \times 100 / P_m$$

Donde,

$P_m$  = cantidad de muestra en gramos.

$P_i$  = peso del crisol + muestra previa al secado.

$P_f$  = peso del crisol + muestra después del secado.

#### **4.3.2. Cenizas totales**

Se pesó en un crisol, previamente seco y tarado, 1 g de la materia vegetal pulverizada. Posteriormente la muestra se calcinó en la mufla por 6 h, la que se programó para que en la primera hora mantenga una temperatura de 105°C para secar, a la segunda hora a una temperatura de 300°C para precalcinar y finalmente las 4 horas restantes a una temperatura de 650°C para incinerar. Finalmente se dejó enfriar en el desecador y se pesó.

Se calculó el porcentaje de cenizas totales con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de cenizas totales} = ( m_2 / m_1 ) \times 100$$

Donde,

$m_2$ = Cantidad de la muestra en gramos.

$m_1$ = Peso del crisol + muestra calcinada en gramos.

#### **4.3.3. Cenizas insolubles en ácido**

Se utilizaron las cenizas totales obtenidas en el procedimiento anterior y se les agregó en el mismo crisol 25 mL de ácido clorhídrico al 7% y se llevaron a ebullición por 5 min en una placa calefactora. Después se filtró cuantitativamente a través de un papel filtro libre de cenizas y se enjuagó el crisol y el filtro con agua caliente hasta que el filtrado quedará libre de cloruros. Posteriormente se colocó el filtro en el crisol y se introdujo en la mufla, previamente programada con el mismo escalamiento de temperatura utilizado para las cenizas totales. Finalmente se dejó enfriar en el desecador y se pesó el crisol con la muestra calcinada.

El porcentaje de cenizas insolubles en ácido se calculó con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de cenizas insoluble en ácido} = ( m_2 / m_1 ) \times 100$$

Donde,

$m_1$ = Cantidad de la muestra en gramos.

$m_2$ = Peso del crisol + muestra calcinada en gramos.

#### **4.3.4. Materias extrañas**

Se pesó 500 g de muestra de flores enteras y sobre un papel se extendió en una capa delgada. Se buscó materia extraña primero a ojo desnudo y luego con la ayuda de un lente de aumento 10x. Se separaron las materias extrañas en forma manual y con una malla N°60 (ASTM) que facilitó la separación del polvo. Se pesó las porciones de materias extrañas y se calculó el porcentaje de éstas en relación a 100 g de muestra secada al aire.

#### **4.3.5 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se informaron en valores promedios  $\pm$  desviación estándar, y se evaluaron mediante un test student con significación estadística como  $p < 0,05$ .

#### **4.4. Identificación química de las flores de *Leptocarpha rivularis* DC.**

##### **4.4.1 Cromatografía en capa fina.**

A partir del material vegetal seco se elaboraron extractos en metanol y etanol con el objeto de determinar el mejor solvente extractivo para el desarrollo del método en cromatografía en capa fina (CCF), dirigido a la identificación de ácidos fenólicos y sesquiterpenlactonas.

##### ***a) Determinación del solvente para preparación de extractos.***

Se realizaron extractos de las muestras M1 y M2 en metanol PA y etanol PA y se eligió uno de estos para preparar las CCF.

Para esto se pesaron 250 mg de cada muestra vegetal seca a las cuales se le agregaron 25 mL del solvente correspondiente. Estos se llevaron a sonicar en un baño ultrasónico a una temperatura de 40°C por 10 min, luego se extrajo el sobrenadante y se reservó. A la muestra nuevamente se le

agregó 25 mL del solvente y se llevaron a sonicar en las mismas condiciones ya descritas, siguiendo este procedimiento tres veces.

Los tres sobrenadantes recolectados se llevaron a sequedad en un rotavapor con presión disminuida y con una temperatura de 50°C. El extracto seco obtenido se llevó a un matraz aforado de 10 mL con el solvente correspondiente.

Se sembraron 15 µL de cada extracto y se realizó una CCF para ácidos fenólicos, con el fin de determinar cuál era el mejor solvente de extracción basado en características cualitativas, en este caso, la fluorescencia.

Cabe mencionar que los extractos fueron almacenados en tubos falcon a una temperatura de -80°C hasta realizar las demás cromatografías respectivas.

*b) Cromatografía en capa fina para ácidos fenólicos.*

Para la CCF de ácidos fenólicos se utilizó una placa de aluminio, recubierto con sílica gel 60 F254 como fase estacionaria, activada a 110°C por 30 min. Como fase móvil se utilizó una fase móvil para flavonoides modificada compuesta por acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, tolueno y agua en la relación 90:11:11:5:13, que es una mezcla de solventes específicos para ellos. (Hildebert Wagner, s. f.)

Se realizaron soluciones estándares de ácido cafeico y ácido clorogénico, pesando 3 mg de cada uno y se aforaron a 5 mL con metanol en un matraz de aforado, posteriormente se realizó una dilución de estos de 2,5 mL en 5 mL de metanol.

Se sembraron 15 µL de la muestra M1 y M2, y 5 µL de los estándares. Una vez desarrollada la placa, la visualización de los componentes activos se realizó observando bajo luz ultravioleta 365 nm, luego

de haber rociado la placa con la mezcla reveladora Natural product/ Polietilenglicol (NP/PEG), para componentes fenólicos (Hildebert Wagner, s. f.).

A partir del cromatograma obtenido se determinó el factor de retención (Rf) de los estándares y los Rf de las bandas obtenidas en la elución de las muestras.

*c) Cromatografía en capa fina para sesquiterpenlactonas.*

Para la CCF de sesquiterpenlactonas se utilizó placas de aluminio, recubierto con sílica gel 60 F254 como fase estacionaria, activada a 110°C por 30 min. Como fase móvil se utilizó ciclohexano y acetato de etilo en la relación de 1:1, los cuales son solventes específicos para sesquiterpenlactonas. (American Herbal Pharmacopoeia And Therapeutic Compendium, 2007)

Se sembraron 15 µL de la muestra M1 y M2. Una vez desarrollada la placa para la visualización de los componentes activos se debió sumergir la placa en su totalidad por un segundo en un agente revelador de sesquiterpenlactonas, anisaldehído-ácido sulfúrico, y luego se observó a la luz visible.

A partir del cromatograma obtenido se determinó los Rf de las bandas obtenidas en la elución de las muestras.

**4.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD)**

Para la identificación de Leptocarpina se utilizó un cromatógrafo líquido alta resolución con detector de Arreglo de diodos (DAD) marca Shimadzu con Autosampler modelo SIL20AC, un horno de columna CTO-20AC, desgasificador DGU-20A5, bomba modelo LC-20AD y detector de arreglo de diodo SPD M20A. Se utilizó una columna cromatográfica (C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm (UP)) y una pre-columna (CC 8/4 nucleodur C18 Gravity, 5 µm).

Se realizó un extracto pesando 750 mg de la muestra M1 y se realizaron tres extracciones con 25 mL de metanol HPLC. Cada extracción se realizó por sonicación a una temperatura de 40°C por 10 min, luego se separó el sobrenadante del extracto. Posteriormente, el solvente recolectado se eliminó llevando a sequedad en un rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 50°C. Finalmente, el extracto seco se aforó en un matraz de 10 mL con metanol HPLC, para luego ser inyectado en el equipo.

Antes de comenzar a inyectar la muestra en el HPLC, el extracto debió ser filtrado a través de un filtro de membrana de Nylon de 0,22 µm de diámetro de poro y se inyectaron 20 µL de este.

Se utilizó el método descrito en la monografía de “American Herbal Pharmacopeia” de la especie *Tanacetum parthenium* para la identificación de la sesquiterpenlactona Partenolida. Se utilizaron dos fases móviles compuestas por una fase móvil (A) identificada como agua ultra pura y la otra de acetonitrilo HPLC (B). Los gradientes de estas fases móviles se pueden apreciar en la tabla N° 6. El caudal fue de 2,0 mL/min a una temperatura de 25°C y la detección se realizó a una longitud de onda de 218 nm.

**Tabla 6:** Sistema de gradientes de fase móvil de A y B.

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0,01	60	40
12,00	60	40
12,01	10	90
17,00	10	90
17,01	60	40
22,00	60	40

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Ensayos de pureza

Al realizar las siguientes pruebas de pureza: Pérdida por secado, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido por triplicado para cada muestra de flores (M1 y M2) se obtuvieron los resultados expresados en la tabla N° 7. Los cálculos se pueden apreciar de manera detallada en el anexo 1.

**Tabla 7:** Valores de pérdida por secado, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido para las flores de *Leptocarpha rivularis* DC para las muestras M1 y M2.

Muestra	Pérdida por secado (%)*	Cenizas totales (%)*	Cenizas insolubles en ácido (%)*
M1	11,34 ± 0,11	8,11 ± 0,12	0,25 ± 0,03
M2	12,35 ± 0,11	8,52 ± 0,08	0,41 ± 0,07

**Nota:** \*Promedio ± desviación estándar ( $\bar{x} \pm D.S$ )

Los resultados promedios obtenidos en la prueba de pérdida por secado para la muestra M1 y M2, 11,34% y 12,35 % respectivamente, se encuentran dentro de un rango aceptable para el límite de esta prueba de pureza. Estos resultados proporcionan definir que el límite de humedad para las flores de *Leptocarpha rivularis* no deben de ser mayor a 13%, debido a que si aumentamos esta humedad se corre el riesgo de posiblemente crecimiento microbiano, de hongos o la atracción de ciertos insectos a las muestras, provocando descomposición de estas.

Para las pruebas de cenizas totales se obtuvieron valores promedios de 8,11% y 8,52% para la muestra M1 y M2 respectivamente, y valores promedios de cenizas insolubles de 0,25% para M1 y 0,41% para M2. Estos resultados nos proporcionan el valor límite de cenizas totales el que *no debe de ser mayor a 9%*, este valor indica la cantidad de compuestos inorgánicos presentes en la planta. Por otro lado, el valor límite de cenizas insolubles en ácido es de *no más de 1%*, estos límites indican la cantidad de suciedad que pueda contener de materias extrañas y de sílice las muestras.

Al realizar la prueba de materias extrañas en ambas muestras no se encontró restos de otras plantas, ni polvo, ni arena, ni tierras o piedras, debido a que estas muestras ya estaban limpias antes de comenzar el análisis. Por ende, el porcentaje de materias extrañas encontrado fue de 0%, por lo tanto, el porcentaje considerando el límite de materias extrañas según la Farmacopea Chilena es que *debe de ser menor a 2%* (Farmacopea Chilena, 2015).

Se realizó un test student para cada parámetro de pureza comparando los valores obtenidos por triplicado de la muestra M1 con la M2, arrojando valores de  $p < 0,05$  (Anexo 2). Con esta información se puede concluir que existen diferencias significativas entre ambas muestras, esto se puede deber a los distintos sitios de obtención de las muestras, fechas desconocidas de sus recolecciones, entre otras causas. Es por esto que se recomienda realizar ensayos con nuevas muestras provenientes de otros lugares a lo largo del país, para obtener valores más representativos.

Además, se realizó una comparación de los ensayos de pureza de *Leptocarpha rivularis* con las flores de otra especie de la familia Asteraceae llamada crisantemo silvestre, publicados en la farmacopea estadounidense en el año 2022 (USP-NF 2022).

**Tabla 8:** Valores de ensayos de pureza para flores de Crisantemo silvestre y palo negro.

<b>Pruebas de purezas</b>	<b>Flores de crisantemo silvestre</b>	<b>Flores de palo negro</b>
Pérdida por secado	No mayor a 14%	No mayor a 13%
Cenizas totales	No más de 8%	No mayor a 9%
Cenizas insolubles en ácido	No más de 2%	No más de 1%

Al observar la tabla 8 se puede concluir que entre ambas especies vegetales sus límites en los ensayos de pureza son bastante similares, no existiendo mayores diferencias entre especies de la misma familia. La leve diferencia en el límite de pérdida por secado de las flores de *Leptocarpha*

*rivularis* y las flores de crisantemo salvaje, se puede deber a las condiciones de secado de nuestras muestras, por diferencias morfológicas, por el lugar de obtención o por la cantidad de aceites esenciales que contiene las flores de cada planta.

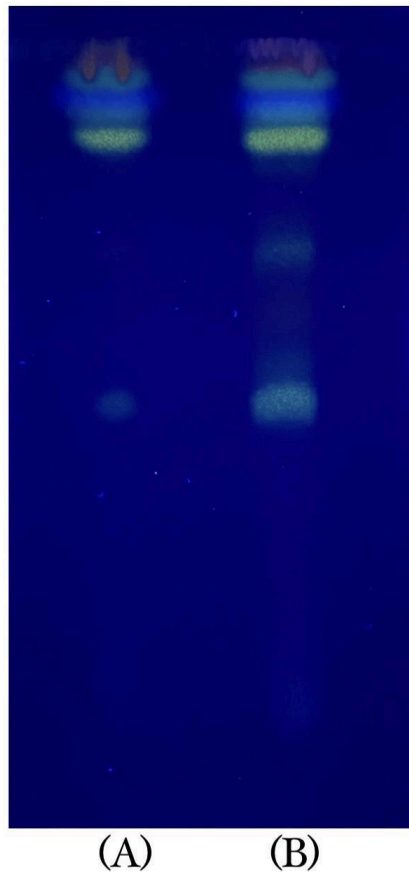
Es recomendable para confirmar los valores obtenidos en cada ensayo de pureza de las flores de *Leptocarpha rivularis* realizar las mismas pruebas con otras muestras recolectadas en distintos lugares. Además, es importante desarrollar otros tipos de ensayos, como lo es la cuantificación de aceites esenciales, para determinar la cantidad total de ellos presentes en las flores y no sobrevalorar el valor de la pérdida por secado. También se sugiere realizar en conjunto una prueba para ver específicamente el contenido de agua, como por ejemplo por medio de una destilación azeotrópica o pérdida por secado en estufa de vacío (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2024).

## **5.2. Identificación química**

### **5.2.1. Elección del solvente de extracción de la muestra para CCF.**

Al revelar la placa cromatográfica con NP/PEG y observar bajo luz ultravioleta con una longitud de onda de 365 nm se obtuvo la placa de la figura 6. Observándose que el mejor extractor es el solvente metanol PA.

Se escogió el solvente de manera cualitativa, ya que con la extracción con metanol se pueden apreciar una mayor cantidad de bandas representativas de compuestos, fluorescentes con colores más intensos, bandas más compactas y separadas entre sí que con el solvente etanol.



**Figura 6.** Cromatografía en capa fina de extractos de M1 para elección del solvente.

**Nota:** (A) Extracto en etanólico de la muestra M1. (B) Extracto metanólico de la muestra M2. Fase móvil: acetato de etilo; ácido fórmico; ácido acético glacial; tolueno; agua (90:11:11:5:13). Revelador: NP/PEG.

Esta diferencia en la extracción se debe a que el metanol tiene una polaridad mayor que etanol, como se demuestra en el estudio realizado por Do *et al.* (2014), donde se indica que el rendimiento de la extracción aumenta con el aumento de la polaridad del solvente utilizado al realizar la extracción de polifenoles.

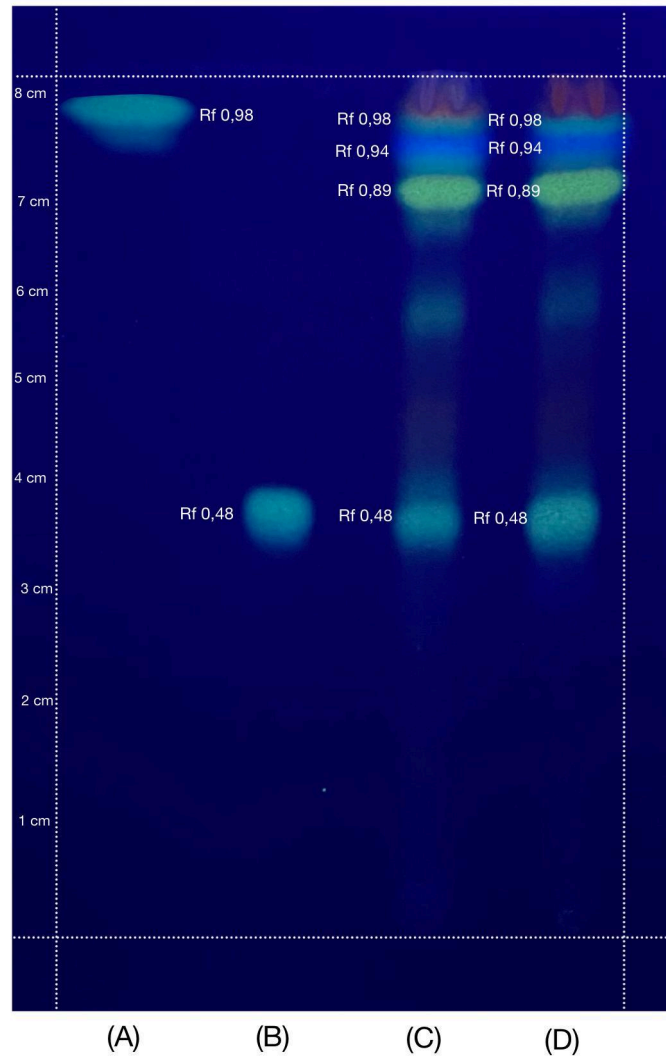
Esta elección de solvente se puede reafirmar con el hallazgo de la investigación realizada por Sultana *et al.* (2009), donde compararon el efecto de etanol absoluto y metanol absoluto, como solvente para realizar extractos en plantas medicinales. Observan que el mejor rendimiento obtenido en variadas técnicas de extracción es el metanol, además recalcan la importancia de la temperatura en las

pruebas de análisis, debido a que observaron que a una temperatura mayor a 80°C se puede apreciar una descomposición térmica de los componentes fenólicos del material vegetal, es por este motivo recomiendan utilizar temperaturas menores en las extracciones, ya que no se vería afectada la estabilidad de los componentes de las muestras.

### **5.2.2. Identificación de ácidos fenólicos en CCF.**

Se realizó una CCF con una fase móvil compuesta acetato de etilo; ácido fórmico; ácido acético glacial; tolueno; agua, pero fue modificada, debido a que en la formulación original descrita por Hildebert Wagner (1985) no contenía tolueno. Este solvente fue adicionado para disminuir la polaridad de la fase móvil, para obtener bandas con menor recorrido de elución, con mayor separación entre sí y más compactas a simple vista.

A continuación, en la figura 7 se presenta la placa cromatográfica revelada con NP/ PEG bajo lámpara UV a 365 nm, donde se aprecia una banda superior de fluorescencia de color celeste verdoso que corresponde al estándar de ácido cafeico (Fig. 7. A), y una banda de fluorescencia celeste en posición media en la placa que corresponde al estándar de ácido clorogénico (Fig. 7. B). Comparando las fluorescencias de las bandas de los estándares y la de los extractos de las muestras M1 y M2, Figura 7 C y D respectivamente, se puede apreciar coincidencia en las tonalidades de color de cada una.



**Figura 7.** Cromatografía en capa fina de ácidos fenólicos de extractos de M1 y M2 de las flores de *Leptocarpha rivularis* DC.

**Nota:** (A) Estándar de ácido cafeico. (B) Estándar de ácido clorogénico. (C) Extracto metanólico de la muestra M1. (D) Extracto metanólico de la muestra M2. Revelador: NP/ PEG.

Además, en la figura 7 y en la tabla 9 se aprecian los Rf calculados para cada estándar y para cada componente eluido de las muestras, entre los que podemos identificar es el ácido cafeico, el que presenta un Rf 0,98 y el de ácido clorogénico un Rf 0,48. Comparando los Rf de los estándares con

los Rf de los extractos metanólicos de las muestras, existen bandas que coinciden perfectamente con los valores de Rf de los componentes de referencia.

**Tabla 9:** Factores de retención obtenidos de la cromatografía de ácidos fenólicos.

Color de fluorescencia	Rf M1	Rf M2	Rf Cafeico	Rf Clorogénico
Celeste verdoso	0,98	0,98	0,98	-
Azul	0,94	0,94	-	-
Amarillo	0,89	0,89	-	-
Celeste	0,48	0,48	-	0,48

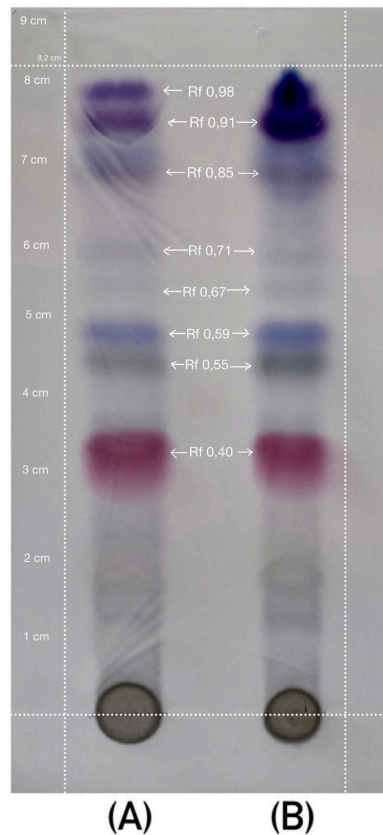
**Nota:** Recorrido total de la fase móvil fue de 8 cm.

A pesar de obtener la identificación de ácidos fenólicos en los extractos metanólicos de flores por medio de una CCF es recomendable realizar otros tipos de análisis, como por ejemplo una HPTLC y un HPLC, que corresponden a las pruebas oficiales dentro de una monografía para la identificación de compuestos, ya que los resultados obtenidos de estas pruebas se pueden complementar entre sí. Estas técnicas permiten obtener resultados más precisos y exactos, logrando un perfil cromatográfico correcto, debido a que sustentarán la información ya encontrada en este estudio, proporcionando además la identificación de posibles materiales que pueden producir una confusión en los cromatogramas por CCF.

### 5.2.3. Identificación de sesquiterpenlactonas por CCF.

En la figura 8 se observa la muestra M1 y M2 eluida en una fase móvil compuesta por ciclohexano y acetato de etilo en proporción 1:1, la que fue descrita en la monografía de *Tanacetum parthenium* en American Herbal Pharmacopoeia para la identificación de lactonas sesquiterpénicas. La placa fue revelada con el revelador anisaldehído-ácido sulfúrico y observada a luz visible.

En esta cromatografía no se pudo identificar Leptocarpina debido a que no se contaba con un estándar de ella. Sin embargo, en esta placa se obtuvieron bandas similares entre las muestras, como lo demuestra la figura 8. Se observan bandas definidas de colores azul, gris, rosado, con Rf 0,59, 0,55 y 0,40 respectivamente, con estos resultados se puede desarrollar un perfil cromatográfico característico para la identificación de las lactonas sesquiterpénicas.



**Figura 8.** Cromatografía en capa fina de sesquiterpenlactonas de extractos de M1 y M2 de flores de *Leptocarpa rivularis* DC.

**Nota:** (A) Extracto metanólico de M1 . (B) Extracto metanólico de M2. Fase móvil: Ciclohexano; acetato de etilo (1:1). Revelador: Anisaldehído- ácido sulfúrico.

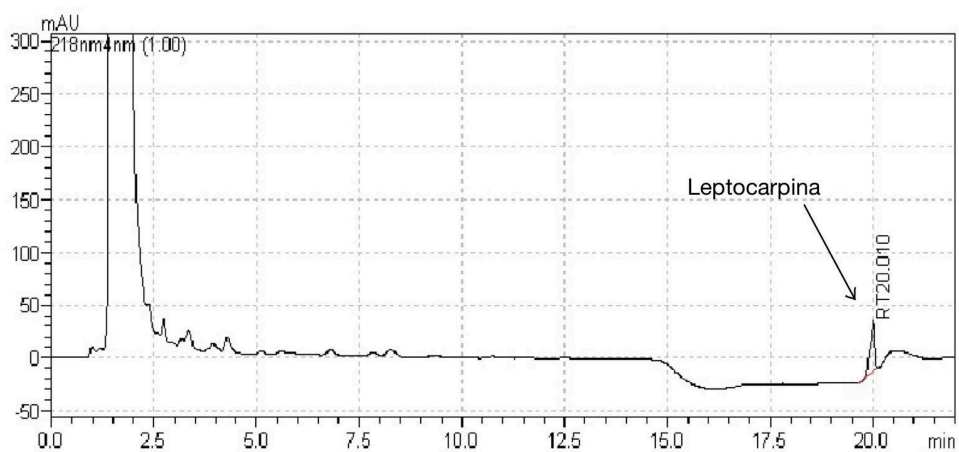
Por otro lado, es importante mencionar que no necesariamente al existir diferencias significativas entre las muestras en los ensayos de pureza, no se obtendrán resultados similares en la identificación de compuestos en una CCF.

#### 5.2.4. Identificación de Leptocarpina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Al no diferenciar Leptocarpina en la CCF para sesquiterpenlactonas se decidió realizar un estudio por HPLC-DAD con un extracto metanólico de la muestra M1 con una concentración de 750 mg/10 mL.

Se siguieron las condiciones descritas en un análisis de American Herbal Pharmacopoeia sobre una monografía de las partes áreas de matricaria, *Tanacetum parthenium*. Este método fue creado específicamente para la identificación de lactonas sesquiterpénicas, Partenolida, la que se estimó una señal cromatográfica con un RT de 12,10 min a una longitud de onda de 200 nm.

Al realizar el HPLC-DAD de las flores de *Leptocarpus rivularis* se obtuvo el cromatograma de la figura 9, donde se estima una señal cromatográfica con un RT 20,01 min a una longitud de onda de 218 nm que podría asociarse a la Leptocarpina. Además, en paralelo se realizó un estudio de hojas y tallos de *Leptocarpus rivularis* en las mismas condiciones que las flores, demostrando que existe una señal cromatográfica con una longitud de onda y un RT parecido (Anexo 3).

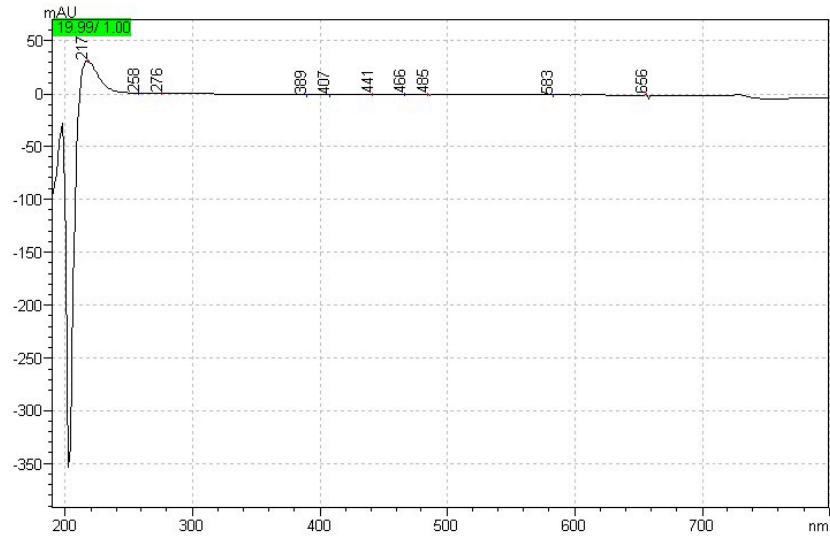


**Figura 9.** Cromatograma HPLC-DAD del extracto M1 metanólico de flores de *Leptocarpus rivularis*.

Al comparar los cromatogramas del estudio de *Tanacetum parthenium* y *Leptocarpha rivularis*, se obtuvo la Partenolida y la Leptocarpina en distintos tiempos de RT, a pesar de que tengan una estructura base de lactonas sesquiterpénicas, tienen diferencias estructurales, lo que lleva a tener distinta polaridad y afinidad por la fase móvil del método utilizado, provocando que sean identificadas en distintos RT.

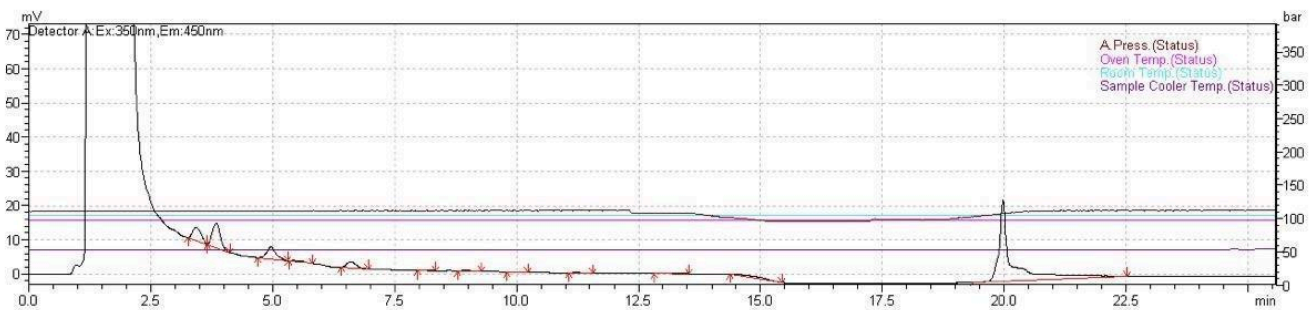
Se realizó una comparación con una investigación realizada por Andrea Jiménez-González *et al.* (2018), en el que analizaron las partes aéreas de *Leptocarpha rivularis* y sus metabolitos por HPLC, en el que realizaron extractos en etanol, acetato de etilo y acuosos. Utilizando un método con un eluyente A de ácido fórmico al 0,1% en agua y uno B de ácido fórmico a 0,1% en ACN con el siguiente gradiente: 5 % B isocrático (0–5 min), 5–30 % B (5–10 min), 30 % B isocrático (10–15 min), 30–70 % B (15–20 min), 70 % B isocrático (20–25 min), 70–5 % B (25–35 min) y 15 min para el equilibrio de la columna antes de las inyecciones. El caudal fue de 1,00 mL/min y el volumen inyectado fue de 10 µL.

En el estudio de Andrea Jiménez-González *et al.* (2018), se analizó con un PDA de 200 a 800 nm para la caracterización de las señales cromatográficas, demostrando que la Leptocarpina se puede apreciar a una longitud de onda máxima de 225 nm siendo similar al resultado logrado, pero no se demuestra el espectro de Leptocarpina para poder comparar con el obtenido en este estudio, el que se puede apreciar en la figura 10.



**Figura 10.** Espectro de absorción de Leptocarpina a una longitud de onda de 218 nm.

Además, en el cromatograma de fluorescencia de la figura 11, donde se utilizó un detector con longitud de excitación a 350 nm y una longitud de emisión de 450 nm, se observa una señal de fluorescencia al mismo RT que la supuesta Leptocarpina, indicando que este compuesto emite fluorescencia.



**Figura 11.** Cromatograma HPLC con detector de fluorescencia de extracto M1 metanólico.

De acuerdo con los antecedentes recaudados según la investigación realizada con los ya existentes, es posible afirmar que la señal cromatográfica obtenida en el min 20,01 puede ser proveniente de la Leptocarpina

### ***5.3 Prototipo de monografía farmacopeica.***

En el anexo 4 se muestra el prototipo de monografía farmacopeica donde se ha logrado definir la especie, características organolépticas, un perfil cromatográfico para la identificación de ácidos fenólicos, valores de ensayos generales tales como pérdida por secado, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido y materias extrañas.

## 6. CONCLUSIONES

Mediante el estudio enfocado en la identificación y en las pruebas de pureza de las flores de *Leptocarpha rivularis* es posible plantear las siguientes conclusiones:

- Mediante la cromatografía en capa fina se logró definir un método para determinar la presencia de ácidos fenólicos, como ácido clorogénico y ácido cafeico en los extractos metanólicos de las flores. También se logró obtener un perfil cromatográfico similar entre ambas muestras estudiadas aplicando un método desarrollado para identificar sesquiterpenlactonas, a pesar que existen diferencias significativas de pureza entre las muestras.
- Mediante la cromatografía líquida de alta resolución se obtuvo posiblemente la identificación de Leptocarpina, pero para la confirmación de esta es necesario contar con un estándar de referencia.
- Se lograron determinar parámetros de pureza que servirán como base para continuar con el desarrollo de la monografía farmacopeica, para esto último se hace necesario un muestreo más representativo que comprenda los factores territoriales y estacionales de diferente localidades del país.
- Con la totalidad de la información obtenida en este estudio se pudo generar un prototipo de monografía farmacopeica con los ítem de identificación química y pureza.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. American Herbal Pharmacopoeia And therapeutic compendium (2007). Feverfew Aerial Parts, *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Standards of Analysis Quality Control, and Therapeutics.
2. Arias, G., Carrasco, H., Espinoza, L., Olea, A. F., Rubio, J., Robles-Kelly, C., & Silva-Moreno, E. (2022). Phytochemical profiling and assessment of anticancer activity of *Leptocarpha rivularis* extracts obtained from in vitro cultures. *Plants*, 11(4), 546. <https://doi.org/10.3390/plants11040546>
3. Bosio C. Tomasoni G, Martinez R, Olea A, Carrasco H, Villena J. (2015). Cytotoxic and apoptotic effects of leptocarpin, a plant-derived sesquiterpene lactone, on human cancer cell lines. *Chem Biol Interact* 242: 415 - 421. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.006>
4. Cañigüeral, S. (2006). PL02 Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales. *Revista de fitoterapia*, 6(S1), S1.
5. Carrasco, N., Garrido, M., Montenegro, I., Madrid, A., Hartley, R., González, I., Rubilar, M., Villena, J., & Valenzuela-Valderrama, M. (2023). Antitumoral Activity of *Leptocarpha rivularis* Flower Extracts against Gastric Cancer Cells. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(2), 1439. <https://doi.org/10.3390/ijms24021439>
6. Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
7. Farmacopea Chilena (Cuarta edición). (2015). Editorial Hunneus E.I.R.L
8. Farmacopea de los Estados Unidos de América (2024). *General Chapter, <731> Pérdida por Secado*. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.
9. Farmacopea de los Estados Unidos de América (2024). *General Chapter, <921> Determinación de Agua*. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.
10. GARCÍA DE MARINA BAYO, A. D. R. I. Á. N., & Yusa Marco, D. J. (2016). *HPLC instrumental*. Editorial Universitat Politècnica de València.
11. Gomez, V., González, P. S. C., Peña, M. E. E., Verdugo, A. D. I., Lagos, C. D. C. R., & Oppenheimer, C. R. W. (2016). Historia, presente y proyecciones de la Farmacopea. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 82, No. 3).

12. González-Garrido, V. B., Jiménez-Baltierra, D. A., Orellana, R., & Cortés, M. E. (2022). Plantas medicinales chilenas: desde el saber ancestral a la comercialización poco regulada. *Revista Medica De Chile*, 150(2), 275-276. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872022000200275>
13. Hildebert Wagner. (1983). *Análisis de drogas vegetales: Un atlas de cromatografía en capa fina* (Segunda edición). Sabine Blatt.
14. Informe de evaluación de solicitud de régimen de control sanitario. (2021, 15 septiembre). ISP. Recuperado 7 de octubre de 2023, de <https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2022/06/INFORME-TECNICO-PALO-NEGRO-9A-22.pdf>
15. Jiménez-Gonzalez, A., Quispe, C., Borquez, J., Sepulveda, B., Riveros, F., Areche, C., Nagles, E., García-Beltran, O., Simirgiotis, M.J. (2018) Análisis UHPLC-ESI-ORBITRAP-MS de la planta medicinal mapuche nativa palo negro (*Leptocarpha rivularis* DC.-Asteraceae) y evaluación de sus propiedades antioxidantes e inhibidoras de la colinesterasa. *J. Inhibi Enzimático. Med. Química*. 33, 936–944.
16. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. (2015). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 46(No. 1), 9-24. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181238817002.pdf>
17. Ministerio de Salud: DECRETO 3 APRUEBA REGLAMENTO DEL SISTEMA NACIONAL DE CONTROL DE LOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS DE USO HUMANO. (2020). BCN. Recuperado 6 de noviembre de 2023, de <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1026879>
18. Montenegro, I., Moreira, J. J. S., Ramírez, I., Dorta, F., Sánchez, E., Alfaro, J. F., Valenzuela, M., Jara-Gutiérrez, C., Muñoz, O., Alvear, M., Werner, E., Madrid, A., Villena, J., & Seeger, M. (2020). Chemical composition, antioxidant and anticancer activities of *Leptocarpha rivularis* DC flower extracts. *Molecules*, 26(1), 67. <https://doi.org/10.3390/molecules26010067>
19. Obando, M. Scientific evidence of the medicinal properties of plants for use in intercultural medicine in Chile. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat.* 2020, 19, 207.
20. Ortega-Chavarría. M. J. (2022, 18 enero). Medicina herbolaria como causa de hepatotoxicidad. mitos y realidades. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=107809>
21. Ossa, A., Morales, L. (2012). Sesquiterpenlactonas. <https://issuu.com/laurismorales/docs/sesquiterpenlactona>

22. Poole, C. (Ed.). (2014). Instrumental thin-layer chromatography. Elsevier.
23. World Health Organization (2011). Quality control methods for herbal materials
24. Rubio, J., Arias, G., Robles-Kelly, C., Silva-Moreno, E., Espinoza, L., Carrasco, H., & Olea, A. F. (2022). Phytochemical profiling and assessment of anticancer activity of leptocarpha rivularis extracts obtained from in vitro cultures. *Plants*, 11(4), 546. <https://doi.org/10.3390/plants11040546>
25. Ruiz Benitez, M. L. (2020). Cromatografía en capa fina y en columna.
26. Srivastava, M. (Ed.). (2010). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Springer Science & Business Media.
27. Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 14(6), 2167-2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
28. United States Pharmacopeial Convention. (2022). United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF) (2022 ed.). United States Pharmacopeial Convention.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1: Cálculos de valores de pérdida por secado, cenizas totales e insolubles en ácido.

- Pérdida por secado M1

CALCULO HUMEDAD						
(g) crisol	(g) muestra	(g)placa + muestra obtenida	(g) muestra obtenida	(g) agua	% agua	
20,9730	1,2047	22,0408	1,0678	0,1369	11,36	
21,1063	1,2010	22,1701	1,0638	0,1372	11,42	
24,2569	1,2042	25,3260	1,0691	0,1351	11,22	
					<b>PROMEDIO</b>	11,34
					<b>DESV</b>	0,11

- Pérdida por secado M2

CALCULO HUMEDAD						
(g) crisol	(g) muestra	(g)placa + muestra obtenida	(g) muestra obtenida	(g) agua	% agua	
20,4882	1,2038	21,5419	1,0537	0,1501	12,47	
20,2913	1,2007	21,3439	1,0526	0,1481	12,33	
20,2985	1,2072	21,3577	1,0592	0,1480	12,26	
					<b>PROMEDIO</b>	12,35
					<b>DESV</b>	0,11

- Cenizas totales M1

CALCULO CENIZAS TOTALES					
(g) crisol	(g)muestra	(g)crisol + cenizas	(g)cenizas obtenidas	%	
20,9730	1,2047	21,0716	0,099	8,18	
21,1063	1,2010	21,2045	0,098	8,18	
24,2569	1,2042	24,3529	0,096	7,97	
				<b>PROM</b>	8,11
				<b>Desv</b>	0,12

- Cenizas totales M2

<b>CALCULO CENIZAS TOTALES</b>				
<b>(g) crisol</b>	<b>(g)muestra</b>	<b>(g)crisol + cenizas</b>	<b>(g)cenizas obtenidas</b>	<b>%</b>
20,4882	1,2038	20,5912	0,103	8,56
20,2913	1,2007	20,3943	0,103	8,58
20,2985	1,2072	20,4002	0,102	8,42
			<b>PROM</b>	8,52
			<b>Desv</b>	0,08

- Cenizas insolubles en ácido M1

<b>CALCULO CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO</b>				
<b>(g) crisol</b>	<b>(g)muestra</b>	<b>(g)crisol + cenizas</b>	<b>(g)cenizas obtenidas</b>	<b>%</b>
20,9730	1,2047	20,9762	0,0032	0,27
21,1063	1,2010	21,1096	0,0033	0,27
24,2569	1,2042	24,2596	0,0027	0,22
			<b>PROM</b>	0,25
			<b>Desv</b>	0,03

- Cenizas insolubles en ácido M2

<b>CALCULO CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO</b>				
<b>(g) crisol</b>	<b>(g)muestra</b>	<b>(g)crisol + cenizas</b>	<b>(g)cenizas obtenidas</b>	<b>%</b>
20,4882	1,2008	20,4928	0,0046	0,38
20,2913	1,2007	20,2972	0,0059	0,49
20,2985	1,2072	20,3028	0,0043	0,36
			<b>PROM</b>	0,41
			<b>Desv</b>	0,07

## Anexo 2: Test student para las pruebas de pureza con muestra M1 v/s M2

- Pérdidas por secado

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	11,33556837	12,35436496
Varianza	0,011079151	0,011224791
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,011151971	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
<b>Estadístico t</b>	<b>-11,81564138</b>	
P(T<=t) una cola	0,000146836	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	<b>0,000293672</b>	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	<b>2,776445105</b>	

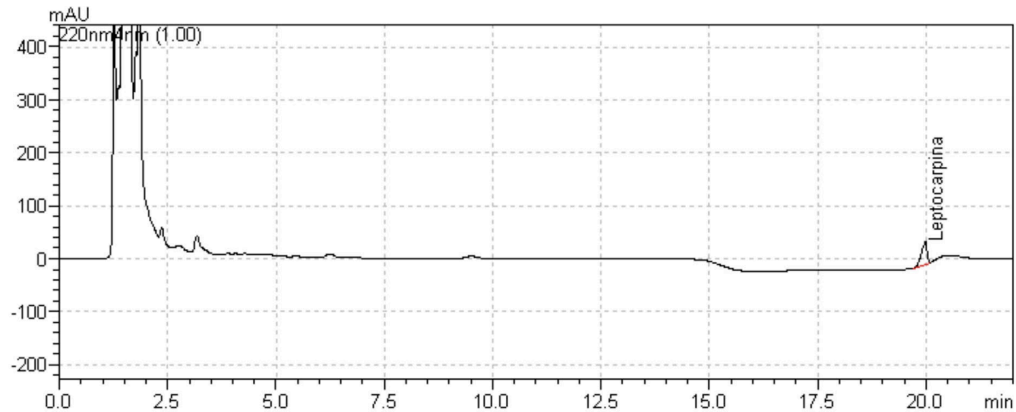
- Cenizas totales

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	8,111075834	8,519673722
Varianza	0,014502565	0,006922199
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,010712382	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-4,835024933	
P(T<=t) una cola	0,00421523	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	<b>0,008430461</b>	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	<b>2,776445105</b>	

- Cenizas insolubles en ácido

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	0,254870856	0,40989982
Varianza	0,000725731	0,005147322
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,002936527	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-3,50381767	
P(T<=t) una cola	0,012405133	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,024810265	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

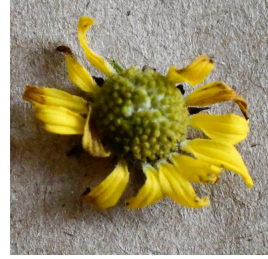
**Anexo 3: Cromatograma de HPLC-DAD de hojas y tallo de *Leptocarpus rivularis* para la identificación de Leptocarpina.**



**Anexo 4: Prototipo de monografía farmacopeica de *Leptocarpha rivularis* DC.**

**Palo negro, flores.**

*Leptocarpha rivularis* DC.



**Nombre común:** Palo negro, Cüdu-mamëll.

**Definición:** Corresponde a las flores secas de *Leptocarpha rivularis* DC.

**Descripción de la planta:** Es arbusto ramoso de aproximadamente de uno a dos metros de altura, compuesta por ramas delgadas de corteza de color oscura, con hojas alternadas y opuestas de color verde oscuro. Las flores tienen un color amarillo intenso, de forma ligadas en el borde y tubulosas en el centro. Además, se aprecia el crecimiento de un fruto aquenio negro el cual en su estructura posee dos pequeñas púas

**Descripción e identificación**

**Análisis organoléptico:** Flores de color amarillo de textura lisa con aroma dulce.

**Cromatografía en capa fina:** Placa de gel de sílice F254 de 10 x 10 cm.

**Solución problema:** Se deben de pesar 250 mg de la muestra seca y tamizada por tamiz mesh #45. Luego se debe de añadir 25 mL de metanol y exponer en un baño de sonicación directa durante 10 min a una temperatura de 40°C. A continuación, se extrae el sobrenadante y se reserva. Este procedimiento se debe de repetir tres veces bajo las mismas condiciones. Los tres sobrenadantes recolectados se llevan a sequedad en un rotavapor con presión disminuida a una temperatura de 50°C. El extracto seco obtenido se transfiere a un matraz aforado de 10 mL con metanol.

**Solución de referencia:** Para la solución de referencia se debe utilizar ácido clorogénico (0,3 mg/mL) en metanol y ácido cafeico (0,3 mg/mL) en metanol.

**Fase móvil:** La fase móvil debe de consistir en acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, tolueno y agua en proporción 90:11:11:5:13 respectivamente.

**Reveladores:** Se debe utilizar una solución al 1% de difenilborato de 2-aminoetilo en metanol (Revelador 1) y una solución al 5% de polietilenglicol 400 (Revelador 2).

**Procedimiento:** Se debe aplicar por separado en punto 15  $\mu\text{L}$  de la preparación de la muestra, 5  $\mu\text{L}$  del estándar de ácido clorogénico y 5  $\mu\text{L}$  del estándar de ácido cafeico, se introduce la placa en la cámara de elución hasta que la fase móvil recorra el 90% de la placa, luego se debe retirar de la cámara y se deja secar en estufa por 10 min a 105°C. Se rocía con el revelador 1 y a continuación con el revelador 2. Se deja secar al aire por aproximadamente 10 min y luego se examina a luz UV a 365 nm.

**Resultado:** Véase a continuación la secuencia de las bandas presentes en los cromatogramas de la solución de referencia y la solución problema.

Zona alta de la placa	
Ácido cafeico: Banda de fluorescencia de color celeste verdoso	Banda de fluorescencia celeste verdoso: Ácido cafeico  Banda de fluorescencia azul  Banda de fluorescencia amarilla
Ácido clorogénico: Banda de fluorescencia de color celeste	Banda de fluorescencia celeste: Ácido clorogénico
Referencia	Problema

## Ensayos

Pérdida por secado: No más de 13%

Cenizas totales: No más de 9%

Cenizas insolubles en ácido: No más de 1%

Materias extrañas: No más de 2%