



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación *in chemico* del potencial irritante de
la piel de *Heterotheca inuloides* y su principio
activo 7-Hidroxi-3,4-dihidrocadalenol

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Rodrigo Luna Portilla



CDMX

2023



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: **Andrés Navarrete Castro**
Vocal: **María Eva González Trujano**
Secretario: **José Luis Balderas López**
Primer suplente: **Ruth Ivonne Téllez Ballesteros**
Segundo suplente: **Víctor Hugo Avilés Rosas**

Sitio donde se desarrolló la investigación:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Laboratorio de Farmacología de Productos Naturales 126.

Asesor: **Dr. Andrés Navarrete Castro**



Sustentante: **Rodrigo Luna Portilla**



Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM a través del proyecto PAPIIT-IN203122, por la Facultad de Química a través del proyecto PAIP-5000-9143 y al proyecto CONACYT A1-S-9698.

- Se agradece Al Dr. Adelfo Reyes Ramírez de la FES Zaragoza, UNAM. por la realización de la síntesis química del compuesto DCYA utilizado en esta investigación.
- También se agradece a los Laboratorios Mixim S.A. de CV por su generosidad al donar las inflorescencias y los extractos fluidos comerciales del árnica mexicana y árnica europea.

Dedicatoria

A mis santos por las bendiciones que me otorgan cada día. A mi madre por su gran amor y apoyo incondicional. A mis maestros por guiarme con paciencia en el sendero del conocimiento. En general a toda aquella persona que formó parte de este maravilloso capítulo.



Índice general

Índice de figuras	7
Índice de cuadros	8
1. Resumen	9
2. Introducción	11
3. Marco teórico.....	12
3.1 Plantas medicinales.....	12
3.2 Plantas medicinales en México.....	13
3.3 Árnica Mexicana (<i>H. inuloides</i>)	13
3.3.1 Morfología.....	14
3.3.2 Usos tradicionales.....	16
3.3.3 Composición química.....	17
3.3.4 Compuestos sesquiterpenoides.....	17
3.3.5 Compuestos polifenólicos.....	18
3.3.6 Otros compuestos de interés.....	19
3.3.7 Actividad biológica.....	21
3.4 Árnica mexicana (<i>Heterotheca inuloides</i> Cass.) vs Árnica europea (<i>Arnica montana</i> L.).....	22
3.5 Productos comerciales.....	24
3.6 Pruebas de irritabilidad en piel.....	25
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivo general	28
6. Objetivos particulares.....	28
7. Materiales y Método	29
7.1 Síntesis de DCYA.....	29
7.2 Validación del método.....	30
7.3 Determinación del potencial irritante de la piel.....	31
8. Resultados	33
9. Análisis de resultados.....	36
10. Conclusiones	43
11. Perspectivas	44
12. Bibliografía	45



Índice de figuras

Figura 1. Árnica mexicana (<i>H. inuloides</i>)	15
Figura 2. Morfología de <i>H. inuloides</i>	15
Figura 3. Compuestos de origen sesquiterpénico de interés aislados de <i>H.inuloides</i>	18
Figura 4. Flavonoides y glucósidos de interés aislados de <i>H. inuloides</i>	19
Figura 5. Otros compuestos de importancia aislados de <i>H. inuloides</i>	20
Figura 6. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>A. montana</i>	23
Figura 7. Cromatografía en placa fina del DCYA sintetizado	30
Figura 8. Procedimiento experimental resumido del método de DCYA	32
Figura 9. IR del extracto fluido de <i>H. inuloides</i> y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno.....	33
Figura 10. IR de los extractos fluidos de <i>H. inuloides</i> y de <i>A. montana</i>	34
Figura 11. Comparación entre las flores seca de <i>H. inoloides</i> y <i>A. montana</i>	37
Figura 12. IR de varias sustancias	39
Figura 13. Aducto esperado en la reacción entre el DCYA y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno	42

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ficha taxonómica de <i>H. inuloides</i>	14
Cuadro 2. Afecciones y modos de uso tradicionales de <i>H. inuloides</i>	16
Cuadro 3. Principales Actividades biológicas de <i>H. inuloides</i>	21
Cuadro 4. Condiciones empleadas para los diferentes controles experimentales	32
Cuadro 5. Validación del método de DCYA	35

1. Resumen

México es uno de los países más ricos en diversidad de plantas medicinales. En la actualidad muchas de esas plantas se han vuelto fuente de materia prima para la industria debido a la producción de diferentes metabolitos. Éstos son integrados en la formulación y producción de múltiples productos, desde los alimenticios hasta fármacos y medicamentos. El árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) es una de las plantas endémicas con mayor uso medicinal desde la antigüedad, tanto por comunidades rurales como urbanas. Hoy en día se puede encontrar a esta especie y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno a la venta en diferentes presentaciones tales como parches, pomadas, tinturas, geles o infusiones. Todas estas presentaciones tienen en común una vía de administración tópica, por lo que para salir al mercado se debe de cumplir con ciertas pruebas de producto terminado entre las que destacan las pruebas de irritabilidad dérmica. El objetivo de esta investigación fue determinar a través de un método *in chemico* si el árnica mexicana y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno son irritantes de la piel utilizando 5-(dimetilamino)-*N*-(2-mercaptoetil)naftalen-1-sulfonamida (DCYA) como marcador fluorescente (fluoróforo). Para llevar a cabo dichas evaluaciones se realizó la validación analítica de este método. El método cumplió satisfactoriamente con ocho de los nueve parámetros de validación mínimos requeridos por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México AC, en su guía de validación de métodos analíticos publicada en 2002.

Los extractos de árnica mexicana (*H. inuloides*) y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno resultaron ser irritantes débiles o no sensibilizadores de la piel, ya que obtuvieron un índice de reactividad entre 0 y 20. El extracto fluido comercial de árnica europea (*A. montana*) y el extracto fluido comercial de árnica mexicana (*H. inuloides*) presentaron un índice de reactividad muy similar entre 5 y 20, en el orden de irritantes débiles de la piel. Para corroborar la funcionalidad del método utilizado también se determinó, el índice de reactividad de los extractos hidroalcohólicos de ortiga fresca y ortiga seca, los cuales presentaron un índice de reactividad entre 5 y 20, por lo que se pueden considerar irritantes débiles de la piel. Como sustancias irritantes de referencia se utilizó el aceite esencial de canela y la *p*-benzoquinona los cuales presentaron un índice de reactividad entre 20 y 80, por lo que se consideran como irritantes moderados de la piel, corroborando así lo reportado en la literatura.

Los resultados obtenidos sustentan el uso y la seguridad de *H. inuloides* y de *A. montana* en diversas formulaciones que suelen aplicarse sobre la piel, sobre todo para aliviar procesos de inflamación y dolor.

2. Introducción.

En México alrededor de 4000 especies de plantas (aproximadamente el 15 % de la flora total) tienen atributos medicinales. Sin embargo, se estima que la validación química, biomédica y farmacológica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo solo en el 5 % o menos de estas especies. Los efectos biológicos se deben a las sustancias de algunas plantas que las hacen útiles como medicamento o cosmético y pueden encontrarse en toda la estructura de la especie o sólo en algunas de ellas. Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad de la planta, el clima, la época del año, el tipo de suelo, la humedad, la forma en que se extraen los compuestos activos, entre otros factores (Ocegueda et al., 2005).

Hablando en materia de regulación nacional, la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Cámara Nacional de Industrias de Productos Cosméticos (CANIPEC) son dos de las principales entidades encargadas del control y vigilancia de los cosméticos y medicamentos. Estas entidades velan por el cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). En cuestiones de irritabilidad, regían anteriormente los métodos generales de análisis (MGA) 515 irritabilidad en piel y MGA 516 irritabilidad ocular, ambos definidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), pero en septiembre de 2021, se aprobó en lo general y en lo particular, una reforma a la Ley General de Salud, en la cual se prohíbe el uso de animales en pruebas de productos cosméticos (Diario Oficial de la Federación, 2021). Es así como surge de nueva cuenta la necesidad de poner en práctica los principios de Russel-Burch (reemplazar, reducir, refinar) para lograr desarrollar nuevos métodos alternativos que eviten en la medida de lo posible el uso de animales (Russell et al., 1959).

Los métodos *in chemico* propuestos hasta ahora se basan en la hipótesis de que los sensibilizadores de la piel se unen covalentemente a un blanco biológico con carácter nucleofílico para formar un complejo antigénico (hapteno) provocando así una respuesta inmune, una mayor exposición al mismo hapteno puede resultar en la producción de una inmunorreacción vigorosa, que habitualmente resulta en una erupción cutánea, enrojecimiento (eritema) u otras lesiones cutáneas (Luebke et al., 2007). Los sensibilizadores conocidos se han clasificado en cinco dominios mecanísticos: (1) aceptores de Michael, (2) agentes acilantes, (3) iniciadores de base de Schiff, (4) pre o proelectrófilos (no electrófilos) y (5) electrófilos capaces de sustitución nucleofílica (SN1, SN2) y sustitución nucleofílica aromática (SNAr) (Aptula et al., 2005). En la presente investigación, se pone a prueba un nuevo método *in chemico* para identificar rápidamente posibles sensibilizadores electrofílicos de la piel

utilizando un derivado fluorescente de cisteamina la 5-(dimetilamino)-*N*-(2-mercaptoetil)naftalen-1-sulfonamida (DCYA). El método DCYA se basa en la cuantificación directa de la formación de aductos (DCYA-Sensibilizador de prueba) mediante detección de fluorescencia en microplacas de 96 pozos (Avonto et al., 2015). El método propuesto se validó para poder determinar de una manera confiable el potencial irritante de la piel para el extracto fluido árnica mexicana, de su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y de otras sustancias (extracto fluido de árnica europea, extractos hidroalcohólicos de ortiga fresca y seca, aceite esencial de canela y *p*-benzoquinona).

3. Marco teórico.

3.1 Plantas medicinales.

Desde los inicios de la vida en el planeta tierra las plantas han desarrollado un papel fundamental como fuente de materia prima y primer eslabón en la cadena alimentaria. Las denominadas plantas alimenticias son las principales productoras de metabolitos primarios, los cuales son sustancias que no ejercen una actividad farmacológica sobre un organismo vivo, pero son necesarios para sobrevivir, por ejemplo: algunos aminoácidos, carbohidratos y lípidos. Mientras que en las plantas medicinales se contienen metabolitos secundarios, los cuales son compuestos con una acción farmacológica, benéfica o perjudicial sobre un organismo vivo (Muñoz et al., 2002). Estos compuestos incluyen a los alcaloides, fenoles, terpenoides, flavonoides, esteroides, entre muchos otros. Dichas sustancias en varios casos son sintetizadas con la misión de proteger a las plantas contra los depredadores, bacterias, hongos y virus (Shurkin *et al.*, 2014).

Muchas plantas medicinales son utilizadas como principio activo de varias formulaciones que se encuentran en el mercado y de varios sistemas médicos tradicionales. Estos sistemas tradicionales de medicina desempeñan un papel esencial en la atención médica, llegando al punto en que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de los habitantes del mundo se basa principalmente en la medicina tradicional para resolver problemas básicos de salud y otras tantas son utilizadas con fines cosméticos. (Panplona et al., 2006).

3.2 Plantas medicinales en México.

El primer libro de plantas medicinales publicado en el continente americano fue el “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*”, mejor conocido como el código de la Cruz-Badiano, publicados en 1552. Este libro habla sobre las hierbas medicinales de los indígenas, el cual fue escrito en náhuatl por el médico indígena Martín de la Cruz y traducido al latín por su compañero Juan Badiano, Dicho libro es la fuente más antigua sobre la herbolaria de México y afortunadamente fue regresado a México en 1990 por el entonces papa Juan Pablo II. (Zamudio et al., 2002).

Se considera que después de China, nuestro país posee el mayor número de plantas medicinales inventariadas, sin embargo, según la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) en el registro del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) solo se encuentran registradas de 3,000 a 4500 especies de plantas con atributos medicinales. Lo anterior también precisa que sólo se ha hecho el análisis farmacológico de menos del 5% del total de esas plantas. De ese universo, aproximadamente 250 se comercializan de manera cotidiana, el 85% son extraídas del medio silvestre sin planes de manejo sustentable y al menos el 80% de la población mexicana ha hecho uso de alguna de ellas por lo menos en una ocasión (Bye et al., 1995).

3.3 Árnica Mexicana (*H. inuloides*)

El nombre *Heterotheca* se deriva de las raíces griegas $\epsilon\tau\epsilon\rho\sigma$ (heteros: "otro, diferente") y $\theta\eta\kappa\eta$ (théke: "caja de semillas") y se refiere a las diversas formas de los frutos producidos por los floretes de rayos y flores de disco (cypselas dimórficas) (Imbert et al., 2002, Venable et al., 1985). *Heterotheca inuloides* Cass conocida popularmente como árnica mexicana, acahual o árnica peluche, es una planta medicinal endémica de México, es utilizada frecuentemente con fines terapéuticos por las comunidades indígenas, rurales y urbanas del país, ya que se le atribuyen múltiples propiedades entre las que destacan las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitarias, citotóxicas y antiinflamatorias (Castillo et al., 2009; Rosas et al., 2012; Rodríguez et al., 2017). En el **Cuadro 1** se muestra la clasificación taxonómica para esta especie

Cuadro 1. Ficha taxonómica de *H. inuloides*

Nivel	Clasificación
Reino	Plantae
Filo	Traqueofita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteráceas
Género	<i>Heterotheca</i> Cass
Nombre científico	<i>Heterotheca inulides</i> Cass

Características taxonómicas obtenidas de la plataforma trópicos, 2022

3.3.1 Morfología.

Planta herbácea que puede llegar a medir hasta 1 m de altura, con tallos erectos llenos de pelos, cuenta con unas hojas largas las cuales se encuentran alternadas y de un contorno entero que puede tender a aserrado. Sus flores son de color amarillo y se encuentran dispuestas en cabezuelas, todas colocadas sobre un receptáculo plano de unos 2 cm de ancho, parecidas a las margaritas. Todo esto sobre pedúnculos de hasta 8 cm de largo, además de contar con numerosas brácteas que rodean la cabezuela, ordenadas de mayor a menor, las cuales son velludas como el tallo (FHEUM, 2021) (**Figura 2**). Suele crecer como hierba silvestre, principalmente, en las regiones más frías y templadas del país, prefiriendo altitudes entre 2000 y 3000 m sobre el nivel del mar, es muy común encontrarse con ella en la temporada comprendida de mayo a diciembre en bosques templados constituidos por pinos, robles, abetos y encinos. Esta especie también sobresale por poder formar parte de la vegetación secundaria como en malezas y campos de pastos abandonados. (Rodríguez et al., 2017). Se encuentra distribuida en varios estados del país como Chihuahua, Durango, Guerrero, Guadalajara, Michoacán, Hidalgo, Morelia, Oaxaca, Puebla, Estado de México y la Ciudad de México (**Figura 1**) (Osuna et al., 2014).



Figura 1. Árnica mexicana (*H. inuloides*), colectada en Mesas Altas, San Juan Xoconusco, Donato Guerra, Estado de México en 2016.

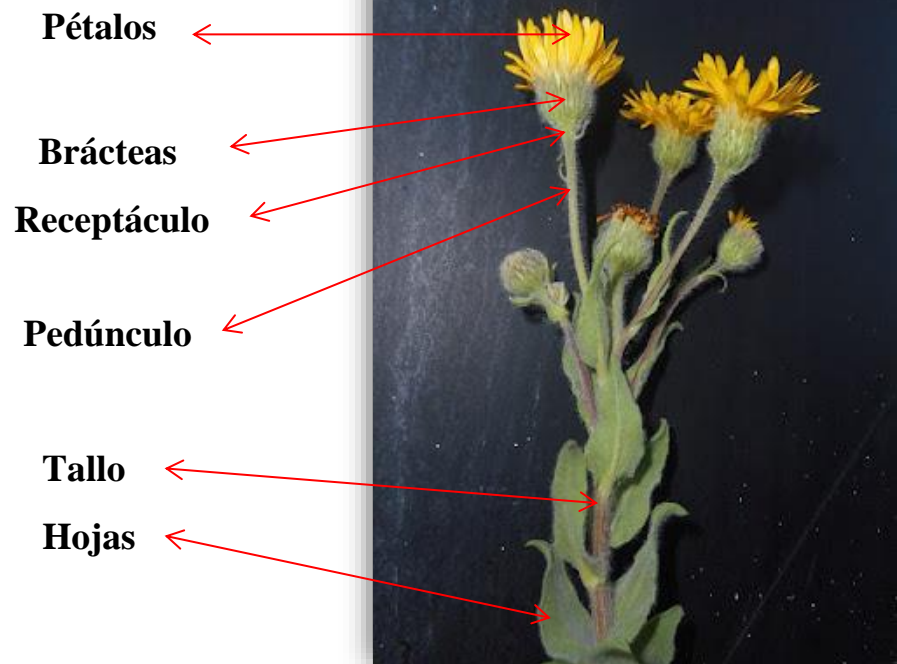


Figura 2. Morfología de Árnica mexicana (*H.inuloides*)

3.3.2 Usos tradicionales.

H. inuloides es una planta que se ha utilizado desde la antigüedad, ya que es muy conocida por su uso en la medicina tradicional mexicana, algunos estudios han documentado diferentes métodos tradicionales para llevar a cabo su preparación y para llevar a cabo su administración. En el **Cuadro 2** se describen algunas de sus aplicaciones terapéuticas y su proceso de preparación. Las partes que comúnmente se utilizan son las flores, seguidas de las hojas y tallos. Entre los métodos de preparación más comunes se encuentran la infusión, la maceración y el remojo (Loredo et al., 2002; Cruz, 2007; Rodríguez et al., 2017).

Cuadro 2. Afecciones y modos de uso tradicionales de *H. inuloides* para aliviarlas.

Afección	Preparación y modo de uso	Referencia
Golpes y heridas hinchadas	Preparar una infusión de ramas y flores en agua. Administrar por vía oral o aplicar con un paño en la zona afectada	Cruz, 2007
Gastritis, Inflamación del estómago y úlceras	Preparar una infusión de la flor fresca y ramas en agua. Beber una taza después de cada comida durante 15 días.	CONAFOR, 2010
Tos y problemas respiratorios	Preparar una infusión de la flor fresca en agua. Beber una taza antes de cada comida durante 3 días, suspender 3 días y reanudar el tratamiento otros 3 días.	INI, 1994
Heridas y mordeduras de perro	Hervir la planta entera en agua y Lavar las heridas con la infusión.	Gallardo, 2008
Hemorroides	Poner a Hervir en agua una rama con inflorescencias. Tomar baños de asiento con la infusión todas las noches durante una semana.	Cruz, 2007
Inflamación del Hígado	Preparar una infusión de las hojas en agua. Tomar una taza durante 3 días, suspender 3 días y reanudar el tratamiento otros 3 días.	INI, 1994 Cruz, 2007
Reumatismo	Preparar una infusión de las hojas frescas en agua. Beber una taza de la infusión después de cada comida durante 15 días. Poner a extraer la planta en alcohol. Frotar el área afectada durante 8 días con el extracto	CONAFOR, 2010 INI, 1994

Espinillas, erupción cutánea, urticaria y picazón.	Poner a Hervir la planta en agua. Aplicar la infusión en la zona afectada una vez al día durante 3 días.	INI, 1994
Dolor de muelas	Preparar una infusión de la planta en agua y aplicar compresas calientes en el área de la molestia.	Linares et al., 1988
Trastornos biliares, disminución del apetito, problemas del riñón y venas varicosas.	Preparar una infusión de flores, hojas y ramas. Administrar por vía oral la infusión	Aguilar et al., 1994 INI, 1994 Loredo et al., 2002.

3.3.3 Composición química.

Esta especie es fuente de una gran cantidad y variedad de compuestos químicos. Entre las técnicas más utilizadas para su aislamiento e identificación se encuentra el ultrasonido, la cromatografía en columna y capa fina, la cromatografía de gases, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Sagrero., 1996; Maldonado, 2004; Stipanovic et al., 2006; Mijangos et al., 2011). Entre los compuestos aislados destacan los sesquiterpenos, flavonoides, fitoesteroles, triterpenos, derivados del ácido benzoico, entre muchos otros. Numerosos estudios han demostrado que los diferentes extractos y algunos compuestos aislados de esta planta presentan una amplia gama de actividades biológicas. Hasta la fecha los estudios relacionados con su toxicidad son limitados (Rodríguez et al., 2017)

3.3.4 Compuestos sesquiterpenoides.

El género *Heterotheca* se caracteriza por sintetizar sesquiterpenos con esqueleto de cadinano, el análisis de las partes aéreas de *H. inuloides* reporta la presencia de múltiples compuestos con estas características, entre los que destacan los ilustrados en la **Figura 3**, como el 7-hidroxicaldeno (1), cadaleno (2), 4-metoxi-isocadaleno (3), 4-hidroxiisocadaleno (4), 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (5), 1 α -hidroxi-1(4H)-isocadalen-4-one (6), 2,3-epoxi-7-hidroxi- β -calacoreno (7), dicadalenol (8), 2,7-dihidroxi- β -calacoreno (9, inuloidina) y 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-one (10) (Rodríguez et al., 2017).

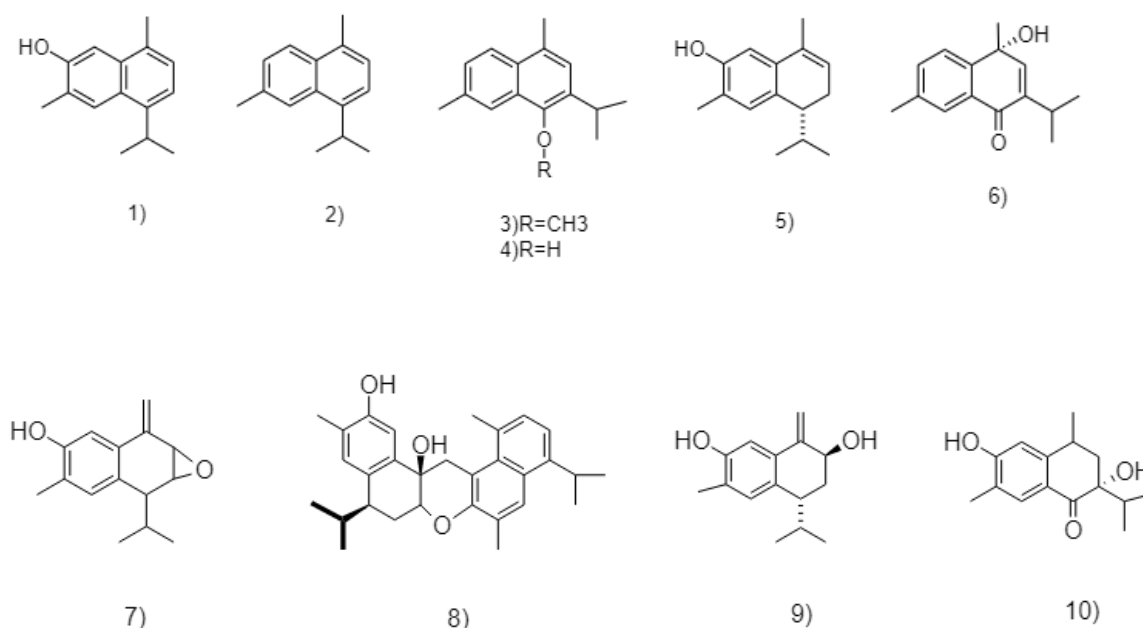
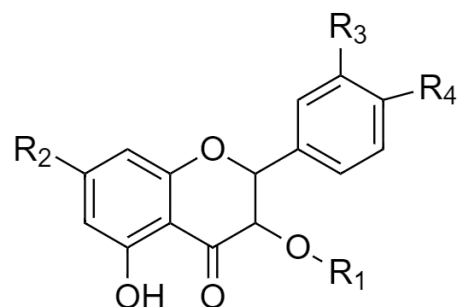
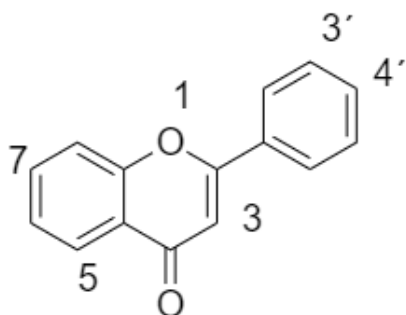


Figura 3. Compuestos de mayor importancia de origen sesquiterpénico aislados de las partes aéreas *H. inuloides*

3.3.5 Compuestos polifenólicos.

El contenido fenólico en extractos y en infusiones de *H. inuloides* disponibles comercialmente se ha evaluado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Muñoz-Velázquez et al., 2012). Se han aislado de las flores secas agliconas y glicósidos ilustrados en la **Figura 4** como la luteolina (11), el kaempferol (12), Kaempferol-3,7-dimetil éter (13), quercetina (14), quercetina-3,3'-dimetil éter (15), quercetina-3,4'-dimetil éter (16), quercetina-3,7-dimetil éter (17), quercetina-3,7,3'-trimetil éter (18), eriodictol-3-metil éter (19), catequina (20). Así como los O-glicósidos kaempferol 3 β -glucopiranósido (21), 3 β -arabinósido (22), quercetina 3 β -glucopiranósido (23), 3 β -galactopiranósido (24), 3 α -L-arabinósido (25) (Rodríguez et al., 2017).



	3	5	7	3'	4'
11)	H	OH	OH	OH	OH
12)	OH	OH	OH	H	OH
13)	OCH3	OH	OCH3	H	OH
15)	OCH3	OH	OH	OCH3	OH
16)	OCH3	OH	OH	OH	OCH3
17)	OCH3	OH	OCH3	OH	OH
18)	OCH3	OH	OCH3	OCH3	OH
19)	OH	OH	OH	OCH3	OH
20)	H	OH	OCH3	OCH3	OH

	R1	R2	R3	R4
21)	β -D-Glucopiranososa	OH		OH
22)	β -Arabinosa	OH		OH
23)	β -D-Glucopiranososa	OH	OH	OH
24)	β -D-Galactopiranososa	OH	OH	OH
25)	α -L-Arabinosa	OH	OH	OH

Figura 4. Flavonoides y glucósidos de mayor relevancia aislados de flores secas de *H. inuloides*

3.3.6 Otros compuestos de interés.

Otros compuestos aislados e identificados de *H. inuloides*, son el guayacol (27), fenol (28), el ácido elágico (29), ácido p-cumárico (30), el ácido 1-cafeoilquínico (31), ácido 3-cafeiloquinico (32), ácido caféico (33), ácido protocatecúico (34), 7-(3,3-dimetilaliloxi) cumarina (35), vainillina (36), ácido vanílico (37), pirocatecol (38), y ácido gálico (39) (**Figura 5**).

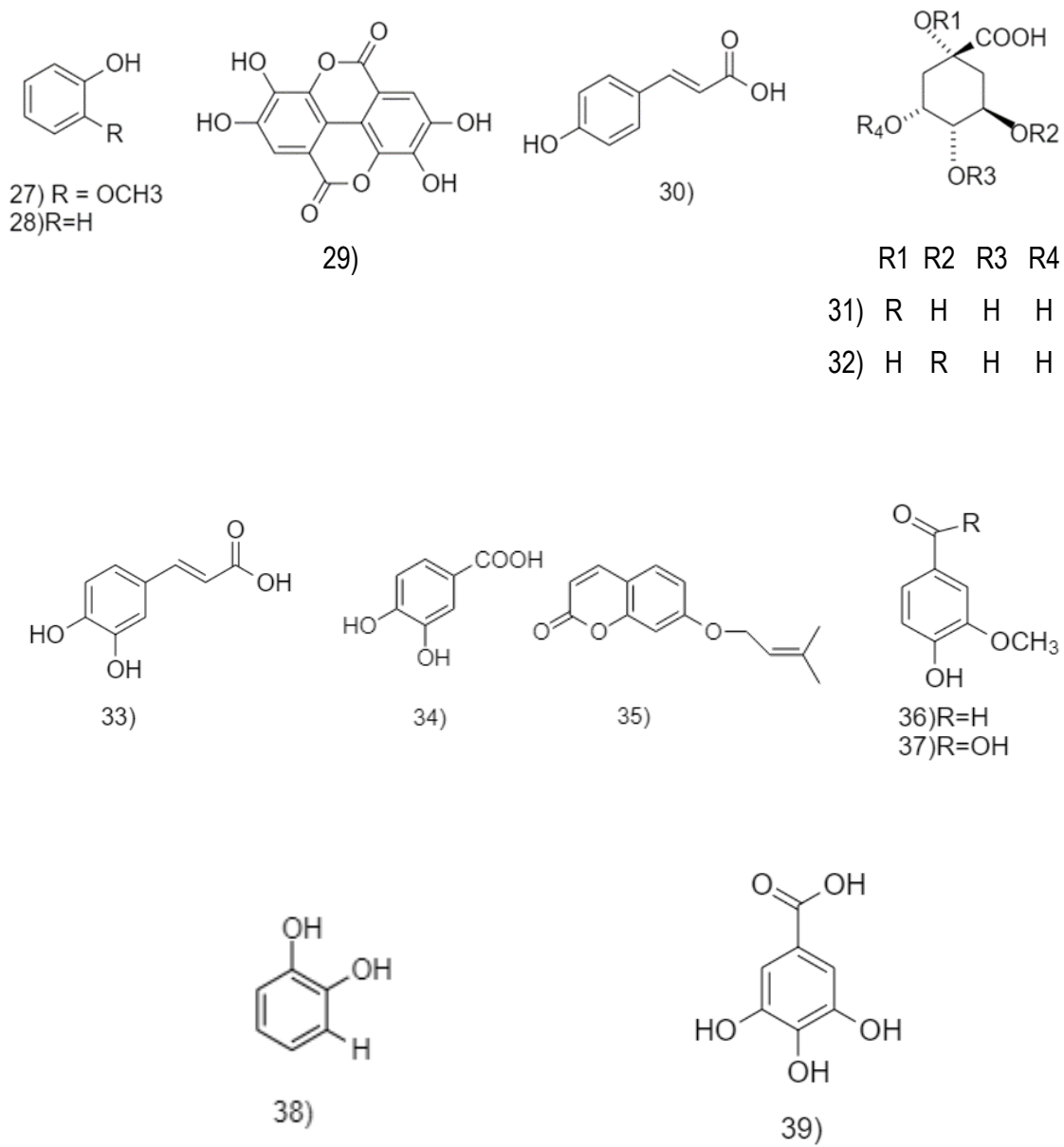


Figura 5. Otros compuestos de importancia aislados de las flores de *H. inuloides* (Rodríguez et al., 2017).

3.3.7 Actividad biológica.

Como se comentó anteriormente *H. inuloides* es fuente de numerosos compuestos químicos, aislados de diferentes partes de la planta y siguiendo diferentes metodologías. La presencia de estos compuestos le han conferido distintas propiedades (**Cuadro 3**). Cabe señalar que en cualquier tipo de planta la composición y la concentración de los metabolitos secundarios que desempeñan el papel de principio activo en muchas ocasiones varía según su hábitat y su edad. (Rodríguez et al., 2017).

Cuadro 3. Principales Actividades biológicas de *H. inuloides* reportadas en la literatura.

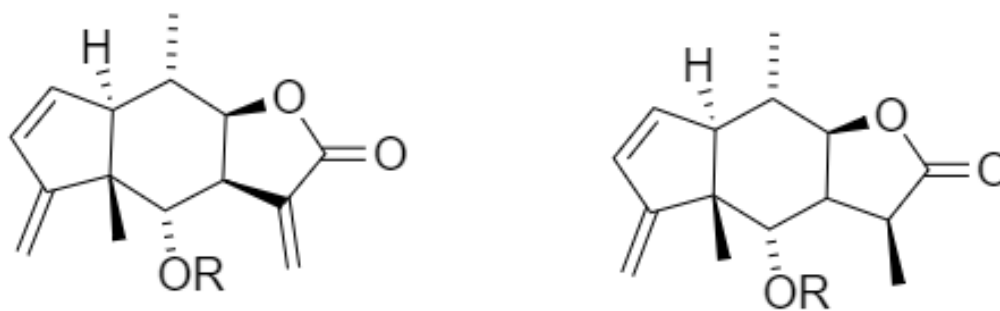
Preparación o compuesto	Actividad biológica	Referencias
Extractos acetónico, metanólico y butanólico.	Anti inflamatorio y analgésico en edema inducido por carragenina. Anti inflamatorio en edema inducido por aceite de crotón.	Gené et al., 1998 Segura et al., 2000
β-cariofileno, β-cariofileno 4,5α-óxido, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno.	Actividad citotóxica en contra de algunas líneas celulares de tumores sólidos.(carcinoma de mama, carcinoma epitelial de cuello uterino, melanoma de humanos, melanoma de ratón)	Kubo et al., 1996
Extracto acetónico y metanólico.	Capacidad antioxidante en contra de ROS	Coballase et al., 2010
Extracto acetónico y metanólico.	Hepatoprotección en contra del daño oxidante inducido por tetracloruro de carbono (CCl ₄).	Coballese et al., 2011 Coballase et al., 2013
Extracto metanólico Extracto etanólico Cadaleno y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno	Actividad antimicrobiana en contra de <i>Helicobacter pylori</i> . Actividad antimicrobiana en contra de <i>Streptococcus mutans</i> Actividad antimicrobiana en contra de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente, ATCC 12598, ATCC 33591, <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> y <i>Trichophyton meentagropytes</i> .	Castillo et al., 2009 Rosas et al., 2012 Kubo et al., 1994
β-cariofileno 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, 7-hidroxicadaleno	Actividad antiparasitaria en contra de <i>Leishmania amazonensis</i> Actividad antiparasitaria en contra de <i>Giardia intestinalis</i>	Soares et al., 2013 Rodríguez et al., 2015

Aceite esencial	Evita el desmontaje del citoesqueleto de actina, vimentina y tubulina en el modelo in vitro de acrilamida para la osteoartritis.	Martín et al., 2013
Infusiones	Actividad quelante en contra del Fe ²⁺	Muñoz et al., 2012
Extracto acetónico	Actividad quelante en contra de Cu ²⁺ , para así unirse a la tirosinasa	Rodríguez et al., 2016.
Polvos de hojas y flores	Actividad insecticida en contra del gorgojo de maíz (<i>Sitophilus zeamais</i>) y gorgojo de frijol (<i>Zabrotes subfasciatus</i>)	Juárez et al., 2010 Rendón et al., 2013
7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno	Actividad analgésica, antiinflamatoria y antineuropática	Rocha et al., 2010; Rocha et al., 2014

3.4 *Árnica mexicana (Heterotheca inuloides Cass.) v.s Árnica europea (Árnica montana L).*

Como se mencionó al inicio, uno de los nombres populares utilizados en México para referirse a *Heterotheca inuloides* Cass es el de "árnica mexicana", el cual deriva de otra especie europea conocida como árnica europea, con la que comparte varias similitudes morfológicas (Rivera et al., 2010). La existencia de plantas medicinales que comparten nombres populares, características morfológicas, características aromáticas y propiedades medicinales es muy habitual en la medicina tradicional de diferentes culturas, de ahí el interés por determinar los diferentes compuestos activos entre la llamada "árnica mexicana" y árnica europea (Perry et al., 2009).

Aunque sus características morfológicas y usos medicinales tradicionales para ambas especies son similares, ya que forman parte de la misma familia (Asteraceae), las investigaciones fitoquímicas han revelado que sus contenidos metabólicos son diferentes. Hoy en día se sabe que los principales compuestos responsables de las propiedades antiinflamatorias de los extractos de *A. montana* son las lactonas sesquiterpénicas (SL), helenalina (40) y dihidrohelenalina (41), y sus correspondientes ésteres de cadena corta (42 y 43) como se ilustra en **Figura 6**; en contraste, *H. inuloides* contienen una serie diferente de metabolitos secundarios que producen la actividad antiinflamatoria como la quercetina (14), el dicadalenol (8) y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (5) (Delgado et al., 2001; Rocha et al., 2014).



40) R= H

42) R= Acetilo

41) R= H

43) isovalerilo

Figura 6. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *A. montana*.

Se ha encontrado que las flores de *A. montana*, contienen un aceite esencial rico en sesquiterpenos, monoterpenos, triperpenos, derivados del timol, carotenos, flavonoides, derivados de ácido fenólico, cumarinas, poliacetilenos y alcaloides. De todos estos compuestos, la helenalina, la dihidrohelenina y sus ésteres se consideran como los principales compuestos activos (Willuhn, 1998). La Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) requiere un contenido de no menos del 0.4% m/m de lactonas sesquiterpénicas (SL), expresadas como tiglato de dihidrohelenalina, con referencia a la droga vegetal seca para la prueba de identidad. (FHEUM, 2021).

Varios estudios reportan que la actividad biológica de estos compuestos se encuentra relacionada con la modulación de varios procesos inflamatorios, como la fosforilación oxidativa, la agregación plaquetaria, la histamina y la liberación de serotonina (Lyss et al., 1998). Cuando se produce inflamación, una infección viral o bacteriana y otros eventos estresantes, el factor NF- κ B promueve la expresión de más de 150 genes diana, por lo que se le considera un mediador central de la respuesta inmune humana. Las SL y más específicamente la helenalina, produce la inhibición de este mediador debido a la alquilación del factor de transcripción activo (García et al., 2001). Se ha demostrado de la misma forma la capacidad de inhibición del factor de transcripción NF-AT, (este al igual que NF- κ B, es una proteína responsable de la transcripción de genes que codifican varios mediadores inflamatorios) (Klaas et al., 2002).

Aunque el principal efecto farmacológico de *A. montana* se atribuye al contenido de SL, se deben tener en cuenta a los flavonoides y los ácidos fenólicos, ya que también se utilizan para asegurar la identidad de *A. montana*. De la misma manera se debe de tomar en cuenta los polifenoles ya que actúan principalmente como antioxidantes y agentes atrapadores de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales también pueden contribuir a la actividad antiinflamatoria de la planta (Paßreiter et al., 1992).

Debido a la alta demanda de *Arnica montana*, las flores comercializadas en los Estados Unidos y Europa a menudo son adulteradas o sustituidas con *H. inuloides* porque esta última es más accesible (Pietta et al., 1994; Walker et al., 2012). En los últimos años, con el cultivo industrial de *A. montana*, la falsificación ocurre con menos frecuencia. Sin embargo, con la intención de controlar esta práctica, se han realizado varios estudios para encontrar un marcador químico que detecte la presencia de *H. inuloides* en preparaciones de *A. montana* (Pietta et al., 1994; Durón et al., 2009). Recientemente también se ha propuesto el uso de códigos de barras de ADN como técnica para la identificación de cualquier especie (Aguilar, 2015). La Farmacopea Europea incluye una prueba para detectar la adulteración de cabezas de flores de *A. montana* con *H. inuloides* (COE-EDQM, 2007), que consiste en la identificación de algunos glucósidos flavonoides, como la rutina (36), la cual se considera un componente específico de *H. inuloides*. Sin embargo, algunos cadinanos, por ejemplo, el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (6), podrían ser más apropiados para la detección, ya que son metabolitos típicos biosintetizados por *H. inuloides* y podrían considerarse como marcadores químicos (Marieschi et al., 2012). En la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2021) está descrita la monografía para árnica mexicana (*H. inuloides*) en el que el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno es utilizado como compuesto marcador para establecer el control de calidad de esta especie, que la distingue de *A. montana* que no contiene este metabolito.

3.5 Productos comerciales.

En la actualidad, *H. inuloides* y *A. montana* se pueden encontrar en los mercados tradicionales y en tiendas departamentales en diferentes formulaciones y formas farmacéuticas, tales como tinturas, pomadas, infusiones, tabletas y geles. Estas especies poseen múltiples propiedades medicinales por las cuales son utilizadas, sin embargo, el efecto anti inflamatorio de estas plantas es el efecto más destacado y por lo que son ampliamente conocidas en varios países. (Heinrich et al., 2014).

Teniendo en cuenta que varias de las presentaciones se aplican tópicamente, el proceso de penetración de la piel de los componentes activos debe de ser muy significativo. Se ha reportado la predicción de la tasa de permeación de los principales compuestos de *A. montana* en el estrato córneo, utilizando el método de extracción con cinta adhesiva y pieles de oreja de cerdo. Los resultados muestran que las preparaciones de árnica tienen una penetración comparable a través del estrato córneo, y que la cantidad permeada es suficiente para lograr la eficacia antiinflamatoria (Wagner et al., 2004; Wagner et al., 2007). El primer ensayo clínico que involucró el uso tópico de *A. montana* confirmó la eficacia de un gel en un ensayo en seres humanos. El gel se aplicó dos veces al día a pacientes con osteoartritis leve a moderada de la rodilla. Después de tres y seis semanas se demostró una mejoría significativa en las condiciones de los pacientes (Knuesel et al., 2002). Para árnica mexicana también se ha demostrado la permeabilidad cutánea utilizando un sistema *in vitro* con membranas sintéticas Strat-M® (Galicia, 2015).

3.6 Pruebas de irritabilidad en piel.

De manera muy general, dentro del campo de la toxicología se encuentran las pruebas de seguridad, que a su vez incluyen pruebas de toxicidad aguda, irritabilidad dérmica o cutánea y ocular para diferentes sustancias. Históricamente, las pruebas en animales han sido las más utilizadas para este tipo de estudios. A grandes rasgos, para este tipo de evaluaciones, se aplica una sustancia a la piel o al ojo de un animal de laboratorio, durante un tiempo determinado. Posteriormente se observa si existen lesiones en las zonas de aplicación, las cuales se califican cualitativamente para determinar el daño provocado (eritema, edema). Los estudios sugieren que las respuestas observadas en los estudios con animales, en varias ocasiones no son similares a la respuesta observada en humanos (Choksi N et al., 2019).

Un agente corrosivo es cualquier sustancia que causa la destrucción de un tejido vivo al contacto, mientras que un agente irritante es aquella sustancia que produce una reacción inflamatoria local al contacto inmediato, repetido o prolongado (CPSC de EE.UU). Las instituciones reguladoras en varias partes del mundo solicitan distintas pruebas para identificar y clasificar este tipo de sustancias, todo esto con el fin de llevar a cabo un correcto etiquetado del producto. Así es como se alerta a los manipuladores/consumidores sobre el posible peligro de lesiones al utilizarlos y se indica el nivel de

equipo de protección adecuado para su manejo. Otros objetivos son determinar los límites de exposición, estimar una dosis tóxica aceptable para la administración en humanos y establecer una dosis inicial para estudios a largo plazo. (Choksi et al., 2019)

Los métodos utilizados inicialmente para la evaluación de la irritación de la piel y ojos, fueron descritos por Draize y en la actualidad aún se usan ampliamente con fines regulatorios (Wilhelmus., 2001). Estos métodos han sido reevaluados, con el fin de reducir el número de animales y sustituir las pruebas *in vivo* por pruebas *in vitro*. Muchos modelos *in vitro* se están desarrollando para su uso en la evaluación del potencial irritante de los ojos y la piel, con la esperanza de que algún día se reemplacen las pruebas con animales. Para que las pruebas alternativas se incorporen a la evaluación de la seguridad, deben someterse a una evaluación definida que permita a los toxicólogos determinar si los nuevos procedimientos brindan información relevante. A medida que se determina la validez de los métodos, los nuevos procedimientos pueden incorporarse a la evaluación de la seguridad mediante un proceso de evaluación por niveles. El primer nivel incluye un análisis exhaustivo de los datos internos y publicados sobre la sustancia de prueba o sustancias similares. Una revisión de las características físico-químicas también puede proporcionar información valiosa. En el segundo nivel se emplean ensayos *in vitro* para complementar la evaluación de la seguridad de la sustancia. Si se requiere información adicional para finalizar los estudios de seguridad, en el último nivel se realizan pruebas *in vivo* usando un número limitado de animales o estudios clínicos en seres humanos (Calvin et al., 1992).

Uno de los principales objetivos del Comité de Coordinación Interinstitucional sobre la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM, por sus siglas en inglés), compuesto por representantes de las agencias reguladoras y de investigación federales de EE. UU., es reducir, perfeccionar y reemplazar las pruebas con animales, cuando sea factible. Como parte de un esfuerzo por aumentar la confianza en los métodos alternativos y mejorar su relevancia para la salud humana, ICCVAM desarrolló una guía para incorporar nuevos enfoques para evaluar la seguridad de los productos químicos y médicos. Esta guía aborda el desarrollo y la evaluación de enfoques alternativos para las pruebas de toxicidad aguda, así como enfoques alternativos para las pruebas de irritación ocular y cutánea (Choksi et al., 2019).

Hablando en materia de regulación nacional, la Ley General de Salud, en el artículo 269, define los productos cosméticos como aquellas sustancias o formulaciones destinadas a ser puestas en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano, con el fin de limpiarlas, perfumarlas, ayudar a

modificar su aspecto, protegerlas, mantenerlas en buen estado, corregir sus olores, atenuar/prevenir deficiencias o alteraciones en el funcionamiento de la piel sana. De la misma forma en el artículo 270 se indica que no podrán atribuirse a los productos cosméticos acciones propias de los medicamentos, tales como curar o ser una solución definitiva de enfermedades, regular el peso o combatir la obesidad ya sea en el nombre, indicaciones, instrucciones para su empleo o publicidad. Esta definición hace distinción entre los productos cosméticos y los medicamentos, teniendo así una regulación diferente más no excluyente, los cosméticos también deben de seguir las normativas y regulaciones, aún aquellos considerados como artesanales u orgánicos (Ley General de Salud, 2022).

La Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Cámara Nacional de Industrias de Productos Cosméticos (CANIPEC) son dos de las principales entidades encargadas del control y vigilancia de los cosméticos y medicamentos. Estas entidades velan por el cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). En cuestiones de irritabilidad, para los cosméticos anteriormente la regía la NOM-039-SSA1-1993. *Bienes y servicios. Productos de perfumería y belleza. Determinación de los índices de irritación ocular, primaria dérmica y sensibilización*. Sin embargo, para el 2003 esta NOM quedó cancelada y sustituida por los métodos generales de análisis (MGA) 515 irritabilidad en piel y MGA 516 irritabilidad ocular, ambos definidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). De esta forma se logró unificar un poco las pruebas entre medicamentos y cosméticos (DOF, 2003). Pero toda esta unificación duró poco ya que, en septiembre de 2021, se aprobó en lo general y en lo particular, una reforma a la Ley General de Salud, en la cual se prohíbe el uso de animales en pruebas de productos cosméticos (Diario Oficial de la Federación, 2021).

Métodos *in chemico*

Los métodos alternativos *in chemico* disponibles para medir la sensibilización de la piel se basan en cuantificar el hapteno formado entre la sustancia de prueba y un nucleófilo modelo. Todo esto debido a que los sensibilizadores de la piel se unen de manera covalente a un blanco biológico con carácter nucleofílico para formar complejos antigénicos (haptenos) los cuales provocaran una respuesta inmune (Chittiboyina et al., 2015). Las reacciones de hipersensibilidad son respuestas inmunitarias que producen daño tisular a través de una respuesta exuberante al antígeno. Existen tres modalidades principales de hipersensibilidad: (1) respuestas alérgicas o reacciones de hipersensibilidad inmediata, (2) reacciones de hipersensibilidad mediadas por células B o anticuerpos, y (3) hipersensibilidad mediada por células T (Mcmanus et al., 2014).

El método de DCYA propuesto por Avonto (Avonto et al., 2015) es un método relativamente nuevo basado en fluorescencia. El método tiene como objetivo la identificación de electrófilos reactivos que puedan en función de su reactividad química reaccionar con el modelo de tiol fluorescente (Avonto et al., 2015).

4 Hipótesis

- El DCYA es un reactivo fluorescente que al entrar en contacto con sustancias irritantes para la piel aumenta su intensidad fluorescente de manera proporcional al grado de irritación de la sustancia. El árnica mexicana (*H. inuloides*) y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno no son considerados irritantes cutáneos por lo que en la prueba *in chemico* al entrar en contacto con el DCYA producirán baja fluorescencia.
- *A. montana* y *H. inuloides* al tener propiedades medicinales antiinflamatorias muy similares tendrán de la misma forma un potencial irritante en piel.

5 Objetivo general

- Determinar el potencial irritante del árnica mexicana (*Heteroteca inuloides*) y de su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, a través de un método *in chemico*, mediante la cuantificación directa de la formación del aducto hapteno-tiol por fluorescencia de 5-(dimetilamino)-N-(2-mercaptoetil)naftalen-1-sulfonamida (DCYA).

6. Objetivos particulares

- Validar el método *in chemico* de 5-(dimetilamino)-N-(2-mercaptoetil)naftalen-1-sulfonamida (DCYA) para predecir el potencial irritante de diversas sustancias.
- Comparar el potencial irritante de la piel de *A. montana* y de *H. inuloides*.

7. Materiales y método

7.1 Síntesis de DCYA.

La síntesis del compuesto utilizado como fluoróforo realizada por el Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez de la FES Zaragoza UNAM, siguiendo la metodología publicada por Avonto y colaboradores (Avonto et al., 2015), que brevemente consistió en:

1.-Síntesis de *N,N'*-(disulfanodiilbis(etano-2,1-diilo))bis(5-(dimetilamino)naftaleno-1 sulfonamida) (disulfuro DCYA).

En un matraz de fondo redondo de 500 mL, se disolvió el cloruro de dansilo (4,03 g, 14,94 mmol) en 170 mL de una mezcla acetona: agua (30:1). Una solución de diclorhidrato de cisamina (1.61 g, 7.15 mmol, 0.49 equivalentes) disuelta en 80 mL de NaHCO₃ acuoso 0.1 M se agregó gota a gota. La solución se mantuvo a un pH 7.5 mediante la adición de hidróxido de sodio acuoso 0.5 M. Después de 90 min, la mezcla de reacción se diluyó con 100 mL de cloroformo, y la solución resultante se lavó cuatro veces con bicarbonato de sodio acuoso, seguido de agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se concentró y purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetona de 10 % al 40 % en hexano) obteniéndose 4.14 g de disulfuro de DCYA como sólido esponjoso amarillo.

2.- Síntesis 5-(dimetilamino)-N-(2-mercaptoetil)naftaleno-1-sulfonamida (DCYA)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL, el compuesto disulfuro de DCYA (0,32 g, 0,524 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (18 mL) y agua (2 mL), se enfrió a 0 °C y se añadió borohidruro de sodio (0,20 g, 5,29 mmol) en pequeñas porciones. Después de 4 h, se evaporó el disolvente y el residuo se diluyó con agua y se extrajo con éter dietílico (3 × 10 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se secaron con MgSO₄ anhidro, se concentraron y se purificaron en una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetona de 10% al 30% en hexano para producir el tiol de DCYA como sólido esponjoso de color amarillo verdoso. Finalmente, la pureza del compuesto se comprobó por medio de cromatografía en placa fina (**Figura 7**).

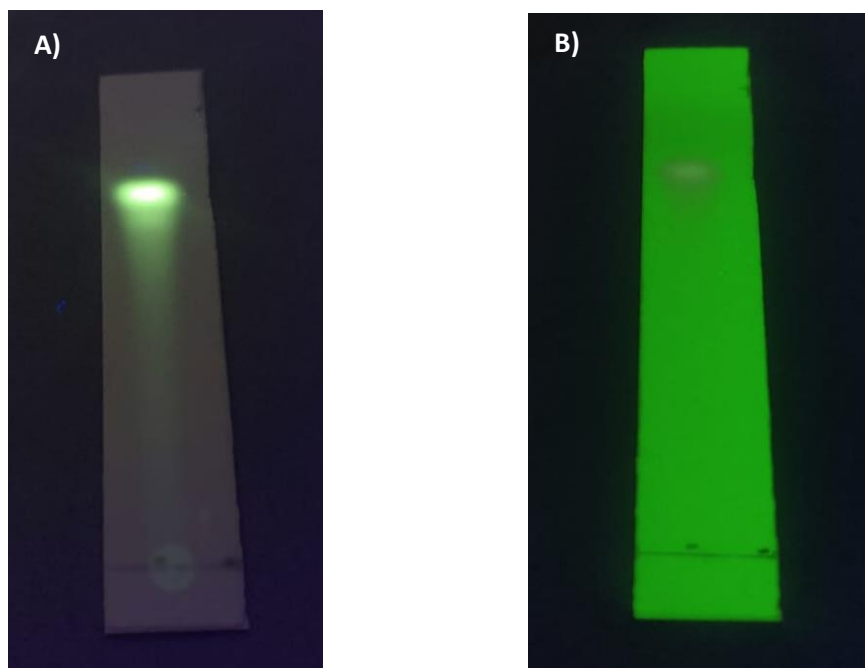


Figura 7. A) Cromatografía en placa fina de DCYA observada a una longitud de onda de 365 nm utilizando como fase móvil acetato de etilo/hexano en proporción 6:4. B) Cromatografía en placa fina de DCYA observada a una longitud de onda de 254 nm utilizando la misma fase móvil en la misma proporción.

7.2 Validación del método.

La parte pre-analítica consistió en establecer las condiciones adecuadas para el manejo de DCYA, compuesto que se utilizó como fluoróforo en el método, así como para establecer el correcto uso del fluorómetro (GloMax EXPLORER). Posterior a esto se optó por seguir con la validación del método analítico, tomando como base la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México AC (García et al., 2002). Se inició realizando la linealidad y precisión del sistema, para después continuar con lo relacionado al método; se determinó la exactitud, la repetibilidad, la linealidad, la precisión, los límites de detección y de cuantificación para las condiciones establecidas en el laboratorio.

7.3 Determinación del potencial irritante de la piel.

Posterior a la validación se continuó con la determinación del potencial irritante de la piel del extracto fluido comercial de árnica mexicana (*H. inuloides*) y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, siguiendo la metodología de Avonto y colaboradores (Avonto et al., 2015) con pequeñas variaciones ya validadas. Adicionalmente se determinó de igual manera el potencial irritante para el extracto fluido comercial de árnica europea (*A. montana*), para el extracto hidroalcohólico de la planta seca de ortiga (*U. dioica*), para el extracto hidroalcohólico de la planta fresca de ortiga (*U. dioica*), para el aceite esencial de canela y para el compuesto *p*-benzoquinona (CAS-No: 106-51-4).

En un tubo de 2 mL, se mezclaron 50 μ L de DCYA (CAS-No: 5354-61-0P) 2,5 mM (1 equivalente), para ser mezclado con 50 μ L de una solución 5 mM de la sustancia de prueba (2 equivalentes), ambos preparados en acetonitrilo (ACN) grado HPLC (CAS-No: 75-05-8). Se añadieron 20 μ L de una solución amortiguadora de fosfatos pH=10 a la mezcla y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Se preparó un conjunto de dos controles y un blanco a la par, como se resume en el **Cuadro 4**. El blanco (BL) se preparó adicionando 20 μ L de ACN en lugar de la solución amortiguadora. Para preparar el control positivo (PC) se utilizaron 50 μ L de DCYA mezclados con 70 μ L de ACN. El control negativo (NC) se preparó agregando 50 μ L de ACN a 50 μ L de DCYA y luego incubando con 20 μ L de solución amortiguadora. A continuación, se añadieron 20 mg maleimida sobre sílice (Código sigma: 569909) para eliminar el DCYA sin reaccionar, se agitó en vórtex y se incubó durante 1 h con agitación vigorosa. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 s, se diluyeron hasta un volumen final de 1 mL con ACN, se volvieron a agitar en vórtex y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. Finalmente, cada muestra se transfirió a una microplaca oscura de 96 pozos resistente a disolventes con fondo plano (100 μ L del sobrenadante más 100 μ L de ACN). Las muestras se resuspendieron con la micropipeta para finalmente ser leídas en el fluorómetro GLoMax EXPLORER de Promega a una longitud de onda de excitación UV 365 nm y, a longitud de onda de emisión de 500-550 nm, 50 lecturas de alta sensibilidad (**Figura 8**).

Cuadro 4. Condiciones empleadas para los diferentes controles experimentales

Reactivo	Condición experimental			
	Control Positivo (PC)	Control Negativo (NC)	Blanco (BL)	Reactivo de Prueba (R)
DCYA	+	+	+	+
Electrófilo de Prueba	-	-	+	+
Buffer de Fosfatos	-	+	-	+
Maleimida sobre sílice	+	+	+	+

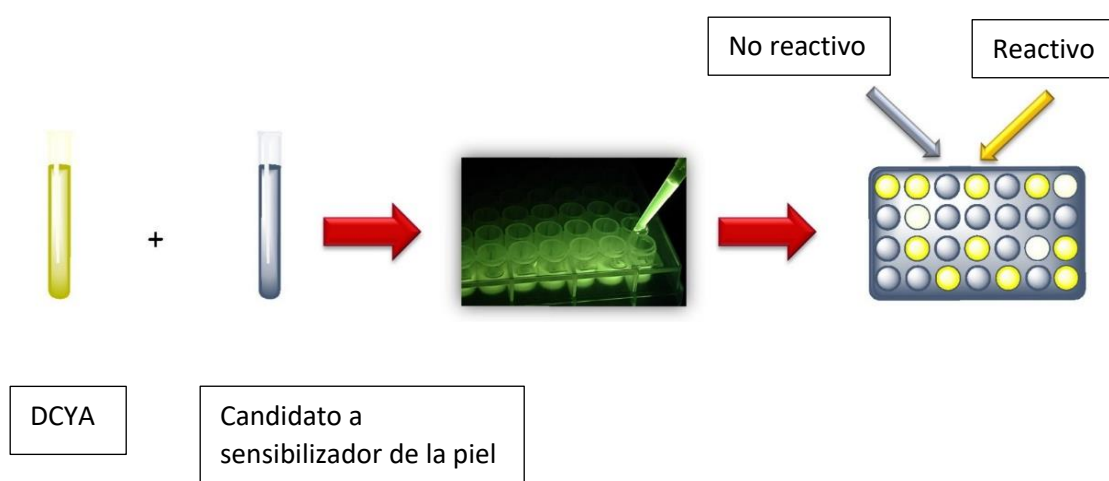


Figura 8. Procedimiento experimental resumido del método de DCYA recuperado de Avonto et al., 2015

Finalmente se calculó el Índice de reactividad para cada sustancia de prueba con la siguiente expresión:

$$\text{Índice de Reactividad} \\ IR = 100 \times \left(1 - \frac{BL-R}{PC-NC} - \frac{PC-BL}{PC} \right)$$

Donde se sustituye la respuesta fluorescente de:

R: Reactivo de prueba/Candidato sensibilizador

PC: Control positivo

NC: Control negativo

BL: Blanco

8. Resultados

El extracto fluido de árnica mexicana (*H. inuloides*) a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL presentó un efecto irritante débil y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno a las concentraciones de 2.5, 5.0 y 10.0 mM no fue irritante en el método *in chemico* ya que presentó un bajo índice de reactividad. La escala del potencial irritante se clasifica como no irritante (no sensibilizador) para un índice de reactividad (IR) < 5, irritante débil para 5 < IR < 20, irritante moderado para 20 < IR < 80 y finalmente irritante fuerte o extremo para un IR > 80 (Figura 9). Como compuesto irritante de referencia se utilizó *p*-benzoquinona que a la concentración de 5 mM presentó un índice de reactividad de 39, correspondiente a una irritabilidad moderada (Figura 9).

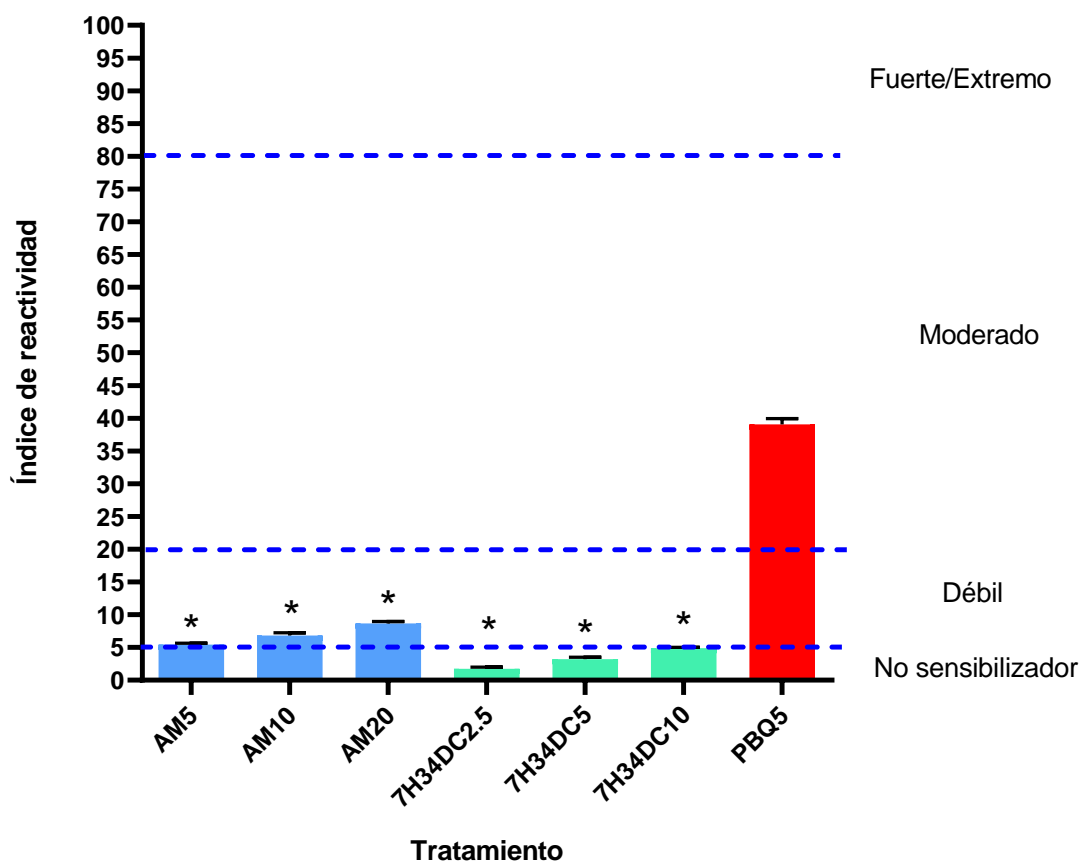


Figura 9. Índice de reactividad del extracto fluido de árnica mexicana (*H. inuloides*; AM) a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL, su principio activo 7-hidroxi,3,4-dihidrocadaleno (3H34DC) a las concentraciones de 2.5, 5.0 y 10.0 mM y *p*-benzoquinona (PBQ) a la concentración de 5 mM. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones de al menos 50 lecturas. Las líneas punteadas delimitan las zonas correspondientes a los diferentes grados de irritación. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) después de un análisis de varianza de una vía, seguida de la prueba Dunnett con respecto al grupo tratado con *p*-benzoquinona.

De igual forma, se evaluaron los extractos fluidos comerciales de árnica mexicana (*H. inuloides*) y de árnica europea (*A. montana*) a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL. Ambos extractos presentaron una irritabilidad débil, con un IR entre 5 y 10 (Figura 10).

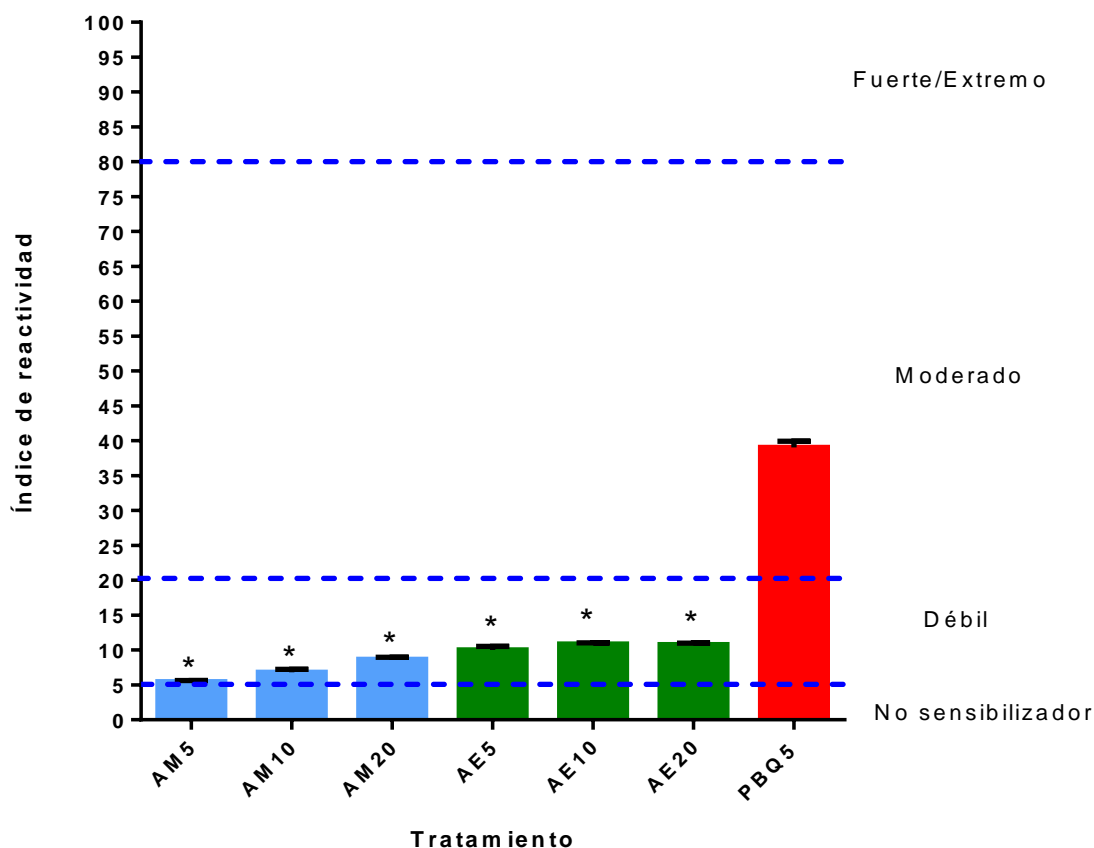


Figura 10. Índice de reactividad para el extracto fluido de árnica mexicana (*H. inuloides*; AM) y el extracto fluido de árnica europea (*A. montana*; AE) a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL comparados con *p*-benzoquinona (PBQ) a la concentración de 5 mM. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones de al menos 50 lecturas. Las líneas punteadas delimitan las zonas correspondientes a los diferentes grados de irritación. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) después de un análisis de varianza de una vía, seguida de la prueba Dunnett con respecto al grupo tratado con *p*-benzoquinona.

Para estas determinaciones de fluorescencia, se llevó a cabo previamente la validación analítica del *método in chemico* de DCYA (**Cuadro 5**). El método cumplió con los parámetros de validación de acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México AC (García et al., 2002) excepto para el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración en el método.

Cuadro 5. Resumen de la validación del método de DCYA en ACN. A una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda emisión de 500-550 nm.

Determinación	Metodología	Criterios de aceptación	Resultados	Conclusión
Linealidad del sistema	Preparar al menos por triplicado 5 niveles de concentración ya sea por dilución o pesadas independientes	$R^2 \geq 0.098$	$R^2 = 0.9897$	Aprobado
Precisión del sistema	Preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones que represente el 100% de la respuesta del analito a cuantificar, por dilución o por pesadas independientes.	$CV \leq 3 \%$	$CV = 3.0701$	Aprobado
Exactitud y repetibilidad del método	Preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones placebo, agregándole lo necesario de analito para obtener el 100% de respuesta analítica.	$97 \% \leq X$ del % de recobro $\leq 103 \%$	X del % de recobro = 98.7855 %	Aprobado
		$CV \leq 3 \%$	$CV = 2.2211$	Aprobado
Precisión Del método	Preparar y analizar por lo menos por triplicado una muestra que contenga la cantidad necesaria de analito para obtener el 100% de la respuesta analítica, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes	$CV \leq 5 \%$	$CV = 3.8064$	Aprobado

Linealidad del método	Preparar por lo menos un triplicado de soluciones placebos, agregándole lo necesario de analito para obtener el 100% de respuesta analítica. Por triplicado también, Seleccionar al menos dos niveles, inferior y superior al 100% de la respuesta analítica	$R^2 \geq 0.098$	$R^2 = 0.983$	Aprobado
		CV para cada nivel < 3 %	CV 20uM= 2.8173 CV 40uM= 2.9963 CV 60uM= 1.5639 CV 70uM= 2.9325 CV 80uM= 2.8458	Aprobado
		$97 \% \leq X$ del % de recobro $\leq 103 \%$	X del % de recobro= 100.4952 % CV 20uM= 4.6296 CV 40uM= 4.1147 CV 60uM= 3.5869 CV 70uM= 3.7040 CV 80uM= 0.5921	Aprobado
		CV del % de recobro para cada nivel < 3 %		No aprobado
Límite de detección del método	Se calculó de manera teórica		LD=4.327uM	
Límite de cuantificación del Método	Se calculó de manera teórica		LC=13.11uM	

9. Análisis de resultados.

Los resultados obtenidos demuestran de manera contundente que los extractos fluidos de árnica mexicana a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL y su principio activo 7-Hidroxi-3,4-dihidrocadaleno a las concentraciones 2.5, 5.0 y 10.0 mM son irritantes débiles o no sensibilizadores de la piel por el método de DCYA. Este tipo de pruebas de sensibilización de la piel son fundamentales para clasificar a la dermatitis alérgica por contacto, la cual se manifiesta en dos etapas. En la primera etapa, al entrar en contacto la piel con un potencial sensibilizador se puede llevar a cabo una reacción covalente para dar paso a un complejo antigénico, este complejo estimula la producción de antígenos, los cuales son responsables del reclutamiento y activación de los linfocitos T. En la segunda etapa, al estar expuesta la piel a un mayor lapso con el sensibilizador se puede producir una respuesta inmunológica más agresiva, que a menudo resulta en una erupción, eritema (enrojecimiento) o edema (Inflamación) (Chittiboyina, 2015).

Debido a la alta demanda de *Árnica montana*, las flores comercializadas en los Estados Unidos y Europa a menudo son adulteradas con *H. inuloides* debido a que esta última es más accesible y cuenta con propiedades medicinales muy similares (Pietta et al., 1994; Walker et al., 2012). En los últimos años, con el cultivo industrial de *A. montana*, la adulteración ocurre con menos frecuencia. Sin embargo, resulta sumamente complicado el poder diferenciar a simple vista a estos dos géneros de la misma familia (Figura 11).



Figura 11. Comparación entre las flores secas de *H. inuloides* (A) y las flores secas de *A. montana* (B)

Con la intención de controlar esta práctica, se han realizado varios estudios para encontrar un marcador químico que detecte la presencia de *H. inuloides* en preparaciones de *A. montana* (Pietta et al., 1994; Durón et al., 2009). Recientemente también se ha propuesto el uso de códigos de barras de ADN como técnica para la identificación de cualquier especie (Aguilar, 2015). La Farmacopea Europea incluye una prueba para detectar la adulteración de cabezas de flores de *A. montana* con *H. inuloides* (COE-EDQM, 2007), que consiste en la identificación de algunos glucósidos flavonoides, como la rutina, la cual se considera un componente presente en *H. inuloides* pero no en *A. montana*. Sin embargo, algunos cadinenos, por ejemplo, el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno es más apropiado para la detección, ya que son metabolitos típicos biosintetizados por *H. inuloides* y se considera como marcador químico (Marieschi et al., 2012).

La Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos utiliza este cadineno como requisito en la prueba de identidad para *H. inuloides*, El cual refiere no menos de 0.05 % de 7-Hidroxi-3,4-dihidrocadaleno con respecto a la droga vegetal seca (FHEUM, 2021).

Como podemos observar en la **Figura 9** el extracto fluido comercial de árnica mexicana (*H. inuloides*) y el extracto fluido comercial de árnica europea (*A. montana*) resultaron ser irritantes débiles de la piel, ya que presentaron un índice de reactividad bajo. Cabe destacar que es la primera comparación que se tiene al respecto de ambos extractos de estas dos especies en el ámbito de la sensibilización de la piel, por lo que una vez más queda demostrado el enorme parecido entre estos dos diferentes géneros de la misma familia y más aún, se ratifica el enorme grado de complejidad para diferenciar a estas dos plantas.

Con fines de comprobar la efectividad del método se utilizaron algunas sustancias potencialmente sensibilizadoras de la piel o irritantes con diferente reactividad química. Se evaluaron extractos hidroalcohólicos de ortiga fresca y ortiga seca (*Urtica dioica*) a las concentraciones de 5, 10, 20 mg/mL los cuales presentaron índices de reactividad entre 5 y 20, en el orden de irritantes débiles o no sensibilizadores (**Figura 10**). También se evaluó el aceite esencial de canela a las concentraciones de 5, 10, 20 mg/mL el cual presentó un índice de reactividad en el rango de 20 a 80, correspondiente a un irritante moderado (**Figura 12**).

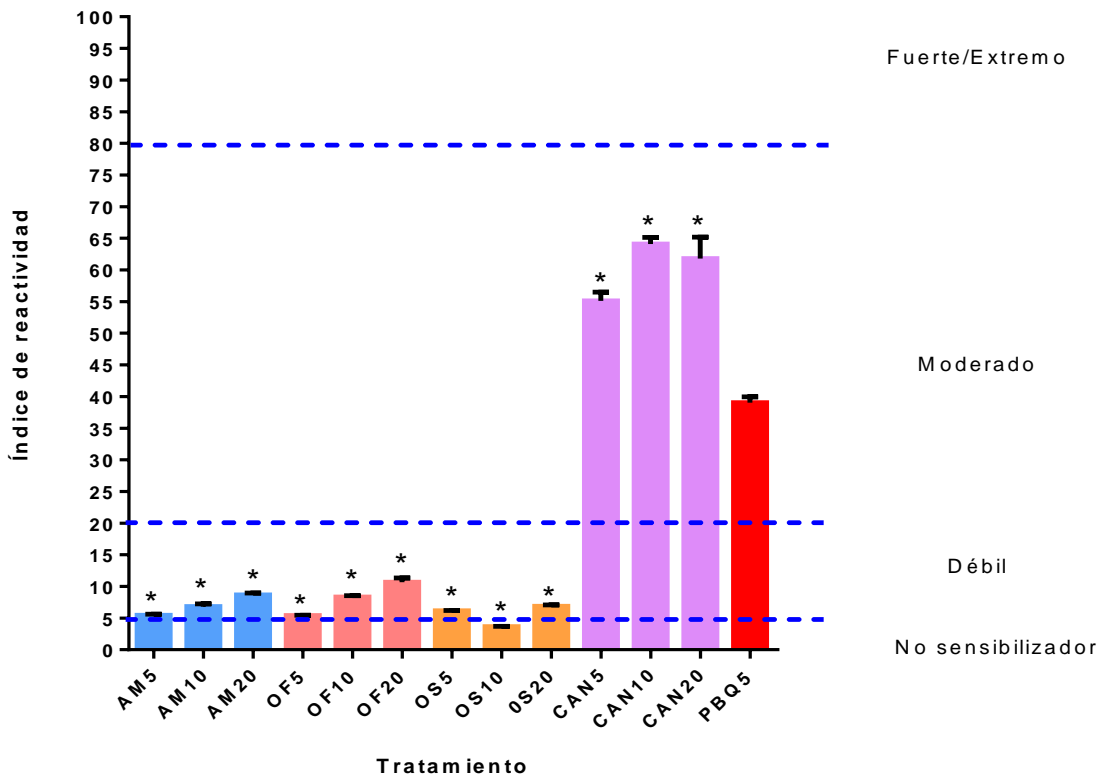


Figura 12. Índice de reactividad del extracto hidroalcohólico de ortiga fresca (OF), extracto hidroalcohólico de ortiga seca (OS) y aceite esencial de canela (CAN) a las concentraciones de 5, 10, 20 mg/mL y *p*-benzoquinona (PBQ;5mM). Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones de al menos 50 lecturas. Las líneas punteadas delimitan las zonas correspondientes a los diferentes grados irritación. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) después de un análisis de varianza de una vía, seguida de la prueba Dunnett con respecto al grupo tratado con *p*-benzoquinona.

En la actualidad aún no se han identificado todos los requisitos necesarios para considerar a una sustancia como un sensibilizador ideal de la piel, pero varias características químicas como el bajo peso molecular, la lipofilia y la reactividad química (electrófilos fuertes, electrofilos aromáticos, bases de Schiff, agentes acilantes y aceptores de Michael) se consideran esenciales para que una sustancia sea considerada como un potencial sensibilizador de la piel (Chittiboyina, 2015). Como podemos observar en la Figura 12 los extractos hidroalcohólicos de ortiga fresca y ortiga seca (*U. dioica*) resultaron irritantes débiles de la piel, esto debido a que el mecanismo por el cual causan irritación es gracias a que en los tallos y las hojas se encuentran pelos urticantes. Estos pelos o tricomas urticantes contienen en su interior varias sustancias químicas como: acetilcolina, histamina, serotonina, moroidina, leucotrienos y posiblemente ácido fórmico. Después de entrar en contacto con la piel, las

puntas de estos pelos o tricomas se desprenden transformándose en un tipo de aguja que penetra la piel liberando todo su contenido irritante, produciendo dolor, ronchas y una sensación de escozor que puede permanecer incluso por más de 12 horas (Jinous, 2012). Este mecanismo pudo haberse destruido o alterado durante la preparación de los extractos hidroalcohólicos o bien con el pH básico que se utiliza en el método *in chemico* de DCYA.

A la par se comprobó que las plantas pierden su carácter punzante al secarse o cocinarse ya que al comparar los extractos hidroalcohólicos de ortiga fresca y ortiga seca a las mismas concentraciones se observa un índice de reactividad menor para los extractos de la planta seca (Dhouibi, 2020)

De la misma forma se corroboró que el aceite esencial de canela, cuyo principal componente es el cinamaldehído, y la *p*-benzoquinona son sensibilizadores moderados con diferente reactividad química (Chittiboyina, 2015).

El diseño de una sonda fluorescente de cisteamina dansilada (DCYA) como nucleófilo modelo para utilizarse con electrófilos potencialmente sensibilizadores de la piel tiene varias ventajas. Los derivados de dansilo se utilizan ampliamente en espectroscopia de fluorescencia, para el marcaje de proteínas y aminoácidos, así como para la detección de iones Zn^{2+} y Fe^{3+} (Yang et al., 2013). Una de las principales ventajas de los fluoróforos de dansilo es su relativa estabilidad, el alto rendimiento cuántico y el gran cambio de Stokes, con una emisión máxima generalmente en el rango de 500 nm. La cisteamina es un análogo de cisteína, lipofílico, versátil, y compatible con disolventes orgánicos (Avonto et al., 2011). La cadena alifática corta proporcionó una distancia de enlace adecuada entre el tiol reactivo y el grupo dansilo sin interferir con el mecanismo electrónico de empujar/jalar de la parte fluorescente. Estas características permitieron que el desarrollo y la validación del método analítico fuera satisfactoria.

A partir de unos años a la fecha se han desarrollado varios métodos alternativos *in silico*, *in vitro* e *in chemico* con el fin de predecir los posibles resultados adversos si se probara directamente en un modelo *in vivo* (Chittiboyina, 2015). De esta manera se ha tratado de dar un poco más de seguimiento al concepto de las 3R de Russel-Burch (reemplazar, reducir y refinar) (Russell y Burch, 1959).

Mientras que los métodos *in silico* como QSAR Toolbox, Derek, TIEMPOS-SS y ToxTree se basan en las relaciones estructura-actividad, los ensayos *in vitro* modelan los eventos tempranos del proceso de sensibilización de la piel basándose en la presencia de ciertas partes de las estructuras químicas,

como los ensayos basados en Nrf-2, por ejemplo KeratinoSens y LuSens los cuales analizan la inducción de la vía antioxidante celular y también los ensayos basados en células dendríticas como MUSST, hCLAT los cuales miden marcadores de maduración DC (CD86, CD54). Por otro lado, los ensayos de reactividad química (*in chemico*) DPRA, GSH, ADRA reflejan el mecanismo de haptención asociado a la sensibilización de la piel. Algunos de estos métodos fueron examinados por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM); los métodos de luciferasa DPRA y ARE-Nrf2 han sido adoptados recientemente por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) para probar los efectos de los productos químicos en la salud (Chittiboyina, 2015).

Es posible que los métodos *in silico* e *in vitro* los cuales son predictivos, no identifiquen sensibilizadores que poseen dominios mecanísticos indefinidos, la presencia de presensibilizadores o prosensibilizadores. Además, se ha demostrado que mezclas potencialmente sensibilizadoras con más de un componente resulta en una tarea difícil de analizar y cuantificar con los métodos existentes, a excepción del ensayo KeratinoSens. Recientemente, Andrés y colaboradores (Andrés et al., 2013) evaluaron la aplicabilidad del ensayo KeratinoSens para extractos de plantas utilizados en el campo cosmético. Sin embargo, hubo limitaciones para un extracto con alta citotoxicidad, en cuyo caso la detección resultó ser muy complicada.

En general, cada uno de los métodos alternativos sin animales puede no ser capaz de predecir completamente el potencial de sensibilización de la piel de una amplia gama de productos químicos. La mayoría de los métodos químicos de última generación independientes o en combinación con algún otro método *in silico* podría proporcionar la información crítica sobre cuánto o qué tan rápido ocurre la reacción para el potencial de sensibilización de una sustancia de prueba dada. Sin embargo, aún quedan preguntas importantes sin respuesta sobre dónde ocurre la reacción y cuáles son las estructuras químicas de los aductos resultantes.

Para aclarar estas dudas críticas y agregar conocimiento adicional a los métodos alternativos actuales, sería ideal adicionar una evaluación utilizando el seguimiento por resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar y clasificar el aducto formado entre el DCYA y la sustancia potencialmente sensibilizadora de la piel. Para el caso del extracto fluido comercial de árnica mexicana y para su compuesto activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno el aducto formado que se esperaría es el mostrado en la **Figura 13**.

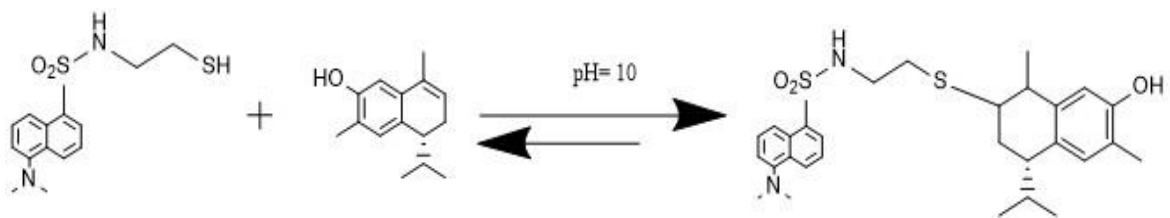


Figura 13. Aducto esperado en la reacción entre el DCYA y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño

Investigar, desarrollar e innovar métodos alternativos que reduzcan o eliminen en la medida de lo posible el uso de animales en pruebas de laboratorio, provocará una disminución en la inversión del capital necesario para la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos y cosméticos. Las pruebas de irritabilidad son fundamentales sobre todo para varios de estos productos cuya zona de aplicación es la superficie de la piel. En septiembre de 2021, se aprobó en lo general y en lo particular, una reforma a la Ley General de Salud, en la cual se prohíbe el uso de animales para pruebas de productos cosméticos (Diario Oficial de la Federación, 2021). Con estas recientes restricciones regulatorias sobre el uso de animales en pruebas cosméticas, este método *in chemico* es una alternativa que beneficiará a la sociedad, brindándole a aquellos productos que se apliquen en la superficie corporal una prueba de irritabilidad eficaz.

10. Conclusiones

- Utilizando el método *in chemico* validado del DCYA se concluye que el extracto fluido comercial de Árnica mexicana (*H.inuloides*) y su principio activo 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno son irritantes débiles o no sensibilizadores de la piel a las concentraciones probadas.
- Utilizando el método *in chemico* validado del DCYA se concluye que el extracto fluido comercial de Árnica mexicana (*H. inuloides*) y el extracto fluido comercial de (*A. montana*) son irritantes débiles de la piel a las concentraciones probadas, lo que comprueba una vez más el enorme parecido entre estas dos plantas de la misma familia.
- Se llevó a cabo la validación del método analítico *in chemico* del DCYA con éxito, cumpliendo satisfactoriamente en ocho de los nueve parámetros mínimos necesarios para cualquier método analítico.

11. Perspectivas

Con base en la investigación realizada algunas perspectivas son:

- El seguimiento en la formación e identificación del aducto cuantificado por el método del DCYA a través de Resonancia magnética nuclear (RMN).
- El *Screening* de diferentes sustancias potencialmente sensibilizadoras de la piel con diferente reactividad química.
- La comprobación de los resultados obtenidos por el método ya validado del DCYA, a través de un método *in vivo* de igual forma ya validado.
- La implementación del método en la industria cosmética y farmacéutica para llevar a cabo las evaluaciones de irritabilidad dérmica en sus productos terminados.

12. Bibliografía

- Aguilar de Alba, H. G. (2015). Development of a DNA barcoding reference library for identification of medicinal plant materials used in the Río Grande Valley of Texas: A representative case study using Arnica (Asteraceae).
- Aguilar, A. Camacho, J. Chino, S. Jáquez, P. & López, M. E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social Información etnobotánica México: IMSS.
- Andres, E., Sa-Rocha, V. M., Barrichello, C., Haupt, T., Ellis, G., & Natsch, A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens assay to evaluate plant extracts: a pilot study. *Toxicol. in Vitro*, 27, 1220–1225.
- Aptula, A. O., Patlewicz, G., & Roberts, D. W. (2005). Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure– activity relationships. *Chemical Research in Toxicology*, 18(9), 1420–1426.
- Avonto, C., Chittiboyina, A. G., Rua, D., & Khan, I. A. (2015). A fluorescence high throughput screening method for the detection of reactive electrophiles as potential skin sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(2), 177–184.
- Avonto, C., Tagliatalata-Scafati, O., Pollastro, F., Minassi, A., Di Marzo, V., De Petrocellis, L., & Appendino, G. (2011). An NMR spectroscopic method to identify and classify thiol-trapping agents: revival of Michael acceptors for drug discovery?. *Angewandte Chemie*, 123(2), 487–491.
- Bye R., Linares E., y E. Estrada. 1995. Biological Diversity of Medicinal Plants in México. In: Arnason J.T., Mata R., Romeo J.T. (eds) Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry. *Proceedings of the Phytochemical Society of North America*. vol 29. Springer, Boston, MA.
- Calvin G. (1992). New approaches to the assessment of eye and skin irritation. *Toxicology Letters*.; 64–65, 157–164.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2009). Anti-Helicobacter pylori activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 402–405.

- Chittiboyina, A. G., Avonto, C., Rua, D., & Khan, I. A. (2015). Alternative testing methods for skin sensitization: NMR spectroscopy for probing the reactivity and classification of potential skin sensitizers. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), 1704–1714.

- Choksi, N. Y., Truax, J., Layton, A., Matheson, J., Mattie, D., Varney, T., Tao, J., Yozzo, K., McDougal, A. J., Merrill, J., Lowther, D., Barroso, J., Linke, B., Casey, W., & Allen, D. (2019). United States regulatory requirements for skin and eye irritation testing. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 38(2), 141–155.

- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O. N., ... & Espinosa-Aguirre, J. J. (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*, 276(1), 41–48.

- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., García-Cruz, M. E., Ramírez-Morales, A., ... & Espinosa-Aguirre, J. J. (2011). Hepatoprotective effect of acetonetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(4), 363–370.

- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., García-Cruz, M. E., Montesinos-Correa, H., ... & Espinosa-Aguirre, J. J. (2013). Acetonetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides*, and quercetin, decrease CCl₄-oxidative stress in several rat tissues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 659165.

- Comisión de Seguridad de Productos de Consumo de EE. UU. *Definiciones. 16 CFR 1500.3* (2015).

- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). (2010). *Árnica del país (Heterotheca Inuloides Cass)*. En plantas medicinales de la Farmacia Viviente del Cefofor: Usos terapéuticos tradiciones y dosificación (págs. 12–14). Jalisco.

- Cruz, G. R. (2007). *Plantas medicinales de nueve comunidades en la frontera entre Chignahuapan, Ixtacamaxtitlán y Aquixtla, Puebla, México*: Universidad Autónoma de Chapingo.

- Delgado, G., Olivares, M., Chávez, M. I., Ramírez-Apan, T., Linares, E., Bye, R., & Espinosa-García, F. J. (2001). Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *Journal of Natural Products*, 64, 861–864.

- Dhouibi, R., Affes, H., Salem, M. B., Hammami, S., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., & Ksouda, K. (2020). Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 150, 67–77.

- Diario Oficial de la Federación (2021). Recuperado el 18 de abril de 2022 de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5632679&fecha=14/10/2021#gsc.tab=0.

- Douglas, J. A., Smallfield, B. M., Burgess, E. J., Perry, N. B., Anderson, R. E., Douglas, M. H., & le Anne Glennie, V. (2004). Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield. *Planta medica*, 70(02), 166–170.

- Durón, R. R., Almaguer, L. C., Garza-Juárez, A. D. J., De La Luz, M., Cavazos, S., & Waksman-De-Torres, N. (2009). Development and validation of thin-layer chromatographic methods for quality control of herbal products. *Acta Chromatographica*, 21(2), 203–215.

- Galicia Alcántara Dulce María. Estudio de difusión transdérmica in vitro de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina aislado de *Heterotheca inuloides* Cass (Árnica Mexicana) utilizando membrabas sintéticas Strat-M®. Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Agosto 18 de 2015.

- Gallardo, A.C.P. (2008). Curanderos y Medicina Tradicional en la Huasteca. México: Instituto Veracruzano de la Cultura.

- Garcia, M. (2002). Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C..https://kupdf.net/download/guia-para-validacion-de-metodos-analiticos-cnqfb-2002_59cec40608bbc58a5a686faa_pdf.

- García-Piñeres AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, Merfort I. Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(43):39713–79720.

- Gené, R. M., Segura, L., Adzet, T., Marin, E., & Iglesias, J. (1998). *Heterotheca inuloides*: Anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 157–162.

- Heinrich, M., Frei Haller, B., & Leonti, M. (2014). A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: the eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *Journal of Natural Products*, 77(3), 678–689.

- Imbert, E. (2002). Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 5(1), 13–36.

- INI (Instituto Nacional Indigenista). (1994). Treinta y cinco monografías del Atlas de las Plantas de la medicina Tradicional Mexicana. En I.N. Indigenista), Flora Medicinal Indígena de México. México.

- Jinous, A., & Razieh, M. (2012). Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(46), 5714–5719.

- Juárez-Flores, B. I., Jasso-Pineda, Y., Aguirre-Rivera, J. R., & Jasso-Pineda, I. (2010). Efecto del polvo de Asteraceae contra el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motsch). *Polibotánica*, (30), 123–135.

- Klaas, C. A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Della Loggia, R., Bomme, U., ... & Merfort, I. (2002). Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Medica*, 68(05), 385–391.

- Knuesel O, Weber M, Suter A. (2002). Arnica montana gel in osteoarthritis of the knee: an open, multicenter clinical trial. *Advances in Therapy*.19(5):209–218.

- Kos, O., Lindenmeyer, M. T., Tubaro, A., Sosa, S., & Merfort, I. (2005). New sesquiterpene lactones from Arnica tincture prepared from fresh flowerheads of Arnica montana. *Planta medica*, 71(11), 1044–1052.

- Kubo, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., ... & Haraguchi, H. (1996). Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta medica*, 62(05), 427–430.

- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S. K., Sanchez, Y., & Ogura, T. (1994). Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta medica*, 60(03), 218–221.
- Linares, E. Flores, B. y Bye, R. (1988). Selección de plantas medicinales de México. México: Limusa.
- Loredó-Medina, O. L., Rodríguez-Chávez, J. M., & Ramos-Espinosa, M. G. (2002). Aprovechamiento de recursos vegetales en una localidad de la reserva de la biosfera mariposa monarca, Michoacán, México. *Etnobiología*, 2(1), 32–60.
- Luebke, R. W., House, R. V., & Kimber, I. (Eds.). (2007). *Immunotoxicology and immunopharmacology*. 3a ed., Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L., & Merfort, I. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33508–33516.
- Maldonado, L. Y. (2004). Quantification of anti-inflammatory cadalenes and isocadalenes in *Arnica (Heterotheca inuloides* Cass) in plants submitted to fertilization and successive cuts. Tesis de licenciatura, Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Escuela de Quimicofarmacobiología.
- Marieschi, M., Torelli, A., & Bruni, R. (2012). Quality control of saffron (*Crocus sativus* L.): development of SCAR markers for the detection of plant adulterants used as bulking agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10998–11004.
- Martín, D. F. S., Perea-Flores, M. D. J., Morales-López, J., Centeno-Alvarez, M. M., Pérez-Ishiwara, G., Pérez-Hernández, N., & Pérez-Hernández, E. (2013). Effect of *Heterotheca inuloides* essential oil on rat cytoskeleton articular chondrocytes. *Natural Product Research*, 27(24), 2347–2350.
- McManus, L. M., & Mitchell, R. (2014). *Pathobiology of human disease: a dynamic encyclopedia of disease mechanisms*. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123864574/pathobiology-of-human-disease#book-description>

- Mijangos Ricárdez, O. F., Ruiz-Jiménez, J., Lagunez-Rivera, L., & Luque de Castro, M. D. (2011). Fast ultrasound-assisted of polar (phenols) and nonpolar (lipids) fractions in *Heterotheca inuloides* Cass. *Phytochemical Analysis*, 22(6), 484–491.
- Muñoz, F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado (reimpresión). México: Ediciones Mundi-Prensa. 365 pp.
- Muñoz-Velázquez, E. E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M., Flavia, G., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., & Ramos-Gómez, M. (2012). Comparison of phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of commercial herbal infusions. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(3), 481–495.
- Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62: 12–15.
- Osuna, H.R., A.G. Hernández, A. Fierro y A.M. Osuna. 2014. Catálogo de semillas de plantas medicinales, enfocado a su propagación (1 Ed.). México: UNAM, Facultad de Ciencias. 90 pp
- Panplona, R.J. 2006. Salud por las plantas medicinales (Vol.1). Madrid, España: Editorial Safeliz, S.L. 384 pp.
- Paßreiter, C. M. (1992). Co-occurrence of 2-pyrrolidineacetic acid with the pyrrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-epimers in *Arnica* species and *Tussilago farfara*. *Phytochemistry*, 31(12), 4135–4137.
- Perry, N. B., Burgess, E. J., Guitián, M. A. R., Franco, R. R., Mosquera, E. L., Smallfield, B. M., ... & Littlejohn, R. P. (2009). Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: helenalin and dihydrohelenalin chemotypes in Spain. *Planta medica*, 75(06), 660–666.
- Pietta, P. G., Mauri, P. L., Bruno, A., & Merfort, I. (1994). MEKC as an improved method to detect falsifications in the flowers of *Arnica montana* and *A. chamissonis*. *Planta medica*, 60(04), 369–372.
- Rivera, D., Obón, C., Verde, A., Fajardo, J., & Valdés, A. (2010). Evidencia histórica sobre la génesis y difusión del concepto de “Árnica” en Europa Occidental. *Revista de Fitoterapia*, 10(2), 157–172.

- Rocha-González H.I., Ramírez-Aguilar M., Granados-Soto V., Reyes-García J.G., Torres-López J.E., Huerta-Cruz J.C., Navarrete A. (2014). Antineuropathic effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin in streptozotocin-induced diabetic rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(129), 1–12.
- Rocha-González, H. I., Blaisdell-Lopez, E., Granados-Soto, V., Navarrete, A. (2010). Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin isolated from *Heterotheca inuloides*: Role of peripheral 5-HT1 serotonergic receptors. *European Journal of Pharmacology* 649(1-3), 154–160.
- Rodríguez- Chávez, J. L., Gómez-Vidales, V., Coballase-Urrutia, E., Ortega-Cuéllar, D., y Delgado-Lamas, G. (2016). *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) metabolites Protect *Caenorhabditis elegans* from oxidative damage and inhibit nitric oxide production. *RSC Advances*, 6, 12032–12041.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Coballase-Urrutia, E., Nieto-Camacho, A., & Delgado-Lamas, G. (2015). Antioxidant capacity of “Mexican arnica” *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives: their anti-inflammatory evaluation and effect on *C. elegans* life span. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 843237, 1–10.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F. J., & Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of ethnopharmacology*, 195, 39–63.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Rufino-Gonzalez, Y., Ponce-Macotela, M., & Delgado, G. (2015). In vitro activity of ‘Mexican Arnica’ *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*. *Parasitology*, 142(4), 576–584.
- Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S., & Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of ethnopharmacology*, 141(3), 860–865.
- Russell W, Burch R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, Londres. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health.
- Sagrero-Nieves, L. (1996). Volatile Components from the Leaves of *Hetrotheca inuloides* Cass. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(1), 49–50.

- Segura, L., Freixa, B., Ringbom, T., Vila, R., Perera, P., Adzet, T., ... & Cañigüeral, S. (2000). Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta medica*, 66(06), 553-555.
- Shurkin, J. (2014). Animals that self-medicate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(49): 17339–1734.
- Soares, D. C., Portella, N. A., Ramos, M. F. D. S., Siani, A. C., & Saraiva, E. M. (2013). Trans- β -caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Stipanovic, R. D., Puckhaber, L. S., Reibenspies, J.H., Y Williams, H. J. (2006). The absolute configuration of (-)-3-hydroxy-alpha-colacorene. *Phytochemistry*, 67 (13), 1304–1308.
- Venable, D. L., & Levin, D. A. (1985). Ecology of achene dimorphism in *Heterotheca latifolia*: I. Achene structure, germination and dispersal. *Journal of Ecology*, 73(1), 133–145.
- Wagner, S., & Merfort, I. (2007). Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different Arnica preparations using a validated GC-MSD method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(1), 32–38.
- Wagner, S., Suter, A., & Merfort, I. (2004). Skin penetration studies of Arnica preparations and of their sesquiterpene lactones. *Planta medica*, 70(10), 897–903.
- Walker, K. M., & Applequist, W. L. (2012). Adulteration of selected unprocessed botanicals in the US retail herbal trade. *Economic botany*, 66, 321–327.
- Wilhelmus, K. R. (2001). The Draize eye test. *Survey of ophthalmology*, 45(6), 493–515.
- Willuhn, G. (1998). Arnica flowers: Pharmacology, toxicology, and analysis of the sesquiterpene lactones—Their main active substances. *Phytochemical of Europe*, chapter 10, 118–132.
- Yang, M., Sun, M., Zhang, Z., & Wang, S. (2013). A novel dansyl-based fluorescent probe for highly selective detection of ferric ions. *Talanta*, 105, 34–39.
- Zamudio, G. 2002. El Real Jardín Botánico del Palacio Virreinal de la Nueva España. *Ciencias* 68: 22-27.

Farmacología de Productos Naturales

