



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

**PRUEBAS DE EFICACIA, SEGURIDAD Y COMPOSICIÓN DE ESPECIES  
SELECTAS MEDICINALES DE LA REGIÓN DE CAPULÁLPAM DE MÉNDEZ,  
OAXACA.**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. ERIKA VIVANI CASTILLEJOS RAMÍREZ**

**DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2022**



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**

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
<b>VOCAL</b>	Dr. Andrés Navarrete Castro
<b>VOCAL</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
<b>VOCAL</b>	Dr. Sol Cristians Niizawa
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Berenice Ovalle Magallanes

### **Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:**

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

## **PUBLICACIÓN**

Castillejos-Ramírez, E.; Pérez-Vásquez, A.; Torres-Colín, R.; Navarrete, A.; Andrade-Cetto, A.; Mata, R. Antinociceptive Effect of an Aqueous Extract and Essential Oil from *Baccharis heterophylla*. *Plants* 2021, 10, 116. <https://doi.org/10.3390/plants10010116>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por permitir fortalecer mi formación académica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (No. de becario 257969).

Al CONACYT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento requerido para realizar la presente investigación a través de los proyectos CONACYT A1-5-11226 y DGAPA-PAPIIT-IN217.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo; por su tiempo, presencia incondicional y sus relevantes aportes, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación. Muchas gracias.

A los miembros de mi Comité tutelar, doctores Adolfo Andrade Cetto y Andrés Navarrete Castro, por su valiosa asesoría a lo largo de mis estudios.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su valiosa asesoría técnica, por el tiempo y el apoyo brindados durante todo el proyecto.

A la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz por su valiosa asesoría técnica y apoyo brindado en la realización de los experimentos analíticos.

A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes por su valioso apoyo brindado durante la realización de los experimentos farmacológicos.

A los miembros del jurado asignado, por sus valiosos comentarios que enriquecieron y mejoraron el contenido de esta tesis.

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

Al Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda y a la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por permitirme utilizar sus equipos y asesoría durante los primeros intentos para separar el compuesto 129.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar por su valioso apoyo en el aislamiento del compuesto 129.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química: a la Q. Georgina Duarte Lisci, por su apoyo en la realización de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo, a las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux por el registro de los espectros de RMN.

A mi madre.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	4
<b>1 ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Medicina tradicional mexicana.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Generalidades de la comunidad Capulálpam de Méndez .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Generalidades del género <i>Cestrum</i> .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Taxonomía y distribución.....	11
1.3.2 Usos tradicionales y farmacología .....	12
1.3.3 Fitoquímica del género <i>Cestrum</i> .....	14
1.3.3.1 Saponinas.....	14
1.3.3.2 Lignanós .....	18
1.3.3.3 Flavonoides.....	20
1.3.3.4 Terpenoides.....	21
1.3.3.5 Otros compuestos.....	21
1.3.4 Generalidades de la especie <i>Cestrum dumetorum</i> .....	22
<b>1.4 Antecedentes del género <i>Baccharis</i> .....</b>	<b>24</b>
1.4.1 Taxonomía y distribución.....	24
1.4.2 Farmacología del género <i>Baccharis</i> .....	25
1.4.3 Antecedentes fitoquímicos del género <i>Baccharis</i> .....	26
1.4.3.1 Compuestos volátiles.....	26
1.4.3.2 Flavonoides.....	27
1.4.3.3 Compuestos fenólicos.....	28
1.4.3.4 Diterpenoides.....	28
1.4.4 Generalidades de la especie <i>Baccharis heterophylla</i> .....	29
<b>2 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>3 HIPÓTESIS .....</b>	<b>34</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5 DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Estudio etnobotánico.....</b>	<b>36</b>



<b>5.2</b>	<b>Material vegetal</b> .....	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>Procedimientos generales</b> .....	<b>37</b>
5.3.1	Análisis cromatográficos .....	37
5.3.2	Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas .....	39
<b>5.4</b>	<b>Estudio químico de la especie <i>B. heterophylla</i></b> .....	<b>40</b>
5.4.1	Preparación del extracto acuoso .....	40
5.4.2	Fraccionamiento secundario de la fracción soluble de AcOEt.....	40
5.4.3	Fraccionamiento terciario de la fracción FB <sub>16</sub> .....	42
5.4.4	Obtención de apigenina (97) de la fracción FB <sub>20</sub> .....	43
5.4.5	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FB <sub>17</sub> .....	44
5.4.6	Preparación del aceite esencial.....	45
<b>5.5</b>	<b>Estudio químico de la especie <i>C. dumetorum</i></b> .....	<b>45</b>
5.5.1	Preparación del extracto acuoso y orgánico .....	45
5.5.2	Fraccionamiento primario del extracto orgánico.....	45
5.5.2.1	Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt .....	46
5.5.2.2	Fraccionamiento secundario de la fracción de <i>n</i> -butanol .....	46
5.5.3	Preparación del aceite esencial de <i>C. dumetorum</i> .....	47
<b>5.6</b>	<b>Evaluaciones farmacológicas</b> .....	<b>47</b>
5.6.1	Preparación de las muestras .....	48
5.6.2	Evaluación del potencial antinociceptivo de <i>B. heterophylla</i> .....	48
5.6.3	Evaluación del potencial antinociceptivo de <i>C. dumetorum</i> .....	49
5.6.4	Evaluación del potencial antihiperalgésico de <i>C. dumetorum</i> .....	49
5.6.5	Evaluación de la toxicidad aguda de <i>C. dumetorum</i> .....	49
5.6.6	Evaluación del efecto antiinflamatorio de <i>C. dumetorum</i> .....	50
5.6.7	Análisis Estadístico .....	50
<b>5.7</b>	<b>Establecimiento de los perfiles cromatográficos</b> .....	<b>51</b>
5.7.1	Establecimiento del perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso de <i>B. heterophylla</i> .....	51
5.7.2	Establecimiento del perfil cromatográfico CLUE-EM de la fracción soluble de AcOEt de <i>C. dumetorum</i> .....	51
<b>5.8</b>	<b>Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de <i>B. heterophylla</i> y <i>C. dumetorum</i></b> .....	<b>52</b>
5.8.1	Preparación de la solución de referencia de los analitos .....	52
5.8.2	Preparación de la matriz de trabajo .....	52
5.8.3	Linealidad del sistema .....	52
5.8.4	Linealidad del método y exactitud .....	53
5.8.5	Precisión .....	54
5.8.6	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) .....	54
5.8.7	Cuantificación de los compuestos presentes en el extracto acuoso de <i>B. heterophylla</i> .....	54
5.8.8	Cuantificación de los compuestos presentes en la fracción soluble de AcOEt de <i>C. dumetorum</i> .....	55
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>

<b>6.1</b>	<b>Estudio etnobotánico.....</b>	<b>56</b>
<b>6.2</b>	<b>Estudio químico de la especie <i>Baccharis heterophylla</i> .....</b>	<b>57</b>
6.2.1	Aislamiento y caracterización de los metabolitos de <i>B. heterophylla</i> .....	57
6.2.2	Determinación de compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de <i>B. heterophylla</i> .....	59
6.2.3	Determinación de compuestos volátiles de <i>B. heterophylla</i> por microextracción en fase sólida .....	60
<b>6.3</b>	<b>Estudio farmacológico de la especie <i>Baccharis heterophylla</i> .....</b>	<b>64</b>
6.3.1	Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto acuoso, mediante el modelo de la formalina.....	64
6.3.2	Evaluación del potencial antinociceptivo del aceite esencial de <i>B. heterophylla</i> ..	66
<b>6.4</b>	<b>Pruebas de composición de la especie <i>Baccharis heterophylla</i> .....</b>	<b>67</b>
6.4.1	Establecimiento del perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso.....	67
6.4.2	Validación de un método analítico para la cuantificación de los componentes del Extracto Acuoso de <i>B. heterophylla</i> .....	69
6.4.2.1	Linealidad del sistema .....	69
6.4.2.2	Linealidad del método y exactitud.....	71
6.4.2.3	Precisión .....	73
6.4.2.4	Límite de detección y límite de cuantificación.....	73
6.4.2.5	Cuantificación de metabolitos presentes en los extractos acuosos de <i>B. heterophylla</i> .....	74
<b>6.5</b>	<b>Estudio químico de <i>Cestrum dumetorum</i>.....</b>	<b>75</b>
6.5.1	Aislamiento y caracterización de los metabolitos de <i>C. dumetorum</i> .....	75
6.5.2	Determinación de compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de <i>C. dumetorum</i> .....	86
6.5.3	Determinación de compuestos volátiles de <i>C. dumetorum</i> por microextracción en fase sólida .....	87
<b>6.6</b>	<b>Estudio farmacológico de la especie <i>Cestrum dumetorum</i> .....</b>	<b>88</b>
6.6.1	Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso .....	88
6.6.2	Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto acuoso de <i>C. dumetorum</i> ..	89
6.6.3	Determinación del potencial antiinflamatorio del extracto acuoso de <i>C. dumetorum</i> 90	
6.6.4	Evaluación del potencial antihiperalgésico del extracto acuoso de <i>C. dumetorum</i>	92
<b>6.7</b>	<b>Pruebas de composición de la especie <i>Cestrum dumetorum</i> .....</b>	<b>93</b>
6.7.1	Establecimiento del perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso.....	93
6.7.2	Validación del método analítico.....	94
6.7.2.1	Linealidad del sistema .....	95
6.7.2.2	Linealidad del método y exactitud.....	96
6.7.2.3	Precisión .....	97
6.7.2.4	Límite de detección y límite de cuantificación.....	97
6.7.2.5	Cuantificación de metabolitos presentes en la fracción de AcOEt del extracto acuoso de <i>C. dumetorum</i> .....	98
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>

<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica de Capulálpam de Méndez. ....	10
<b>Figura 2.</b> Instalaciones del Centro de Medicina Indígena Tradicional.....	11
<b>Figura 3.</b> Farmacia del Centro de Medicina Indígena Tradicional.....	11
<b>Figura 4.</b> Arbusto de <i>Cestrum dumetorum</i> .....	22
<b>Figura 5.</b> Hojas y frutos de <i>Cestrum dumetorum</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> Distribución de la especie <i>Cestrum dumetorum</i> desde 1829 hasta el 2019. ....	24
<b>Figura 7.</b> Arbusto de <i>Baccharis heterophylla</i> .....	30
<b>Figura 8.</b> Flores y hojas de <i>Baccharis heterophylla</i> .....	30
<b>Figura 9.</b> Distribución de la especie <i>Baccharis heterophylla</i> desde 1829 hasta el 2019.....	31
<b>Figura 10.</b> Cromatograma iónico total del aceite esencial de las partes aéreas de <i>B. heterophylla</i> . 61	
<b>Figura 11.</b> Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles de <i>B. heterophylla</i> . ....	63
<b>Figura 12.</b> A) Curso temporal del efecto antinociceptivo de EA de <i>B. heterophylla</i> , cada punto representa el promedio del tiempo de lamida $\pm$ EEM $n=6$ . B) ABC total de todos los tratamientos. C) ABC de la primera y segunda fase del modelo. ....	65
<b>Figura 13.</b> A) Curso temporal del efecto antinociceptivo de AE de <i>B. heterophylla</i> , cada punto representa el promedio del tiempo de lamida $\pm$ EEM $n=6$ . B) Área bajo la curva total. C) ABC de la primera y segunda fase del modelo. ....	67
<b>Figura 14.</b> Cromatograma por CLAE del extracto acuoso de las partes aéreas de <i>B. heterophylla</i> . 69	
<b>Figura 15.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto <b>103</b> .....	70
<b>Figura 16.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto <b>105</b> .....	71
<b>Figura 17.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto <b>106</b> .....	71
<b>Figura 18.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto <b>103</b> . ....	72
<b>Figura 19.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto <b>105</b> . ....	72
<b>Figura 20.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto <b>106</b> . ....	72
<b>Figura 21.</b> Flavonoides aislados de las partes aéreas de <i>C. dumetorum</i> .....	75
<b>Figura 22.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>129</b> .....	76
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (100 MHz, CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>129</b> .....	77
<b>Figura 24.</b> A) Principales correlaciones en HMBC y COSY del compuesto <b>129</b> .....	78
<b>Figura 25.</b> A) Principales correlaciones observadas en los espectros de HMBC y COSY para los ciclos A, B y C. B) Vista parcial del espectro de COSY del compuesto <b>129</b> . ....	79
<b>Figura 26.</b> A) Principales correlaciones observadas en los espectros de HMBC y COSY. B) Vista parcial del espectro de HSQC del compuesto <b>129</b> .....	80

<b>Figura 27.</b> Vista parcial del espectro de HMBC del compuesto <b>129</b> . .....	80
<b>Figura 28.</b> Principales correlaciones observadas en el NOESY del compuesto <b>129</b> .....	81
<b>Figura 29.</b> Vista parcial del espectro de TOCSY del compuesto <b>129</b> .....	82
<b>Figura 30.</b> Vista parcial del espectro de NOESY del compuesto <b>129</b> .....	83
<b>Figura 31. A)</b> Principales correlaciones observadas en los espectros de HMBC y COSY. ....	84
<b>Figura 32.</b> Estructura del compuesto <b>129</b> . .....	84
<b>Figura 33.</b> Cromatograma iónico total del aceite esencial de las partes aéreas de <i>C. dumetorum</i> . ..	87
<b>Figura 34. A)</b> Curso temporal del vehículo y el control positivo en el modelo de formalina, cada punto representa el promedio del tiempo de lamida $\pm$ EEM $n=6$ . <b>B)</b> ABC total de todos los tratamientos. VEH, (vehículo); DIC (50 mg/kg, control positivo). <b>C)</b> ABC de la primera y la segunda fase del modelo. ....	90
<b>Figura 35. A)</b> Curso temporal del potencial antiinflamatorio de EA de <i>C. dumetorum</i> en la prueba edema inducido por carragenina. <b>B)</b> ABC total del potencial antiinflamatorio. VEH, (vehículo); DIC (10 mg/kg, control positivo).....	91
<b>Figura 36. A)</b> Curso temporal del efecto antihiperalgésico de EA de <i>C. dumetorum</i> , cada punto representa el promedio del tiempo de lamida $\pm$ EEM $n=6$ . <b>B)</b> ABC total de todos los tratamientos. <b>C)</b> ABC de la primera y la segunda fase del modelo. ....	93
<b>Figura 37.</b> Cromatograma por CLUE de la fracción soluble del extracto acuoso.....	94
<b>Figura 38.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto <b>127</b> .....	95
<b>Figura 39.</b> Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto <b>128</b> .....	95
<b>Figura 40.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto <b>127</b> . ....	96
<b>Figura 41.</b> Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto <b>128</b> . ....	96
<b>Figura 42.</b> Modelo de entrevista semiestructurada para el estudio etnobotánico.....	118
<b>Figura 43.</b> Ejemplo del consentimiento informado de dos de las especialistas entrevistadas el estudio etnobotánico en el CMIT. ....	119
<b>Figura 44.</b> Solicitud del permiso correspondiente para la realización de entrevistas en la comunidad de Capulálpam de Méndez.....	120
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del éster metílico del ácido 3,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>125</b> ). 122	
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del éster metílico del ácido 3,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>125</b> ). 123	
<b>Figura 47.</b> Espectro de masas del éster metílico del ácido 3,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>125</b> ). .... 124	
<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 3,4-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>104</b> )..... 125	
<b>Figura 49.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del ácido 3,4-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>104</b> )..... 126	
<b>Figura 50.</b> Espectro de masas EM- ESI del ácido 3,4-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>104</b> ). .... 127	
<b>Figura 51.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 3,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>105</b> )..... 128	
<b>Figura 52.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del ácido 3,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>105</b> )..... 129	

<b>Figura 53.</b> Espectro de masas EM- ESI del ácido 3,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>105</b> ).....	130
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 4,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>106</b> ).....	131
<b>Figura 55.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de ácido 4,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>106</b> ).....	132
<b>Figura 56.</b> Espectro de masas EM- ESI del ácido 4,5-di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico ( <b>106</b> ).....	133
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la apigenina ( <b>97</b> ).....	134
<b>Figura 58.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la apigenina ( <b>97</b> ).....	135
<b>Figura 59.</b> Espectro de masas EM- ESI de la apigenina ( <b>126</b> ).....	136
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la genkwanina ( <b>113</b> ).....	137
<b>Figura 61.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la acetina ( <b>126</b> ).....	138
<b>Figura 62.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la acetina ( <b>126</b> ).....	139
<b>Figura 63.</b> Espectro de masas EM- ESI de la acetina ( <b>126</b> ).....	140
<b>Figura 64.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del hiperósido ( <b>127</b> ).....	141
<b>Figura 65.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de hiperósido ( <b>127</b> ).....	142
<b>Figura 66.</b> Espectro de masas EM- ESI del hiperósido ( <b>126</b> ).....	143
<b>Figura 67.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) de la isoquercitrina ( <b>128</b> ).....	144
<b>Figura 68.</b> Espectro de masas EM- ESI la isoquercitrina ( <b>128</b> ).....	145
<b>Figura 69.</b> Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>129</b> .....	146
<b>Figura 70.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>129</b> .....	147
<b>Figura 71.</b> Espectro HMBC del compuesto <b>129</b> .....	148
<b>Figura 72.</b> Espectro NOESY del compuesto <b>129</b> .....	149
<b>Figura 73.</b> Espectro TOCSY del compuesto <b>129</b> .....	150
<b>Figura 74.</b> Espectro de masas EM- ESI del compuesto <b>129</b> .....	151
<b>Figura 75.</b> Espectro de IR del compuesto <b>129</b> .....	152
<b>Figura 76.</b> Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto <b>103</b> .....	154
<b>Figura 77.</b> Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto <b>105</b> .....	154
<b>Figura 78.</b> Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto <b>106</b> .....	155
<b>Figura 79.</b> Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto <b>127</b> .....	155
<b>Figura 80.</b> Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto <b>128</b> .....	156

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción soluble de AcOEt de <i>B. heterophylla</i> .....	41
<b>Tabla 2.</b> Rango de concentraciones utilizadas para los diferentes analitos en la evaluación de la linealidad del sistema. ....	53
<b>Tabla 3.</b> Intervalo de concentraciones utilizadas para la evaluación de la linealidad y exactitud del método. ....	53
<b>Tabla 4.</b> Concentración de los analitos para la evaluación de la precisión.....	54
<b>Tabla 5.</b> Usos tradicionales de las especies objeto de estudio.....	56
<b>Tabla 6.</b> Metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de las partes aéreas de <i>B. heterophylla</i> .....	58
<b>Tabla 7.</b> Compuestos volátiles detectados en <i>B. heterophylla</i> .....	62
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de calibración del método.....	70
<b>Tabla 9.</b> Parámetros estadísticos de la linealidad del método y porcentajes de recobro. ....	73
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la precisión del método. ....	73
<b>Tabla 11.</b> Límites de detección y límites de cuantificación de los analitos.....	74
<b>Tabla 12.</b> Contenido (mg/g) en cuatro muestras de <i>B. heterophylla</i> .....	74
<b>Tabla 13.</b> Datos de RMN- <sup>13</sup> C y RMN- <sup>1</sup> H en CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub> del compuesto <b>129</b> . ....	85
<b>Tabla 14.</b> Constituyentes volátiles de <i>Cestrum dumetorum</i> identificados por CG-EM. ....	88
<b>Tabla 15.</b> Toxicidad aguda del extracto acuoso de <i>Cestrum dumetorum</i> . ....	89
<b>Tabla 16.</b> Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema. Detector UV.95	
<b>Tabla 17.</b> Parámetros estadísticos de la linealidad del método y porcentajes de recobro. ..	97
<b>Tabla 18.</b> Evaluación de la precisión.....	97
<b>Tabla 19.</b> Límites de detección y límites de cuantificación de los analitos.....	97
<b>Tabla 20.</b> Contenido (µg /mL) en cuatro muestras de <i>C.dumetotum</i> .....	98
<b>Tabla 21.</b> Análisis de varianza de la linealidad del compuesto <b>103</b> . ....	153
<b>Tabla 22.</b> Análisis de varianza de la linealidad del compuesto <b>105</b> . ....	154
<b>Tabla 23.</b> Análisis de varianza de la linealidad del compuesto <b>106</b> . ....	155
<b>Tabla 24.</b> Análisis de varianza de la linealidad del compuesto <b>127</b> . ....	155
<b>Tabla 25.</b> Análisis de varianza de la linealidad del compuesto <b>128</b> . ....	156
<b>Tabla 26.</b> Parámetros estadísticos para la linealidad del método de <i>B. heterophylla</i> . ....	156

**Tabla 27.** Parámetros estadísticos para la linealidad del método de *C. dumetorum*..... 157



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ANADEVA</b>	Análisis de varianza
<b>b<sub>0</sub></b>	Ordenada al origen
<b>b<sub>1</sub></b>	Pendiente
<b>CCA</b>	Cromatografía en columna abierta
<b>CCF</b>	Cromatografía de capa fina
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
<b>CLAE</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
<b>CLUE</b>	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
<b>CMIT</b>	Centro de Medicina Índigena Tradicional
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>IC (β<sub>0</sub>)</b>	Intervalo de confianza para la ordenada
<b>IC (β<sub>1</sub>)</b>	Intervalo de confianza para la pendiente
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
<b>IR</b>	Índice de Retención de Kováts
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>MEFS</b>	Microextracción en fase sólida
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>R</b>	Coefficiente de correlación
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>S<sub>b</sub></b>	Varianza de la pendiente
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>WHA</b>	World Health Assembly
<b>WHO</b>	World Health Organization

## RESUMEN

El presente trabajo describe la investigación etnomédica, química y farmacológica de las especies *Baccharis heterophylla* (Asteraceae) y *Cestrum dumetorum* (Solanaceae), las cuales son ampliamente utilizadas en el tratamiento de padecimientos dolorosos e inflamatorios en la medicina tradicional de la comunidad de Capulálpam de Méndez, Oaxaca. Los resultados condujeron a la generación de información científica que sustenta la eficacia y seguridad preclínicas de ambas especies, y al establecimiento de las pruebas de calidad de la droga cruda. Esta información permitirá generar su monografía científica de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud.

El estudio químico de la infusión elaborada con las partes aéreas de *B. heterophylla* condujo al aislamiento de cuatro ácidos di-cafeoilquínicos, el éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**125**), ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**104**), ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**), ácido 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**106**), y tres flavonoides identificados como apigenina (**97**), genkwanina (**113**) y acetina (**126**). Previamente estos compuestos se habían aislado en otras especies del género *Baccharis*, sin embargo, los compuestos **104**, **105**, **106**, **125** y **126** se describen por vez primera en *B. heterophylla*.

También se establecieron los perfiles cromatográficos del aceite esencial y de los compuestos volátiles determinados por microextracción en fase sólida. El análisis del aceite esencial permitió establecer que los componentes mayoritarios son el D-limoneno (**87**), mirceno (**89**) y  $\beta$ -pineno (**92**). De manera complementaria, el análisis de los componentes volátiles por microextracción en fase sólida permitió establecer que la composición volátil de las partes aéreas de la planta se caracteriza por un elevado número de hidrocarburos y que la fibra de polaridad mixta DVB/CAR/PDMS es la más adecuada para establecerla.

La eficacia del extracto acuoso y el aceite esencial de *B. heterophylla* se evaluaron mediante el modelo de la formalina. El extracto acuoso en la fase 1 de la prueba, mostró un efecto antinociceptivo a la dosis más alta ensayada (316 mg/kg), por otro lado, las dosis de 100 y 316 mg/kg mostraron una reducción significativa del estímulo durante la segunda fase.

En consecuencia, el extracto acuoso de *B. heterophylla* posee un efecto antinociceptivo sobre todo en la fase inflamatoria del modelo de la formalina. Este efecto puede estar relacionado con el alto contenido de los ácidos clorogénico (**104**) y di-cafeoilquínicos **105** y **106**, así como de los flavonoides **97** y **113**. El aceite esencial disminuyó el comportamiento nociceptivo en la primera fase a la concentración de 30 µg/pata, en tanto que en la segunda fase el efecto se observó a las concentraciones de 100 y 177 µg/pata. Estos resultados también están en armonía con la composición química de la esencia, rica en compuestos con conocida actividad antinociceptiva.

También se desarrolló el perfil cromatográfico que permitió identificar a los ácidos di-cafeoilquínicos (**104-106**) como los compuestos mayoritarios en la infusión, así como la presencia de ácido clorogénico (**103**). Finalmente, se validó un método analítico por CLAE que resultó ser selectivo, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones evaluado y constituye una prueba de composición para la droga cruda de la planta.

El estudio químico de *C. dumetorum* permitió el aislamiento de los flavonoides hiperósido (**127**) e isoquercitrina (**128**), así como una saponina de tipo furostanol 26-*O*-β-D-glucopiranosil-22-hidroxifurost-25(27)-en-3-ol-(3β[(*O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil-(1→2)]-*O*-β-D-xilopiranosil-(1→3)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil) (**129**). Este es el primer estudio químico que se realiza a la especie, por lo tanto, los resultados constituyen una aportación inédita a la composición de la planta.

El análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial de *C. dumetorum* permitió identificar como constituyentes mayoritarios al *cis*-2-hexenal (**146**), *cis*-3-hexen-1-ol (**147**), *cis*-2-hexen-1-ol (**148**) y ácido *n*-hexadecanoico (**156**).

Los estudios de seguridad y eficacia preclínicas de esta especie se realizaron mediante ensayos farmacológicos *in vivo*. En primera instancia, se realizó un estudio de la toxicidad aguda del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. dumetorum* siguiendo el método de Lorke, los resultados indicaron que la DL<sub>50</sub> de la decocción de *C. dumetorum* es mayor a 5 g/kg, por lo que no se considera tóxica para roedores tras una única administración. Se

determinó la eficacia del extracto acuoso como agente antinociceptivo, antihiperalgésico, y antiinflamatorio mediante los modelos de formalina en ratones normoglucémicos, hiperglucémicos y edema inducido por carragenina, respectivamente. El extracto acuoso mostró un efecto antinociceptivo durante la segunda fase del modelo de la formalina a las dosis de 31.6 y 316 mg/kg. La acción antihiperalgésica se determinó en ratones hiperglucémicos y el efecto máximo se alcanzó durante la segunda fase del modelo a una dosis de 316 mg/kg. Finalmente, se observó una reducción del 42% de la inflamación a la dosis de 177 mg/kg, en el modelo de carragenina. Los resultados proporcionan evidencias experimentales que correlacionan con los usos populares de la planta.

Finalmente, se desarrolló y validó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia (CLUE), que permitió la cuantificación de los flavonoides hiperósido (**127**) e isoquercitrina (**128**) presentes en la fracción soluble de acetato de etilo del extracto acuoso, constituyendo las pruebas de identidad y composición. El método será de utilidad para el control de calidad de *C. dumetorum*.

## ABSTRACT

This research was undertaken to investigate the preclinical efficacy and security of *Cestrum dumetorum* and *Baccharis heterophylla*, both species are used in the traditional medicine of Capulálpam de Méndez for the treatment of painful and inflammatory conditions. In addition, a second aim was to establish the identity, and composition tests for the traditional preparations.

The chemical study of the aqueous extract prepared from the aerial parts of *B. heterophylla* led to the isolation and characterization of 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid methyl ester (**125**), 3,4-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (**104**), 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (**125**), 4,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (**106**), apigenin (**97**), genkwanin (**113**), and acacetin (**126**). Compounds **104-106**, **125** and **126** are new for *B. heterophylla*. Analyses of the essential oil and the headspace solid-phase microextraction products via gas-chromatography-mass spectrometry revealed that the major volatiles were  $\beta$ -pinene, myrcene, and D-limonene.

The antinociceptive effect of aqueous extract and essential oil was assessed using the formalin test. The oral administration of the aqueous extract (31.6–316 mg/kg) provoked antinociceptive effects in both phases of formalin-induced nociception; in the first stage, the effect was only observed at the highest dose tested (316 mg/kg); the highest responses in the second phase was observed at the doses of 100 and 316 mg/kg, which reduced the licking time significantly. On the other hand, intraplantar pretreatment of mice with essential oil (30–177  $\mu$ g/paw) also decreased the nociceptive response in both phases of the formalin test; in the first stage, the highest effect was observed at the concentration of 30  $\mu$ g/paw, but in the second phase the antinociceptive action was more pronounced at the concentrations of 100 and 177  $\mu$ g/paw. The antinociceptive effects of the aqueous extract could be related to the high content of chlorogenic acid, di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acids, apigenin, and acacetin.

A High-Pressure Liquid Chromatographic (HPLC) method was developed and validated to quantify the chlorogenic acid (**103**) and di-caffeoylquinic acids **104–106** in the

aqueous extract of the plant. This method was linear, precise, and accurate in the concentration range evaluated and can be regarded as a composition test for this plant.

Phytochemical analysis of the decoction of *C. dumetorum* resulted in the isolation of hyperoside (**127**), isoquercitrin (**128**), and a furostanol saponin characterized as 26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-22-hydroxyfurost-25(27)-en-3-yl-(3 $\beta$ [(*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- $\beta$ -D-xylopiranosyl-(1 $\rightarrow$ 3))-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosyl) (**129**). These compounds are reported for the first time in this species. Analyses of the hydrodistilled essential oil and the headspace solid-phase microextraction products via GC-MS revealed that the significant volatile components were *cis*-2-hexenal (**146**), *cis*-3-hexen-1-ol (**147**), *cis*-2-hexen-1-ol (**148**) and hexadecenoic acid (**156**).

According to Lorke's procedure, the decoction was not toxic ( $LD_{50} > 5$  g/kg) to mice. The effect antinociceptive of the aqueous extract (31.6-316 mg/kg) was evaluated using the formalin test in mice. The antinociceptive effect was higher in the second phase of the test at 31.6 and 316 mg/kg doses. The anti-inflammatory effect was assayed with the carrageenan-induced rat paw edema; the aqueous extract induced 42% inhibition of inflammation at the dose of 170 mg/kg. On the other hand, the antihyperalgesic action recorded in hyperglycemic mice (NAD-STZ) was relevant at the dose of 316 mg/kg.

Finally, a precise, reliable, and accurate UPLC method for quantifying hyperoside and isoquercitrin content in the ethyl acetate fraction of decoction of the plant was developed and validated.

Altogether, these results tend to support the medicinal use of *B. heterophylla* and *C. dumetorum* to treat pain complaints in Mexican folk medicine and contribute to the rational use of these valuable medicinal plants.

## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 Medicina tradicional mexicana

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la medicina tradicional como “el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales” (OMS, 2013).

En México la medicina tradicional es el conjunto de conocimientos y prácticas que ha evolucionado a través de los siglos, a partir del sincretismo que se produjo entre las culturas prehispánica y española, producto de la conquista (Jiménez, 2017). La medicina tradicional, es un componente fundamental del patrimonio tangible e intangible de los pueblos indígenas (Casas *et al.*, 2016; Delgado *et al.*, 2018).

Históricamente, y a pesar de su uso ancestral, la medicina tradicional ha sido subvalorada por los servicios de salud oficiales, y no fue sino hasta mediados de 1980 que en México surgieron planes gubernamentales para mejorar la salud de los pueblos indígenas. Entre las acciones más importantes destacan la conformación de asociaciones de terapeutas de los pueblos indígenas, el reconocimiento jurídico de sus métodos curativos, y su incorporación en hospitales de varias comunidades de los pueblos indígenas del país (Campos-Navarro, 2017). Estas acciones gubernamentales tuvieron su origen en las recomendaciones emitidas por la OMS en la declaración de Alma Atta, en 1979, misma que invitaba a las autoridades sanitarias de sus países miembros, a valorar e incorporar de manera racional las prácticas médicas tradicionales. Posteriormente se han emitido una serie de resoluciones a través de la Asamblea Mundial de la Salud (WHA 31.33 1978; WHA 40.33, 1987; WHA 42.43, 1989; y WHA 62.13, 2009) en las cuales se ha enfatizado aún más la necesidad de asegurar la calidad y eficacia de los recursos medicinales tradicionales, que generalmente son plantas. La OMS también ha publicado numerosos documentos que, intentan orientar a las autoridades sanitarias de sus países miembros, como lograr este cometido. Una de las últimas publicaciones es la “Estrategia de la OMS sobre medicina

tradicional 2014-2023” (OMS, 2013). Este documento señala que la práctica médica tradicional debe hacerse de forma segura y eficaz, y destaca la necesidad de implementar criterios de calidad de los recursos utilizados en estas prácticas. En este escrito se contemplan dos objetivos principales: el primero consiste en brindar apoyo a los países miembros para que aprovechen la medicina tradicional para lograr su bienestar y atención primaria a sus problemas de salud; mientras que el segundo trata de promover la utilización segura y eficaz de la medicina tradicional mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales. Las metas más importantes de este documento son: (i) el fortalecimiento de la seguridad, la calidad y la eficacia de esos productos herbolarios mediante su reglamentación; y (ii) fomentar la cobertura sanitaria universal por medio de la integración de servicios de medicina tradicional a los sistemas nacionales de salud (OMS, 2013).

Derivado de las distintas propuestas de la OMS, el Instituto Nacional Indigenista (INI) en el año de 1982 ya reconocía a 82 Organizaciones de Médicos Indígenas Tradicionales y posteriormente en el 2001 la Constitución de los Estados Unidos Mexicanos en su Artículo 2º reconoció a la medicina tradicional (Guzmán-Rosas *et al.*, 2017). Actualmente, la Secretaría de Salud (SSA) es responsable de “Promover el conocimiento y desarrollo de la medicina tradicional y su práctica en condiciones adecuadas” a través de la Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural, así como la inclusión de la Medicina Tradicional en la Ley General de Salud, y la cooperación entre los servicios que ofrece la SSA y los practicantes de la medicina tradicional (Palacios, 2007).

Las plantas medicinales representan el recurso más importante de las prácticas médicas tradicionales, debido entre otros factores, a su fácil acceso (Jiménez, 2017). En este contexto la OMS estima que más del 80% de la población mundial emplea plantas medicinales en el marco de los distintos sistemas de salud (OMS, 2018). México no escapa de esta realidad, ya que se estima que más del 90% de sus habitantes utiliza plantas medicinales para el tratamiento de varias enfermedades (Alonso-Castro *et al.*, 2012). Así, de las más de 31000 especies de plantas vasculares de México, más de 3350 forman parte de la flora medicinal (Mata *et al.*, 2019).



De acuerdo con los textos históricos y las investigaciones arqueológicas, las culturas prehispánicas asentadas en Mesoamérica y en el norte de Aridoamérica utilizaban cientos de plantas con fines medicinales; el uso actual de muchas de estas especies constituye el mejor testimonio de su eficacia y valor cultural (Cruz-Pérez, *et al.*, 2021).

En el marco de las consideraciones anteriores, para incorporar a los sistemas de salud oficiales, la medicina tradicional a base de plantas debe cumplir con los requisitos establecidos por la OMS en varios documentos, y es necesario evaluar su calidad, seguridad y eficacia (WHO 1998; WHO 2000).

Para evaluar la eficacia de las plantas medicinales, es fundamental realizar ensayos experimentales preclínicos y clínicos. También es importante conocer los principios activos, así como estudiar los preparados tradicionales y sus constituyentes, considerando que la eficacia se logra con las mezclas de los compuestos presentes en estas preparaciones (Kunle, 2012; Salmerón-Manzano *et al.*, 2020).

El control de calidad de las drogas vegetales y derivados pretende garantizar su identidad (es decir que la planta sea la que debe ser), pureza (ausencia de contaminantes, sustituciones o adulteraciones) y contenido en principios activos y/o marcadores (Cañigueral y Vila, 2005). La OMS ha elaborado monografías de las plantas medicinales de mayor uso a nivel global, que sirven de modelo para la elaboración de monografías similares o farmacopéicas que establezcan la calidad de las plantas. La calidad es un requisito importante sobre la que se sustenta la seguridad y eficacia de las plantas medicinales (Cañigueral y Vila, 2005).

Para establecer la identidad de las plantas se aplican diferentes métodos, que van desde los botánicos hasta los genéticos. Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas, desde la cromatografía en capa delgada (CCD), la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y hasta la cromatografía de gases (CG), que se utiliza en plantas que contienen compuestos volátiles (Gong *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2009; Kharyuk *et al.*, 2018). Aunque uno de los objetivos de estas pruebas es confirmar la presencia de principios activos, es frecuente que no se haya establecido la naturaleza del principio activo. En tales casos, las

pruebas cromatográficas, solamente ayudan a identificar algunos constituyentes designados como marcadores, útiles solo con fines analíticos (Sahoo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2017).

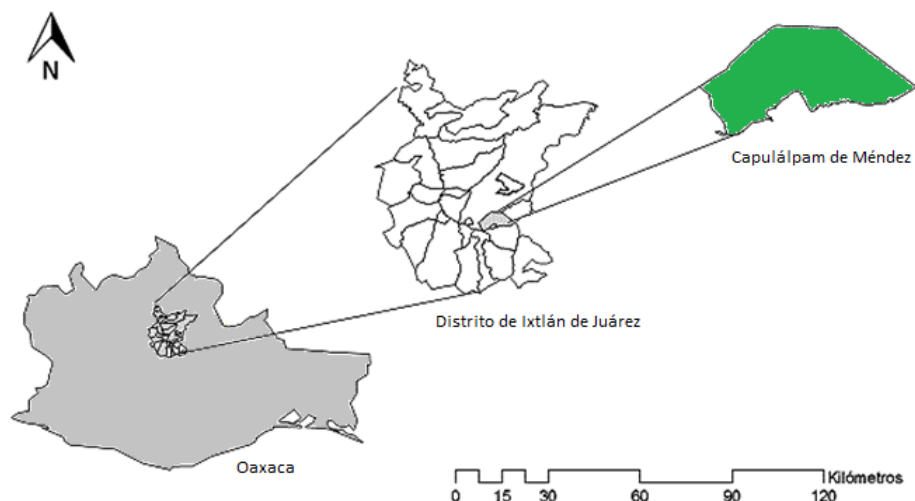
La pureza establece la ausencia de contaminantes (materia extraña), metales pesados, radiactividad, micotoxinas, contaminación microbiológica, pesticidas, y hasta exceso de humedad (WHO, 2007).

Las pruebas de composición o valoración consisten en la cuantificación de los principios activos, si estos son conocidos, o de los marcadores en las drogas crudas y/o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados y cuantificados. Para los análisis de valoración, se utiliza una amplia gama de métodos analíticos como la espectroscopia ultravioleta, cromatografía de líquidos de alta y ultra eficiencia, cromatografía de gases y electroforesis capilar, entre otros (Sahoo *et al.*, 2010).

## **1.2 Generalidades de la comunidad Capulálpam de Méndez**

Capulálpam de Méndez, es una comunidad zapoteca que, con base en documentos históricos, tuvo su origen en el año 1500, su nombre es de origen náhuatl y significa tierra del árbol del capulín (Santiago, 2009). Se localiza en el Distrito de Ixtlán de Juárez en la Sierra Norte del Estado de Oaxaca (Figura 1), a una altitud que va de los 1100 m s.n.m. a los 3200 m s.n.m., cuenta con un territorio aproximado de 3850 hectáreas, donde convergen una variedad de climas que van desde el templado húmedo, hasta el semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano. Con respecto a su vegetación más del 93% de su superficie está compuesta por bosques de pino, encino y mesófilo de montaña; la temperatura en invierno oscila entre los -3 y 18 °C y la media anual entre 12 y 18 °C (RITA, 2018), estas condiciones climatológicas han permitido a sus pobladores tener acceso a una abundante diversidad biológica que está íntimamente relacionada con su diversidad cultural.

La comunidad de Capulálpam de Méndez se rige mediante el sistema de usos y costumbres; la conformación de este sistema de gobierno le ha permitido conservar sus recursos naturales, así como su identidad cultural a través de los años, todas estas características le otorgaron en el 2008 el título de Pueblo Mágico (Centeno y Arriaga, 2010).



**Figura 1.** Ubicación geográfica de Capulálpam de Méndez (Imagen modificada de Ríos-Altamirano *et al.*, 2016).

En el último censo de población realizado en el 2015, Capulálpam de Méndez contaba con 1549 habitantes, de los cuales solo el 56.2% tienen acceso a un servicio de salud, esta cifra es considerablemente mayor a la de años anteriores donde registros del INEGI indican que en el año 1995 únicamente el 20% de la población tenía acceso a servicios de salud (INEGI, 2021). La necesidad de los pobladores de contar con servicios de salud accesibles y el amplio conocimiento ancestral en medicina tradicional, heredado de generación en generación condujo a la formación de la Organización de Médicos Indígenas Zapotecos de la Sierra de Juárez, conformada por 45 médicos tradicionales pertenecientes a la comunidad de Capulálpam de Méndez y comunidades aledañas, esta organización gestionó la creación del Centro de Medicina Indígena Tradicional (CMIT).

El CMIT (Figura 2), fue creado en 1995 con el apoyo de la autoridad municipal. Actualmente laboran en este centro 10 médicos tradicionales que comparten su experiencia ancestral a través de “limpias”, masajes o reconfortantes baños de temazcal y ofrecen medicamentos (Figura 3) a base de plantas elaborados por ellos mismos (SAGARPA, 2009). Son varias las especies utilizadas en ese centro para tratar afecciones acompañadas con fiebre y dolor. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios químicos o farmacológicos conducentes a establecer la eficacia, seguridad e inocuidad de estas plantas. Dada la importancia que el CMIT ha adquirido en la procuración de salud de la zona, es de gran

importancia la validación científica de las propiedades de las plantas más utilizadas. De las especies con mayor demanda en la región se encuentran *Cestrum dumetorum* Schltl. (Solanaceae) y *Baccharis heterophylla* Kunth (Asteraceae), conocidas popularmente como “potonxihuite” y “chamizo de barrer”, respectivamente.



**Figura 2.** Instalaciones del Centro de Medicina Indígena Tradicional. Erika Castillejos, 2018.



**Figura 3.** Farmacia del Centro de Medicina Indígena Tradicional. Erika Castillejos, 2018.

### 1.3 Generalidades del género *Cestrum*

#### 1.3.1 Taxonomía y distribución

El género *Cestrum* fue descrito por primera vez por Carlos Linneo en 1753 y publicado en su obra *Species Plantarum*. En esta obra se describe la taxonomía de las

especies, *C. nocturnum* L. y *C. diurnum* L. Es el segundo género más grande de la familia Solanaceae, con alrededor de 158 especies distribuidas, desde el sur de Estados Unidos hasta Chile, principalmente en regiones cálidas y subtropicales (Monro, 2012; Ribeiro *et al.*, 2016). En México existen 42 especies del género *Cestrum* (18 de ellas son endémicas) distribuidas en los estados de Chiapas, Oaxaca, Campeche, Colima, Michoacán, Guerrero, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Quintana Roo, Nayarit y Jalisco (Martínez *et al.*, 2017).

### 1.3.2 Usos tradicionales y farmacología

Algunas especies de este género se destacan por su uso ornamental y aplicaciones en la medicina tradicional de varias regiones del mundo. En Chile, por ejemplo, *C. parqui* L'Hér se utiliza para el tratamiento de la fiebre y afecciones de la piel como alergias, herpes e impétigo (Backhouse *et al.*, 1996). En Perú *C. auriculatum* L'Hér se utiliza en el tratamiento de heridas y ectoparásitos (De la Cruz *et al.*, 2007). En China, a pesar de no ser una planta original de la región, las hojas de *C. nocturnum* se utilizan en el tratamiento de quemaduras e inflamaciones, aplicadas localmente. En Camerún *C. nocturnum* es un repelente de insectos, principalmente del mosquito anófeles, vector del paludismo (Mimaki *et al.*, 2001; Mimaki *et al.*, 2006). En Colombia *C. parvifolium* Willd. es útil para afecciones en la piel, úlceras y como febrífugo (Moreno-Murillo, 2001). *Cestrum laevigatum* Schltld., en Guinea, tiene reputación como febrífugo y antipalúdico (de Madureira *et al.*, 2002). Los curanderos mayas Q'eqchi' emplean *C. schlechtendahlia* G. Don en el tratamiento del pie de atleta y aftas (Ta *et al.*, 2016).

El género *Cestrum* tiene diversas aplicaciones en la medicina tradicional, por tal motivo, sus especies han sido objeto de diversos estudios farmacológicos, que han demostrado su potencial antiinflamatorio, antipirético, antimicrobiano, antioxidante, citotóxico y antipalúdico (Begum, 2007).

Las propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias del género han sido ampliamente descritas en varias especies. Shehnaz y colaboradores (1999) reportaron el efecto antiinflamatorio a una dosis de 3 g/kg de un extracto metanol-H<sub>2</sub>O (1:1) de las partes aéreas de *C. parqui* en el modelo de edema inducido por carragenina, en ratones. *Cestrum*

*auriculatum* mostró actividad antiinflamatoria y espasmolítica en un modelo de contracciones inducidas por prostaglandinas E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> y acetilcolina utilizando íleon de cobayo (Kawano *et al.*, 2009). El efecto antiinflamatorio y analgésico de un extracto metanólico de las partes aéreas de *C. nocturnum* se estableció en los modelos de edema inducido por carragenina y placa caliente, respectivamente; los efectos fueron dosis-dependientes y atribuidos a los parquinósidos A y B (Avijit *et al.*, 2010). El extracto metanólico de *C. diurnum* también mostró una inhibición del 50% de inflamación en el modelo de edema de pata inducido por carragenina a las dosis 150 y 300 mg/kg, además se demostró un efecto antinociceptivo en ambas fases del modelo de formalina a las mismas dosis, adicionalmente se evaluó la actividad inhibitoria del Factor Nuclear kappa B (NF-κB) mediante un ensayo de activación de NF-κB inducido por TNF-α en células de macrófagos RAW 264.7 a una concentración de 100 µg/mL (Khatun *et al.*, 2020).

Varias especies del género como *C. schlechtdahlii* y *C. levignatum* demostraron actividad antifúngica contra varios hongos patógenos (Ta *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016); los principios activos fueron las saponinas esteroidales presentes. *Cestrum auriculatum*, *C. nocturnum*, *C. aurentiacum* L. y *C. diurnum* presentaron actividad antibacteriana contra una batería de microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Rojas *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2011; Bhattacharjee *et al.*, 2005; Sivaraj *et al.*, 2015).

Los extractos y las saponinas esteroidales aisladas de las especies *C. laevigatum*, *C. sendtenerianum* y *C. nocturnum* resultaron citotóxicos contra las líneas celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana), SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de colon humano) y OVCAR-8 (carcinoma de ovario) (Ribeiro *et al.*, 2016; Baqai *et al.*, 2001; Haraguchi *et al.*, 2000). Por otro lado, el parquispirósido aislado de *C. parqui* inhibió el crecimiento de las células derivadas de varios tumores humanos [Hela (cáncer cervicouterino), HepG2 (carcinoma hepatocelular), U87 (glioblastoma) y MCF7 (cáncer de mamá)] (Mosad *et al.*, 2017). Finalmente, el extracto de acetato de etilo de *C. elegans* (Brongn.) Schltdl. mostró citotoxicidad en células Vero (Nasr *et al.*, 2018).

### 1.3.3 Fitoquímica del género *Cestrum*

Algunas especies selectas del género han sido estudiadas con la finalidad de identificar sus metabolitos característicos. El primer estudio fitoquímico del género lo realizó Peckolt en 1909 y estudios posteriores de otras especies de *Cestrum* permitieron establecer que los productos característicos de este género son principalmente saponinas esteroidales, lignanos, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos.

#### 1.3.3.1 Saponinas

Las saponinas son glucósidos de esteroides o triterpenoides que poseen poder afrógeno. En el género *Cestrum* está bien documentada la presencia de saponinas esteroidales, sus agliconas (sapogeninas) generalmente son de tipo colestano, furostano, furoespirostando y espirostando; las más comunes son las de tipo espirostando que contienen una cadena de azúcares en la posición C-3 y un acetal espiro-biciclo en la posición C-22. Los derivados de furostando generalmente presentan un hemiacetal o un acetal en C-22 o una insaturación (25,27), además de un enlace glucosídico en C-26. En ambos esqueletos, C-25 puede presentar una configuración *R* o *S*, y en algunos casos se encuentran como mezclas inseparables. Los furostandos son conocidos como precursores biogénicos de espirostandos (Ribeiro *et al.*, 2016). El interés de diversos investigadores en estos compuestos radica en su diversidad estructural y actividades biológicas.

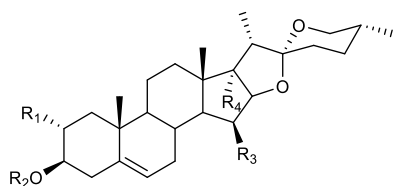
Una de las especies más estudiada del género y de la cual se han reportado la mayor cantidad de saponinas es *Cestrum nocturnum*. A partir de extractos metanólicos de las hojas de *C. nocturnum* se logró el aislamiento de saponinas de tipo espirostando como los nocturnosidos A (**1**) y B (**2**) (Ahmad *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 1995) y otros siete compuestos del mismo tipo (**3-9**). También se ha reportado la presencia en esta planta de una saponina de tipo furostando (25*R*)-26-[( $\beta$ -D glucopiranosil)oxi]-2 $\alpha$ -hidroxi-22 $\alpha$ -metoxifurost-5-en-3 $\beta$ -il-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosido (**10**), otra de naturaleza pseudofurostando (25*R*)-26-[( $\beta$ -D glucopiranosil)oxi]-2 $\alpha$ -hidroxifurosta-5,20(22)-dien-3 $\beta$ -il-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-

(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosido (**11**), glucósidos de pregnano como el 3β-[(O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-galactopiranosil)-oxi]-16-β-[[[(4R)-5-(β-D-glucopiranosil oxi)-4-metil-1-oxopentil] oxi]-2α-hidroxipregn-5-en-20-ona (**12**), y el 3β-[(O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-galactopiranosil)-oxi]-2α-hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**13**) y un glicósido esteroidal 3β-[(β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-xilopiranosil)-oxi]-2α,16β-dihidroxipregn-5-ene-20-ácido carboxílico γ-lactona (**14**), así como glicósidos de colestano como (25R)-3β-[(O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-galactopiranosil)-oxi]-26-[(β-D-glucopiranosil)-oxi]-2α-hidroxicolesta-5,17-diene-16,22-diona (**15**) y (25R)-3β-[(O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-galactopiranosil)oxi]-26-[(β-D-glucopiranosil)-oxi]-2α-hidroxicolesta-5,17-diene-16,22-diona (**16**) (Mimaki *et al.*, 2001; Mimaki *et al.*, 2002).

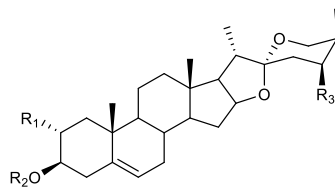
*Cestrum parqui* es otra de las especies que ha sido estudiada ampliamente desde el punto de vista fitoquímico. Sus principales componentes son los parquisósidos A (**17**) y B (**18**) (Baqai *et al.*, 2001), el parquispirósido (**19**), el parquifurósido (**20**) y el capsicósido D (**21**), todos obtenidos de un extracto metanólico de las partes aéreas (Mosad *et al.*, 2017). Chakravarti y colaboradores (1964) estudiaron por primera vez *C. diurnum* y reportaron el aislamiento de tigonina (**22**), y años más adelante se reportaron en la misma especie el diurnosido (**23**) y las cesdiurinas I (**24**), II (**25**) y III (**26**) (Ahmad *et al.*, 1993; Fouad *et al.*, 2008). Ribero y colaboradores (2016) aislaron a partir de un extracto etanólico de los tallos de *C. laevigatum* la diosgenina 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosido (**27**), nueve saponinas de tipo espirostano (**28-36**) y cuatro de tipo furostano (**37-40**). De *C. sendtenerianum* se reportaron seis saponinas esteroidales **41-46** (Haraguchi *et al.*, 1999; Haraguchi *et al.*, 2000). A partir de un extracto etanólico de las hojas de *C. schlechtendahl* se aislaron y caracterizaron dos saponinas (**45** y **47**) de tipo espirostanol (Ta *et al.*, 2016). También se ha reportado la presencia de las sapogeninas



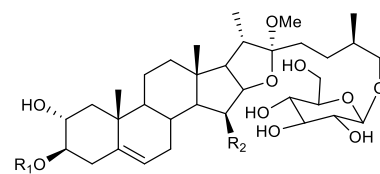
gitogenina (**48**) y tigogenina (**49**) en las especies *C. diurnum*, *C. nocturnum*, *C. parqui*, *C. laevigatum* y *C. elegans* (Begum, 2007).



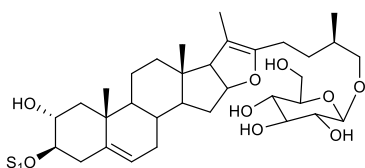
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
<b>1</b>	OH	S <sub>1</sub>	H	H
<b>2</b>	H	S <sub>2</sub>	H	H
<b>3</b>	OH	S <sub>3</sub>	H	H
<b>4</b>	OH	S <sub>3</sub>	H	OH
<b>5</b>	OH	S <sub>1</sub>	OH	H
<b>6</b>	OH	S <sub>1</sub>	H	OH
<b>7</b>	H	S <sub>4</sub>	H	H
<b>8</b>	OH	S <sub>4</sub>	H	H
<b>27</b>	H	S <sub>9</sub>	H	H



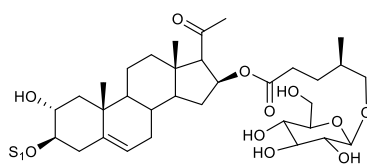
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>9</b>	OH	S <sub>1</sub>	β-D-Glucosa
<b>17</b>	H	S <sub>5</sub>	OH
<b>18</b>	H	S <sub>6</sub>	OH



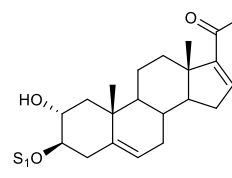
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>10</b>	S <sub>1</sub>	H
<b>25</b>	S <sub>8</sub>	H
<b>26</b>	S <sub>8</sub>	OH



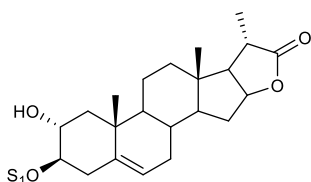
**11**



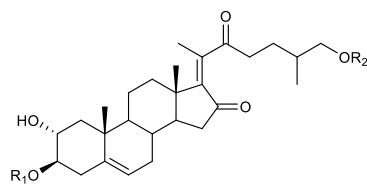
**12**



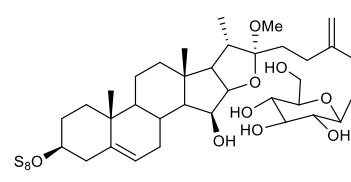
**13**



**14**

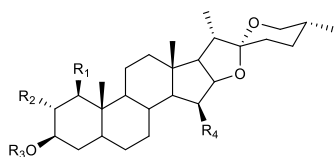


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>15</b>	S <sub>1</sub>	β-D-Glucosa
<b>16</b>	S <sub>3</sub>	β-D-Glucosa

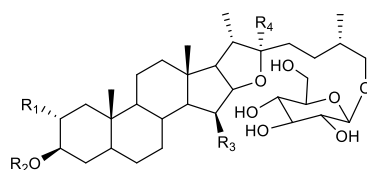


**24**

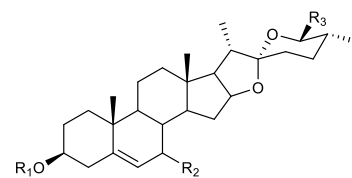
ANTECEDENTES



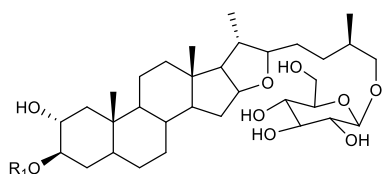
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
<b>19</b>	H	H	S <sub>1</sub>	OH
<b>22</b>	H	H	S <sub>7</sub>	H
<b>23</b>	H	H	S <sub>1</sub>	H
<b>31</b>	H	OH	S <sub>10</sub>	H
<b>32</b>	H	OH	S <sub>11</sub>	H
<b>33</b>	H	OH	β-D-Galactosa	H
<b>45</b>	OH	OH	S <sub>13</sub>	H
<b>47</b>	OH	OH	β-D-Galactosa	H



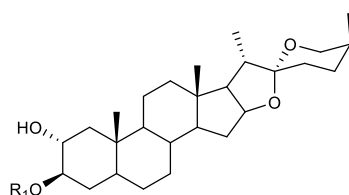
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
<b>20</b>	H	S <sub>1</sub>	OH	OH
<b>21</b>	H	S <sub>1</sub>	H	OH
<b>39</b>	OH	β-D-Galactosa	H	H
<b>40</b>	OH	S <sub>12</sub>	H	H



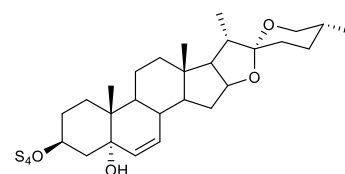
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>28</b>	S <sub>4</sub>	H	OH
<b>30</b>	S <sub>4</sub>	O	H



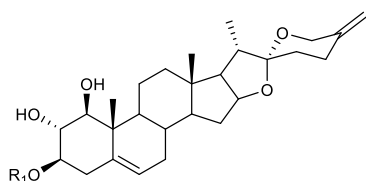
	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>37</b>	β-D-Galactosa
<b>38</b>	S <sub>12</sub>



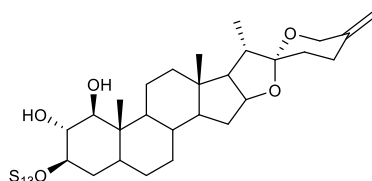
	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>34</b>	S <sub>10</sub>
<b>35</b>	S <sub>11</sub>
<b>36</b>	β-D-Galactosa



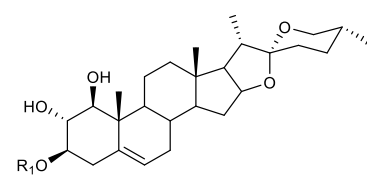
**29**



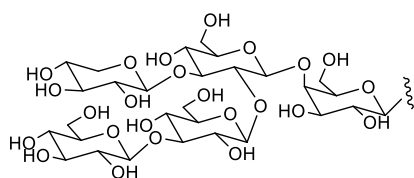
	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>41</b>	S <sub>13</sub>
<b>42</b>	S <sub>14</sub>
<b>46</b>	β-D-Galactosa



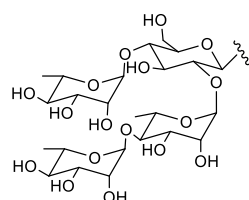
**43**



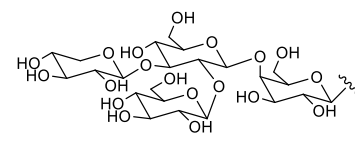
	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>44</b>	S <sub>13</sub>



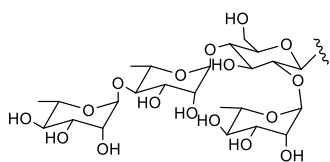
**S<sub>1</sub>**



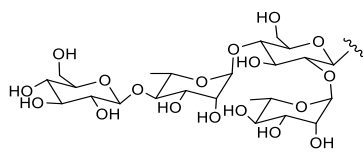
**S<sub>2</sub>**



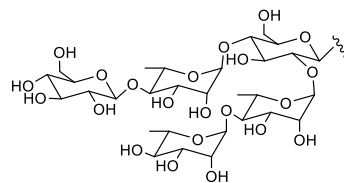
**S<sub>3</sub>**



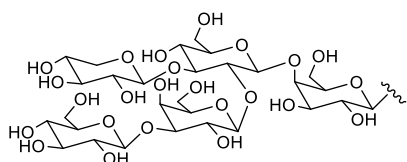
S4



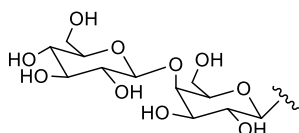
S5



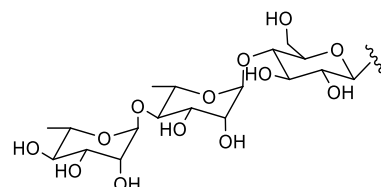
S6



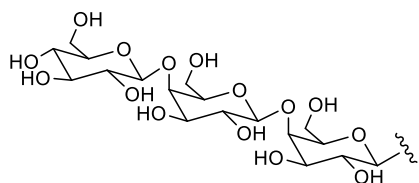
S7



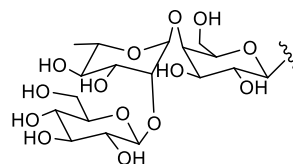
S8



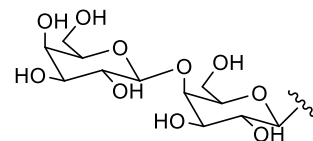
S9



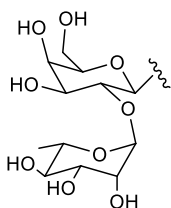
S10



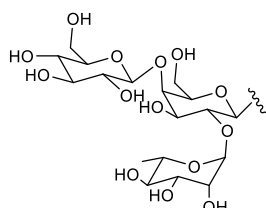
S11



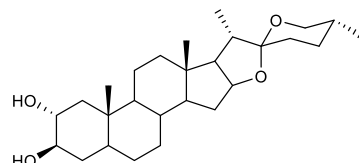
S12



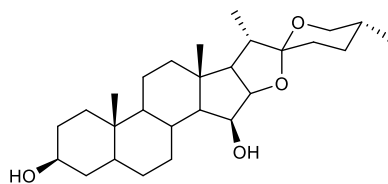
S13



S14



48

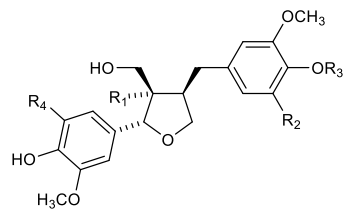
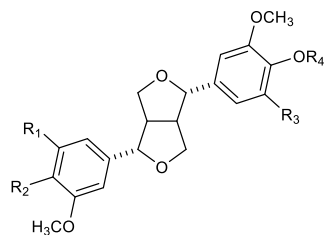


49

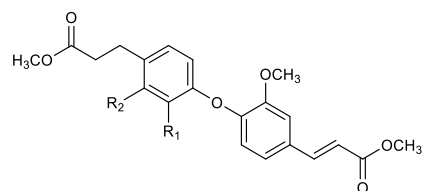
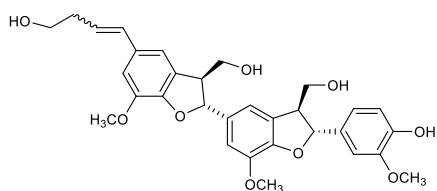
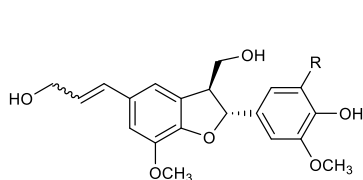
### 1.3.3.2 Lignanos

La presencia de lignanos únicamente se ha descrito en las especies *C. parqui* y *C. diurnum*. A partir de un extracto hidroalcohólico de las hojas de *C. parqui* se aislaron cuatro diepoxilignanos (**50-53**), cuatro epoxilignanos (**54-57**), tres neolignanos (**58-60**), cinco

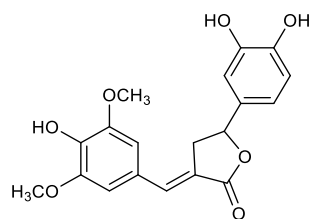
sesquilignanicos (**61**, **62** y **65-67**), un oxileonignano **63** y el norlignanico **64** (Fiorentino *et al.*, 2007). De un extracto metanólico de las partes aéreas de *C. diurnum* se aislaron el cestrumosido **68** y el compuesto **69** (Mohamed *et al.*, 2007).



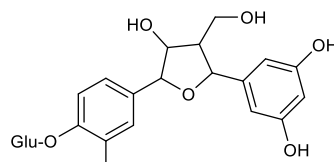
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>50</b>	H	OH	H	H	<b>54</b>	H	H	H	H
<b>51</b>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	<b>55</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
<b>52</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	<b>56</b>	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
<b>53</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -β-D-Glucosa	<b>57</b>	OH	H	H	H
<b>69</b>	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -β-D-Glucosa	OCH <sub>3</sub>	<i>O</i> -β-D-Glucosa					



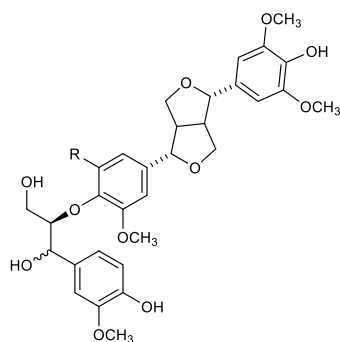
		R <sub>1</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>58</b>	<i>Cis</i>	H	<b>61</b>	<i>Cis</i>	
<b>59</b>	<i>Trans</i>	H	<b>62</b>	<i>Trans</i>	
<b>60</b>	<i>Trans</i>	OCH <sub>3</sub>			<b>63</b>
					R <sub>1</sub>
					R <sub>2</sub>



**64**



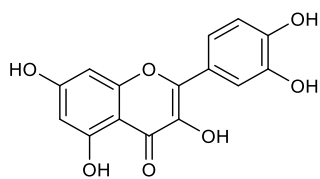
**68**



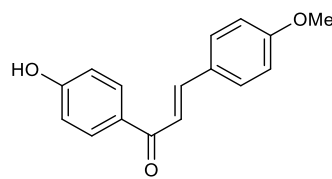
		<b>R</b>
<b>65</b>	<i>Treo</i>	H
<b>66</b>	<i>Eritro</i>	H
<b>67</b>	<i>Eritro</i>	OCH <sub>3</sub>

### 1.3.3.3 Flavonoides

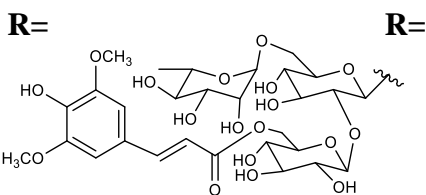
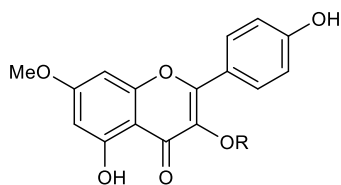
De un extracto acuoso de las hojas de *C. parqui* se aisló la quercetina (**70**) y la 4'-hidroxi-4-metoxichalcona (**71**) (D'Abrosca *et al.*, 2004). Por otro lado, el estudio fitoquímico de un extracto metanólico de las hojas de *C. nocturnum* resultó en el aislamiento de dos glicósidos de flavonoides, el 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavonol 3-*O*-[6-*O*-(*E*)-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinnamoil- $\beta$ -D-glucopiranosil]-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosido (**72**) y el 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavonol 3-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosido (**73**) (Mimaki *et al.*, 2001).



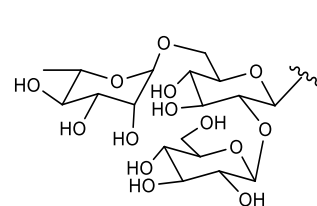
**70**



**71**



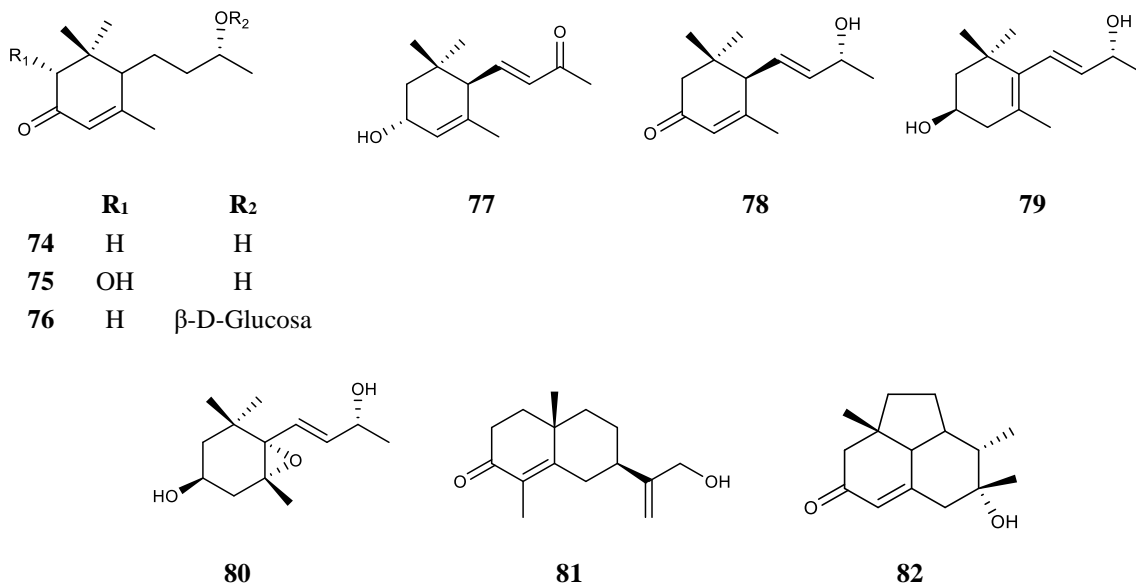
**72**



**73**

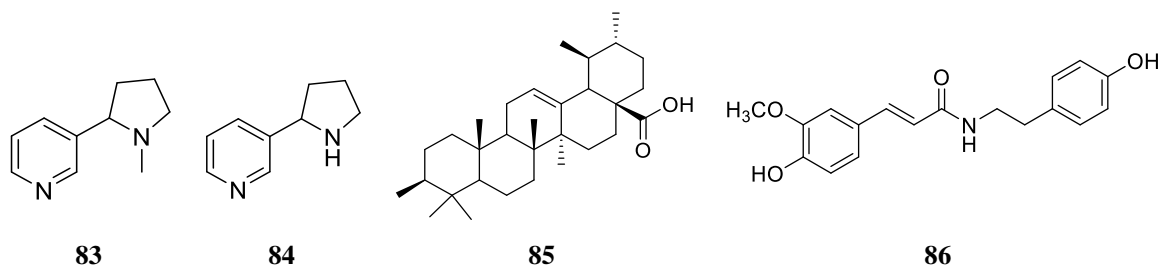
### 1.3.3.4 Terpenoides

*Cestrum parqui* contiene más de 50 *nor*-isoprenoides C<sub>13</sub> derivados de la degradación de carotenoides, a continuación, se muestran algunos ejemplos de ellos (**74-80**), además algunos sesquiterpenoides (**81-82**) (D'Abrosca *et al.*, 2004; D'Abrosca *et al.*, 2005).



### 1.3.3.5 Otros compuestos

Otros metabolitos especializados se han encontrado en diferentes especies del género como los alcaloides nicotina (**83**) y nornicotina (**84**) en *C. dirunum* y *C. nocturnum*. El ácido ursólico (**85**) en *C. diurnum*, *C. kunthii* Francey y *C. parqui*. En *C. lanatum* se encontró el N-trans-feruloiltiramina (**86**) (Begun, 2007).



### 1.3.4 Generalidades de la especie *Cestrum dumetorum*

*Cestrum dumetorum* Schltl. (Solanaceae) [Sinonimias: *C. honduro-nicaraguense* C. Nelson; *C. laxiflorum* Francey; *C. semivestitum* Dunal] es un árbol o arbusto hasta de 6 m de altura, sus hojas son elípticas o angostamente ovadas aproximadamente de 16 cm de largo, acuminadas y ambas superficies suavemente tomentosas (Figura 4). Las inflorescencias se encuentran en forma de panículas laxas, los frutos son negros y aproximadamente de 1 cm de longitud (Figura 5). Esta especie se distribuye ampliamente desde México hasta Panamá (Figura 6) (Trópicos, 2021).



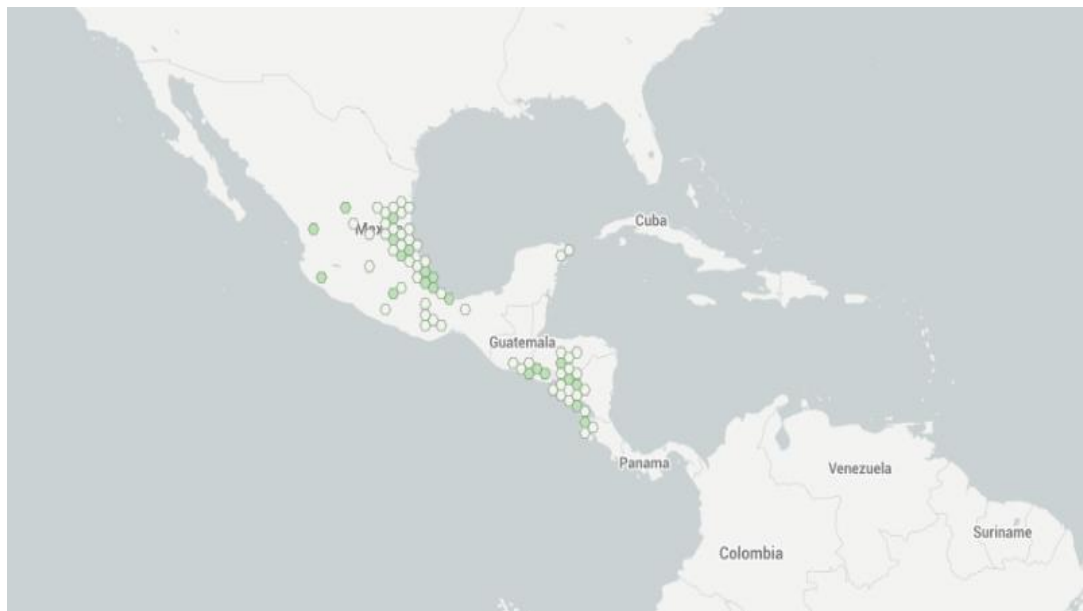
**Figura 4.** Arbusto de *Cestrum dumetorum*. Oaxaca, Erika Castillejos, 2017.



**Figura 5.** Hojas y frutos de *Cestrum dumetorum*. Oaxaca, Erika Castillejos, 2017.

Popularmente se le conoce como potonxihuite (Oaxaca), galán, huela de día (Nuevo León), palo hediondo (Tamaulipas, El Salvador), chacuaco, hediondilla, tepozáan (Veracruz), huela de noche (Veracruz, El Salvador), tiscuite, y hediondo (El Salvador). Aunado a los usos tradicionales que se le da a esta especie en el CMIT en otras regiones de Oaxaca de acuerdo con lo descrito por Pliego (2011) y Cervantes (1990) se utiliza para tratar dolores de cabeza, baños después del parto y como febrífugo; para ello la planta se combina con chaca (*Bursera simaruba* L.), cordoncillo (*Piper amalago* L.), muicle (*Justicia spicigera* Schltdl.) y piochi (*Melia azedarach* L.). En Morelos la hoja de la planta se usa en caso de inflamación bajo la forma de cocimiento o en cataplasmas (Monrroy-Ortiz, 2007) y para tratar el derrame de bilis, afecciones cutáneas (heridas, granos, cáncer), gangrena y erisipela. La savia es cicatrizante. En la Huasteca Potosina las hojas se usan para limpias (Argueta *et al.*, 1994). La decocción de la planta es utilizada en Tamaulipas como remedio para las enfermedades cutáneas (Standley, 1920). Desde el punto de vista químico y farmacológico esta especie no ha sido objeto de estudio alguno.





**Figura 6.** Distribución de la especie *Cestrum dumetorum* desde 1829 hasta el 2019. Imagen modificada de Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2021).

## 1.4 Antecedentes del género *Baccharis*

### 1.4.1 Taxonomía y distribución

El género *Baccharis* (Asteraceae) fue descrito en 1753 por Carlos Linneo en su obra *Species Plantarum*; incluye alrededor de 400 a 500 especies (Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008), distribuidas principalmente en regiones tropicales del continente americano, desde el sur de Estados Unidos hasta Chile y Argentina. Treinta y ocho de las especies de este género son endémicas de México (Martínez *et al.*, 2005).

En general, las especies de *Baccharis* son arbustos, de 0.5 a 4.0 m de altura, aunque algunas son perennes herbáceas y subarbustos (Jasinski *et al.*, 2014). La mayoría de las plantas de *Baccharis* se pueden distinguir por su hoja o tallo alado (Freire *et al.*, 2007). Muchas de las especies de este género son medicinales, ornamentales o materia prima para la elaboración de aceites esenciales (Ramos-Campos *et al.*, 2016). Las especies medicinales se emplean bajo la forma de infusiones, decocciones y cataplasmas para tratar varios padecimientos incluyendo los inflamatorios, dolores varios, reuma, diabetes y males

urinarios, entre otros (Ramos-Campos *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017; Minteguiaga *et al.*, 2018).

#### 1.4.2 Farmacología del género *Baccharis*

Muchas especies del género *Baccharis* se han analizado desde el punto de vista farmacológico. Las propiedades investigadas incluyen: antimicrobiana (Morales *et al.*, 2008; Timbe *et al.*, 2021; Parreira *et al.*, 2010), antioxidante (De Oliveira *et al.*, 2004; Ascari *et al.*, 2019; Tapia *et al.*, 2004) citotóxica (Búfalo *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2019; Bonin *et al.*, 2020; Jaramillo-García *et al.*, 2018), antinociceptiva (Funes *et al.*, 2018; dos Santos *et al.*, 2010; de Almeida *et al.*, 2021) y antiinflamatoria (Gómez *et al.*, 2019). Sin embargo, las más estudiadas son la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva utilizando diferentes modelos. En los párrafos siguientes se mencionan ejemplos de estos estudios.

La fracción butanólica derivada del extracto acuoso de las partes aéreas de *B. trimera* (Less.) DC., a las dosis de 40 a 100 mg/kg inhibió significativamente la inflamación inducida por carragenina o dextrano en ratas, con valores del 70.4 al 90.8% y del 25.7 al 71.3%, respectivamente. Además, esta fracción a la dosis de 100 mg/kg, inhibió en un 95.1% las constricciones abdominales inducidas por ácido acético en rata (Gene *et al.*, 1996).

Cifuentes y colaboradores (2001) evaluaron la actividad antiinflamatoria de distintos extractos orgánicos de las partes aéreas de *B. medullosa* DC. y *B. rufescens* Spreng. en el modelo de edema en pata de rata inducido por carragenina; los autores sólo evaluaron la dosis de 80 mg/kg, encontrando la mayor actividad a las 5 horas después de la administración de los extractos. Los preparados más activos fueron los extractos de hexano de *B. medullosa*, y los extractos de acetona y cloroformo de *B. rufescens*.

El potencial antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *B. dracunculifolia* DC. fue evaluado en ratones, a las dosis de 50-400 mg/kg, vía intragástrica (*p.o.*), el cual provocó una disminución de las contracciones abdominales inducidas por ácido acético y de la inflamación inducida por carragenina e histamina en un modelo de edema en pata de rata (dos Santos *et al.*, 2010).

Boller y colaboradores (2010) investigaron un extracto obtenido de las hojas de *B. illinita* DC. en distintos modelos animales de inflamación cutánea, incluyendo los de edema auricular inducido por acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), ácido araquidónico (AA) o capsaicina. La aplicación tópica del extracto (0.03-1 mg/oreja) inhibió de forma dosis-dependiente el edema auricular inducido por TPA de manera similar a la dexametasona; así mismo, la dosis de 1 mg/oreja redujo el edema inducido por AA, sugiriendo la presencia de metabolitos inhibidores de la síntesis de AA. El extracto no afectó la formación del edema auricular inducido por capsaicina.

Los aceites esenciales de algunas especies del género han recibido gran atención por sus efectos antiinflamatorios, como el aceite esencial de *B. punctulata* DC. cuya actividad antiinflamatoria fue evaluada en un modelo de edema auricular inducido por TPA. La aplicación tópica del aceite esencial logró una disminución significativa del edema; el efecto farmacológico fue atribuido a los constituyentes de la esencia (Ascari *et al.*, 2019).

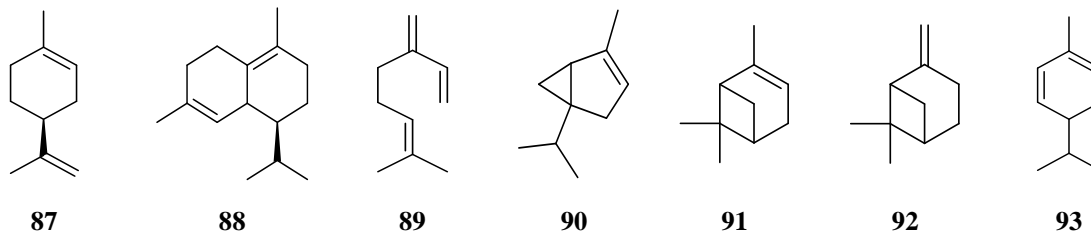
### **1.4.3 Antecedentes fitoquímicos del género *Baccharis***

Las investigaciones fitoquímicas de este género han demostrado que los principales constituyentes son de naturaleza terpenoide, particularmente diterpenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Abad *et al.*, 2007; Ramos-Campos *et al.*, 2016). Las esencias contienen principalmente compuestos volátiles de tipo mono y sesquiterpenoides (Ramos-Campos *et al.*, 2016).

#### **1.4.3.1 Compuestos volátiles**

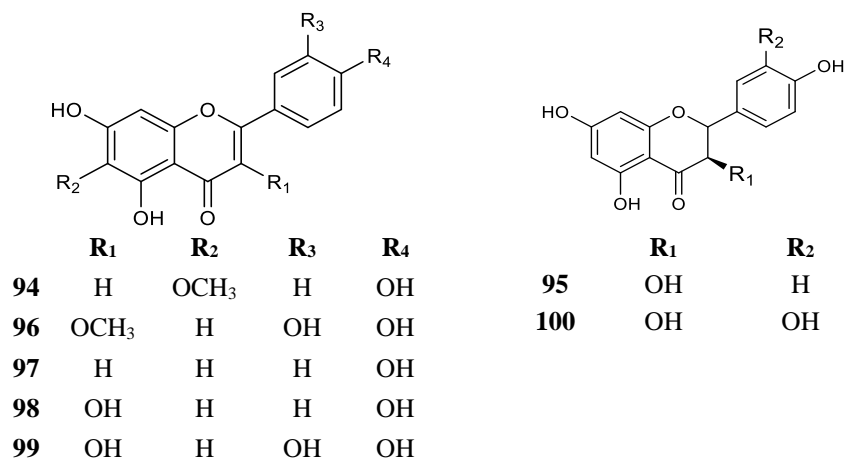
Una de las características notables del género *Baccharis* es la abundancia de aceite esencial en las partes aéreas de sus especies, esto ha permitido que el aceite esencial de especies selectas sea utilizado en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica; en esta última se emplean como medicamentos o coadyuvantes para promover la absorción de medicamentos aumentando la penetración en la epidermis (Florão *et al.*, 2012). En *B. racemosa* (Ruiz & Pav.) DC., *B. linearis* (Ruiz & Pav.) Pers. y *B. obovata* Hook. & Arn se han identificado limoneno (**87**),  $\delta$ -cadineno (**88**) y mirceno (**89**) como compuestos

mayoritarios (Molares *et al.*, 2009); en *B. salicifolia* los compuestos  $\alpha$ -tujeno (**90**),  $\alpha$ -pineno (**91**),  $\beta$ -pineno (**92**) y  $\alpha$ -felandreno (**93**) son los mayoritarios (Malizia *et al.*, 2005a; Malizia *et al.*, 2005b).



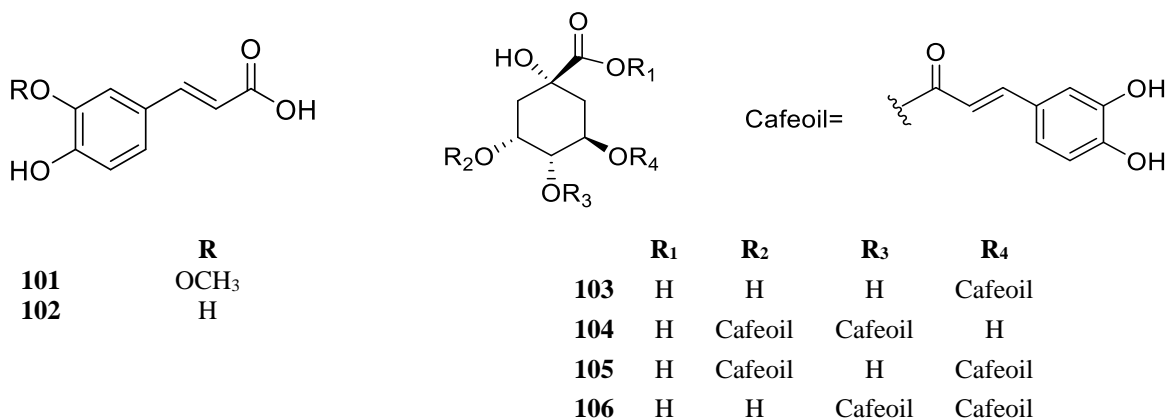
### 1.4.3.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos frecuentemente aislados en el género *Baccharis*, principalmente aquellos de tipo flavona, flavanona y flavonol, hasta el momento se han descrito más de 57 flavonoides en el género. A continuación, se mencionan algunos ejemplos de los que han sido reportados con mayor frecuencia. A partir de un extracto metanólico de *B. pseudotenuifolia* se aislaron los flavonoides hispidulina (**94**), aromadendrina (**95**), 3'-metoxiluteolina (**96**), apigenina (**97**), kaempferol (**98**) y quercetina (**99**). Los flavonoides **94** y **96** también fueron aislados de *B. ligustrina* (Moreira *et al.*, 2003). En *B. trimera* y *B. illinita* en cambio destacó la presencia de **97**, **99** y taxifolina (**100**) entre otros (Verdi *et al.*, 2004).



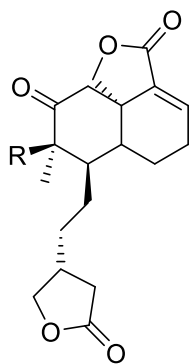
### 1.4.3.3 Compuestos fenólicos

*Baccharis dracunculifolia* tiene la proporción más alta de compuestos fenólicos en las especies analizadas a la fecha, seguida de *B. grisebachii*, *B. trimera* y *B. retusaa*. Muchos de estos compuestos son derivados del ácido cinámico, como los ácidos ferúlico (**101**) y caféico (**102**), presentes en *B. dracunculifolia* y *B. uncinella*. También se han aislado derivados del ácido clorogénico (**103**), incluyendo los ácidos 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**104**), 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**) y 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**106**), aislados a partir de *B. retusaa*, *B. trimera* y *B. incarum* (Abad *et al.*, 2007; Ramos-Campos *et al.*, 2016).



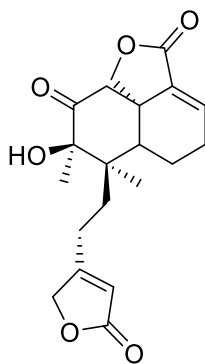
### 1.4.3.4 Diterpenoides

Los diterpenoides del género *Baccharis* pertenecen principalmente a las categorías de los neo-clerodanos y labdanos. Dentro de la primera clase se encuentran metabolitos como gaudichanolida A (**107**), gaudichanolida B (**108**) y bacchariol (**109**), aislados de *B. dracunculifolia* (Hayashi *et al.*, 2005) y platipodiol (**110**), aislado de *B. platypoda*. Dentro del segundo grupo se encuentran el ácido bacchabolivico (**111**) y el (13*E*)-15-2β-dihidroxi-labda-7,13-dieno (**112**) obtenidos de *B. grisebachii* (Ramos-Campos *et al.*, 2016).

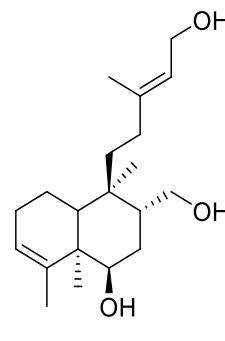


107  
108

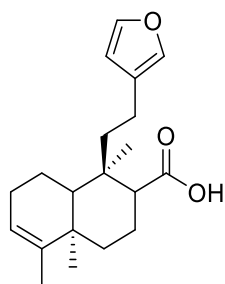
R  
OH  
H



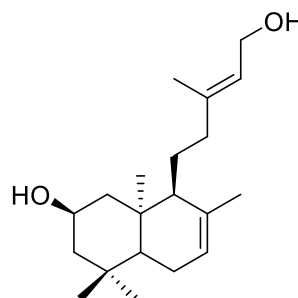
109



110



111



112

#### 1.4.4 Generalidades de la especie *Baccharis heterophylla*

*Baccharis heterophylla* Kunth (Asteraceae) [sinonimias (*Baccharis cuneata* DC, *Baccharis spathulata* S. Schauer)] fue identificada y descrita por Kunth en su obra *Nova Genera et Species Plantarum* (1818). Es un árbol o arbusto de 1 a 4 metros de altura (Figura 7), densamente ramificado, las ramas son estriadas y frondosas, sus hojas son sésiles, subsésiles o muy cortas-pediceladas, de 2 a 5 cm de largo y de 0.5 a 2 cm de ancho, redondeadas a obtusas en el ápice, o algunas veces subaguda, lustrosas, atenuadas en la base, los márgenes con dientes gruesos e irregulares hacia el ápice flores estaminadas, de unos 3 mm de largo (Figura 8). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en México, desde Chihuahua hasta Chiapas, Yucatán y Quintana Roo (Figura 9) (Villaseñor, 2016).



**Figura 7.** Arbusto de *Baccharis heterophylla*. Oaxaca, México. Erika Castillejos 2018.



**Figura 8.** Flores y hojas de *Baccharis heterophylla*. Oaxaca, México. Erika Castillejos 2018.

Popularmente *B. heterophylla* se conoce como chamizo de barrer, chamizo de cerro, macuracuata, jarakatua, y hierba de la mula. En Querétaro la planta se emplea para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales bajo la forma de decocciones e infusiones (Rojas *et al.*, 1995, Abad, 2007, Prada, 2016). En Oaxaca la decocción se emplea en el tratamiento de la inflamación y fiebre (Arrazola-Guendulay, 2018) y en Michoacán para tratar enfermedades del aparato digestivo y urinario (Bello-González *et al.*, 2015). También es

utilizada comúnmente para la fabricación de escobas (Padilla Gómez, 2007; Arrazola-Guendulay, 2018).



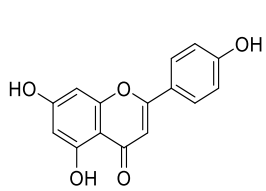
**Figura 9.** Distribución de la especie *Baccharis heterophylla* desde 1829 hasta el 2019. Imagen modificada de Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2021).

Con respecto a los estudios farmacológicos, el extracto orgánico  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (1:1) de *B. heterophylla* demostró un efecto espasmolítico en el modelo de íleon aislado de rata y activó los canales de cloro dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en oocitos de *Xenopus laevis* (Rojas *et al.*, 1999, Rojas *et al.*, 2003).

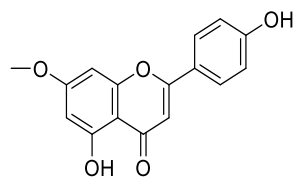
Los estudios químicos y farmacológicos sobre *B. heterophylla* son escasos, de tal manera que el análisis del exudado de *B. heterophylla* permitió la caracterización de los flavonoides apigenina (**97**), genkwanina (**113**) y narigenina (**114**) (Wollenweber *et al.*, 1986); dos triterpenoides, el ácido oleanólico (**115**) y maniladiol (**116**) (Wollenweber *et al.*, 1986; Arriaga-Giner *et al.*, 1986), así como del germacreno D (**117**),  $\beta$ -cariofileno (**118**), óxido de cariofileno (**119**), 4  $\alpha$ -hidroxigermacra-1(10*E*,5*E*)-dieno (**120**), espatulenol (**121**), fitol (**122**) y dos diterpenoides de tipo clerodano (**123** y **124**) (Jakupovic *et al.*, 1990).



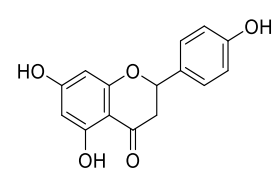
ANTECEDENTES



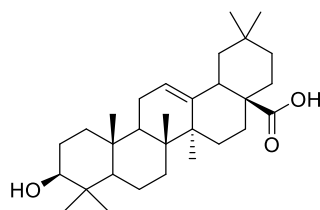
97



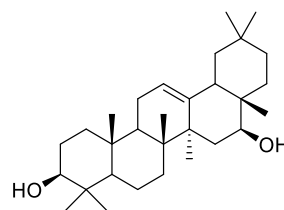
113



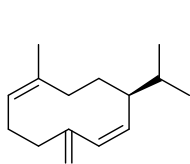
114



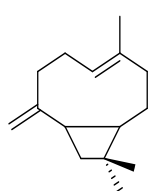
115



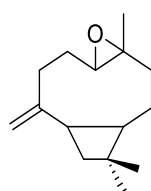
116



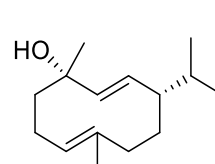
117



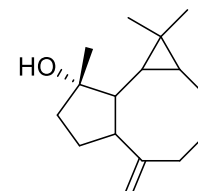
118



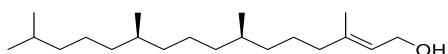
119



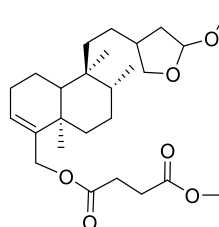
120



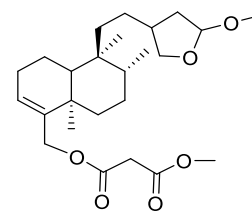
121



122



123



124

## 2 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo surge con el propósito de satisfacer las demandas en cuanto al uso seguro, eficaz, y la necesidad de establecer los criterios de calidad de las plantas de mayor uso en los países miembros de la OMS. Estas peticiones se establecen en el documento “Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023” (OMS, 2013), y en otros publicados por la OMS anteriormente. Así será factible apoyar a los numerosos centros de medicina tradicional indígena con información útil para sentar las bases de terapias más racionales y que contribuyan a la conservación de sus recursos naturales medicinales. Una fitoterapia racional requiere del conocimiento científico de los parámetros de seguridad, calidad y eficacia de los recursos terapéuticos utilizados. De esta forma también se contribuye a la integración de los centros de medicina tradicional de México al sistema nacional de salud. En el caso específico del presente trabajo se pretende abordar el estudio de dos plantas utilizadas en del Centro de Medicina Indígena Tradicional que da servicio a los miles de habitantes de la región. Las plantas seleccionadas fueron *C. dumetorum* y *B. heterophylla*, debido a su amplio uso y a la falta de estudios integrales de naturaleza química y farmacológica conducentes a establecer la eficacia, seguridad y calidad de estos recursos, de tal manera que se puedan cumplir demandas de la OMS (2013) en su plan estratégico 2014-2023 sobre medicina tradicional.

### 3 HIPÓTESIS

Aunque el presente proyecto se realizará con base en los lineamientos de la OMS es factible establecer las siguientes hipótesis:

-Los usos medicinales de *C. dumetorum* para el tratamiento de padecimientos febriles y dolorosos sugieren que la planta biosintetiza metabolitos secundarios con propiedades antinociceptivas y/o antiinflamatorias. Los antecedentes de tipo quimiotaxonómico permiten predecir que la naturaleza química de los principios activos sea de tipo flavonoide y/o esteroides.

-Los usos medicinales de *B. heterophylla* para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, dolor e inflamación sugieren que sus metabolitos secundarios presentan actividad antinociceptiva y antiinflamatoria. Los antecedentes de tipo quimiotaxonómico permiten predecir que la naturaleza química de los principios activos sea de tipo flavonoide y compuestos fenólicos.

## 4 OBJETIVOS

### Objetivo general

Con el propósito de satisfacer las demandas en cuanto al uso seguro, eficaz, y la necesidad de establecer los criterios de calidad de las plantas de mayor uso en México, con base en el plan estratégico de Medicina Tradicional 2014-2023 de la OMS, el presente trabajo pretende establecer los parámetros de calidad, eficacia y seguridad preclínicos de las especies *C. dumetorum* y *B. heterophylla*.

### Objetivos particulares

1. Realizar el estudio etnobotánico de *Cestrum dumetorum* y *Baccharis heterophylla*.
2. Establecer la toxicidad aguda del preparado tradicional de *Cestrum dumetorum* mediante la prueba de Lorke en roedores.
3. Establecer la eficacia potencial como agentes antinociceptivos y antiinflamatorios de los preparados tradicionales obtenidos a partir de las drogas crudas de *Cestrum dumetorum* y *Baccharis heterophylla*, mediante las pruebas de la formalina y edema inducido por carragenina, respectivamente.
4. Caracterizar los compuestos marcadores de las especies seleccionadas evaluando su utilidad para el establecimiento de las pruebas de identidad química y valoración de ambas especies.
5. Obtener los perfiles cromatográficos de diferentes extractos de las especies seleccionadas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de los volátiles obtenidos por microextracción en fase sólida (SPME-HS), con la finalidad de establecer las pruebas de identidad química.
6. Validar un método analítico que permita cuantificar al menos un principio activo o un compuesto marcador, con la finalidad de establecer una prueba de valoración que contribuya al establecimiento de la calidad de las drogas crudas de *C. dumetorum* y *B. heterophylla*.

## 5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Estudio etnobotánico

En observaciones previas de campo en las regiones de la Sierra Juárez, los Valles Centrales y la Costa del estado de Oaxaca, se observó la utilidad de *C. dumetorum* y *B. heterophylla*, para el tratamiento de diversos padecimientos. Por lo tanto, para conocer el uso tradicional de las especies antes mencionadas, se realizó un estudio etnobotánico que se enfocó en un grupo de especialistas en medicina tradicional (Heinrich *et al.*, 2009). El trabajo de campo se realizó desde julio del 2017 hasta noviembre de 2019.

El trabajo de campo consistió en la aplicación de entrevistas semiestructuradas a los especialistas en medicina tradicional que laboran en el Centro de Medicina Indígena Tradicional de Capulálpam de Méndez, siguiendo los lineamientos y metodologías descritas por Vargas y Andrade-Cetto (2018); Andrade-Cetto (2009). En primera instancia se les preguntó sobre sí mismos y sus experiencias como curanderos, posteriormente se les preguntó a los especialistas sobre los usos, nombres comunes, preparación, aplicación y cantidades utilizadas de las especies objeto de estudio. El cuestionario aplicado (Anexo 1) sirvió como base para la recopilación de la información

Para la realización de las entrevistas, se solicitó el permiso a la Autoridad de Bienes Comunes y a la Autoridad Municipal de Capulálpam de Méndez. Se obtuvo también el consentimiento informado de las médicas tradicionales con la finalidad de garantizar que las entrevistadas expresaron de manera libre y voluntaria su intención de participar en la investigación (Anexo 1).

### 5.2 Material vegetal

Las partes aéreas de *C. dumetorum* se recolectaron en la comunidad de San Juan Chilateca, Oaxaca en el mes de julio del 2017 [Voucher 1486502, Herbario Nacional (MEXU)], además se colectaron los lotes de enero, abril y agosto de 2018 (CD-2, CD-3 y CD-4) en el mismo lugar.

*Baccharis heterophylla* (partes aéreas) se recolectó en la comunidad de Capulálpam de Méndez, Oaxaca en el mes de abril de 2019 [Voucher 1512112, Herbario Nacional (MEXU)], adicionalmente los lotes de febrero, julio y octubre (BH-2, BH-3 y BH-4 respectivamente) fueron recolectados en el mismo lugar y año, para analizar su contenido. La identificación de ambas especies estuvo a cargo del M. en C. Rafael Torres Colin del Instituto de Biología de la UNAM.

El proceso de desecación del material vegetal se llevó a cabo a temperatura ambiente. Una vez desecado, la droga cruda se fragmentó en un molino de cuchillas Modelo Willey 4 (Thomas Scientific Incorporation, Swedesboro, NJ, EE. UU.) con un tamaño de malla de 2 mm.

### **5.3 Procedimientos generales**

#### **5.3.1 Análisis cromatográficos**

Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizaron en placas de aluminio y/o vidrio de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice (0.25 mm; 60 F<sub>254</sub>, malla de 3.5-7.0  $\mu\text{m}$  ASTM, Merck, NJ, EE.UU.), utilizando diferentes sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó, con una lámpara en el UV (254 y 365 nm) y como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal [12 g de Ce<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> en 22.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Stahl, 1969), para el desarrollo del color fue necesario calentar durante dos minutos a 110 °C aproximadamente.

El fraccionamiento de los extractos orgánicos y la purificación de los compuestos se realizó mediante la cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (Kieselgel 60 Merck; tamaño de partícula 0.063-0.200  $\mu\text{m}$ , malla de 70-230  $\mu\text{m}$  ASTM, NJ, EE. UU.) o gel de dextrano (Sephadex LH20, Sigma Aldrich, MO, EE. UU.) y diversos sistemas de elución.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division,

Milford, MA, EE. UU.), equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA 2996), una bomba cuaternaria y un sistema de inyección manual. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). Los análisis se realizaron en una columna empacada con gel de sílice (XBridge C<sub>18</sub> sílice gel) con un tamaño de partícula 5 µm, con un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 250 mm.

La cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas (CLUE-EM) del extracto acuoso de *C. dumetorum* se realizó empleando un cromatógrafo Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> clase H (Waters Chromatography Division), equipado con los detectores de arreglo de fotodiodos (PDA) y de cuadrupolo simple (SQD2) empleando como técnica de ionización al electrospray, una bomba cuaternaria y un inyector automático. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa MassLynk (Waters). Todos los análisis se realizaron en una columna BEH RP18 (Waters) con un tamaño de partícula de 1.7 µm, con un diámetro interno 2.1 mm y una longitud de 100 mm. Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc<sup>®</sup>) de 0.2 µm antes de ser inyectadas en el equipo para su análisis.

La cromatografía de gases (CG) se efectuó en un cromatógrafo Agilent<sup>®</sup> 6890N (Agilent Technology, CA, EE.UU.) equipado con un detector de masas (LECO-TOF). Todos los análisis se realizaron en una columna capilar DB-5 (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano), con un tamaño de partícula de 0.18 µm [0.18 mm de diámetro interno × 10 m de longitud], utilizando un gradiente de temperatura desde 40 hasta 300 °C (4 °C/min; 20 minutos), para finalmente mantenerse isotérmica a 300 °C durante 15 minutos. La identificación de los componentes presentes en las muestras analizadas se realizó mediante el cálculo de sus índices de retención utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>27</sub>), y la comparación de los espectros de masas generados con aquellos reportados en la base de datos (NIST, 2005).

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) se realizó con fibras de diferente polaridad [Polidimetilsiloxano (PDMS), Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB), Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)] de un cm de longitud (100  $\mu\text{m}$ ; Supelco® Technology, MO, EE.UU.) Previo a cada análisis, todas las fibras fueron acondicionadas en el CG a 250 °C durante dos horas. El proceso de extracción para *B. heterophylla* se realizó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación constante a 480 rpm, a partir de 50 mg del material vegetal seco, 2 g de NaCl y 15 mL de agua grado HPLC, por otro lado, para *C. dumetorum* el proceso de extracción se realizó durante 30 minutos a 60 °C con agitación constante a 600 rpm a partir de 920 mg de material vegetal seco, 90 mg de NaCl y 15 mL de agua grado HPLC. Transcurrido el tiempo de extracción, la fase sólida se introdujo en el CG para su subsecuente análisis, utilizando las mismas condiciones analíticas indicadas en el párrafo anterior. Todos los análisis se realizaron por triplicado. El registro de los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM.

### 5.3.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el infrarrojo (película o pastilla) se obtuvieron en un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer, rango: 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  y de 600–50  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se registraron en los equipos Varian Modelo VNMRS 9.4 T (RMN- $^1\text{H}$ , 400 MHz y RMN- $^{13}\text{C}$ , 100 MHz) y/o JEOL ECA-500 (RMN- $^1\text{H}$ , 600 MHz y RMN- $^{13}\text{C}$ , 125 MHz), empleando  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  o  $\text{DMSO}-d_6$  como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros de RMN monodimensionales y bidimensionales se utilizó el programa MestreNova® versión 12.



Los espectros de masas generados por la técnica de ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo se registraron en un espectrómetro de masas SQD2 utilizando un barrido de 100 a 1000 unidades de masa-carga ( $m/z$ ) por segundo.

## **5.4 Estudio químico de la especie *B. heterophylla***

### **5.4.1 Preparación del extracto acuoso**

La preparación del extracto acuoso se realizó a partir de 5 g de material vegetal seco y molido, mediante la técnica de infusión, empleando 250 mL de agua destilada a 82 °C durante 30 minutos. Posteriormente, este extracto, se filtró y concentró a presión reducida utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-II-HB) con una bomba de alto vacío (BUCHI-V-710), obteniéndose 1.2 g de extracto. Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener la cantidad de 6 g de extracto total (EABH).

Por otra parte, también se realizó la preparación de la fracción soluble de AcOEt a partir del extracto acuoso, mediante un proceso de reparto utilizando AcOEt como disolvente ( $3 \times 250$  mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío, obteniéndose 116 mg de un residuo café. Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener la cantidad de 10 g de muestra para la realización del estudio químico.

### **5.4.2 Fraccionamiento secundario de la fracción soluble de AcOEt**

La fracción soluble de AcOEt (9.5 g) se sometió a un fraccionamiento mediante una CC utilizando como adsorbente Sephadex LH20 (volumen de lecho de 678 mL). El proceso de elución se efectuó utilizando MeOH. Este proceso cromatográfico generó un conjunto de 28 fracciones primarias (FB<sub>1</sub>-FB<sub>28</sub>; Tabla 1).

**Tabla 1.** Fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción soluble de AcOEt de *B. heterophylla*.

<b>Fase móvil</b>	<b>Fracciones reunidas</b>	<b>Clave</b>	<b>Cantidad (g)</b>
CH <sub>3</sub> OH	1-3	FB-1	0.011
	4-10	FB-2	0.041
	11-16	FB-3	0.038
	17-21	FB-4	0.250
	22-32	FB-5	0.430
	33-38	FB-6	0.810
	39-44	FB-7	0.720
	45-41	FB-8	0.600
	52-55	FB-9	0.500
	56-62	FB-10	0.450
	63-65	FB-11	0.110
	66-75	FB-12	0.150
	76-79	FB-13	0.800
	80-83	FB-14	0.600
	84-87	FB-15	1.1
	88-92	FB-16	1.2
	93-96	FB-17	0.900
	97-100	FB-18	0.625
	101-103	FB-19	0.025
	104-106	FB-20	0.106
	107-108	FB-21	0.150
	109-111	FB-22	0.109
	112-115	FB-23	0.050
	116-118	FB-24	0.031
	119-122	FB-25	0.010
	123-125	FB-26	0.015
	126-129	FB-27	0.020
	130	FB-28	0.010

### 5.4.3 Fraccionamiento terciario de la fracción FB<sub>16</sub>

La fracción secundaria FB<sub>16</sub> (1.2 g) se sometió a un fraccionamiento terciario en cromatografía en columna con Sephadex LH-20, utilizando como mezcla de elución acetona-MeOH (9:1). Este proceso generó un conjunto de 24 fracciones terciarias (FB<sub>16-1</sub>–FB<sub>16-24</sub>). De la fracción F6<sub>16-5</sub> cristalizaron 14 mg del compuesto **125**, caracterizado como el éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico.

Por otra parte, a partir de la fracción F6<sub>16-7</sub> cristalizaron 6 mg del compuesto **104**, identificado como el ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico. Finalmente, a partir de las fracciones F6<sub>16-10</sub> (8 mg) y F6<sub>16-13</sub> (5 mg) precipitaron dos sólidos vítreos identificados como los ácidos 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**) y 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**106**), respectivamente.

**Éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (125):** sólido café; p.f. 136 °C; IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3324, 1682, 1596, 1153 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS  $m/z$  529.31 [M – H]<sup>-</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta_H$  (ppm) 7.60 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'), 7.53 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7''), 7.05 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 7.04 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-2''), 6.95 (d,  $J = 2.7, 8.2$  Hz, H-6', H-6''), 6.77 (d,  $J = 8.2$  Hz, H-5'), 6.76 (d,  $J = 8.2$  Hz, H-5''), 6.32 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8'), 6.20 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8''), 5.38 (m, H-5), 5.29 (m, H-3), 3.96 (dd,  $J = 3.2, 6.5$  Hz, H-4), 3.67 (s, OCH<sub>3</sub>), 2.34-2.25 (m, H-6a, 6b), 2.18-2.09 (m, H-2a, 2b). RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta_C$  (ppm) 175.6 (C-7), 168.8 (C-9'), 167.9 (C-9''), 149.8 (C-4''), 149.6 (C-4'), 147.5 (C-7''), 147.2 (C-7'), 146.9 (C-3'), 146.8 (C-3''), 127.9 (C-1'), 127.6 (C-1''), 123.1 (C-6'), 123.0 (C-6''), 116.6 (C-5''), 116.5 (C-5'), 115.4 (C-8'), 115.1 (C-2'), 115.1 (C-2''), 114.8 (C-8''), 74.6 (C-1), 72.2 (C-5), 71.9 (C-3), 69.6 (C-4), 53 (OCH<sub>3</sub>), 36.6 (C-6), 35.5 (C-2).

**Ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (104):** sólido blanco; p.f. 232 °C; IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3331.74, 1597, 1258, 808 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS  $m/z$  515.28 [M – H]<sup>-</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta_H$  (ppm) 7.59 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7', H-7''), 7.08 (d,  $J = 1.9$  Hz, H-2', H-2''), 6.90 (dd,  $J = 3.0, 8.0$  Hz, H-6'), 6.85 (dd,  $J = 3.0, 8.0$  Hz, H-6''), 6.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.70 (d,  $J = 8.0$  Hz, H-5''), 6.25 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8', H-8''), 5.61 (brd, 3.4, H-3), 4.96 (dd,  $J = 3.9, 9.0$  Hz, H-4), 4.34 (dd,  $J = 3.3, 9.0$  Hz, H-5), 2.05-2.32 (m, H-2a, 2b, H-6a, 6b). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta_C$  (ppm) 178.2 (C-7), 168.6 (C-9'), 168.5 (C-9''), 149.6 (C-4', C-4''), 147.4

(C-7''), 147.3 (C-7''), 146.6 (C-3', C-3''), 127.8 (C-1'), 127.7 (C-1''), 123.3 (C-6'), 123.1 (C-6''), 116.5 (C-5', C-5''), 115.2 (C-8'), 115.1 (C-2'), 115 (C-2''), 114.9 (C-8''), 76.5 (C-4), 75.1 (C-1), 70.1 (C-3), 65.8 (C-5), 41.9 (C-2), 36.9 (C-6).

**Ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico (105):** sólido blanco; p.f. 156 °C; ESI-MS  $m/z$  515.28  $[M - H]^-$ ; RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ):  $\delta_H$  (ppm) 7.61 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7', H-7''), 7.08 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-2', H-2''), 6.96 (dd,  $J = 2.0, 8.1$  Hz, H-6', H-6''), 6.80 (dd,  $J = 0.9, 8.1$  Hz, H-5', H-5''), 6.37 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8'), 6.29 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8''), 5.44 (dd,  $J = 3.3, 8.0$  Hz, H-5), 5.35 (m, H-3), 3.99 (dd,  $J = 3.3, 8.0$  Hz, H-4), 2.3-2.2 (dd,  $J = 3.9, 13.9$  Hz, H-6a, 6b), 2.1-1.9 (m, H-2a, 2b); RMN- $^{13}C$  (100 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ):  $\delta_C$  (ppm) 177.4 (C-7), 168.9 (C-9'), 168.4 (C-9''), 149.6 (C-4') 149.5 (C-4''), 147.2 (C-7'), 147.0 (C-7''), 146.8 (C-3', C-3''), 127.9 (C-1'), 127.8 (C-1''), 123.1 (C-6'), 123.0 (C-6''), 116.5 (C-5', C-5''), 115.6 (C-8''), 15.2 (C-8'), 115.1 (C-2') 115.1 (C-2''), 74.8 (C-1), 72.5 (C-3), 72.1 (C-5), 70.1 (C-4), 38.1 (C-2), 36 (C-6).

**Ácido 4,5-di-O-(E)-cafeoilquínico (106):** sólido café, IR (FT-IR)  $\nu_{max}$  3370, 1687, 1639, 1517  $cm^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$  515.35  $[M - H]^-$ ; RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ):  $\delta_H$  (ppm) 7.63 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'), 7.55 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7''), 7.04 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 7.02 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-2''), 6.95 (m, H-6', H-6''), 6.77 (d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.75 (d,  $J = 8.2$  Hz, H-5''), 6.30 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8'), 6.22 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8''), 5.72-5.67 (m, H-5), 5.14 (dd,  $J = 3.0, 9.7$  Hz, H-4), 4.36 (d,  $J = 3.6$  Hz, H-3), 2.33-2.09 (m, H-2a, 2b, H-6a, 6b); RMN- $^{13}C$  (100 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ):  $\delta_C$  (ppm) 178.6 (C-7), 168.6 (C-9'), 168.4 (C-9''), 149.6 (C-4', C-4''), 147.6 (C-7'), 147.4 (C-7''), 146.7 (C-3'), 127.7 (C-1'), 127.6 (C-1''), 123.2 (C-6'), 123.1 (C-6''), 116.4 (C-5', C-5''), 115.0 (C-8', C-8''), 114.9 (C-2', C-2''), 80.7 (C-1), 76.7 (C-4), 70.3 (C-3), 69.4 (C-5), 40.3 (C-6), 38.7 (C-2).

#### 5.4.4 Obtención de apigenina (97) de la fracción FB<sub>20</sub>

A partir de la fracción **FB<sub>20</sub>** (106 mg) precipitó un polvo blanco que se purificó mediante lavados sucesivos con MeOH obteniéndose 85 mg de apigenina (**97**).

**Apigenina (97):** sólido blanco; p.f. > 300 °C; IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  2614, 1650, 1351, 826  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$  269.10  $[\text{M}-\text{H}]^-$  RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_H$  (ppm) 12.95 (s, OH-5), 7.91 (d,  $J = 8.9$  Hz, H-2', H-6'), 6.91 (d,  $J = 8.9$  Hz, H-3', H-5'), 6.76 (s, H-3), 6.46 (d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.18 (d,  $J = 2.1$  Hz, H-6); RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_C$  (ppm) 181.7 (C-4), 164.1 (C-7), 163.7 (C-2), 161.5 (C-5), 161.2 (C-4'), 157.3 (C-8a), 128.5 (C-2', C-6'), 121.2 (C-1'), 116.0 (C-3', C-5'), 103.7 (C-4a), 102.9 (C-3), 98.8 (C-6), 94.0 (C-8).

#### 5.4.5 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FB<sub>17</sub>

La resolución de la fracción secundaria FB<sub>17</sub> (900 mg) se llevó a cabo mediante una CC utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil un gradiente de elución con las mezclas de hexano-AcOEt (9:1→0:1) y AcOEt-MeOH (1:0→0:1) que permitió la obtención de 9 mg de la genkwana (113) y 20 mg de la acetina (126).

**Genkwana (113):** sólido marrón; p.f. > 300°C; ESI-MS  $m/z$  283.21  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ; RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_H$  (ppm) 12.97 (s, OH-5), 7.96 (d,  $J = 8.9$  Hz, H-2', H-6'), 6.93 (d,  $J = 8.9$  Hz, H-3', H-5'), 6.85 (s, H-3), 6.78 (d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.38 (d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 3.87 (s, OCH<sub>3</sub>). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_C$  (ppm) 183.8 (C-4), 167.8 (C-2), 167.2 (C-7), 161.8 (C-4'), 159.2 (C-8a), 157.7 (C-5), 129.2 (C-2', C-6'), 118.8 (C-1'), 116.3 (C-3', C-5'), 105.9 (C-4a), 103.4 (C-3), 99.1 (C-6), 93.3 (C-8), 55.8 (OCH<sub>3</sub>).

**Acetina (126):** sólido café; p.f. > 300 °C; IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  2614, 1650, 1351, 826  $\text{cm}^{-1}$ . ESI-MS  $m/z$  283.21  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ; RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, CH<sub>3</sub>OH- $d_4$ ):  $\delta_H$  (ppm) 7.86 (d,  $J = 8.9$  Hz, H-2', H-6'), 7.0 (d,  $J = 8.9$  Hz, H-3', H-5'), 6.55 (s, H-3), 6.38 (d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.12 (d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 3.80 (s, OCH<sub>3</sub>). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz, CH<sub>3</sub>OH- $d_4$ ):  $\delta_C$  (ppm) 183.0 (C-4), 167.1 (C-7), 165.9 (C-2), 164.4 (C-5), 162.9 (C-4'), 159.5 (C-8a), 129.3 (C-2', C-6'), 124.6 (C-1'), 115.6 (C-3', C-5'), 105.4 (C-4a), 104.4 (C-3), 100.2 (C-6), 95.1 (C-8), 56.1 (OCH<sub>3</sub>).

#### 5.4.6 Preparación del aceite esencial

El aceite esencial de las partes aéreas de *B. heterophylla* (AEBH) se preparó mediante la técnica de hidrodestilación a partir de 200 g del material vegetal fresco y 1.3 L de agua destilada durante 3 horas. Al término de la extracción, la esencia se separó del destilado, mediante un proceso de partición con diclorometano ( $3 \times 250$  mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró al vacío, obteniéndose 320 mg de esencia. Este procedimiento se realizó por triplicado. Todas las esencias se almacenaron a  $-4$  °C hasta su análisis por CG-EM, utilizando las condiciones de análisis descritas en el inciso 5.3.1.

#### 5.5 Estudio químico de la especie *C. dumetorum*

##### 5.5.1 Preparación del extracto acuoso y orgánico

El extracto acuoso de *C. dumetorum* se preparó mediante el método de decocción, a partir de 5 g de material vegetal y 250 mL de agua destilada a ebullición durante 5 minutos. Enseguida, el extracto acuoso se filtró y se concentró a presión reducida utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-II-HB) adaptado a una bomba de alto vacío (BUCHI-V-710) obteniéndose 380 mg de un residuo café oscuro. Este procedimiento se repitió hasta obtener 7 g del extracto acuoso total (EACD).

El extracto orgánico se preparó a partir de 1.5 kg de material vegetal seco y molido mediante un proceso de maceración utilizando  $\text{CH}_3\text{OH}$  (5 L;  $2 \times 3$  días) y posteriormente una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1) (5 L;  $1 \times 3$  días). Los extractos resultantes se filtraron, se concentraron al vacío y se reunieron, obteniéndose 133 g de extracto total seco.

##### 5.5.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico

El extracto total (5 g) se resuspendió en 300 mL de una mezcla de  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:9) y se realizó un fraccionamiento preliminar mediante un proceso de reparto utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 200$  mL),  $\text{AcOEt}$  ( $8 \times 200$  mL) y *n*-butanol ( $8 \times 200$  mL). Al término de cada extracción las fases orgánicas se concentraron a presión reducida hasta sequedad. Este procedimiento se

repitió cuantas veces fue necesario hasta fraccionar 100 g de muestra, obteniéndose 31 g de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7 g de la fracción de AcOEt y 10 g de la fracción de *n*-butanol.

### 5.5.2.1 Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt

La fracción de AcOEt (800 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario en cromatografía en columna abierta con Sephadex LH-20, utilizando como fase móvil MeOH. Este proceso permitió la obtención de un conjunto de 17 fracciones secundarias (**FCA<sub>1</sub>**-**FCA<sub>17</sub>**).

A partir de las fracciones **FCA<sub>12</sub>** y **FCA<sub>15</sub>** precipitaron 5 mg de isoquercetina (**127**) y 12 mg del hiperósido (**128**), respectivamente.

**Isoquercetina (127):** sólido amarillo; ESI-MS (*m/z*) 463.69 [M – H]<sup>–</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta_H$  (ppm): 7.70 (d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.21 (d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.24 (d, *J* = 7.5 Hz, H-1"), 3.70 (dd, *J* = 11.9, 2.4 Hz, H-6a"), 3.67 (m, H-5"), 3.62 (m, H-2"), 3.50 (m, H-6b"), 3.34 (dd, *J* = 9.8, 9.5 Hz, H-3"), 3.30 (dd, *J* = 9.5 Hz, H-4").

**Hiperósido (128):** sólido amarillo; IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3269, 1605, 1361, 1202 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS *m/z* 463.69 [M – H]<sup>–</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  (ppm) 12.64 (s, 5-OH), 7.67 (dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz, H-6'), 7.53 (d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.41 (d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.38 (d, *J* = 7.7 Hz, H-1"), 3.65 (s, H-4"), 3.58 (m, H-2"), 3.45 (dd, *J* = 5.6, 9.9 Hz, H-6a"), 3.38 (d, *J* = 4.5 Hz, H-3"), 3.30 (m, H-5", H-6b"); RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$  (ppm) 178.0 (C-4), 164.6 (C-7), 161.7 (C-5), 156.8 (C-9), 156.7 (C-2), 148.9 (C-4'), 145.3 (C-3'), 133.9 (C-3), 122.5 (C-6'), 121.5 (C-1'), 116.4 (C-2'), 115.6 (C-5'), 104.4 (C-8a), 102.2 (C-1"), 99.1 (C-6), 94.0 (C-8), 76.3 (C-5"), 73.6 (C-3"), 71.7 (C-2"), 68.4 (C-4"), 60.6 (C-6").

### 5.5.2.2 Fraccionamiento secundario de la fracción de *n*-butanol

Con la finalidad de obtener los principios mayoritarios de la fracción de *n*-butanol (6 g), se realizó una separación mediante una cromatografía en columna con Sephadex LH-20,

utilizando como eluyente una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9). Este proceso permitió la obtención de un conjunto de 15 fracciones secundarias (**FCB<sub>1</sub>–FCB<sub>15</sub>**).

De la fracción **FCB<sub>2</sub>** precipitó un polvo blanco que se purificó mediante sucesivos lavados con CH<sub>3</sub>OH. Las aguas madres se analizaron por CLAE, utilizando una columna analítica XBridge Shield RP-18 (5 µm, 4.6 × 250 mm) y un gradiente de elución de ACN (**A**)-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico; **B**) (2:8) [0-12.5 min (25% **A**); 12.5-12.6 min, (20% **A**); 12.6-20 min (20% **A**)]. En el cromatograma resultante se puede observar la presencia de un compuesto mayoritario en un *t<sub>R</sub>* de 10.4 min. La purificación de este producto se realizó en una columna preparativa XBridgePrep Shield RP-18 (5 µm, 19 × 250 mm), con flujo de 17.1 mL/min, e inyecciones de 100 µL (15 mg). De este procedimiento se obtuvieron 4.5 mg de un sólido blanco (**129**).

### 5.5.3 Preparación del aceite esencial de *C. dumetorum*

El aceite esencial de las partes aéreas de *C. dumetorum* (AECD) se preparó mediante la técnica de hidrodestilación a partir de 100 g del material vegetal fresco y 1.2 L de agua destilada durante 4 horas. Al término de la extracción, la esencia se separó del destilado, mediante un proceso de partición con diclorometano (3 × 250 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío obteniéndose 30 mg de esencia. Este procedimiento se realizó por triplicado. Todas las esencias se almacenaron a -4 °C hasta su análisis por CG-EM, utilizando las condiciones de análisis descritas en el inciso **5.3.1**.

## 5.6 Evaluaciones farmacológicas

En todos los experimentos de la especie *B. heterophylla* se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 con un peso de 30 a 38 g. Por otro lado, para las evaluaciones de *C. dumetorum* se utilizaron ratones macho de la cepa ICR con un peso de 20 a 30 g y/o ratas Wistar con un peso de 160 a 180 g. Todos los animales utilizados se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio estándar, siguiendo los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999, con temperatura controlada (22 ± °C), ciclo de 12/12 h luz/oscuridad, además de tener acceso a alimento estándar y agua *ad libitum*. El Comité Institucional para el Cuidado



y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, aprobó los protocolos experimentales aquí descritos (FQ/CICUAL/291/18, FQ/CICUAL/294/18 y FQ/CICUAL/391/19). Al concluir los experimentos, todos los animales fueron sacrificados mediante hipoxia en una cámara de CO<sub>2</sub>.

### 5.6.1 Preparación de las muestras

Las muestras ensayadas (extractos, fracciones y/o compuestos puros) y los controles positivos se prepararon usando como vehículo solución salina isotónica (NaCl al 0.9%) con 0.05% de Tween 80. Para la evaluación de la toxicidad aguda, el potencial antiinflamatorio y antinociceptivo, la administración se realizó vía intragástrica (*p.o.*) usando sondas de acero inoxidable (3.0 × 0.3" o 5.9 × 0.3") en un volumen de administración de 0.2 mL/10 g de peso para ratones y 0.2 mL/100 g de peso en ratas. Para las evaluaciones del potencial antinociceptivo del aceite esencial de *B. heterophylla* se administraron 40 µL en el dorso de la extremidad posterior derecha de la pata por vía intraplantar (*i.pl.*), de los fármacos de referencia y la esencia empleando una jeringa hipodérmica (0.5 mL, 31 g × 6 mm).

### 5.6.2 Evaluación del potencial antinociceptivo de *B. heterophylla*

El potencial antinociceptivo de la especie *B. heterophylla* se evaluó utilizando el ensayo de la formalina con base en el diseño experimental descrito por Tjølsen y colaboradores (1992). Previo al experimento, los ratones se colocaron individualmente dentro de un cilindro de acrílico de 20 × 40 cm durante 15 min. Enseguida de la adaptación al dispositivo, los animales fueron administrados con cada uno de los tratamientos [VEH (solución salina isotónica con 0.05% de Tween 80, *p.o.*); EABH (31.6, 100, 316 mg/kg, *p.o.*), AEBH (30, 100 y 177 mg/kg, *i.pl.*); diclofenaco (50 mg/kg *p.o.* ó 100, *i.pl.*)], 30 minutos antes del estímulo químico [30 µL de una solución de formalina al 2%]. Inmediatamente después de la administración de la formalina, se registró cada 5 min la respuesta bifásica inducida por la solución de formalina (lamer la pata) por un período de media hora. Una vez obtenidos los valores de las lecturas se calculó el área bajo la curva de los cursos temporales para las fases 1 y 2 del experimento.

### 5.6.3 Evaluación del potencial antinociceptivo de *C. dumetorum*

El potencial antinociceptivo de *C. dumetorum* también se evaluó mediante el modelo de la formalina. Los animales fueron administrados con los tratamientos [VEH (solución salina con 0.5 % de Tween, *p.o.*); EACD (10, 31.6, 100, 177 y 316 mg/kg; *p.o.*), diclofenaco (50 mg/kg; *p.o.*)], después de 30 minutos de la administración de los tratamientos todos los animales fueron administrados con 30  $\mu$ L de una solución de formalina al 2% en la pata posterior derecha. La respuesta se cuantificó como se describe en el inciso 5.6.2.

### 5.6.4 Evaluación del potencial antihiperalgésico de *C. dumetorum*

Para el establecimiento del potencial antihiperalgésico de *C. dumetorum* se utilizaron ratones hiperglucémicos, para la inducción de la hiperglucemia los ratones se mantuvieron en ayuno durante 4 h, posteriormente recibieron por vía intraperitoneal (*i.p.*) nicotinamida (NA, 50 mg/kg) disuelta en solución isotónica inyectable. Después de treinta minutos, todos los animales fueron tratados con una dosis única de estreptozotocina vía intraperitoneal (*i.p.*) (STZ, 130 mg/kg) disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M ( $pH = 4.5$ ). Los ratones se emplearon a los 14 días después de la inducción de hiperglucemia. A estas unidades experimentales se les administraron los siguientes tratamientos [VEH (solución salina con 0.5 % de Tween, *p.o.*); EACD (31.6, 100, 316 mg/kg, *p.o.*); gabapentina (40 mg/kg, *p.o.*). Enseguida 30, minutos posteriores a la administración de cada tratamiento a los animales se les administró 30  $\mu$ L de una solución de formalina al 1% como se describe en el inciso 5.6.2.

### 5.6.5 Evaluación de la toxicidad aguda de *C. dumetorum*

La evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de *C. dumetorum* se basó en el método descrito por Lorke (1983). El ensayo se realizó en dos etapas independientes, en ambas se utilizaron doce ratones divididos en cuatro grupos ( $n = 3$ ). En la primera etapa, las dosis administradas del EACD fueron 10, 100 y 1000 mg/kg; y de sobrevivir todas las unidades experimentales se procedió a la segunda etapa donde se administraron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En las dos etapas el grupo control sólo recibió vehículo (solución

salina isotónica – 0.05 % Tween). Durante la primera hora posterior a la administración de los tratamientos los animales se mantuvieron en observación para identificar efectos tóxicos agudos, cambios en los patrones de comportamiento o muertes. Durante catorce días, el peso y/o muertes de los animales se registraron diariamente. Al término del periodo de 14 días los animales se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> y se procedió a la obtención de corazón, hígado, pulmones, y riñones para un análisis macroscópico en busca de lesiones. En caso de no existir mortalidad el método establece que la DL<sub>50</sub> del preparado evaluado, es mayor a 5000 mg/kg de peso.

#### **5.6.6 Evaluación del efecto antiinflamatorio de *C. dumetorum***

Esta prueba se realizó siguiendo el protocolo descrito por Winter y colaboradores (1962) en ratas Wistar (160-180 g), utilizando grupos de seis animales, y administrando 100 µL de una solución de carragenina ( $\lambda$ -carragenina) al 1% [p/v; intraplantar (*i.pl.*)] en la pata trasera derecha 30 minutos posteriores a la administración de los tratamientos [VEH (NaCl 0.9%); diclofenaco (DIC, 10 mg/kg); EACD (100, 177 y 316 mg/kg)]. Los volúmenes desplazados por la pata tratada se midieron utilizando un pletismómetro (modelo 7150, Ugo Basile, Italia) a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 hrs) después de la administración de la solución de carragenina.

#### **5.6.7 Análisis Estadístico**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo analizando las diferencias significativas entre los promedios  $\pm$  el error estándar (EEM), mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett considerando los valores de diferencias significativas de  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$  y  $***p \leq 0.001$ .

## 5.7 Establecimiento de los perfiles cromatográficos

### 5.7.1 Establecimiento del perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso de *B. heterophylla*

El establecimiento del perfil cromatográfico y la identificación de los componentes mayoritarios presentes en el extracto acuoso de *B. heterophylla* se realizó mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia utilizando una columna XBridge Shield RP18, con un flujo de 0.8 mL/min y como fase móvil un gradiente de elución de ACN (**A**)-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico, **B**) (20% **A**): [0-10 min (40% **A**); 10-23 min (100% **A**); 23-24 min (100% **A**); 24-28 min (20% **A**); 28-30 min (20% **A**)]. Una vez filtradas las muestras (compuestos o extractos), se inyectaron 20 µL de la solución en todos los casos. La identificación de los compuestos en el cromatograma se llevó a cabo mediante el análisis comparativo de los tiempos de retención y por coelución con respecto a los de una muestra de referencia de ácido clorogénico (**103**) (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.).

### 5.7.2 Establecimiento del perfil cromatográfico CLUE-EM de la fracción soluble de AcOEt de *C. dumetorum*

El establecimiento del perfil cromatográfico de la fracción soluble de AcOEt de *C. dumetorum* se realizó mediante la técnica de CLUE-EM utilizando una columna BEH® C18, y como sistema de elución un gradiente de ACN (**A**)-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico; **B**) (15% **A**): [0-10 min (20% **A**); 10-12 min (30% **A**); 12-13 min (100% **A**); 13.1-14.50 min (15% **A**)]. Los análisis se realizaron utilizando un flujo de 0.3 mL/min, un volumen de inyección de 3 µL y a 40 °C. Las condiciones de ionización en los análisis por EM fueron las siguientes: voltaje del capilar (kV): 3.5 (ionización positiva) y 2.5 (ionización negativa); Cono (V): 45.0; temperatura de la fuente: 120 °C; temperatura de desolvatación: 360 °C; flujo del gas de desolvatación (L/h): 570. La identificación de los compuestos en el cromatograma se realizó mediante el análisis de los tiempos de retención y los espectros de masas.

## 5.8 Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de *B. heterophylla* y *C. dumetorum*

La validación de los métodos analíticos se realizó con base en los lineamientos establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos [ICH Q2 (R1), 2005]. Cada método se validó de manera independiente, evaluando los parámetros de desempeño descritos en los siguientes puntos.

### 5.8.1 Preparación de la solución de referencia de los analitos

Las soluciones de referencia se prepararon siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: 5 mg de los compuestos **103**, **105** y **106** se disolvieron en 5 mL de ACN-H<sub>2</sub>O [25:75 (1 mg/mL)]. Por otro lado, 5 mg de los compuestos **127** y **128** se disolvieron en 5 mL de MeOH-H<sub>2</sub>O [3:7 (1 mg/mL)]. Todas las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc® de 0.2 µm antes de ser inyectadas en el equipo para su análisis.

### 5.8.2 Preparación de la matriz de trabajo

El extracto acuoso de *B. heterophylla* (EABH-1) se preparó siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito en el inciso **5.4.1**. Brevemente, 5 mg de EABH-1 se disolvieron en 5 mL de ACN-H<sub>2</sub>O (25:75) y 5 mg de la fracción soluble de AcOEt de *C. dumetorum* (EACD-FA) se disolvieron en 5 mL de MeOH-H<sub>2</sub>O (3:7). Todas las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc® de 0.2 µm antes de ser inyectadas en el equipo para su análisis.

### 5.8.3 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo diferentes curvas de calibración. En el caso de *B. heterophylla* se construyó una curva con cinco niveles de concentración y tres réplicas, para la especie *C. dumetorum* se prepararon seis curvas de calibración con siete niveles de concentración (Tabla 2). El área bajo la curva (ABC) correspondiente a cada uno de los picos de cada analito se graficó con respecto a la concentración del analito en cada

solución. El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios:  $b_0=0$ ;  $b_1 \neq 0$ ;  $r \geq 0.99$ ;  $r^2 \geq 0.98$  y  $IC(\beta_1)$  no incluye el cero.

**Tabla 2.** Rango de concentraciones utilizadas para los diferentes analitos en la evaluación de la linealidad del sistema.

<b>Analito</b>	<b>Rango de linealidad (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>103</b>	5-150
<b>105</b>	20-200
<b>106</b>	13.4-133.4
<b>127</b>	1-75
<b>128</b>	1-50

#### 5.8.4 Linealidad del método y exactitud

La linealidad y exactitud del método analítico se determinaron mediante la adición de tres diferentes concentraciones de los analitos (**103**, **105**, **106**, **127** y **128**) a la matriz de trabajo correspondiente (Tabla 3). Se evaluaron seis réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Estos valores se interpolaron en las curvas de calibración desarrolladas en el inciso **5.8.3**. Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs concentración recuperada) fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ( $b_0=0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $R \geq 0.99$ ,  $R^2 \geq 0.98$  y  $CV_{y/x} \leq 2\%$ ) mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar ( $S$ ), coeficiente de variación ( $CV$ ) y el intervalo de confianza para la media poblacional [ $IC(\beta_1)$ ] del porcentaje (%) de recobro.

**Tabla 3.** Intervalo de concentraciones utilizadas para la evaluación de la linealidad y exactitud del método.

<b>Analito</b>	<b>Rango de concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>103</b>	5-150
<b>105</b>	20-200
<b>106</b>	13.4-133.4
<b>127</b>	5-75
<b>128</b>	5-50

### 5.8.5 Precisión

La repetibilidad y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida de cada uno de los analitos (Tabla 4). El análisis se efectuó en dos días diferentes por el mismo analista. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones de análisis se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

**Tabla 4.** Concentración de los analitos para la evaluación de la precisión.

Analitos	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>103</b>	50
<b>105</b>	100
<b>106</b>	66.8
<b>127</b>	50
<b>128</b>	30

### 5.8.6 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de las curvas de calibración de una serie de diluciones a partir de la solución de referencia. Las soluciones empleadas contenían entre 2.5 y 20  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto **105**, entre 1.5 y 12  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto **106** y entre 0.25 y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de los compuestos **127** y **128**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva (ABC) de cada uno de picos de interés de las referencias se graficó con respecto a la concentración. Para el cálculo de la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de correlación ( $R$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo con las ecuaciones que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

### 5.8.7 Cuantificación de los compuestos presentes en el extracto acuoso de *B. heterophylla*

Cinco miligramos de tres extractos preparados de manera independiente, de cada muestra de *B. heterophylla* (BH-1, BH-2, BH-3 y BH-4) se disolvieron en 5 mL de ACN-

H<sub>2</sub>O (25:75). Los compuestos presentes se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones indicadas en la sección **5.7.1**. La concentración de los compuestos **103**, **105** y **106** se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en las ecuaciones de la recta, obtenidas a partir de las curvas de calibración diseñadas en la evaluación de la linealidad del sistema. La cuantificación del compuesto **104** se realizó con la ecuación obtenida de la curva diseñada para el compuesto **106**.

#### **5.8.8 Cuantificación de los compuestos presentes en la fracción soluble de AcOEt de *C. dumetorum***

Cinco miligramos de tres extractos preparados de manera independiente, de cada muestra de *C. dumetorum* (CD-FA1, CD-FA2, CD-FA3 y CD-FA4) se disolvieron en 5 mL de MeOH-H<sub>2</sub>O (3:7), a partir de esta solución de referencia se preparó otra con una concentración de 200 µg/mL, para realizar la cuantificación. Los compuestos presentes se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones indicadas en la sección **5.7.2**. La concentración de los compuestos **128** y **127** se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en las ecuaciones de la recta, obtenidas a partir de las curvas de calibración diseñadas en la evaluación de la linealidad del sistema.



## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se discutirán en dos secciones. En la primera, se presentan los resultados de la investigación farmacológica y química de *B. heterophylla*. La segunda parte contiene los resultados sobre el estudio de *C. dumetorum*.

### 6.1 Estudio etnobotánico.

Se realizó un estudio etnobotánico con la finalidad de documentar los usos tradicionales de las especies objeto de estudio. Este estudio estuvo dirigido a un grupo de especialistas en medicina tradicional, y la información se obtuvo mediante la aplicación de entrevistas semiestructuradas (Heinrich *et al.*, 2009; Schultes y von Reis, 2008). Se entrevistaron a seis de las 10 médicas que laboran en el CMIT, todas ellas indicaron ser originarias de Capulálpam de Méndez o de comunidades aledañas y señalan haber adquirido el conocimiento a través de sus padres.

La información proporcionada se resume en la Tabla 5. Ambas especies son utilizadas para tratar procesos inflamatorios y en el caso de *C. dumetorum* se destaca su uso como antifebril.

**Tabla 5.** Usos tradicionales de las especies objeto de estudio.

	<i>Cestrum dumetorum</i>	<i>Baccharis heterophylla</i>
<b>Nombre común</b>	Toponxihuite, potonxihuite	Chamizo de barrer
<b>Uso tradicional</b>	Tratamiento de la fiebre, inflamación, hemorroides, ingrediente de jabones medicinales	Torceduras, golpes, empacho, dolor de estómago y limpias
<b>Parte utilizada</b>	Partes aéreas	Partes aéreas

**Tabla 5.** Usos tradicionales de las especies objeto de estudio (Continuación).

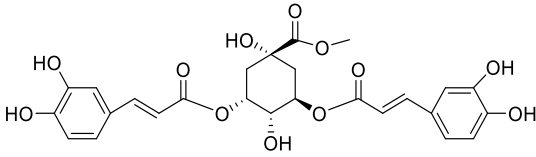
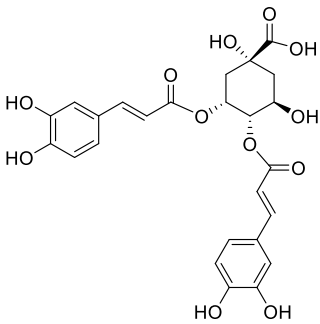
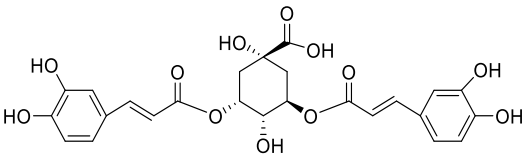
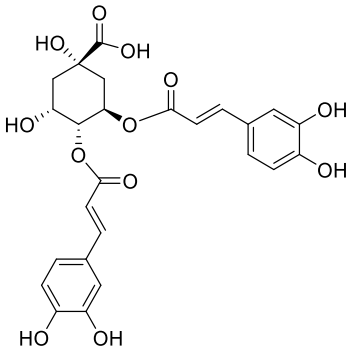
	<i>Cestrum dumetorum</i>	<i>Baccharis heterophylla</i>
<b>Forma de preparación</b>	Baños o ingestión del cocimiento	Cataplasma e infusión
<b>Dosis</b>	300 g (baños) o 2.5 (decocción) g	4 g
<b>Obtención</b>	Recolectada durante todo el año	Recolectada y cultivada, durante todo el año
<b>Propiedades organolépticas</b>	Olor fuerte	Olor fresco

## 6.2 Estudio químico de la especie *Baccharis heterophylla*

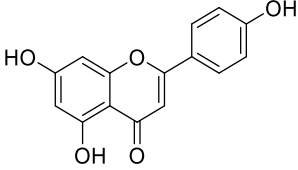
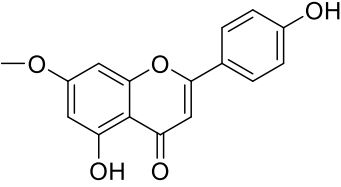
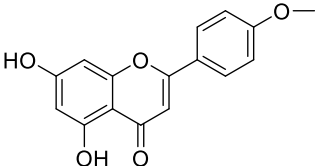
### 6.2.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos de *B. heterophylla*

Con la finalidad de obtener los metabolitos presentes en *B. heterophylla* se preparó la infusión. Este preparado se seleccionó para su análisis considerando que es el de mayor uso en la medicina tradicional. La aplicación conjunta de las cromatografías en columna abierta (gel de sílice y sephadex) permitió el aislamiento del éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**125**), ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**104**), 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**), y 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**106**), así como tres flavonoides identificados como apigenina (**97**), genkwanina (**113**) y acetina (**126**). Todos los productos aislados se caracterizaron comparando los datos espectroscópicos obtenidos en los diferentes espectros generados en el presente estudio (Anexo 2) con los reportados en la literatura (Tamayose *et al.*, 2019; Pérez-Vásquez *et al.*, 2020; Grecco *et al.*, 2012; Van Loo *et al.*, 1986). Previamente estos compuestos se habían aislado en otras especies del género *Baccharis* (Tabla 6). Es importante mencionar que los compuestos **104**, **105**, **106**, **125** y **126** se describen por vez primera en *B. heterophylla*.

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de las partes aéreas de *B. heterophylla*.

Compuesto aislado	Otras fuentes del género
 <p data-bbox="537 533 581 562"><b>125</b></p>	-
 <p data-bbox="529 959 573 989"><b>104</b></p>	<p data-bbox="894 646 1414 709">Partes aéreas de <i>B. dracunculifolia</i> (Mookawa <i>et al.</i>, 2003).</p> <p data-bbox="894 716 1414 779">Tallos y hojas de <i>B. incarum</i> (Zampini <i>et al.</i>, 2009).</p> <p data-bbox="894 785 1414 848">Partes aéreas de <i>B. retusa</i> (Greco <i>et al.</i>, 2012).</p> <p data-bbox="894 854 1414 911">Partes aéreas de <i>B. trimera</i> (Aboy <i>et al.</i>, 2012).</p>
 <p data-bbox="529 1251 573 1281"><b>105</b></p>	<p data-bbox="894 1056 1414 1119">Partes aéreas de <i>B. dracunculifolia</i> (Mookawa <i>et al.</i>, 2003).</p> <p data-bbox="894 1125 1414 1188">Partes aéreas de <i>B. retusa</i> (Greco <i>et al.</i>, 2012).</p> <p data-bbox="894 1194 1414 1251">Partes aéreas de <i>B. trimera</i> (Aboy <i>et al.</i>, 2012).</p>
 <p data-bbox="529 1671 573 1701"><b>106</b></p>	<p data-bbox="894 1413 1414 1476">Tallos y hojas de <i>B. incarum</i> (Zampini <i>et al.</i>, 2009).</p> <p data-bbox="894 1482 1414 1545">Partes aéreas de <i>B. retusa</i> (Greco <i>et al.</i>, 2012).</p> <p data-bbox="894 1551 1414 1608">Partes aéreas de <i>B. trimera</i> (Aboy <i>et al.</i>, 2012).</p>

**Tabla 6.** Metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de las partes aéreas de *B. heterophylla* (Continuación).

Compuesto aislado	Otras fuentes del género
	Exudado de <i>B. heterophylla</i> (Wollenwebe <i>et al.</i> , 1986)
<b>97</b>	
	Exudados de <i>B. heterophylla</i> (Wollenwebe <i>et al.</i> , 1986)
<b>113</b>	
	Exudado de <i>B. dracunculifolia</i> (Park <i>et al.</i> , 2004)
<b>126</b>	

### 6.2.2 Determinación de compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de *B. heterophylla*

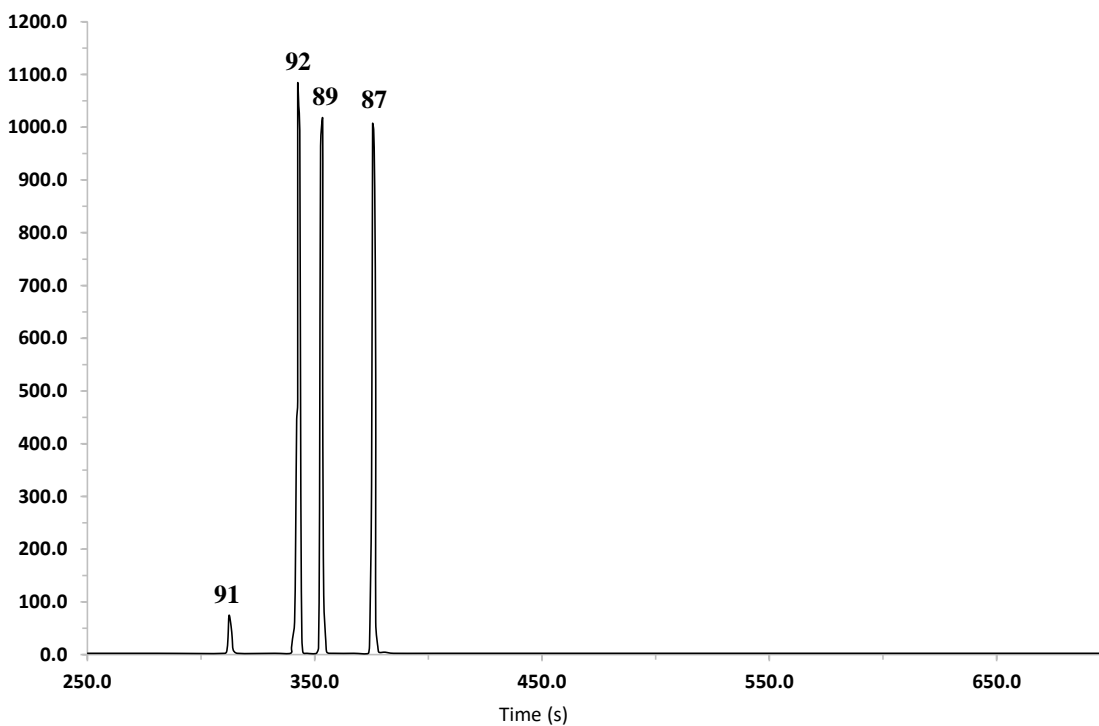
Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, principalmente monoterpenoides, sesquiterpenoides, productos de degradación de los carotenoides, fenilpropanoides y productos de degradación de ácidos grasos, incluyendo

alcanos, alquenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas (Maffei *et al.*, 2011; Chua *et al.*, 2019). El estudio químico de las esencias contribuye a la generación de pruebas de identidad de las especies medicinales. Además, las esencias son generalmente bioactivas ya que continen compuestos con propiedades antisépticas, analgésicas, sedantes, antiinflamatorias y espasmolíticas, por tan solo mencionar algunas (Baptista-Silva *et al.*, 2020).

El aceite esencial de las partes aéreas de *B. heterophylla* (AEBH) se analizó por CG-EM bajo las condiciones descritas en el apartado 5.3.1, esta técnica es idónea para la separación y análisis de compuestos volátiles, permitiendo la obtención de perfiles cromatográficos adecuados para establecer la identidad de las esencias. Los componentes se identificaron mediante el cálculo de sus índices de retención utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>27</sub>) y por comparación de sus espectros de masas con los reportados en la literatura, los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 7. Los componentes mayoritarios de la esencia son monoterpenoides [D-limoneno (87), mirceno (89) y β-pineno (92)] (Figura 10). Estos compuestos han sido reportados previamente en las especies *B. latifolia*, *B. magellanica*, *B. uncinella* y *B. semiserrata* (Minteguiaga *et al.*, 2021, Valarezo *et al.*, 2013, Simonsen *et al.*, 2009, Vannini *et al.*, 2012).

### 6.2.3 Determinación de compuestos volátiles de *B. heterophylla* por microextracción en fase sólida

Con el propósito de complementar el estudio de los componentes volátiles de *B. heterophylla*, se estudiaron los productos extraídos mediante la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS). Esta técnica es versátil, reproducible, sensible y selectiva, la preparación de muestras y la extracción de analitos de interés son relativamente fáciles. El éxito del análisis depende de las características estructurales tanto de las fibras como de los analitos y la volatilidad de estos últimos (Dawidowicz *et al.*, 2016). Para el desarrollo del método de microextracción en fase sólida se consideró la diversidad estructural de los compuestos volátiles presentes en la esencia de *B. heterophylla*, por lo tanto, se utilizaron cuatro fibras de diferente polaridad (CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB y PDMS), de tal forma que los metabolitos fueron determinados de acuerdo con su mayor o menor afinidad por cada fibra.



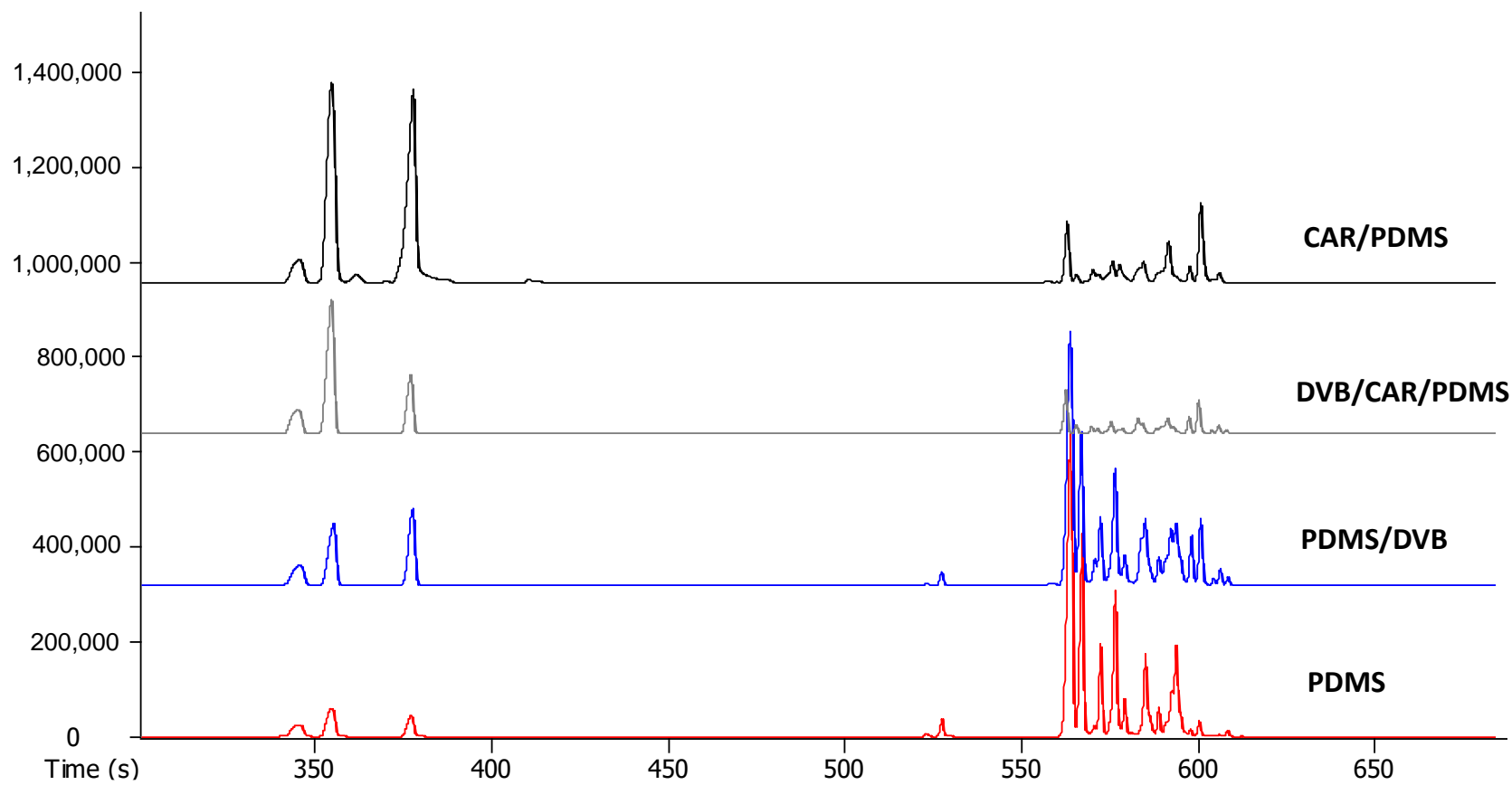
**Figura 10.** Cromatograma iónico total del aceite esencial de las partes aéreas de *B. heterophylla*.  $\alpha$ -Pineno (**91**),  $\beta$ -pineno (**92**), mirceno (**89**) y D-limoneno (**87**).

El estudio con las fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB y PDMS permitió la caracterización de 13, 13, 14 y 14 compuestos respectivamente (Tabla 7, Figura 11); Los compuestos D-limoneno (**87**), mirceno, (**89**) y  $\beta$ -pineno (**92**) son los mayoritarios detectados con las fibras CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS; esta composición es consistente con los compuestos mayoritarios detectados en el aceite esencial. Por otro lado, el cedreno (**133**) y  $\beta$ -cariofileno (**118**) son los compuestos mayoritarios identificados en las fibras PDMS/DVB y PDMS. En conjunto, estos resultados revelaron que la composición volátil de las partes aéreas de la planta se caracteriza por un elevado número de hidrocarburos y que la fibra de polaridad mixta DVB/CAR/PDMS es la más adecuada para establecerla.

**Tabla 7.** Compuestos volátiles detectados en *B. heterophylla*.

N°	Compuestos	$I_R^a$	$I_R^b$	Contenido (%)				
				AE	PDMS	PDMS/DVB	DVB/CAR/PDMS	CAR/PDMS
91	$\alpha$ -Pinoeno	922	924	5.34	-	-	-	-
92	$\beta$ -Pinoeno	969	969	28.86	4.29	4.85	10.6	1.97
89	Mirceno	982	983	29.57	3.43	9.4	27.19	10.53
130	<i>o</i> -Cimeno	1016	1018	-	-	-	-	26.71
87	D-Limoneno	1019	1021	36.24	4.07	8.82	23.02	26.71
131	<i>p</i> -Cimeneno	1081	1089	-	-	-	-	3.18
132	$\delta$ -Elemeno	1327	1337	-	2.45	1.34	-	-
133	Cedreno	1413	1412	-	19.99	15.62	-	-
118	$\beta$ -Cariofileno	1414	1415	-	19.99	15.62	9.25	4.23
134	Isogermacreno D	1422	1420	-	8.51	5.12	1.89	-
135	Aromadendreno	1435	1436	-	3.64	4.01	-	1.92
136	$\alpha$ -Cariofileno	1447	1452	-	7.37	6.95	1.72	5.03
117	Germacreno D	1454	1451	-	1.14	1.15	-	-
137	$\gamma$ -Elemeno	1470	1465	-	5.6	4.45	8.59	2.7
138	$\alpha$ -Selineno	1479	1470	-	1.04	-	-	-
139	$\beta$ -Cadineno	1486	1481	-	-	-	-	4.46
140	$\beta$ -Amorfeno	1488	1497	-	-	-	4.77	4.32
141	$\beta$ -Himachaleno	1493	1500	-	9.72	8.46	1.27	-
142	$\delta$ -Amorfeno	1510	1506	-	-	3.53	4.3	-
143	Calameneno	1511	1511	-	-	-	4.3	3.92
144	$\alpha$ -Cadineno	1525	1534	-	-	-	2.45	1.6
145	$\alpha$ -Calacoreno	1531	1540	-	0.39	0.4	0.64	-
Total (%)				100	91.63	89.72	99.99	97.28

$I_R^a$ : índice de retención experimental en una columna DB-5 con referencia a *n*-alcanos.  $I_R^b$ : índice de retención reportado en la literatura en una columna DB-5.



**Figura 11.** Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles de *B. heterophylla* obtenidos por microextracción en fase sólida.



### 6.3 Estudio farmacológico de la especie *Baccharis heterophylla*

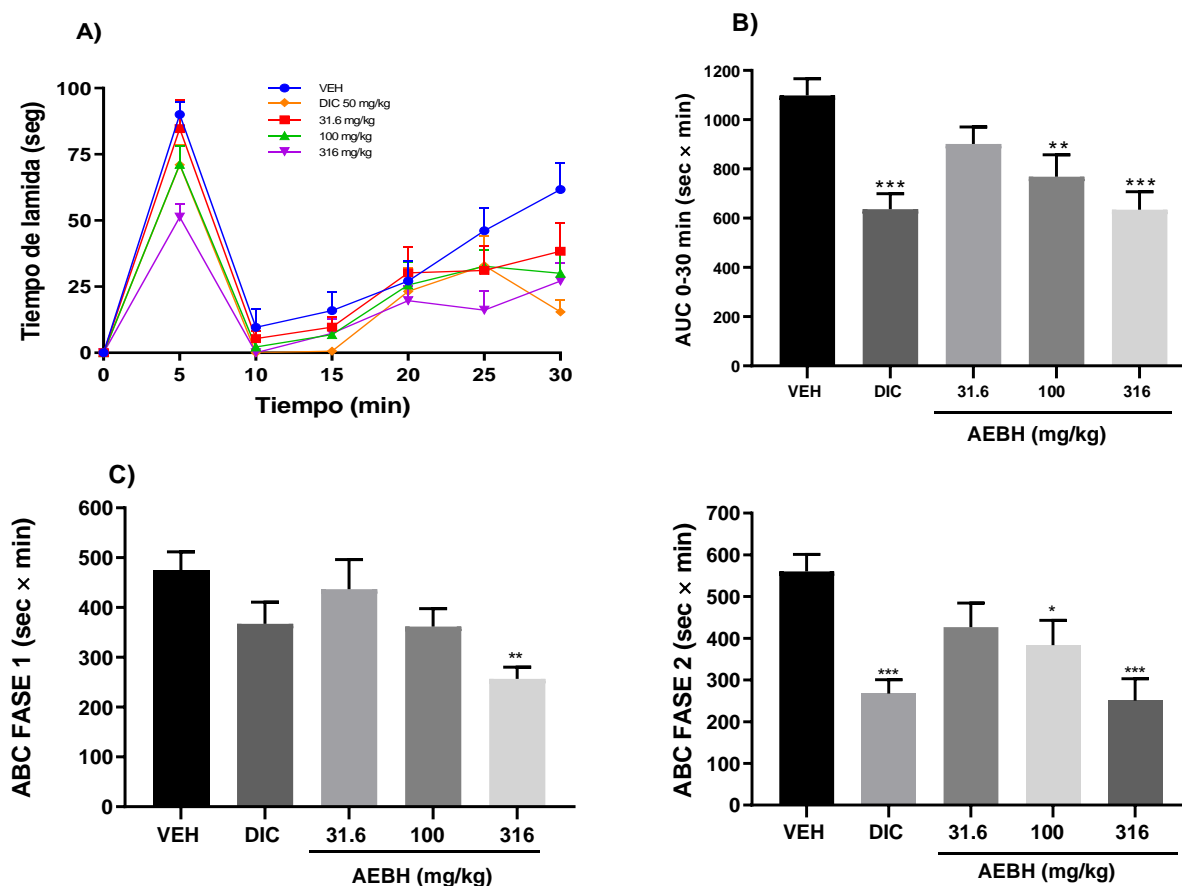
El uso de infusiones y cataplasmas de *B. heterophylla* para el tratamiento de padecimientos dolorosos e inflamatorios condujo a evaluar el potencial antinociceptivo de la infusión y el aceite esencial de la especie mediante el modelo de la formalina.

La prueba de formalina, originalmente descrita por Dubuisson y Dennis (1977), es actualmente uno de los modelos farmacológicos más utilizados para el descubrimiento de sustancias analgésicas ya que se detectan los eventos inflamatorios y neurogénicos de la nocicepción. Esta prueba consiste en la evaluación del comportamiento de roedores en respuesta a un estímulo químico. Así, la administración de formalina en la pata trasera del roedor produce un patrón típico de respuestas espontáneas, tales como lamer, sacudir, brincar y morder, mismas que se aprecian en dos fases (Tjølsen *et al.*, 1992). La primera fase llamada nocicepción neurogénica es producida por la activación de las fibras nociceptivas, principalmente las fibras C, que liberan sustancia P, glutamato y bradicinina, y la activación de los receptores TRPA1 y TRPV1. La segunda fase, se caracteriza por la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos y de la sensibilización a los receptores de glutamato y sustancia P (Sawynok y Liu, 2003, Silva-Correa *et al.*, 2021)

#### 6.3.1 Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto acuoso, mediante el modelo de la formalina

La administración de formalina (2%, 30  $\mu$ L, *i.pl.*) a ratones macho de la cepa CD1, pretratados con vehículo (VEH, NaCl 0.9%), generó un incremento en el ABC del tiempo de lamida de la pata tratada (Figura 12). Sin embargo, en los animales pretratados con el extracto acuoso de *B. heterophylla* (EABH, 31.6-316 mg/kg) se observó una reducción significativa de la respuesta al estímulo químico durante ambas fases del modelo. En la fase 1, el efecto antinociceptivo únicamente se observó en la dosis más alta (316 mg/kg) ensayada. Por otro lado, las dosis de 100 y 316 mg/kg provocaron una reducción significativa del estímulo

durante la segunda fase, comparada con la respuesta observada para el diclofenaco utilizado como control positivo (DIC, 50 mg/kg).



**Figura 12.** A) Curso temporal del efecto antinociceptivo de EA de *B. heterophylla*, cada punto representa el promedio del tiempo de lamida  $\pm$  EEM  $n=6$ . B) ABC total de todos los tratamientos. C) ABC de la primera y segunda fase del modelo. VEH (vehículo); DIC (diclofenaco, 50 mg/kg, control positivo). Cada barra es el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra tiempo)  $\pm$  EEM de los animales,  $n=6$ . ANADEVAs de 1 vía, *post hoc* Dunnett, \* $p=0.05$ , \*\*  $p=0.01$ , \*\*\*  $p=0.001$  en comparación con el grupo VEH.

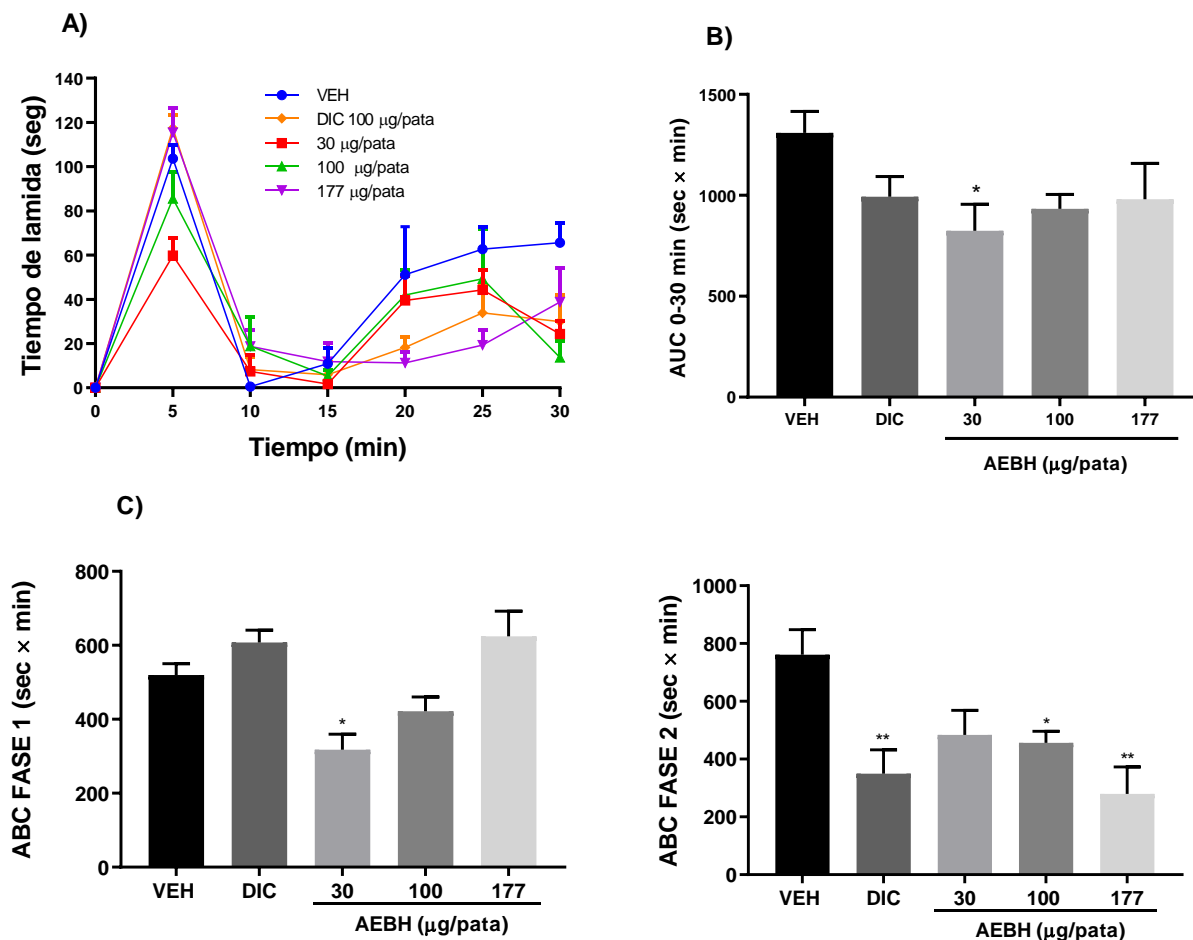
En consecuencia, el extracto acuoso de *B. heterophylla* posee un efecto antinociceptivo sobre todo en la fase inflamatoria y puede estar relacionado con el alto contenido de ácido clorogénico (104), ácidos di-cafeoilquínicos (105-106) y flavonoides (97 y 113). Los compuestos 104 y 105 son antinociceptivos en los modelos de contracciones inducidas por ácido acético y placa caliente en ratones (Dos Santos *et al.*, 2005, Choi *et al.*, 2007). Posteriormente, Abdel Motaal y colaboradores (2016) reportaron que los compuestos

**103**, **105** y **106** inhiben significativamente el edema inducido por carragenina. Con referencia a los estudios *in vitro* el compuesto **106** inhibe la ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducida por hipoxia (Hong *et al.*, 2015). Por otra parte, el compuesto **105** así como una mezcla de ácidos di-cafeoilquínicos suprimieron la producción de NO, PGE<sub>2</sub> y citocinas proinflamatorias (TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) inhibiendo las vías NF- $\kappa$ B y MAPK en líneas celulares de macrófagos (RAW264.7) (Hong *et al.*, 2015, Wan *et al.*, 2019). Finalmente, los flavonoides **97** y **113** presentan efectos antinociceptivos en diferentes modelos (Xiao *et al.*, 2016).

### **6.3.2 Evaluación del potencial antinociceptivo del aceite esencial de *B. heterophylla***

El uso tradicional de cataplasmas de *B. heterophylla* dio la pauta para evaluar el efecto antinociceptivo del aceite esencial (AEBH) mediante el modelo de la formalina en ratones. En este caso la administración de los tratamientos fue local. En la Figura 13 (Panel C), se observa que la administración del AEBH disminuyó el comportamiento nociceptivo en ambas fases, producido por la administración de formalina (2%, 30  $\mu$ L, *i.pl.*). En la primera fase el efecto antinociceptivo máximo se alcanzó a la concentración de 30  $\mu$ g/pata, en tanto que en la segunda se observó a las concentraciones de 100 y 177  $\mu$ g/pata; estos resultados son comparables con los producidos por el control positivo (diclofenaco 100  $\mu$ g/pata).

Las propiedades antinociceptivas del AE de *B. heterophylla* están en armonía con los compuestos volátiles presentes en el preparado (sección **6.2.1**). Así, el  $\beta$ -pineno presenta actividad antinociceptiva (0.3 mg/kg, *i.p.*) en el modelo de placa caliente en ratones (Liapi *et al.*, 2007); el mirceno a la dosis de 10 mg/kg *p.o.* es activo en los modelos de formalina y placa caliente (Paula-Freire *et al.*, 2013). El  $\alpha$ -pineno disminuye la producción de interleucina-6 y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  inducida por lipopolisacáridos (LPS), también inhibe la expresión de la Óxido Nítrico Sintasa (ONS) y COX-2 (Kim *et al.*, 2015). Finalmente, el limoneno tiene actividades antiinflamatoria y antinociceptiva en diferentes modelos *in vivo* (particularmente en los modelos químicos de nocicepción) e *in vitro* principalmente modulando la acción de citocinas, y participando en vías que están estrechamente ligadas a la respuesta inflamatoria (Viera *et al.*, 2018).



**Figura 13.** A) Curso temporal del efecto antinociceptivo de AE de *B. heterophylla*, cada punto representa el promedio del tiempo de lamida  $\pm$  EEM  $n=6$ . B) Área bajo la curva total. C) ABC de la primera y segunda fase del modelo. VEH, (vehículo); DIC (diclofenaco, 100  $\mu\text{g/pata}$ , control positivo). Cada barra es el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra tiempo)  $\pm$  EEM de los animales,  $n=6$ . ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, \* $p=0.05$ , \*\* $p=0.01$ , \*\*\* $p=0.001$  en comparación con el grupo VEH.

## 6.4 Pruebas de composición de la especie *Baccharis heterophylla*

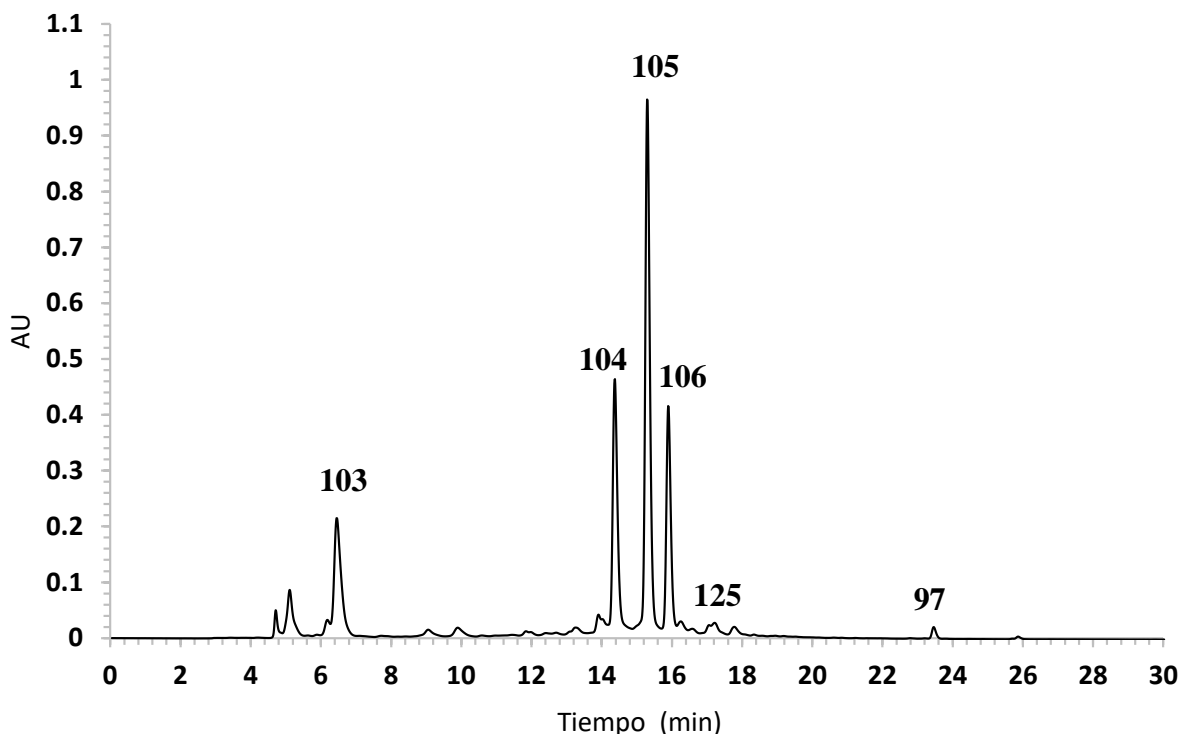
### 6.4.1 Establecimiento del perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso

El desarrollo y la validación de métodos analíticos son de gran relevancia para el establecimiento de las pruebas de identidad y composición química de las drogas crudas y sus preparados tradicionales. En este sentido, la CLAE es una de las técnicas más utilizadas para el desarrollo de métodos analíticos de plantas medicinales, debido a su sensibilidad,

reproducibilidad y posibilidad de utilizar una gran variedad de soportes cromatográficos, mismos que permiten la resolución de mezclas muy complejas, de los extractos de las drogas crudas (Syed *et al.*, 2021).

El perfil cromatográfico se desarrolló mediante el ensayo de las condiciones que influyen en la calidad del cromatograma como la fase estacionaria, composición de la fase móvil, el gradiente de elución y la longitud de onda ( $\lambda$ ) adecuada.

Como fase estacionaria se seleccionó una columna de fase reversa; la longitud de onda ( $\lambda$ ) apropiada se estableció a 327 nm tomando como referencia los reportes descritos para separación de ácidos fenólicos y flavonoides (Aboy *et al.*, 2012). El sistema de elución se determinó mediante el ensayo de diferentes mezclas de disolventes y gradientes de elución. La fase móvil compuesta por H<sub>2</sub>O y ACN funcionó mejor ya que permitió una buena separación de los picos de interés. La adición de ácido fórmico en una concentración de 0.1% a la fase móvil (H<sub>2</sub>O) mejoró la resolución. De igual forma, la velocidad de flujo se estableció por ensayo y error y la mejor velocidad fue la 0.8 mL/min. Los componentes del extracto acuoso se identificaron en el perfil cromatográfico mediante la técnica de coelución con los productos aislados y caracterizados en este estudio (Tabla 6). Los resultados obtenidos permitieron identificar al compuesto ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**) como mayoritario. De manera adicional se corroboró la presencia del ácido clorogénico (**103**). El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Cromatograma por CLAE del extracto acuoso de las partes aéreas de *B. heterophylla*. Columna XBridge Shield RP<sub>18</sub>. Fase móvil: ACN (A)-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico, B) (20% A): [0-10 min (40% A); 10-23 min (100% A); 23-24 min (100% A); 24-28 min (20% A); 28-30 min (20% A)].  $\lambda = 327$  nm. Velocidad de flujo 0.8 mL/min. Tiempos de retención [**103** ( $t_R = 6$  min); **104** ( $t_R = 14.6$  min); **105** ( $t_R = 15.6$  min); **106** ( $t_R = 16.2$  min); **125** ( $t_R = 17.1$  min); **97** ( $t_R = 26.3$  min)].

#### 6.4.2 Validación de un método analítico para la cuantificación de los componentes del Extracto Acuoso de *B. heterophylla*

Una vez establecido el perfil cromatográfico por CLAE se procedió a la validación de un método analítico para la cuantificación de ácidos fenólicos presentes en los diferentes lotes de *B. heterophylla*. En el presente estudio, los parámetros de calidad fueron evaluados de acuerdo con las Guías de Validación publicadas por la FDA [ICH Q2 (R1), 2005].

##### 6.4.2.1 Linealidad del sistema

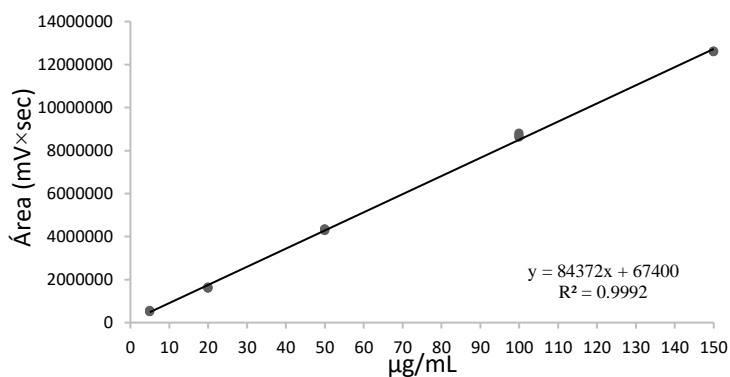
Un sistema es lineal cuando las respuestas analíticas, en un rango de concentraciones establecidas, son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra. La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración para cada analito (**103**, **105** y **106**). El ABC correspondiente a cada uno de los picos de cada analito se graficó

con respecto a la concentración del analito en cada solución (Figuras 15-17). El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (Tabla 8).

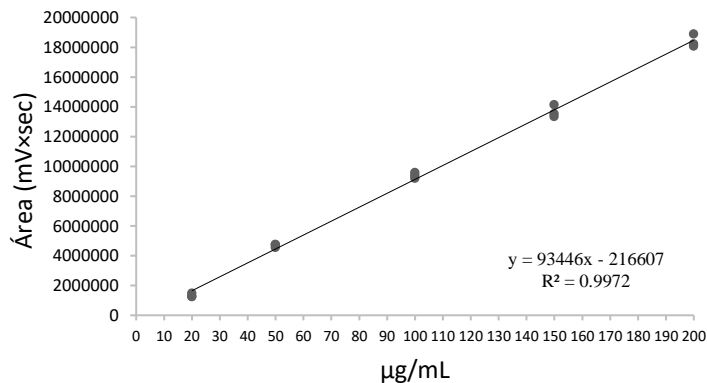
Con base en los valores de  $R^2$  y parámetros estadísticos obtenidos a partir de las curvas de calibración de cada analito (Anexo 3), se puede concluir que la linealidad del sistema se cumple para cada uno de los analitos en el rango de concentraciones analizadas, esto con base en los límites establecidos por la ICH.

**Tabla 8.** Parámetros de calibración del método.

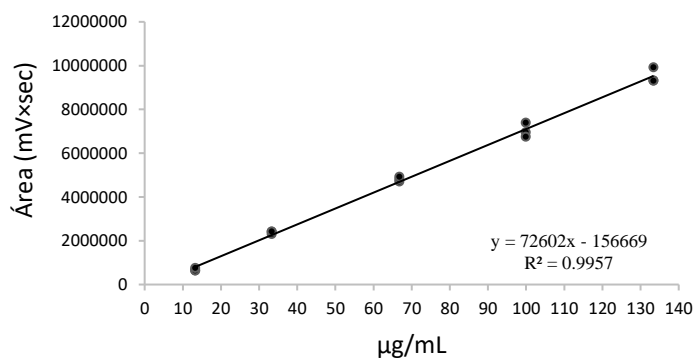
Estadístico	103	105	106
( $b_1$ )	84372	93446	72602
( $b_0$ )	67400	-216607	-156669
( $R$ )	0.9996	0.9996	0.9978
( $R^2$ )	0.9992	0.9972	0.9957
[IC( $\beta_1$ )]	82951 - 85793	90457 - 96434	69730 - 75474



**Figura 15.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 103.



**Figura 16.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 105.

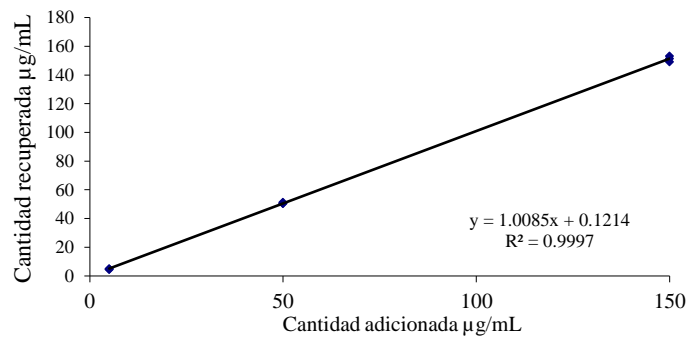


**Figura 17.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 106.

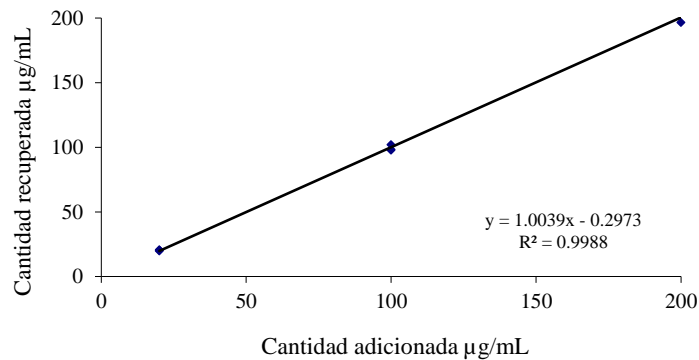
#### 6.4.2.2 Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método se evaluó con las curvas de calibración construidas a partir de diferentes concentraciones de los analitos, que se adicionaron a la matriz de trabajo. Las Figuras 18-20 corresponden a las gráficas de linealidad del método, y la Tabla 9 resume los parámetros estadísticos calculados. Los resultados obtenidos permiten determinar que el método analítico es lineal, puesto que cumple con los criterios de aceptación establecidos en la guía normativa seleccionada para este estudio (ICH Q2 (R1), 2005).

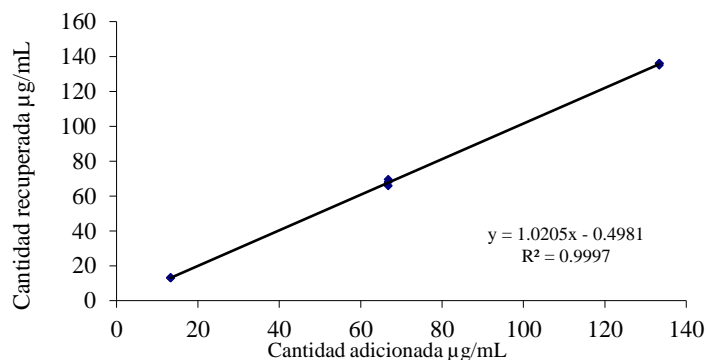




**Figura 18.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 103.



**Figura 19.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 105.



**Figura 20.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 106.

La exactitud del método se define como la correspondencia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en la Tabla 9. Los resultados obtenidos para todos los analitos se

encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%) por lo tanto el método es exacto para el intervalo de concentraciones ensayadas (Anexo 3).

**Tabla 9.** Parámetros estadísticos de la linealidad del método y porcentajes de recobro.

Analito	Intervalo de trabajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecuación	$R^2$	IC del intercepto 95%	% Recobro
103	5 – 150	$y = 1.0085x + 0.1214$	0.9997	-1.488 – 1.218	100.83
105	20 – 200	$y = 1.0039x - 0.2973$	0.9988	-3.810 – 4.199	99.15
106	13.4 – 133.4	$y = 1.0189x - 0.3143$	0.9997	-1.119 – 1.697	100.4

#### 6.4.2.3 Precisión

La precisión de un método analítico está dada por la concordancia entre las respuestas analíticas individuales, que resultan de varias estimaciones de la concentración de un analito en una misma solución homogénea, y bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión se debe calcular considerando la dispersión de los datos individuales con respecto a la media y se expresa como desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV). En el presente trabajo la precisión se determinó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Ambas se establecieron mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida. El análisis de la precisión intermedia se efectuó en dos días diferentes. Los resultados obtenidos (Tabla 10) se expresan en términos del coeficiente de variación (CV), los valores obtenidos son iguales o menores al 2% por lo tanto, se establece la precisión del método.

**Tabla 10.** Evaluación de la precisión del método.

Analito	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)
103	50	0.91	1.32
105	100	1.22	1.8
106	66.8	1.96	2.0

#### 6.4.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) de un método está dado por la concentración mínima de un analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Por otro lado, el límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito, que puede

ser determinada con precisión y exactitud aceptable. Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de curvas de calibración realizadas para cada uno de los analitos en un intervalo de concentración de 1 y 5 µg/mL del compuesto **103**, 2.5 y 20 µg/mL del compuesto **105** y 1.5 y 12 µg/mL del compuesto **106**. Así, realizando el análisis estadístico de los datos y utilizando las expresiones matemáticas indicadas en el inciso **5.8.6** de la sección experimental, los valores de LD y LC calculados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Límites de detección y límites de cuantificación de los analitos.

Analito	S	LC (µg/mL)	LD (µg/mL)
<b>103</b>	10459	1.5	0.51
<b>105</b>	64998	6.63	2.19
<b>106</b>	33847	4.12	1.36

#### 6.4.2.5 Cuantificación de metabolitos presentes en los extractos acuosos de *B. heterophylla*

El método analítico validado se aplicó para cuantificar el contenido de ácido clorogénico y ácidos di-cafeoilquínicos en tres extractos preparados de manera independiente y bajo las mismas condiciones, de cuatro muestras de *B. heterophylla* (BH-1, BH-2, BH-3 y BH-4); el CV de cada pico fue  $\leq 2\%$ . La concentración de los compuestos **103**, **105** y **106** se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en las ecuaciones de la recta descritas para la linealidad del sistema [ $y = 84372x + 67400$  (**103**);  $y = 93446x - 216607$  (**105**);  $y = 72602x - 156669$  (**106**)]. La cuantificación del compuesto **104** se realizó con la ecuación obtenida de la curva diseñada para el compuesto **106**. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12

**Tabla 12.** Contenido (mg/g) en cuatro muestras de *B. heterophylla*

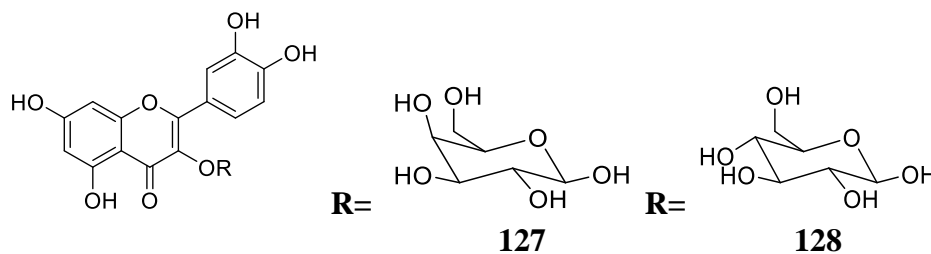
Compuesto	$T_R$ (min)	Contenido (mg/g)			
		BH-1	BH-2	BH-3	BH-4
<b>103</b>	6	37.9 ± 3.4	39.7 ± 1.7	29.3 ± 1.8	33.9 ± 2.1
<b>104</b>	14.6	52.4 ± 1.4	61.5 ± 4.5	58.8 ± 3.4	53.1 ± 1.4
<b>105</b>	15.6	104.7 ± 3.4	107 ± 12.3	79.8 ± 8.4	99.6 ± 4.4
<b>106</b>	16.2	42.1 ± 1.2	44.5 ± 4.3	40.6 ± 4.3	29.3 ± 0.3

De acuerdo con la información obtenida se estableció que en general el contenido de los metabolitos **103-106** fue similar en todos los lotes; el ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**) resultó el compuesto mayoritario en todas las muestras analizadas. Las diferencias encontradas en la composición de las muestras analizadas pueden deberse a variaciones estacionales ya que las muestras fueron recolectadas en diferentes meses del año.

## 6.5 Estudio químico de *Cestrum dumetorum*

### 6.5.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos de *C. dumetorum*

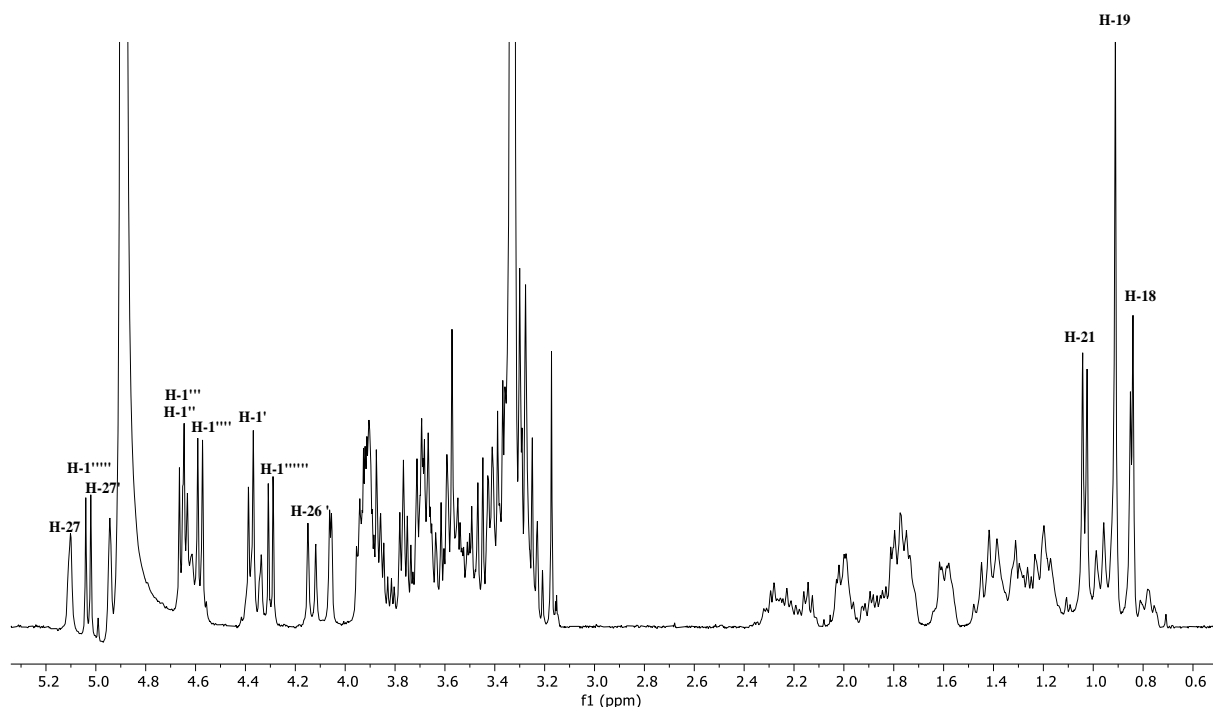
Con el propósito de obtener los metabolitos presentes en la droga cruda de *C. dumetorum* se preparó un extracto con MeOH; la selección del disolvente fue con base en los estudios químicos previos de las especies del género. Este extracto se sometió a varios repartos sucesivos con disolventes de diferente polaridad (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt y *n*-butanol), posteriormente las fracciones resultantes de AcOEt y *n*-butanol se sometieron a procedimientos cromatográficos en columna abierta de gel de sílice y CLAE. Esta estrategia permitió el aislamiento de los flavonoides hiperósido (**127**) e isoquercitrina (**128**), así como una saponina de tipo furostanol 26-*O*-β-D-glucopiranosil-furost-25(27)-eno-3, 26 diol (3β [(*O*-β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-*O*-[β-D-xilopiranosil-(1→3)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil) (**129**). Todos los compuestos se identificaron mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos y por comparación con los datos reportados en la literatura (Pérez-Vásquez *et al.*, 2020). Este es el primer reporte de los compuestos **127** y **128** en especie y género (Figura 21). El compuesto **129** es una entidad química nueva, por lo tanto, su caracterización se describe a continuación.



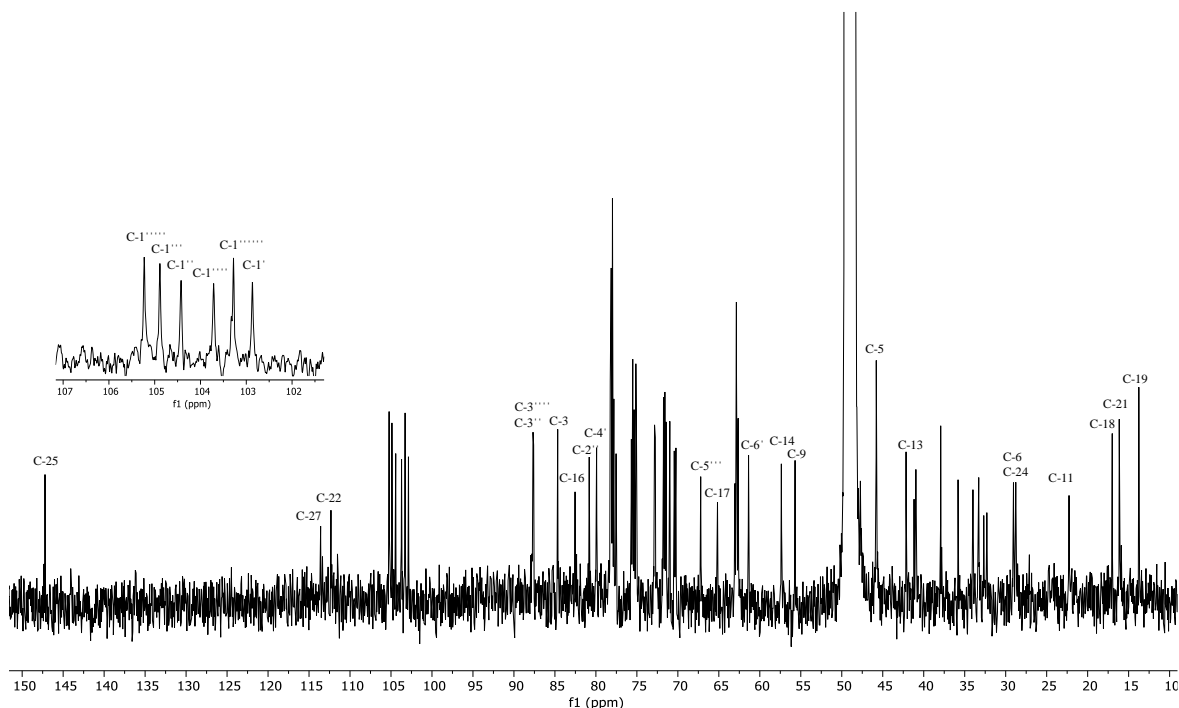
**Figura 21.** Flavonoides aislados de las partes aéreas de *C. dumetorum*.

El espectro de masas de alta resolución del compuesto **129**, obtenido mediante la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (Anexo 2), muestra un ión correspondiente a la molécula protonada  $[M + H]^+$  en un valor de  $m/z$  de 1375.1430, que permite una fórmula molecular de  $C_{62}H_{102}O_{33}$  y un índice de deficiencia de hidrógenos de 12. En el espectro al IR (Anexo 2), se observan bandas características para grupos hidroxilo en 3350, 2926 y 1034  $cm^{-1}$ .

La inspección preliminar del espectro de RMN- $^1H$  (Figura 22) muestra tres señales de metilos con desplazamiento en  $\delta_H$  0.9 (s), 1.02 (d,  $J = 6.8$  Hz), 0.83 (s) característicos de un compuesto de naturaleza esteroide, y señales para seis protones anoméricos; el valor de la constante de acoplamiento observada para estos hidrógenos indica su configuración  $\beta$  [ $\delta_H$  5.03 (d,  $J = 7.8$  Hz), 4.66 (d,  $J = 7.8$  Hz), 4.66 (d,  $J = 7.8$  Hz), 4.58 (d,  $J = 7.8$  Hz), 4.38 (d,  $J = 7.8$  Hz), 4.28 (d,  $J = 7.8$  Hz)].



**Figura 22.** Espectro RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ) del compuesto **129**.



**Figura 23.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del compuesto **129**.

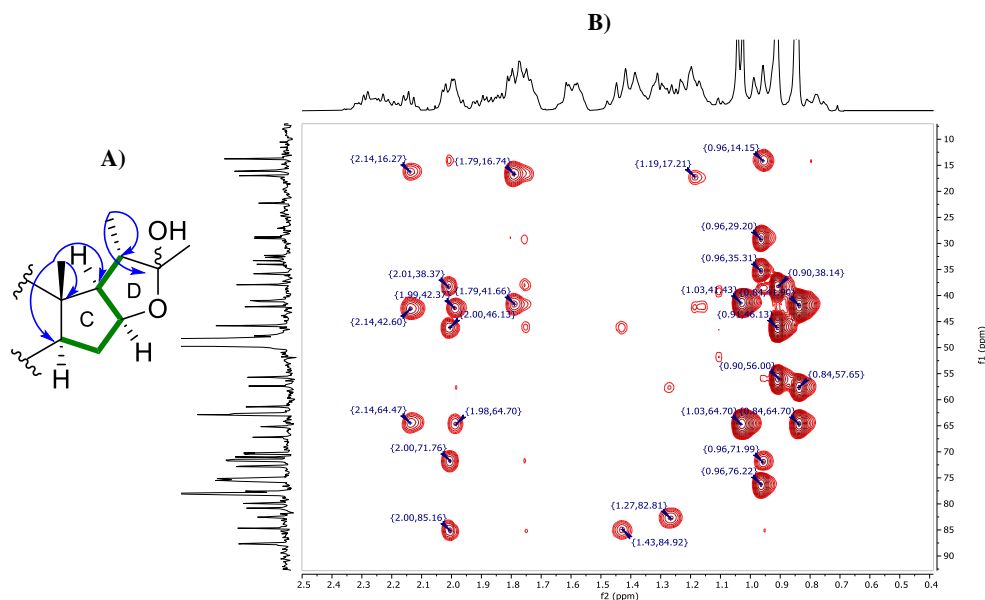
El análisis de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 23), confirma la naturaleza furostanol de la molécula (Kang *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2022), se aprecian los metilos y seis unidades de azúcar; además, se observa un carbono cuaternario oxigenado en  $\delta_{\text{C}}$  112.3 congruente con la presencia de un hemiacetal en la molécula. Las correlaciones que se aprecian en el experimento HSQC permiten identificar dos metinos oxigenados ( $\delta_{\text{H/C}}$  3.49/84.7 y 4.57/82.5) y un metileno oxigenado ( $\delta_{\text{H/C}}$  3.49-4.35/72.8) característicos de los furostanoles (Fouad *et al.*, 2008).

El análisis en conjunto de los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ , RMN- $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY, TOCSY y NOESY permitió la asignación de todos los protones y carbonos de la aglicona (Tabla 13).

En el experimento COSY se tomó como punto de partida el metilo H-21 [ $\delta_{\text{H/C}}$  1.02 (d.  $J=6.8$ )/16.2] que correlaciona con un metino que inequívocamente se trata del protón H-20 [ $\delta_{\text{H/C}}$  2.13/41.2]. Este último, correlaciona con otro metino ( $\delta_{\text{H/C}}$  1.78/65.2) que por su desplazamiento a campo bajo en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  sugiere la unión de dos ciclos y fue

identificado como H-17. El protón H-17 correlaciona con un metino oxigenado ( $\delta_{H/C}$  4.57/82.5) asignable a H-16.

La identificación de H-17 permitió un análisis más claro y detallado del experimento HMBC, que condujo a la asignación de H-18 a las señales en  $\delta_H$  0.83 y  $\delta_C$  17, basado en la fuerte correlación de los protones de H-18 con el carbono C-17. Los protones del metilo H-18 muestran un acoplamiento entre H-18 y H-12 característico de los compuestos esteroidales (Puri *et al.*, 1993). Las correlaciones en HMBC de H-18 con el carbono del metino  $\delta_{H/C}$  1.16/57.3 y el carbono cuaternario en  $\delta_H$  42.1 permitió la asignación de los carbonos como C-14 y C-13, respectivamente. El carbono cuaternario oxigenado con desplazamiento en  $\delta_C$  113.6 es característico para el C-22 de los furostanoles y tiene una fuerte correlación con H-21. De esta forma, la combinación de todos los datos presentados permitió construir los ciclos C y D de la estructura (Figura 24).

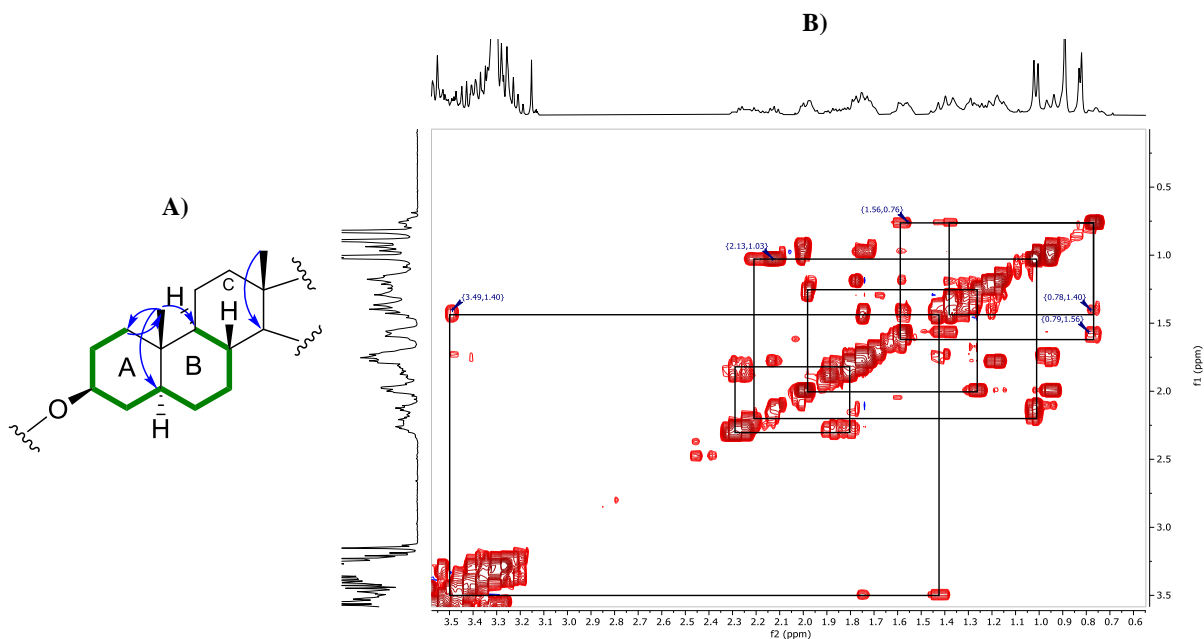


**Figura 24.** A) Principales correlaciones en HMBC y COSY del compuesto **129**. B) Vista parcial del espectro de HMBC del compuesto **129**.

El metino con desplazamiento a campo alto en RMN- $^1H$  ( $\delta_{H/C}$  0.76/55.7) se asigna a H-9 con base en las correlaciones en el espectro HMBC con H-19, y en el espectro COSY con los protones en  $\delta_H$  1.58 (H-8) y otro que pertenece a uno de los protones del metileno

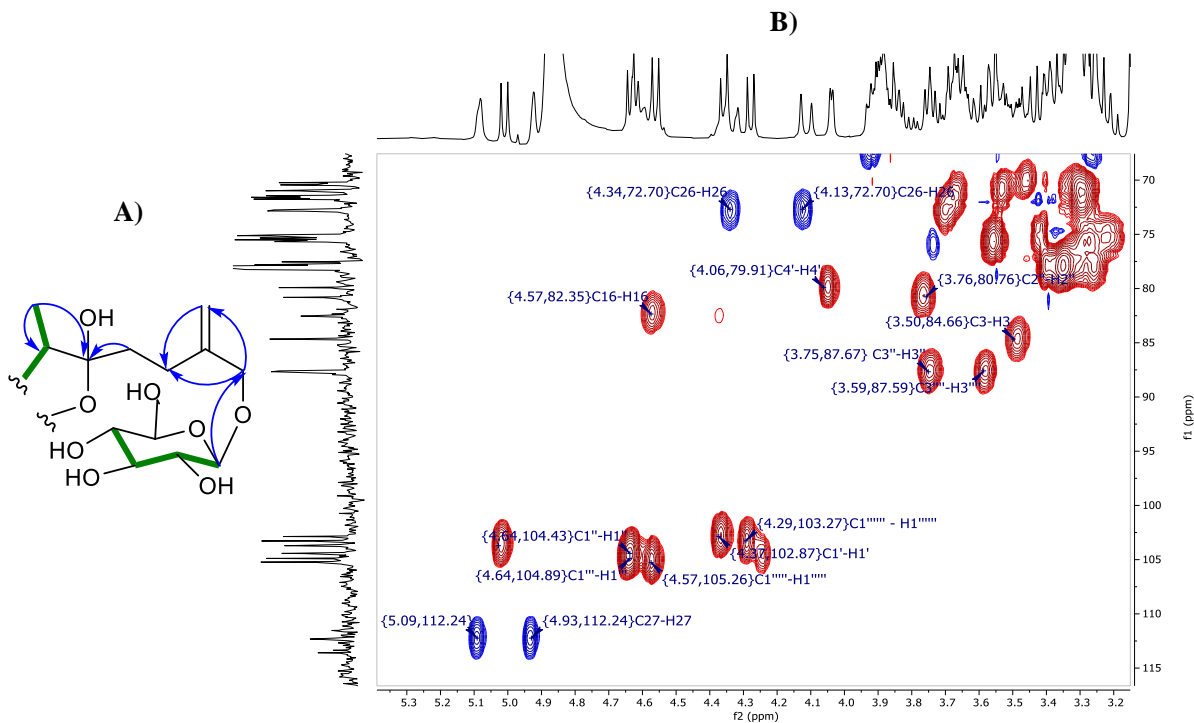
correspondiente a H-11 ( $\delta_H$  1.39). Por otro lado, las correlaciones en HMBC de los protones de H-19 con el carbono de un metino ( $\delta_{H/C}$  1.19/45.8) y el carbono de un metileno ( $\delta_C$  37.9) permitió la asignación de estos carbonos como C-5 y C-1, respectivamente. El análisis de las correlaciones en COSY, permitió la asignación del resto de protones de los ciclos A, B y C (Figura 25).

El análisis de los espectros de RMN- $^{13}C$ , RMN- $^1H$  y HSQC permitió identificar señales atribuibles a un grupo metileno exocíclico [ $\delta_C$  113.6 y 147.3 (C-25), y  $\delta_H$  5.11 (sa) y  $\delta_H$  4.94 (sa)]; la correlación observada en el espectro de HMBC entre los dos protones del metileno y el carbono  $\delta_C$  72.8, permitió asignar a este último como C-26 y se corrobora la presencia de una saponina de tipo furostanol (Figuras 25 y 26).

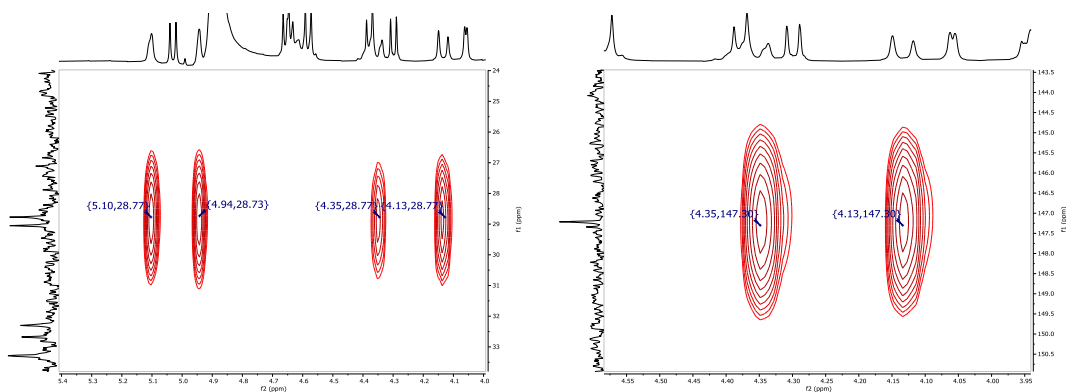


**Figura 25.** A) Principales correlaciones observadas en los espectros de HMBC y COSY para los ciclos A, B y C. B) Vista parcial del espectro de COSY del compuesto **129**.





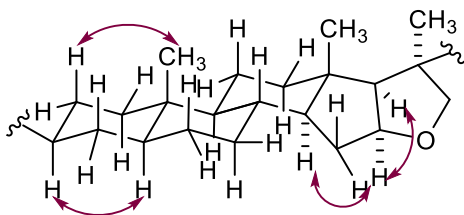
**Figura 26.** A) Principales correlaciones observadas en los espectros de HMBC y COSY. B) Vista parcial del espectro de HSQC del compuesto 129.



**Figura 27.** Vista parcial del espectro de HSQC del compuesto 129.

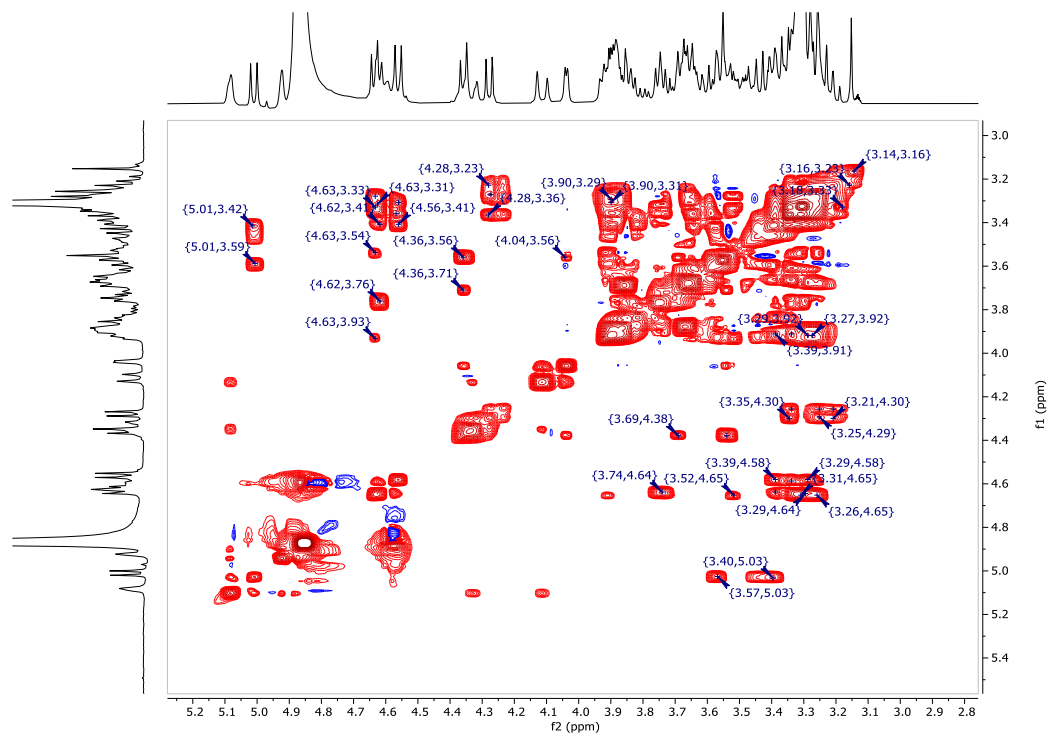
El resto de la aglicona se identificó por los desplazamientos de los espectros de RMN-<sup>13</sup>C y RMN-<sup>1</sup>H y sus respectivas correlaciones en los experimentos HSQC, HMBC, NOESY y TOCSY, así como por la comparación con estructuras similares reportadas en la literatura (Mosad *et al.*, 2017; Fouad *et al.*, 2008).

Las correlaciones observadas en el experimento NOESY entre los protones unidos a los anillos D y E (H-14, H-16 y H-17) confirman la unión *cis* D/E del núcleo esteroidal. La correlación NOESY entre H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1.19) y H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.49) junto con los desplazamientos químicos del carbono de C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  45.8), C7 ( $\delta_{\text{C}}$  33.3) y C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  13.8), sugieren la fusión *trans* entre los anillos A y B (Figura 28).



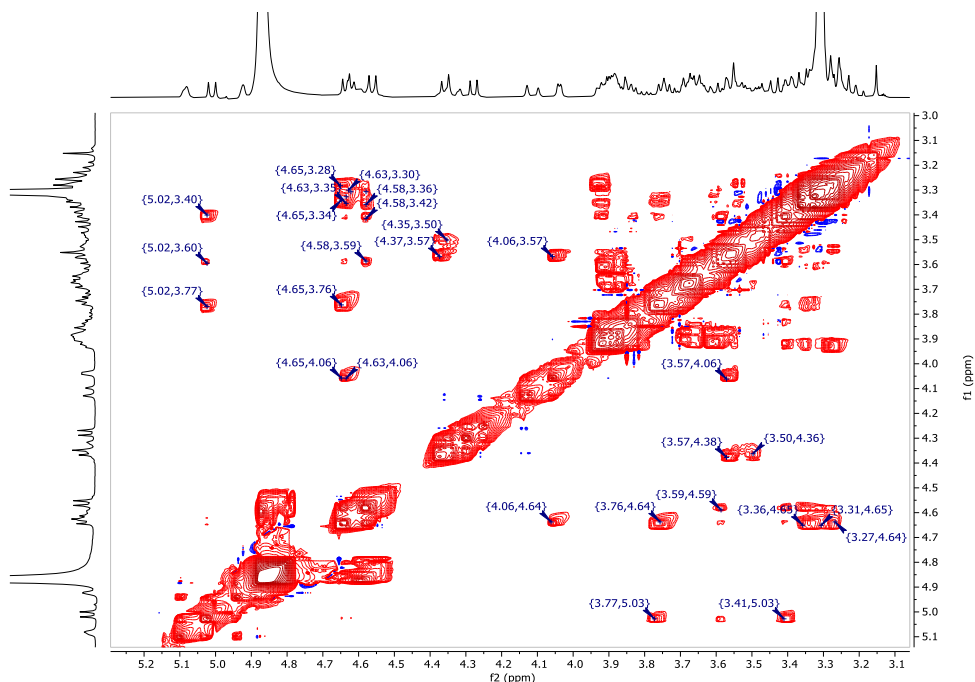
**Figura 28.** Principales correlaciones observadas en el espectro NOESY del compuesto **129**.

Con relación a las unidades glicosídicas, inicialmente se identificó un residuo de galactosa (Gal), con base en las correlaciones registradas en el experimento TOCSY (Figura 29) entre los protones  $\delta_{\text{H}}$  4.38,  $\delta_{\text{H}}$  3.71 y  $\delta_{\text{H}}$  4.06, asignados como H-1', H-2' y H-4', respectivamente, y la constante de acoplamiento de H-4' ( $J = 2.8$  Hz) característica de la interacción axial-ecuatorial entre H-3', H-4', y el acoplamiento ecuatorial-axial entre H-4' y H-5' de la galactosa. El residuo glicosídico correspondiente al protón anomérico  $\delta_{\text{H}}$  4.66 (d,  $J = 7.8$  Hz) se identificó como glucosa (Gluc I), derivado del análisis del sistema de spin observado en el experimento TOCSY, entre los protones  $\delta_{\text{H}}$  4.66 (H-1''),  $\delta_{\text{H}}$  3.76 (H-2''),  $\delta_{\text{H}}$  3.79 (H-3'') y  $\delta_{\text{H}}$  3.29 (H-4''), así como a la constante de acoplamiento de H-3'' (dd,  $J = 6.1$  Hz) que corresponde a un acoplamiento axial-axial-axial entre H-2'', H-3'' y H-4'', respectivamente. La identificación de un residuo de xilosa (Xil) se llevó a cabo gracias al desplazamiento característico de los protones H-5''' ( $\delta_{\text{H}}$  3.26 y 3.93) que correlacionan en el experimento TOCSY con el protón anomérico H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  4.66), y la correlación de éste con protones con un desplazamiento en  $\delta_{\text{H}}$  3.27 (H-2'''),  $\delta_{\text{H}}$  3.33 (H-3''') y  $\delta_{\text{H}}$  3.35 (H-4''').



**Figura 29.** Vista parcial del espectro de TOCSY del compuesto **129**.

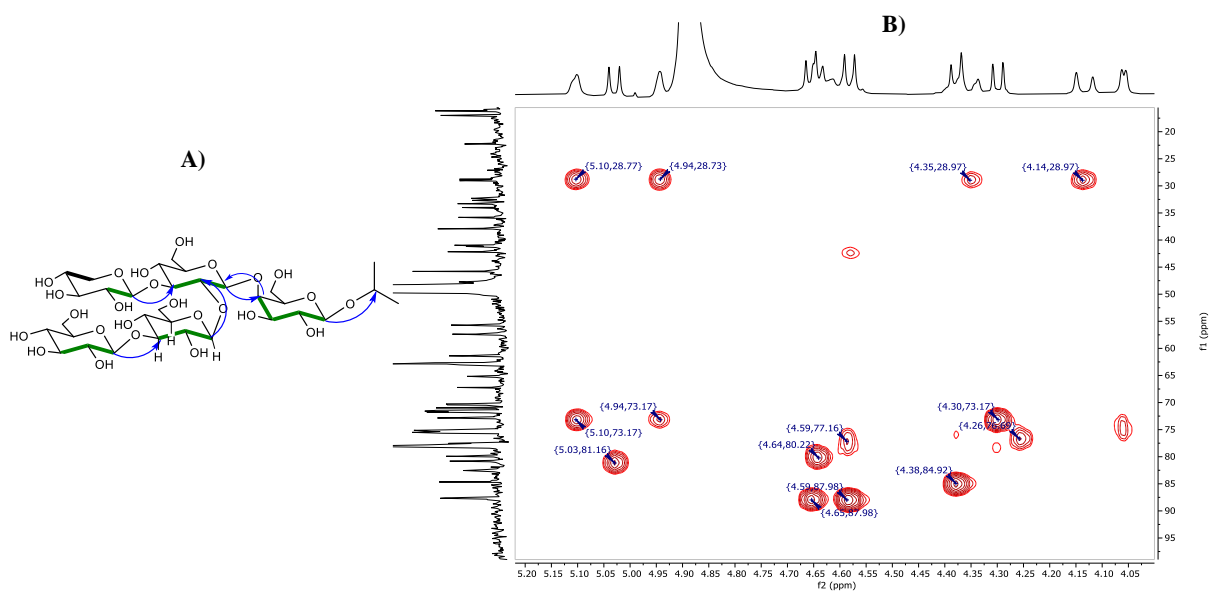
Un análisis cuidadoso de las correlaciones observadas en el espectro de NOESY (Figura 30) entre el protón anomérico H-1<sup>'''</sup> (δ<sub>H</sub> 5.03) con H-3<sup>'''</sup> (δ<sub>H/C</sub> 3.59/87.6) y H5<sup>'''</sup> (δ<sub>H/C</sub> 3.77/78.0), así como la ausencia de señales que indicaran la correlación con H-4<sup>'''</sup> (δ<sub>H</sub> 3.46) permitió establecer la orientación β del hidroxilo en C-4<sup>'''</sup> y confirmar la presencia de otra unidad de glucosa (Gluc II). Finalmente, la comparación con la información descrita en la literatura (Mimaki *et al.*, 2002; Yahara *et al.*, 1994; Maisashvili *et al.*, 2012; Fattorusso *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2012) y el análisis de los experimentos TOCSY y COSY se identificaron dos unidades más de glucosa, cuyos protones anoméricos se observan en δ<sub>H</sub> 4.58 (H-1<sup>''''</sup> Gluc III) y δ<sub>H</sub> 4.30 (H-1<sup>'''''</sup>, Gluc IV).



**Figura 30.** Vista parcial del espectro de NOESY del compuesto **129**.

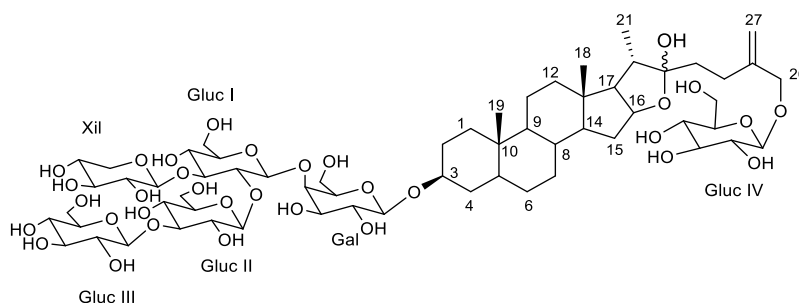
El análisis del espectro de HMBC (Figura 31) permitió establecer la secuencia y los sitios de enlace de las unidades glicosídicas, así como su unión con la aglicona. En primera instancia, las correlaciones entre las señales de  $\delta_{\text{H}}$  4.37 (C-1') con  $\delta_{\text{C}}$  84.7 (C-3 de la aglicona), sugirieron la presencia de un enlace *O*-glicosídico en C-3, y la correlación presente en el espectro NOESY del protón H-3 con H-5, sugieren la orientación  $\beta$  del residuo de glucosa. La correlación de las señales  $\delta_{\text{H}}$  4.37 (H-1'') con  $\delta_{\text{C}}$  79.9 (C-4') y  $\delta_{\text{H}}$  4.06 (H-4') con  $\delta_{\text{C}}$  104.43 (C-1'') establecieron la unión 1 $\rightarrow$ 4 entre una de las glucosas (Gluc I) y la galactosa. El protón anomérico (H-1''',  $\delta_{\text{H}}$  4.37) atribuido a la xilosa (Xil), mostró una correlación con el carbono C-3'' ( $\delta_{\text{C}}$  87.7) demostrando la unión 1 $\rightarrow$ 3 entre Xil y Gluc I. Otro de los protones anoméricos (H-1''',  $\delta_{\text{H}}$  4.37) que corresponde a la Gluc II también presentó una correlación con el carbono C-2'' ( $\delta_{\text{C}}$  80.8) de la Gluc I, estableciendo la unión 1 $\rightarrow$ 2 entre ambos azúcares. El hidrógeno anomérico de la glucosa IV mostró una correlación con  $\delta_{\text{C}}$  87.6 (C-3''') que permitió establecer la unión 1 $\rightarrow$ 2, entre la glucosa IV y la glucosa V. Finalmente la unión de la glucosa IV con la aglicona se estableció con la correlación observada en el experimento HMBC de la señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.30 (d,  $J = 7.8$  Hz) con el carbono C-26  $\delta_{\text{C}}$  72.8; todos estos resultados están

en armonía con los reportados para saponinas con un penta-sacárido de la misma naturaleza en la posición C-3 (Mosad et al., 2017, Ahmad *et al.*, 1995).



**Figura 31.** A) Principales correlaciones observadas en los espectros de HMBC y COSY. B) Vista parcial del espectro de HMBC del compuesto **129**.

Por lo tanto, el análisis de los datos en combinación con la comparación de los reportados en la literatura permiten proponer que la estructura del compuesto **129** es 26-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-22-hidroxifurost-25(27)-en-3-ol-(3 $\beta$  [(*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3))-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosil).



**Figura 32.** Estructura del compuesto **129**. 26-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-22-hidroxifurost-25(27)-en-3-ol (3 $\beta$  [(*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3))-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosil).

**Tabla 13.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) y RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) en CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> del compuesto **129**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J en Hz)	Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J en Hz)
1	37.9	1.99 (m) 0.95 (m)	26	72.8	4.12 (d, 12.48) 4.33 (d, 12.48)
2	32.3	1.74 (m) 1.35 (m)	27	113.6	5.11 (s a)
3	84.7	3.49 (m)			4.94 (s a)
4	32.7	1.99 (m)	Galactosa		
		1.26 (m)	1'	102.9	4.38 (d, 7.8)
5	45.8	1.19 (m)	2'	72.8	3.71(m)
		1.37 (m)	3'	75.1	3.59 (m)
6	29.1	1.23 (m)	4'	79.9	4.06 (da, 2.81)
		1.74 (m)	5'	75.7	3.56(m)
7	33.3	0.96 (m)	6'	61.3	3.69(m)
8	35.8	1.58 (m)			3.84(m)
9	55.7	0.76 (m)	Glucosa I		
10	37.9	-	1"	104.4	4.66 (d, 7.8)
		1.39 (m)	2"	80.8	3.76 (m)
11	22.3	1.57 (m)	3"	87.7	3.79 (d, 6.1)
		1.77 (m)	4"	70.4	3.29 (m)
12	41.0	1.19 (m)	5"	77.8	3.40 (m)
13	42.1	-	6"	62.6	3.14 (m)
14	57.3	1.16 (m)			3.41 (m)
		1.42 (m)	Xilosa		
15	34	1.43 (m)	1'''	104.9	4.66 (d, 7.8)
16	82.5	4.57 (m)	2'''	75.0	3.27 (m)
17	65.2	1.78 (m)	3'''	78.0	3.33 (m)
18	17	0.83 (s)	4'''	70.2	3.35 (m)
19	13.8	0.9 (s)	5'''	67.2	3.26 (m)
20	41.2	2.13 (m)			3.93 (m)
21	16.2	1.02 (d, 6.81)	Glucosa II		
22	112.3	-	1''''	103.7	5.03 (d, 7.8)
		1.84 (m)	2''''	75.3	3.43 (m)
23	32.7	1.79 (m)	3''''	87.6	3.59 (m)
		2.24 (m)	4''''	71.4	4.46 (m)
24	28.8	2.3 (m)	5''''	78.0	3.77 (m)
		-	6''''	62.9	3.14 (m)
25	147.2	-			3.41 (m)

**Tabla 13.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) y RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) en CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> del compuesto **129** (Cont.).

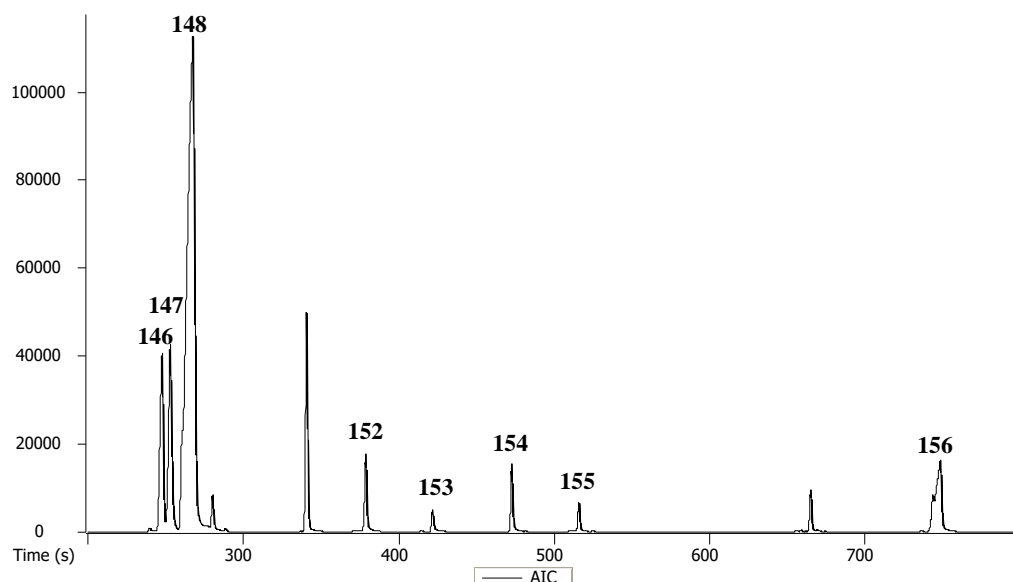
Posición	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H (J en Hz)	Posición	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H (J en Hz)
Glucosa III			Glucosa IV		
1''''	105.2	4.58 (d, 7.8)	1''''	103.3	4.30 (d, 7.8)
2''''	75.5	3.32 (m)	2''''	75.5	3.23 (m)
3''''	78.0	3.36 (m)	3''''	77.5	3.38 (m)
4''''	71.6	3.60 (m)	4''''	71.4	3.30 (m)
5''''	77.8	3.35 (m)	5''''	78.3	3.35 (m)
6''''	62.9	3.14 (m)	6''''	62.9	3.14 (m)
		3.41(m)			3.41 (m)

### 6.5.2 Determinación de compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de *C. dumetorum*

Como ya se indicó anteriormente, la composición química de las esencias de plantas medicinales se utiliza como pruebas de identidad. También recientemente el estudio de las esencias como fuente de productos biodinámicos ha adquirido gran auge en años recientes (Baptista-Silva *et al.*, 2020). Por lo tanto, en este caso también se estableció la composición química del aceite esencial de *C. dumetorum* por CG-EM. Los componentes se identificaron mediante el cálculo de sus índices de retención utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>27</sub>) y la comparación de los espectros de masas generados con aquellos reportados en la base de datos (NIST, diciembre 2005).

El análisis de los cromatogramas (Figura 33) permitió identificar ocho compuestos, mismos que representan el 91% de su composición (Tabla 14). La mayoría de los compuestos encontrados son productos de degradación de ácidos grasos, incluyendo *cis*-2-hexenal (**146**), *cis*-3-hexen-1-ol (**147**), *cis*-2-hexen-1-ol (**148**) y ácido *n*-hexadecanóico (**156**). Estos resultados son similares a los publicados por Gupta y colaboradores en 1954 y Collins en 1972, para las especies *C. nocturnum* y *C. diurnum*, respectivamente. Estos autores reportaron que las esencias contienen *trans*-2-hexenal y *cis*-3-hexen-1-ol. Estudios posteriores demostraron la presencia del alcohol bencílico y alcohol feniletílico en la esencia de *C. nocturnum* (Al-Reza *et al.*, 2009). Es importante destacar que este es el primer reporte

de la composición química de la esencia de *C. dumetorum*, y su establecimiento representa una prueba de identidad valiosa para el control de calidad de la especie.



**Figura 33.** Cromatograma iónico total del aceite esencial de las partes aéreas de *C. dumetorum*. *cis*-2-Hexenal (146), *cis*-3-hexen-1-ol (147), *cis*-2-hexen-1-ol (148), alcohol bencílico (152), alcohol feniletílico (153), 4-vinilfenol (154), 2-metoxi-4-vinilfenol (155), ácido *n*-hexadecanóico (156).

### 6.5.3 Determinación de compuestos volátiles de *C. dumetorum* por microextracción en fase sólida

De manera adicional se estudiaron los productos extraídos mediante la técnica de MEFS. El análisis se realizó con cuatro fibras de diferente polaridad (PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS) y 300 mg de material vegetal seco.

El análisis de los cromatogramas evidenció que las fibras de PDMS, PDMS/DVB y DVB/CAR/PDMS no son adecuadas para la determinación de volátiles en *C. dumetorum*, debido a que no se observó la presencia de compuestos en los cromatogramas. No obstante, la fibra de CAR/PDMS permitió establecer al *cis*-2-hexenal (48%) como el compuesto mayoritario.



**Tabla 14.** Constituyentes volátiles de *Cestrum dumetorum* identificados por CG-EM.

N°	Compuestos	$I_R^a$	$I_R^b$	Contenido (%)	
				AE	CAR/PDMS
146	<i>cis</i> -2-Hexenal	841	841	7.97	48.22
147	<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	848	851	6.79	-
148	<i>cis</i> -2-Hexen-1-ol	865	869	40.23	-
149	1-Hexanol	870	865	-	9.41
150	Aldehído sórbico	904	909	-	6.86
151	2-metil-1-hepten-6-ona	977	966	-	18.29
152	Alcohol bencílico	1021	1023	6.70	-
153	Alcohol feniletílico	1103	1114	2.87	-
154	4-Vinilfenol	1200	1211	6.09	-
155	2-Metoxi-4-vinilfenol	1300	1309	7.71	-
156	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	1955	1961	12.67	-
Total (%)				91.03	82.78

$I_R^a$ : índice de retención experimental en una columna DB-5 con referencia a *n*-alcanos.  $I_R^b$ : índice de retención reportado en la literatura en una columna DB-5.

## 6.6 Estudio farmacológico de la especie *Cestrum dumetorum*

### 6.6.1 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso

El uso recurrente de *C. dumetorum* permite suponer que la planta carece de efectos tóxicos. Sin embargo, es necesario establecer mediante métodos apropiados la seguridad preclínica y clínica de las especies. En este caso se estableció la seguridad de *C. dumetorum* mediante la determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso (EACD), siguiendo el método descrito por Lorke (1983), que permite la obtención de resultados reproducibles. El ensayo se realizó en dos etapas independientes, ambas con ratones macho de la cepa ICR. En la primera etapa los animales se trataron con 10, 100, y 1000 mg/kg de EACD y solución salina isotónica como vehículo; en la segunda etapa los ratones recibieron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg del mismo tratamiento. Al término del ensayo, los animales

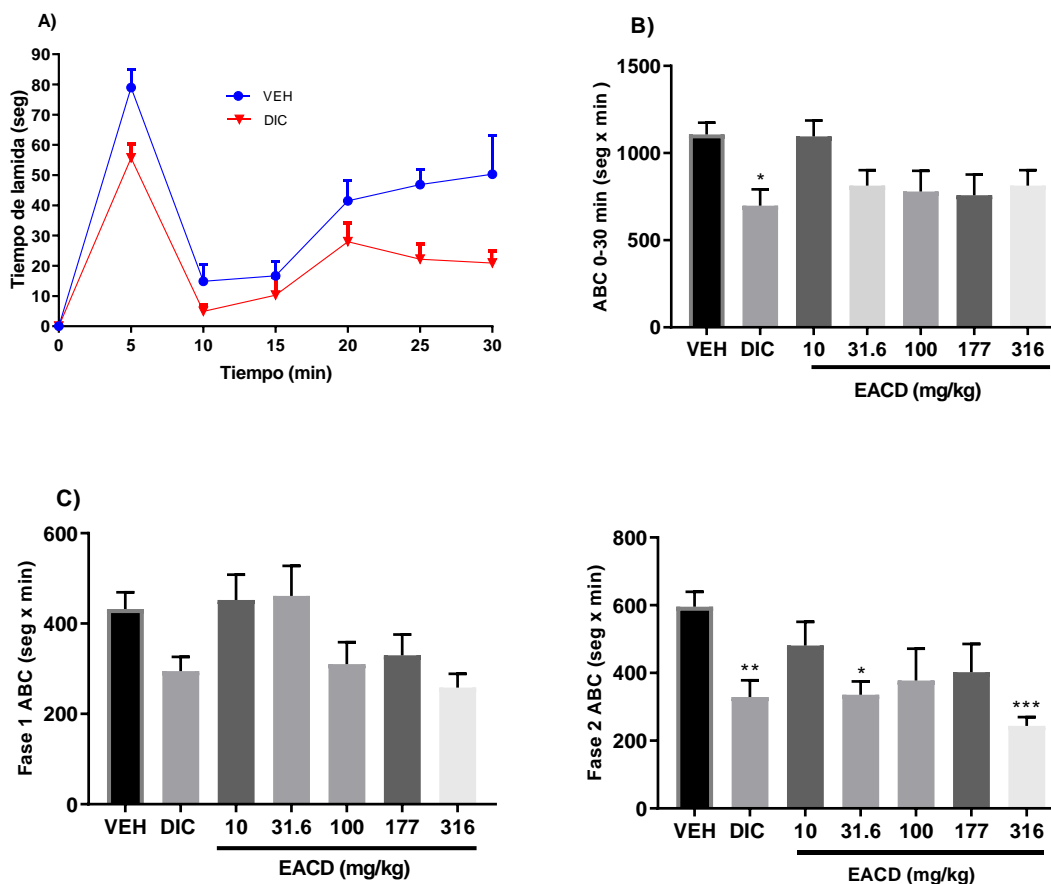
sobrevivientes se sacrificaron y se procedió a la obtención de corazón, hígado, pulmones y riñones para un análisis macroscópico en busca de lesiones. Los resultados obtenidos (Tabla 16), permitieron proponer que la DL<sub>50</sub> del preparado tradicional es mayor a 5 g/kg, ya que a dosis analizadas no se observó la muerte de ninguno de los animales. Entonces el preparado tradicional de la planta es inocuo para ratones y no produce efectos tóxicos aún en dosis elevadas.

**Tabla 15.** Toxicidad aguda del extracto acuoso de *Cestrum dumetorum*.

Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/3	1500	0/3
100	0/3	2600	0/3
1000	0/3	5000	0/3

### 6.6.2 Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto acuoso de *C. dumetorum*

El uso tradicional de *C. dumetorum* para el tratamiento de padecimientos dolorosos e inflamatorios, llevó a establecer el potencial antinociceptivo de la especie, mediante el modelo de formalina previamente descrito en la sección 6.3.1. En la Figura 34 se observa que la administración de formalina (2%, 30  $\mu$ L, *i.pl.*) a ratones pretratados con el vehículo (VEH, NaCl 0.9%), incremento en el ABC del tiempo de lamida de la pata tratada. Sin embargo, en los animales pretratados con el extracto acuoso de *C. dumetorum* (10–316 mg/kg) se observó una reducción significativa de la respuesta al estímulo nociceptivo. Este efecto se registró únicamente durante la segunda fase del ensayo en las dosis de 31.6 y 316 mg/kg y fue comparable con el efecto generado por el control positivo (DIC, 50 mg/kg). En consecuencia, la decocción posee propiedades antinociceptivas en la fase inflamatoria y debe contener sustancias que modulen la producción o liberación de los medidores inflamatorios implicados en la segunda fase de la prueba de la formalina.



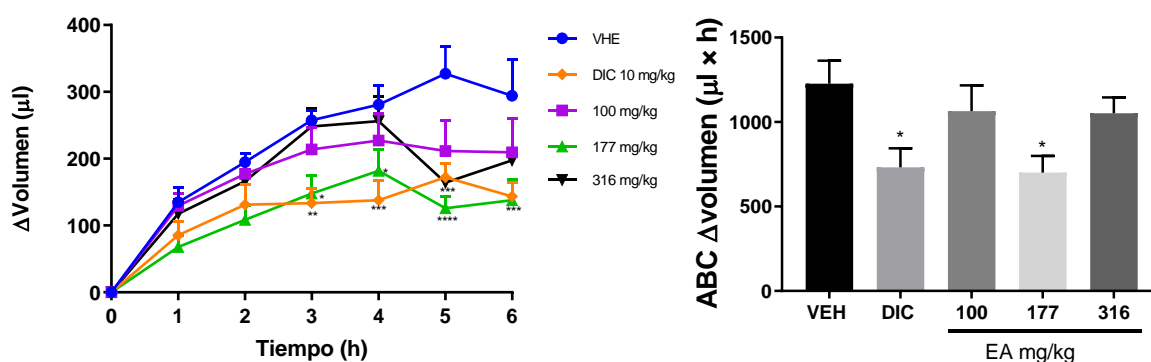
**Figura 34.** A) Curso temporal del vehículo y el control positivo en el modelo de formalina, cada punto representa el promedio del tiempo de lamida  $\pm$  EEM  $n=6$ . B) ABC total de todos los tratamientos. VEH, (vehículo); DIC (50 mg/kg, control positivo). C) ABC de la primera y la segunda fase del modelo. VEH, (vehículo); DIC (50 mg/kg, control positivo). Cada barra es el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra tiempo)  $\pm$  EEM de  $n=6$ . ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, \* $p=0.05$ , \*\*  $p=0.01$ , \*\*\*  $p=0.001$  en comparación con el grupo VEH.

### 6.6.3 Determinación del potencial antiinflamatorio del extracto acuoso de *C. dumetorum*

Derivado de los resultados obtenidos en el ensayo de la formalina, se procedió a determinar el efecto antiinflamatorio observado durante la segunda fase de la prueba, mediante la evaluación del potencial antiinflamatorio del extracto acuoso *C. dumetorum*, empleando el modelo de edema inducido por carragenina, descrito por Morris (2003). Ya se comentó que este modelo es ampliamente utilizado en la evaluación de compuestos potencialmente antiinflamatorios y los mecanismos implicados en la inflamación. El desarrollo de edema en la pata trasera de la rata después de la inyección de carragenina se ha descrito como un evento

bifásico en el que varios mediadores operan en secuencia para producir la respuesta inflamatoria. La primera fase se presenta entre las 0 y 2.5 h después de la administración de carragenina y su regulación se atribuye a la acción de histamina, serotonina y bradicinina. La segunda fase ocurre entre las 2.5 y 6 h posteriores, y es caracterizada por la generación de radicales libres, óxido nítrico (NO), prostaglandinas y la expresión de la enzima COX-2 (Necas y Bartosikova, 2013).

La administración intraplantar de 100  $\mu$ L de una solución de carragenina al 1% a ratas Wistar (160-180 g), pretratadas con el vehículo (VEH, NaCl 0.9%), produjo un edema en la pata tratada, alcanzando su punto máximo a las 5 horas (Figura 35). Los volúmenes de la pata se midieron con ayuda de un pletismómetro a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h) posterior a la administración de la carragenina. Sin embargo, cuando los animales fueron administrados con el EA (100–316 mg/kg), el tamaño del edema se redujo significativamente. Se observó una reducción del 42% a la dosis de 177 mg/kg efecto comparable al generado por la administración de DIC (40%, 10 mg/kg). Estos resultados y los obtenidos en el ensayo de formalina sugieren que la respuesta antiinflamatoria puede estar mediada por una inhibición de la síntesis o liberación de prostaglandinas, o la expresión de la COX-2.



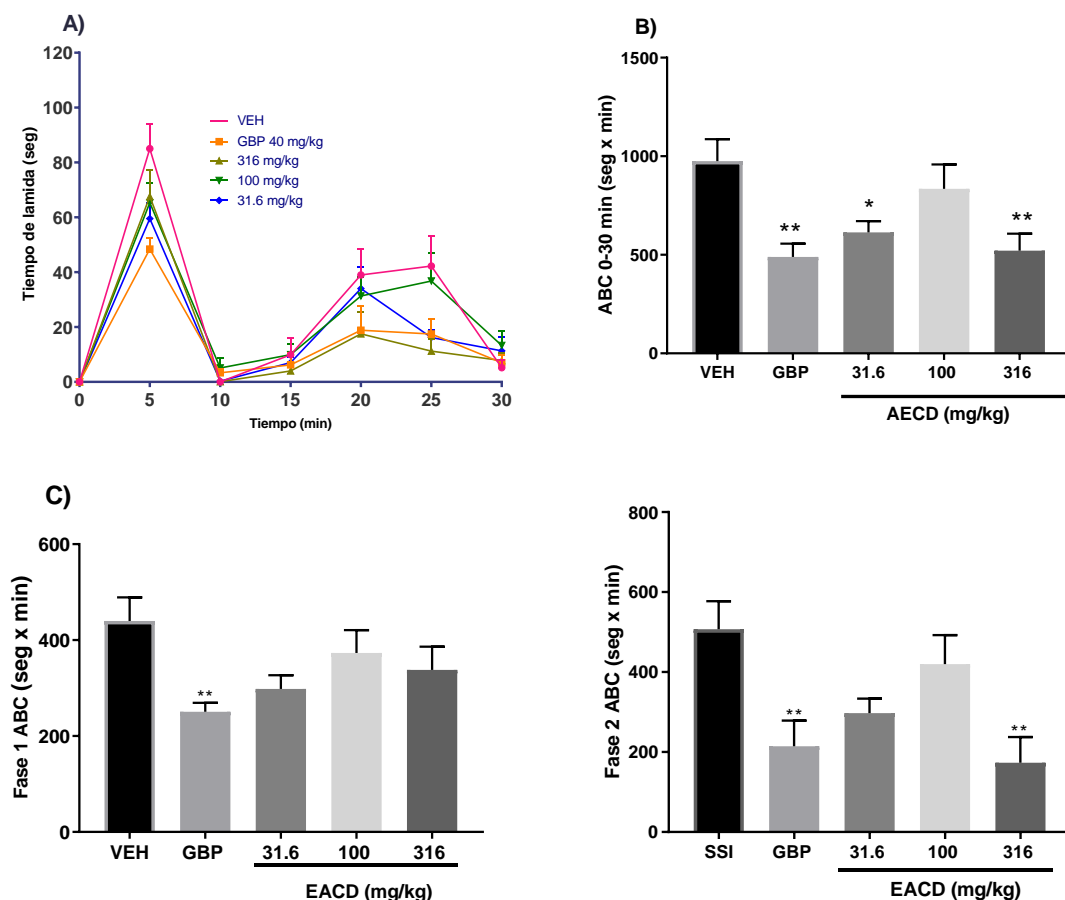
**Figura 35. A)** Curso temporal del potencial antiinflamatorio de EA de *C. dumetorum* en la prueba edema inducido por carragenina. **B)** ABC total del potencial antiinflamatorio. VEH, (vehículo); DIC (10 mg/kg, control positivo) Cada punto en la gráfica representa la media  $\pm$  EEM de  $n=6$ . ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, \* $p=0.05$ , \*\*  $p=0.01$ , \*\*\*  $p=0.001$  en comparación con el grupo VEH.

El potencial antinociceptivo y antiinflamatorio de *C. dumetorum* es congruente con la composición química del extracto acuoso ya que en diversas publicaciones se evidencian la acción antinociceptiva y antiinflamatoria, *in vivo* e *in vitro*, de los flavonoides hiperósido e isoquercetrina (Raza *et al.*, 2017). De la misma manera algunas saponinas de tipo furostanol presentan propiedades antiinflamatorias (Lee *et al.*, 2014).

#### **6.6.4 Evaluación del potencial antihiperalgésico del extracto acuoso de *C. dumetorum***

Con el propósito de abordar de manera más amplia el potencial analgésico de *C. dumetorum*, se analizó el efecto antihiperalgésico potencial del preparado tradicional, mediante el modelo de formalina en ratones hiperglucémicos (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015). Los ratones hiperglucémicos (glucemia  $410.23 \pm 25.78$ ) desarrollaron hiperalgnesia tras 14 días de un tratamiento con NA-STZ (50-130 mg/kg, *i.p.*). Esta condición de hiperalgnesia se establece analizando el incremento significativo en el tiempo de lamida, en comparación con aquel en ratones normoglucémicos tratados con una solución de formalina de mayor concentración (2%, 30  $\mu$ L, *i.pl.*). Ambos grupos fueron administrados con el vehículo (VEH, NaCl 0.9%). En los animales tratados con EA (316 mg/kg), se observó una reducción significativa de la respuesta al estímulo químico, este efecto se registró únicamente durante la segunda fase del experimento a las dosis de 316 mg/kg. El efecto antihiperalgésico de EA (316 mg/kg) fue comparable al generado por el control positivo (gabapentina 40 mg/kg; Figura 36).

Estos resultados vislumbran el potencial de esta especie para el tratamiento de dolor neuropático, una complicación frecuente en padecimientos como la diabetes y otras enfermedades.



**Figura 36.** A) Curso temporal del efecto antihiperalgésico de EA de *C. dumetorum*, cada punto representa el promedio del tiempo de lamida  $\pm$  EEM  $n=6$ . B) ABC total de todos los tratamientos. C) ABC de la primera y la segunda fase del modelo. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); Gabapentina (40 mg/kg, control positivo). Cada barra es el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra tiempo)  $\pm$  EEM de  $n=6$ , ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, \* $p=0.05$ , \*\*  $p=0.01$ , \*\*\*  $p=0.001$  en comparación con el grupo VEH.

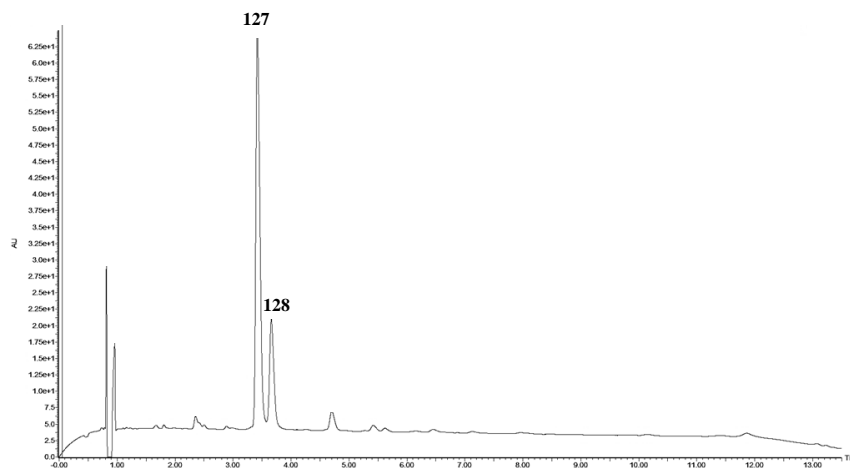
## 6.7 Pruebas de composición de la especie *Cestrum dumetorum*

### 6.7.1 Establecimiento del perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso

Previamente en la sección 6.4.1 se describieron las ventajas de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para el establecimiento de las pruebas de identidad y composición de las drogas crudas, en este contexto, se desarrolló el perfil cromatográfico de la fracción soluble del extracto acuoso de *C. dumetorum* mediante Cromatografía de Líquidos

de Ultra Eficiencia (CLUE), que es considerada una técnica que mejora notablemente la sensibilidad, resolución y el tiempo de análisis con respecto a la CLAE.

Para el desarrollo del perfil cromatográfico se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas para la resolución y cuantificación de los dos metabolitos mayoritarios de la fracción de AcOEt del extracto acuoso. Como fase estacionaria se utilizó una columna BEH® C<sub>18</sub> y como sistema de elución un gradiente de ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico), la velocidad de flujo se estableció a 0.3 mL/min. Los flavonoides hiperósido (**127**) e isoquercetrina (**128**) se identificaron en el perfil cromatográfico por sus tiempos de retención y los valores *m/z* de los iones correspondientes [M-H]<sup>-</sup> 463.69. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 37.



**Figura 37.** Cromatograma por CLUE de la fracción soluble del extracto acuoso de *C. dumetorum*. Columna BEH® C<sub>18</sub>; fase móvil: ACN (A)-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico; B) (15% A): [0-10 min (20% A); 10-12 min (30% A); 12-13 min (100% A); 13.1-14.50 min (15% A)]. Velocidad de flujo 0.3 mL/min. Tiempos de retención [**127** (*t<sub>R</sub>* = 3.41 min); **128** (*t<sub>R</sub>* = 3.65 min)].

### 6.7.2 Validación del método analítico

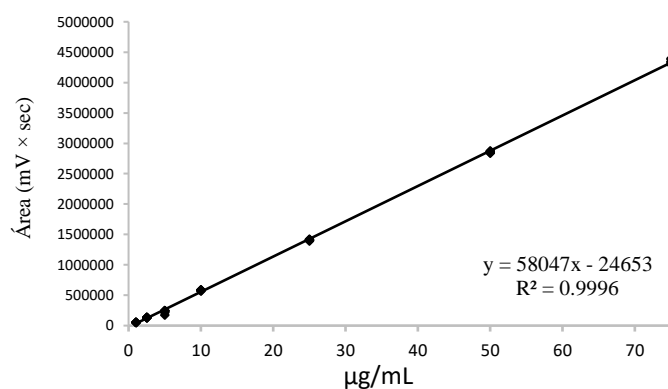
Una vez establecido el perfil cromatográfico por CLUE se procedió a la validación del método analítico. Como se mencionó previamente en el apartado 6.4.2 para validar un método es necesario generar la información que demuestre científicamente que dicho método cumple con las características de desempeño aprobadas por las Guías de Validación de la FDA (ICH Q2 (R1), 2005).

### 6.7.2.1 Linealidad del sistema

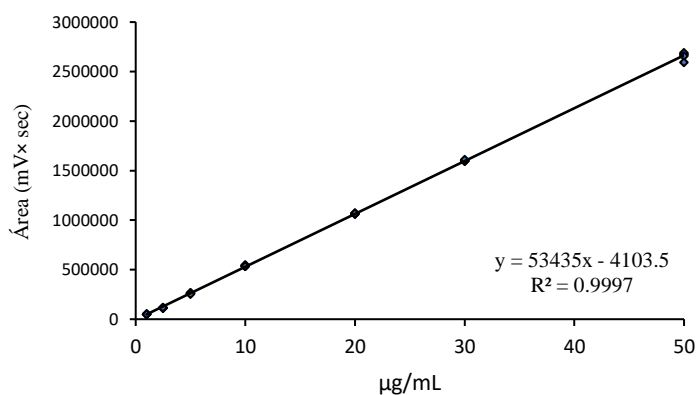
La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración para cada analito (**127** y **126**). La respuesta analítica se determinó midiendo el ABC de los picos cromatográficos registrados en UV. En la Tabla 16 y en las Figuras 38-39 se muestran los resultados.

**Tabla 16.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema. Detector UV.

Estadístico	127	128
( $b_1$ )	58046.6	53435.1
( $b_0$ )	-24652.8	-4103.5
( $R$ )	0.9998	0.9999
( $R^2$ )	0.9996	0.9997
[IC( $\beta_1$ )]	57689.4-58403.9	53142.4- 53727.8



**Figura 38.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto **127**.



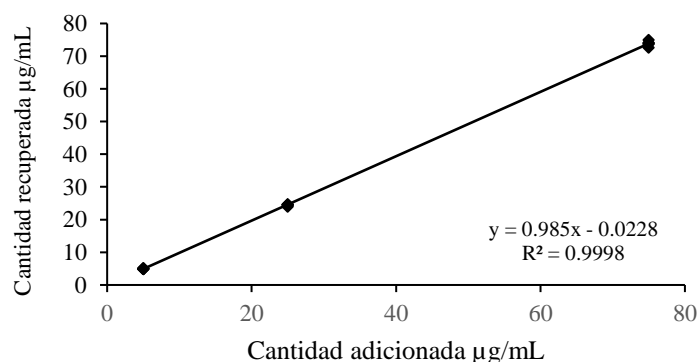
**Figura 39.** Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto **128**.



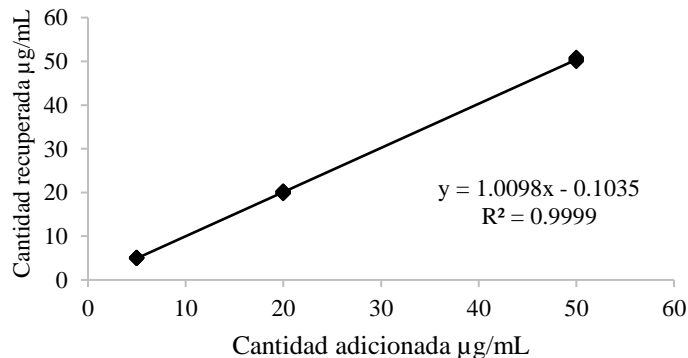
Como puede observarse los valores de R y  $R^2$  de las curvas de los dos analitos con se encuentran dentro de los límites establecidos según la ICH (Anexo 3), por lo que se puede concluir que la linealidad del sistema se cumple para los dos analitos dentro del rango de concentraciones analizadas y tomando en cuenta la respuesta analítica de los dos detectores.

### 6.7.2.2 Linealidad del método y exactitud

Para evaluar la linealidad del método se realizaron curvas de calibración para cada analito (**127** y **128**) recuperados de la matriz de trabajo. La respuesta de la cantidad recuperada para cada analito se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz de trabajo sin adición de ningún analito. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de la respuesta analítica y los análisis de regresión lineal, y en las Figuras 40 y 41 se muestran las curvas de calibración de los analitos. Estos resultados demuestran que el método es lineal cuando se utiliza el detector PDA y que el recobro de ambos analitos usando los datos de UV se encuentran dentro del rango 98-102%, con valores de CV por debajo del 2%.



**Figura 40.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto **127**.



**Figura 41.** Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto **128**.

**Tabla 17** Parámetros estadísticos de la linealidad del método y porcentajes de recobro.

Analito	Intervalo de trabajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecuación	$R^2$	IC del intercepto 95%	% Recobro
127	5 – 75	$y = 0.985x - 0.0228$	0.9998	-0.3449 – 0.3868	98.80
128	5 – 50	$y = 1.0098x - 0.1035$	0.9999	-0.09558 – 0.3068	100.29

### 6.7.2.3 Precisión

La precisión del método se determinó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Ambas se establecieron mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida. El análisis de la precisión intermedia se efectuó en dos días diferentes. Los resultados (Tabla 18) se expresan en términos del coeficiente de variación (CV) y demuestran que el método es preciso ya que en todas las determinaciones realizadas el CV calculado es menor al 2%.

**Tabla 18** Evaluación de la precisión.

Analito	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)
127	50	0.47	1.33
128	30	0.02	0.03

### 6.7.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación

Para establecer el límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD) se siguió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.4. Se realizaron curvas de calibración de cada analito en un intervalo de concentraciones de 0.25 a 2.5  $\mu\text{g/mL}$ ; en la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 19.** Límites de detección y límites de cuantificación de los analitos.

Analito	S	LC ( $\mu\text{g/mL}$ )	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )
127	1391	0.26	0.08
128	2145	0.40	0.13

### 6.7.2.5 Cuantificación de metabolitos presentes en la fracción de AcOEt del extracto acuoso de *C. dumetorum*

El método analítico validado se aplicó para cuantificar el contenido de flavonoides en tres extractos preparados de manera independiente y bajo las mismas condiciones, de cuatro muestras de *C. dumetorum* (CD-FA1, CD-FA2, CD-FA3 y CD-FA4) el CV de cada pico fue  $\leq 2\%$ . La concentración de los compuestos **128** y **127** se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en las ecuaciones de la recta descritas para la linealidad del sistema [ $y = 58047x - 24653$  (**127**);  $y = 53435x - 4103.5$  (**128**)]. El hiperósido (**127**) resultó ser el compuesto mayoritario en todas las muestras analizadas (Tabla 20). Las diferencias encontradas en la composición de las muestras analizadas pueden deberse a variaciones estacionales ya que las muestras fueron recolectadas en diferentes meses del año.

**Tabla 20.** Contenido ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en cuatro muestras de *C.dumetotum*

Compuesto	$T_R$ (min)	Contenido ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
		CD-FA1	CD-FA2	CD-FA3	CD-FA4
<b>127</b>	6	$37.9 \pm 3.4$	$39.7 \pm 1.7$	$29.3 \pm 1.8$	$33.9 \pm 2.1$
<b>128</b>	14.6	$52.4 \pm 1.4$	$61.5 \pm 4.5$	$58.8 \pm 3.4$	$53.1 \pm 1.4$

## 7 CONCLUSIONES

- Los estudios de toxicidad aguda en ratones indicaron que la DL<sub>50</sub> de la decocción de *C. dumetorum* es mayor a 5 g/kg, por lo que no se considera tóxica para roedores tras una única administración. Evidentemente estos estudios deben completarse con estudios de toxicidad crónica, y de ser posible clínica.
- Se estableció la eficacia de la decocción de *C. dumetorum* como agente antinociceptivo, antihiperalgésico y antiinflamatorio mediante los modelos de formalina y edema inducido por carragenina, respectivamente. Los resultados proporcionan evidencias experimentales que correlacionan con los usos populares de la planta.
- El estudio químico de *C. dumetorum* permitió el aislamiento y caracterización de los flavonoides hiperósido (**127**) e isoquercetrina (**128**), así como de un compuesto de tipo furostanol. Este es el primer estudio químico que se realiza a la especie. La composición química encontrada correlaciona con las actividades biológicas, respondiendo a la hipótesis original formulada.
- El análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial de *C. dumetorum* permitió identificar como constituyentes mayoritarios al *cis*-3-hexaen-1-ol y *cis*-2-hexaen-1-ol. Estos resultados concuerdan con los encontrados en las únicas dos especies del género *Cestrum* analizadas por su contenido de volátiles.
- Se estableció el potencial antinociceptivo del extracto acuoso y aceite esencial de *B. heterophylla* mediante el modelo de formalina. Estas acciones pueden estar vinculadas con el uso popular de la especie para tratar torceduras y contusiones.
- El estudio químico realizado al extracto acuoso de *B. heterophylla* permitió la caracterización de ocho compuestos: ácido clorogénico (**103**), ácido 3-4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**104**), ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**), ácido 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**106**), éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**125**), apigenina (**97**), genkwanina (**113**) y acacetina (**126**). Estos productos poseen propiedades antinociceptivas bien conocidas.

- El análisis del aceite esencial de *B. heterophylla* permitió identificar como constituyentes mayoritarios al  $\beta$ -pineno, mirceno y D-limoneno. De manera complementaria, el análisis de los componentes volátiles por microextracción en fase sólida permitió establecer que los compuestos presentes son monoterpenos  $\beta$ -pineno, mirceno, cedreno y  $\beta$ -cariofileno. De nueva cuenta la composición química correlaciona con los efectos farmacológicos encontrados.
- Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar el contenido de ácido clorogénico y ácidos di-cafeoilquínicos presentes en *B. heterophylla*, este método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas. De igual forma se desarrolló un método con las mismas características para cuantificar hiperósido e isoquercetrina en *C. dumetorum*.
- Los resultados generados sobre la seguridad, eficacia, identidad y la composición de las drogas crudas de *C. dumetorum* y *B. heterophylla* aportan información científica para el uso racional y aseguramiento de la calidad, útiles en la generación de sus monografías tipo OMS y farmacopéica.
- El presente trabajo respondió a las hipótesis planteadas, y atendió al llamado de la OMS a través del documento “Estrategia Sobre Medicina Tradicional 2014-2023” para que se estudien de manera integral los recursos medicinales tradicionales. La división de medicina tradicional de la Secretaría de Salud tiene ahora la obligación de revisar tesis y publicaciones que respondan al llamado de la OMS para proporcionar a la población directrices a seguir en materia de uso de remedios tradicionales.

## 8 PERSPECTIVAS

- Complementar el estudio etnobotánico de ambas especies, mediante entrevistas a los pobladores de Capulálpam de Méndez.
- Obtener los metabolitos minoritarios de la infusión de *B. heterophylla*.
- Determinar el efecto antinociceptivo de los compuestos **104**, **105**, **106** y **97** así como los posibles mecanismos de acción subyacentes.
- Continuar con el estudio fitoquímico de *C. duemetorum*.
- Evaluar el potencial antinociceptivo y antiinflamatorio del compuesto **129**.

## 9 REFERENCIAS

- Abad, M. J., Bermejo, P. (2007). *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(1), 76-96.
- Abdel Motaal, A., Ezzat, S. M., Tadros, M. G., El-Askary, H. I. (2016). In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2864-2870.
- Aboy, A. L., Apel, M. A., Debenedetti, S., Francescato, L., Rosella, M. A., Henriques, A. T. (2012). Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1219, 147-153.
- Ahmad, V. U., Baqai, F. T., Ahmad, R. (1993). A tigogenin pentasaccharide from *Cestrum diurnum*. *Phytochemistry*, 34(2), 511-515.
- Ahmad, V. U., Baqai, F. T., Ahmad, R. (1995). A diosgenin tetrasaccharide from *Cestrum nocturnum*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 50(7), 11042-1110.
- Ahmad, V. U., Baqai, F. T., Fatima, I., Ahmad, R. (1991). A spirostanol glycoside from *Cestrum nocturnum*. *Phytochemistry*, 30(9), 3057-3061.
- Alonso-Castro, A. J., Maldonado-Miranda, J. J., Zarate-Martinez, A., del Rosario Jacobo-Salcedo, M., Fernández-Galicia, C., Figueroa-Zuñiga, L. A., Carranza-Alvarez, C. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of ethnopharmacology*, 143(1), 292-298.
- Al-Reza, S. M., Rahman, A., Kang, S. C. (2009). Chemical composition and inhibitory effect of essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. on food-borne pathogens. *International journal of food science & technology*, 44(6), 1176-1182.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of ethnopharmacology*, 122(1), 163-171.
- Argueta, V.A., Cano, L., Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas Medicinales Tradicionales Mexicanas. Instituto Nacional Indigenista. México, D. F.
- Arrazola-Guendulay, A. A., Hernández-Santiago, E., Rodríguez-Ortiz, G. (2018). Conocimiento tradicional de plantas silvestres en una comunidad de los valles centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(1), 55-78.
- Arriaga-Giner, F. J., Wollenweber, E., Schober, I., Dostal, P., Braunt, S. (1986). 2 $\beta$ -Hydroxyhauriwaic acid, a clerodane type diterpenoid and other terpenoids from three *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 25(3), 719-721.

- Ascari, J., de Oliveira, M. S., Nunes, D. S., Granato, D., Scharf, D. R., Simionatto, E., Otuki, M., Soley, B., Heiden, G. (2019). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 234, 1-7.
- Avijit, M., Bhatt, A., Bonde, V. A., Shaikh, A., y Rupa, M. (2009). Screening of the leaves of *cestrum nocturnum* for its antipyretic. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 13, 36-40.
- Backhouse, N., Delporte, C., Negrete, R., Salinas, P., Pinto, A., Aravena, S., Cassels, B. K. (1996). Antiinflammatory and Antipyretic Activities of *Cuscuta chilensis*, *Cestrum parqui*, and *Psoralea glandulosa*. *International journal of pharmacognosy*, 34(1), 53-57.
- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., Sarmiento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(4), 279-295.
- Baqai, F. T., Ali, A., Ahmad, V. U. (2001). Two new spirostanol glycosides from *Cestrum parqui*. *Helvetica Chimica Acta*, 84(11), 3350-3356.
- Begum, A. S., Goyal, M. (2007). Phcog Mag. Review Article Research and Medicinal Potential of the genus *Cestrum* (Solanaceae) A Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(2).
- Bello-González, M. Á., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez, M., Nieves, B., Salgado-Garciglia, R. (2015). Plantas útiles de la comunidad indígena nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, (39), 175-215.
- Bhattacharjee, I., Ghosh, A., Chandra, G. (2005). Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum diurnum* (L.) (Solanales: Solanaceae). *African Journal of Biotechnology*, 4(4), 371-374.
- Boller, S., Soldi, C., Marques, M. C., Santos, E. P., Cabrini, D. A., Pizzolatti, M. G., Zampronio, A. R., Otuki, M. F. (2010). Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *Journal of ethnopharmacology*, 130(2), 262-266.
- Bonin, E., Carvalho, V. M., Avila, V. D., dos Santos, N. C. A., Benassi-Zanqueta, É., Lancheros, C. A. C., Prado, I. N. (2020). *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. *LWT*, 120, 108920.
- Budel, J. M., Matzenbacher, N. I., Duarte, M. R. (2008). Genus *Baccharis* (Asteraceae): a review of chemical and pharmacological studies. *Phytopharmacology and therapeutic values III*, 1-18.



- Búfalo, M. C., Candeias, J. M. G., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., Sforcin, J. M. (2010). In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. *Natural product research*, 24(18), 1710-1718.
- Campos-Navarro., Peña-Sánchez, E. Y., Maya, A. P. (2017). Aproximación crítica a las políticas públicas en salud indígena, medicina tradicional e interculturalidad en México (1990-2016). *Salud colectiva*, 13, 443-455.
- Cañigüeral, S., Vila, R. (2005). La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 6, 43–51.
- Casas, A., Blancas, J., Lira, R. (2016). Mexican ethnobotany: interactions of people and plants in Mesoamerica. In *Ethnobotany of Mexico*. Springer, New York, NY.
- Centeno, P., Arriaga, S. (2010). Uso y aprovechamiento de fauna silvestre en comunidades del Parque Estatal de La Sierra, Tabasco, México. Uso y manejo de la fauna silvestre en el norte de Mesoamérica. Veracruz: Secretaría de Educación del Gobierno del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave, 213-78.
- Cervantes, L., Gutiérrez, J. V. (1990). Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, 60, 85-103.
- Chakravarti, R. N., Datta, S., Mitra, M. N. (1964). Tigogenin and ursolic acid from *Cestrum diurnum* Linn. *Experientia*, 20(4), 200-200.
- Choi, M. Y., Park, H. J. (2007). Antinociceptive effects of 3, 4-Dicaffeoyl Quinic acid of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. *Korean Journal of Plant Resources*, 20(3), 221-225.
- Chua, L. Y., Chong, C. H., Chua, B. L., Figiel, A. (2019). Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 12(3), 450-476.
- Cifuentes, D. A., Simirgiotis, M. J., Favier, L. S., Rotelli, A. E., Pelzer, L. E. (2001). Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. *Phytotherapy Research*, 15(6), 529-531.
- Collins, R. P., Halim, A. F. (1972). Chemical examination of the essential oil from flowers of *Cestrum nocturnum* Linn. and *Cestrum diurnum* Linn. *Flavour industry*, 3(3), 159-60.
- Cruz-Pérez A. L., Barrera-Ramos J., Bernal-Ramírez L. A., Bravo-Avilez. D., Rendón-Aguilar B. (2021). Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17, 7.
- D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Natale, A., Oriano, P., Zarrelli, A. (2005). Structural characterization of phytotoxic terpenoids from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry*, 66(22), 2681-2688.

- D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Oriano, P., Temussi, F. (2004). Structure elucidation and phytotoxicity of C13nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry*, 65(4), 497-505.
- D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Zarrelli, A. (2004). Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum parqui*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4101-4108.
- Dawidowicz, A. L., Szewczyk, J., Dybowski, M. P. (2016). Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials. *Talanta*, 146, 195-202.
- de Almeida, N. S., Ferraz, A. D. B. F., Pedron, C., Correa, D. S., Vieira, L. B., Antunes, F. T. T., de Souza, A. H. (2021). *Baccharis trimera* aqueous extract modulates inflammation and nociception in mice. *Clinical Phytoscience*, 7(1), 1-10.
- de Madureira, M. D. C., Martins, A. P., Gomes, M., Paiva, J., da Cunha, A. P., do Rosário, V. (2002). Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 23-29.
- de Oliveira, S. Q., Dal-Pizzol, F., Moreira, J. C., Schenkel, E. P., Gosmann, G. (2004). Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23, 365-368.
- De la Cruz, H., Vilcapoma, G., Zevallos, P. A. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 284-294.
- Delgado, G. A. G., Ravina, L. M. M., Marbán, M. A., Solares, G. A. A. (2018). La medicina tradicional como impulsora del turismo de salud. *PODIUM Sport, Leisure and Tourism Review*, 7(3), 402-414.
- dos Santos, D. A., Fukui, M. D. J., Nanayakkara, N. D., Khan, S. I., Sousa, J. P., Bastos, J. K., Andrade, S. F., da Silva, F. A. A., Quintão, N. L. (2010). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *Journal of ethnopharmacology*, 127(2), 543-550.
- Dos Santos, M. D., Gobbo-Neto, L., Albarella, L., de Souza, G. E. P., Lopes, N. P. (2005). Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 545-549.
- Dubuisson, D., Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4, 161-174.
- Fattorusso, E., Lanzotti, V., Tagliatalata-Scafati, O., Di Rosa, M., Ianaro, A. (2000). Cytotoxic saponins from bulbs of *Allium porrum* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3455-3462.

- Fiorentino, A., DellaGreca, M., D'Abrosca, B., Oriano, P., Golino, A., Izzo, A., Zarrelli, A., Monaco, P. (2007). Lignans, neolignans and sesquilignans from *Cestrum parqui* l'Her. *Biochemical systematics and ecology*, 35(6), 392-396.
- Florão, A., Budel, J. M., Duarte, M. D. R., Marcondes, A., Rodrigues, R. A. F., Rodrigues, M. V. N., Weffort-Santos, A. M. (2012). Essential oils from *Baccharis species* (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. *Journal of Essential Oil Research*, 24(6), 561-570.
- Fouad, M. A., Mohamed, K. M., Kamel, M. S., Matsunami, K., Otsuka, H. (2008). Cesdiurins I–III, steroidal saponins from *Cestrum diurnum* L. *Journal of natural medicines*, 62(2), 168-173.
- Freire, S. E., Urtubey, E., Giuliano, D. A. (2007). Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*, 29(1), 23-38.
- Funes, M., Garro, M. F., Tosso, R. D., Maria, A. O., Saad, J. R., Enriz, R. D. (2018). Antinociceptive effect of neo-clerodane diterpenes obtained from *Baccharis flabellata*. *Fitoterapia*, 130, 94-99.
- Gene, R. M., Cartañá, C., Adzet, T., Marín, E., Parella, T., Canigüeral, S. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta medica*, 62(03), 232-235.
- Global Biodiversity Information Facility (2021). Obtenido de <https://www.gbif.org/species/7300199>.
- Global Biodiversity Information Facility (2021). Obtenido de <https://www.gbif.org/species/7418178>.
- Gómez, J., Simirgiotis, M. J., Lima, B., Paredes, J. D., Villegas Gabutti, C. M., Gamarra-Luques, C., Bórquez, J., Luna, L., Wendel, G. H., Maria, A. O., Feresin, G. E., Tapia, A. (2019). Antioxidant, gastroprotective, cytotoxic activities and UHPLC PDA-Q orbitrap mass spectrometry identification of metabolites in *Baccharis grisebachii* decoction. *Molecules*, 24(6), 1085.
- Gong, F., Liang, Y. Z., Xie, P. S., Chau, F. T. (2003). Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *Journal of Chromatography A*, 1002(1-2), 25-40.
- Grecco, S. D. S., Ferreira, M. J., Romoff, P., Favero, O. A., Lago, J. H. G. (2012). Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 42, 21-24.
- Gupta, G. N., Chandra, G., Nautiyal, K. N. (1954). Chemical examination of some new Indian essential oils. *Perf. Ess. Oil Rec*, 80-84.

- Guzmán-Rosas, S. C., Kleiche-Dray, M. (2017). La inclusión del conocimiento tradicional indígena en las políticas públicas del Estado mexicano. *Gestión y política pública*, 26(2), 297-339.
- Haraguchi, M., Mimaki, Y., Motidome, M., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., Yokosuka, A., Sashida, Y. (2000). Steroidal saponins from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*. *Phytochemistry*, 55 (7), 715-720.
- Haraguchi, M., Motidome, M., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., Mimaki, Y., Sashida, Y. (1999). New polyhydroxylated steroidal saponin and saponin from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 47(4), 582-584.
- Hayashi, K. I., Kanamori, T., Yamazoe, A., Yamada, M., Nozaki, H. (2005). Gaudichanolides A and B, clerodane diterpenes from *Baccharis gaudichaudiana*. *Journal of natural products*, 68(7), 1121-1124.
- Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D. E., Leonti, M. (2009). Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(1), 1-17.
- Hong, S., Joo, T., Jhoo, J. W. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of 3, 5-dicaffeoylquinic acid isolated from *Ligularia fischeri* leaves. *Food Science and Biotechnology*, 24(1), 257-263.
- INEGI, 2021. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Obtenido de <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/denue/Default.aspx?idee=3182830>.
- International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.
- Jakupovic, J., Schuster, A., Ganzer, U., Bohlmann, F., Boldt, P. E. (1990). Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 29(7), 2217-2222.
- Jaramillo-García, V., Trindade, C., Lima, E., Guecheva, T. N., Villela, I., Martínez-López, W., Corrêa, D. S., Ferraz, A. B. F., Moura, S., Sosa, M. Q., Da Silva, J., Henriques, J. A. P. (2018). Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 213, 210-220.
- Jasinski, V. C., Silva, R. Z. D., Pontarolo, R., Budel, J. M., Campos, F. R. (2014). Morpho-anatomical characteristics of *Baccharis glaziovii* in support of its pharmacobotany. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(6), 609-616.
- Jiménez, S. Á. A. (2017). Medicina Tradicional. *Boletín conamed-ops*, (13).

- Kang, L. P., Liu, Y. X., Eichhorn, T., Dapat, E., Yu, H. S., Zhao, Y., Ma, B. P. (2012). Polyhydroxylated steroidal glycosides from *Paris polyphylla*. *Journal of natural products*, 75(6), 1201-1205.
- Kawano, M., Otsuka, M., Umeyama, K., Yamazaki, M., Shiota, T., Satake, M., Okuyama, E. (2009). Anti-inflammatory and analgesic components from “hierba santa,” a traditional medicine in Peru. *Journal of natural medicines*, 63(2), 147-158.
- Khan, M. A., Inayat, H., Khan, H., Saeed, M., Khan, I., Rahman, I. (2011). Antimicrobial activities of the whole plant of *Cestrum nocturnum* against pathogenic microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 612-616.
- Kharyuk, P., Nazarenko, D., Oseledets, I., Rodin, I., Shpigun, O., Tsitsilin, A., Lavrentyev, M. (2018). Employing fingerprinting of medicinal plants by means of LC-MS and machine learning for species identification task. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Khatun, A., Rahman, M., Nesa, L., Looi, C. Y., Wong, W., F., Hazni, H., Mahdzir, A. M., Uddin, S. J., Awang, K., Shilpi, J. A. (2020). Anti-inflammatory and NF- $\kappa$ B inhibitory activity of aerial parts of *Cestrum diurnum*.
- Kim, D. S., Lee, H. J., Jeon, Y. D., Han, Y. H., Kee, J. Y., Kim, H. J., Shin, H. J., Kang, J., Lee, B. S., Kim, S. H. (2015). Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *American journal of Chinese medicine*, 43, 731-742.
- Kunle, O. F., Egharevba, H. O., Ahmadu, P. O. (2012). Standardization of herbal medicines- A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 4, 101-112.
- Lee, C. L., Hwang, T. L., Yang, J. C., Cheng, H. T., He, W. J., Yen, C. T., Wu, Y. C. (2014). Anti-inflammatory spirostanol and furostanol saponins from *Solanum macaonense*. *Journal of Natural Products*, 77(8), 1770-1783.
- Liang, X. M., Jin, Y., Wang, Y. P., Jin, G. W., Fu, Q., Xiao, Y. S. (2009). Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*. 1216(11): 2033-2044.
- Liapi, C., Anifantis, G., Chinou, I., Kourounakis, A. P., Theodosopoulos, S., Galanopoulou, P. (2007). Antinociceptive properties of 1, 8-cineole and  $\beta$ -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Medica*, 73, 1247-1254.
- Linneo, C. (1753). *Species Plantarum*. L. Savius, Stockholm, 1200 pp.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54(4), 275-287.
- Maffei, M. E., Gertsch, J., Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural product reports*, 28(8), 1359-1380.

- Maisashvili, M. R., Kuchukhidze, D. K., Kikoladze, V. S., Gvazava, L. N. (2012). Steroidal glycosides of gitogenin from *Allium rotundum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(1), 86-90.
- Malizia, R. A., Cardell, D. A., Molli, J. S., González, S., Guerra, P. E., Grau, R. J. (2005). Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part II: *Baccharis obovata* Hooker et Arnott and *B. salicifolia* (Ruiz et Pav.) Pers. species from Argentina. *Journal of essential oil research*, 17(2), 194-197.
- Malizia, R. A., Cardell, D. A., Molli, J. S., González, S., Guerra, P. E., Grau, R. J. (2005). Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part I: *B. racemosa* (Ruiz et Pav.) DC and *B. linearis* (Ruiz et Pav.) Pers. Species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), 103-106.
- Martinez, M. J. A., Bessa, A. L., Benito, P. B. (2005). Biologically active substances from the genus *Baccharis* L.(Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 703-759.
- Martínez, M., Vargas-Ponce, O., Rodríguez, A., Chiang, F., Ocegueda, S. (2017). Solanaceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 95(1), 131-145.
- Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and biology of selected Mexican medicinal plants. *In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 108.
- Mimaki, Y., Watanabe, K., Ando, Y., Sakuma, C., Sashida, Y., Furuya, S., Sakagami, H. (2001). Flavonol Glycosides and Steroidal Saponins from the Leaves of *Cestrum nocturnum* and Their Cytotoxicity. *Journal of natural products*, 64(1), 17-22.
- Mimaki, Y., Watanabe, K., Sakagami, H., Sashida, Y. (2002). Steroidal Glycosides from the Leaves of *Cestrum nocturnum*. *Journal of natural products*, 65(12), 1863-1868.
- Minteguiaga M., González H.A., Ferreira F., Dellacassa E. (2021) *Baccharis dracunculifolia* DC. In *Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol. 2* (pp. 85-105). Springer, Cham.
- Mohamed, K. M., Fouad, M. A., Matsunami, K., Kamel, M. S., Otsuka, H. (2007). A new norlignan glycoside from *Cestrum diurnum* L. *Arkivoc*, (13), 63-70.
- Molares, S., González, S. B., Ladio, A., Agueda Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn.(Asteraceae: Astereae). *Acta Botanica Brasilica*, 23, 578-589.
- Monro, A. K. (2012). Eight new species of *Cestrum* (Solanaceae) from Mesoamerica. *PhytoKeys*, (8), 49.

- Monroy-Ortíz, C., Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mookawa, K., BANskoTA, A. H., Tezuka, Y., MASusce, K. (2003). Buds of *Baccharis dracunculifolia*: potent source of biologically active caffeoylquinic acids and labdane-type diterpenes of Brazilian propolis. *Journal of Traditional Medicine*, 20(5), 187–194.
- Morales, G., Paredes, A., Sierra, P., Loyola, L. A. (2008). Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*, 13(4), 790-794.
- Moreira, F. D. P. M., Coutinho, V., Montanher, A. B. P., Caro, M. S. B., Brighente, I. M. C., Pizzolatti, M. G., Monache, F. D. (2003). Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, 26, 309-311.
- Moreno-Murillo, B. (2001). Cytotoxicity screening of some South American Solanaceae. *Fitoterapia*, 72(6), 680-685.
- Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation protocols*, 115-121.
- Mosad, R. R., Ali, M. H., Ibrahim, M. T., Shaaban, H. M., Emara, M., Wahba, A. E. (2017). New cytotoxic steroidal saponins from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry Letters*, 22, 167-173.
- Nasr, S. M., Ghareeb, M. A., Mohamed, M. A., Elwan, N. M., Abdel-Aziz, A. E. W. A., Abdel-Aziz, M. S. (2018). High-Performance Liquid Chromatography-Fingerprint Analyses, In vitro Cytotoxicity, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Extracts of Two *Cestrum* Species Growing in Egypt. *Pharmacognosy Research*, 10(2) 179-180.
- Necas, J., Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinarni medicina*, 58(4), 187-205.
- NIST, N. (2005). EPA/NIH Mass Spectral Library. *National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg*.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 58 p.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95008>.
- Ovalle-Magallanes, B., Déciga-Campos, M., Mata, R. (2015). Antinociceptive and hypoglycaemic evaluation of *Conyza filaginoides* (DC) Hieron Asteraceae. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 1733-1743.

- Padilla Gómez, E. (2007). Estudio ecológico y etnobotánico de la vegetación del municipio San Pablo Etla, Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR Oaxaca).
- Palacios, R. D. H. (2007). Una prospectiva de la salud en México (Algunos aspectos del marco sociojurídico). *Alegatos*, (65), 47-56.
- Pang, X., Kang, L., Yu, H., Zhao, Y., Xiong, C., Zhang, J., Shan, J., Ma, B. (2012). Rapid isolation of new furostanol saponins from fenugreek seeds based on ultra-performance liquid chromatography coupled with a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, 35(12), 1538-1550.
- Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., Fujiwara, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1100-1103.
- Parreira, N. A., Magalhães, L. G., Morais, D. R., Caixeta, S. C., de Sousa, J. P., Bastos, J. K., Cunha, W. R., Silva, M. L., Nanayakkara, N. P., Rodrigues, V., da Silva Filho, A. A. (2010). Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry y biodiversity*, 7(4), 993-1001.
- Paula-Freire, L. I. G. D., Andersen, M. L., Molska, G. R., Köhn, D. O., Carlini, E. L. A. (2013). Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L.(Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. *Phytotherapy Research*, 27(8), 1220-1224.
- Peckolt, Th. (1909). Medicinal and Useful Plants of Brazil. *Berichte Der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*.
- Pereira, C. B., Kanunfre, C. C., Farago, P. V., Borsato, D. M., Budel, J. M., de Noronha Sales, B. H. L., Campesatto, E. A., Sartoratto, A., Miguel, M. D., Miguel, O. G. (2017). Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. *Toxicology in Vitro*, 42, 214-221.
- Pérez-Vásquez, A., Aguilar-Cruz, R., Bye, R., Linares, E., Rivero-Cruz, I. (2020). UHPLC-MS Analysis of Polyphenols in the Aqueous Extract of *Hydrangea seemannii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1-5.
- Pliego, N., Rojas, M. (2011). Catálogo de plantas medicinales del Jardín Botánico del Instituto de Biología. *México: TLAHUI AC*.
- Prada, J., Ordúz-Díaz, L. L., Coy-Barrera, E. (2016). *Baccharis latifolia*: Una Asteraceae poco valorada con potencialidad Química y Biológica en el Neotrópico. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(1), 92-105.



- Puri, R., Wong, T. C., Puri, R. K. (1993). Solasodine and diosgenin:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magnetic resonance in chemistry*, 31(3), 278-282.
- Ramos-Campos, F., Bressan, J., Godoy Jasinski, V. C., Zuccolotto, T., da Silva, L. E., y Bonancio Cerqueira, L. (2016). *Baccharis* (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities. *Chemistry & biodiversity*, 13(1), 1-17.
- Raza, A., Xu, X., Sun, H., Tang, J., Ouyang, Z. (2017). Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(2), 483-489.
- Red Indígena de Turismo de México a.c. (RITA). (2018). Protocolo Comunitario Biocultural de Capulálpam de Méndez, Oaxaca.
- Ribeiro, P. R., Araújo, A. J., Costa-Lotufo, L. V., Braz-Filho, R., Nobre Junior, H. V., da Silva, C. R., de Andrade Neto, J. B., Silveira, E. R., Lima, M. A. (2016). Spirostanol glucosides from the leaves of *Cestrum laevigatum* L. *Steroids*, 106, 35-40.
- Ribeiro, P. R., Braz-Filho, R., Araújo, A. J., Costa-Lotufo, L. V., Souza, L. G., Nobre Junior, H. V., Lima, M. A. S. (2016). New epimeric spirostanol and furostanol-type steroidal saponins from *Cestrum laevigatum* L. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27, 2170-2180.
- Ríos-Altamirano, A., Alfonso-Corrado, C., Aguirre-Hidalgo, V., Ángeles-Pérez, G., Mendoza-Díaz, M. M., Rodríguez-Rivera, V., Roldán-Felix, E., Clark-Tapia, R. (2016). Abundancia y distribución del género *Pinus* en Capulálpam de Méndez, Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y bosques*, 22(3), 61-74.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., Serrano, V., Pacheco, S. (1999). Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, 6(5), 367-371.
- Rojas, A., Mendoza, S., Moreno, J., Arellano, R. O. (2003). Extracts from plants used in mexican traditional medicine activate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channels in *Xenopus laevis* oocytes. *Phytomedicine*, 10(5), 416-421.
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J., Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 88(2-3), 199-204.
- Sahoo, N., Manchikantia, P., Dey, S. (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. 81(6): 462-471.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *International journal of environmental research and public health*, 17(10), 3376.

- Santiago, E. M. (2009). Plan de Desarrollo Municipal Capulálpam de Méndez. *Capulálpam de Méndez, México: Consejo Municipal de Desarrollo Rural Sustentable*, 11-15.
- Sawynok, J., Liu, X. J. (2003). The formalin test: characteristics and usefulness of the model. *Reviews in analgesia*, 7(2), 145-163.
- Schultes, R. E., Von Reis, S. (1995). *Evolution of a Discipline* (Vol. 414). Portland, Ore: Dioscorides Press.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2009). Plan de Desarrollo Municipal Capulálpam de Méndez, Oaxaca de Juárez, 164.
- Shehnaz, D., Hamid, F., Baqai, F. T., Uddin Ahmad, V. (1999). Effect of the crude extract of *Cestrum parqui* on carrageenin-induced rat paw oedema and aggregation of human blood platelets. *Phytotherapy Research*, 13(5), 445-447.
- Silva-Correa, C. R., Campos-Reyna, J. L., Villarreal-La Torre, V. E., Calderón-Peña, A. A., Blas, M. V. G., Aspajo-Villalaz, C. L., Cruzado-Razco, J. L., Sagástegui- Guarniz, W. A., Guerrero- Espino, L. M., Hilario-Vargas, J. (2021). Potential Activity of Medicinal Plants as Pain Modulators: A Review. *Pharmacognosy Journal*, 13(1).
- Simonsen, H. T., Riedel, C., Gade, L. B., Jebjerg, C. P., Guzman, A., Mølgaard, P. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil of *Baccharis magellanica* (Lam.) Pers. and *Baccharis elaeoides* Remy from Chile. *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 377-380.
- Sivaraj, B., Vidya, C., Nandini, S., Sanil, R. (2015). Antimicrobial Activity of *Cestrum aurantiacum* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 830-834.
- Stahl, E. (1969). Thin-layer chromatography. 2ª edición. *Toppa Printing Co. Singapoore*, 1014.
- Standley, P. C. (1920). *Trees and Shrubs of Mexico*. (Vol. 23). US Government Printing Office.
- Syed, M., Khan, M. N., Khadim, A., Shadab, H., Perveen, A., El-Seedi, H. R., Musharraf, S. G. (2021). Chemical fingerprinting of three Anemone species and an adulteration study to detect cross mixing of medicinal plants by HPLC-HR-ESI-MS/MS method. *Journal of King Saud University-Science*, 33(5), 101461.
- Ta, C. A. K., Guerrero-Analco, J. A., Roberts, E., Liu, R., Mogg, C. D., Saleem, A., Otárola-Rojas, M., Poveda, L., Sanchez-Vindas, P., Cal, V., Caal, F., Subramaniam, R., Smith, M. L., Arnason, J. T. (2016). Antifungal Saponins from the Maya Medicinal Plant *Cestrum schlechtendahlia* G. Don (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, 30 (3), 439–446.

- Tamayose, C. I., Torres, P. B., Roque, N., Ferreira, M. J. P. (2019). HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity of flavones and chlorogenic acid derivatives from *Moquiniastrum floribundum* (Asteraceae). *South African Journal of Botany*, 123, 142-146.
- Tapia, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Feresin, G. E., y Schmeda-Hirschmann, G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of ethnopharmacology*, 95(2-3), 155-161.
- Timbe, P. P. R., de Souza da Motta, A., Stincone, P., Pinilla, C. M. B., Brandelli, A. (2021). Antimicrobial activity of *Baccharis dracunculifolia* DC and its synergistic interaction with nisin against food-related bacteria. *Journal of Food Science and Technology*, 58(8), 3010-3018.
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5-17.
- Tropicos. 2021. Missouri Botanical Garden. Obtenido de <https://tropicos.org/name/29600510>.
- Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses, M., Morocho, V. (2013). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of essential oil research*, 25(3), 233-238.
- Van Loo, P., De Bruyn, A., Buděšínský, M. (1986). Reinvestigation of the structural assignment of signals in the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of the flavone apigenin. *Magnetic resonance in Chemistry*, 24(10), 879-882.
- Vannini, A. B., Santos, T. G., Fleming, A. C., Purnhagen, L. R. P., Lourenço, L. A., Butzke, E. T. B., Butzke, E., Kempt, M. Kempt, Begnini, I. M., Begnini, I., Rebelo, R. A., Rebelo, R., Dalmarco, E. M., Dalmarco, E., Bella Cruz, A., Bella Cruz, A., Schmit, A. P., Schmit, A., Cruz, R. C. B., Cruz, R., Yamanaka, C.N., Yamanaka, C., Steindel, M. (2012). Chemical characterization and antimicrobial evaluation of the essential oils from *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis semiserrata* DC (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, 24(6), 547-554.
- Vargas, J. M., Andrade-Cetto, A. (2018). Ethnopharmacological field study of three Q'eqchi communities in Guatemala. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1246.
- Verdi, L. G., Brighente, I. M. C., Schripsema, J., Braz Filho, R., Pizzolatti, M. G. (2004). Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. *Biochemical systematics and ecology* 32, 837-840.
- Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M., y Rozza, A. L. (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-biological interactions*, 283, 97-106.

- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902.
- Wan, P., Xie, M., Chen, G., Dai, Z., Hu, B., Zeng, X., Sun, Y. (2019). Anti-inflammatory effects of dicaffeoylquinic acids from *Ilex kudingcha* on lipopolysaccharide-treated RAW264. 7 macrophages and potential mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 126, 332-342.
- WHA31.33. (1978). World Health Assembly Medicinal plants. Obtenido de <https://www.who.int/medicines/areas/traditional/wha3133.pdf>.
- WHA40.33. (1987). World Health Assembly. Traditional medicine. Obtenido de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/201057/WHA40\\_R33\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/201057/WHA40_R33_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- WHA42.43. (1989). World Health Assembly. Traditional medicine and modern health care. Obtenido de: <https://www.who.int/medicines/areas/traditional/wha4243.pdf>.
- WHA62.13. (2009). Asamblea Mundial de la Salud. Medicina Tradicional. Obtenido de [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/A62/A62\\_R13-sp.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_R13-sp.pdf).
- Wollenweber, E., Schober, I., Dostal, P., Hradetzky, D., Arriaga-Giner, F. J., Yatskievych, G. (1986). Flavonoids and terpenoids from the exudates of some *Baccharis* species. *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 41(1-2), 87-93.
- World Health Organization. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41986>.
- World Health Organization. (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42783>
- World Health Organization. (2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43510>
- World Health Organization. Programme on Traditional Medicine. (2000). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66783>.
- Xiao, X., Wang, X., Gui, X., Chen, L., Huang, B. (2016). Natural flavonoids as promising analgesic candidates: A systematic review. *Chemistry y biodiversity*, 13, 1427-1440.
- Yahara, S., Ura, T., Sakamoto, C., Nohara, T. (1994). Steroidal glycosides from *Capsicum annuum*. *Phytochemistry*, 37(3), 831-835.

- Yan, H., Ni, W., Yu, L. L., Xiao, L. G., Ji, Y. H., Liu, H. Y. (2022). Parisvaniosides A–E, five new steroidal saponins from *Paris vaniotii*. *Steroids*, 177, 108949.
- Yang, W., Zhang, Y., Wu, W., Huang, L., Guo, D., Liu, C. (2017). Approaches to establish Q-markers for the quality standards of traditional Chinese medicines. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 7(4), 439-446.
- Zampini, I. C., Isla, M. I., Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *Baccharis incarum* (Wedd.) Perkins. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(4), 477-48.

# Anexo 1



### ENTREVISTA ETNOBOTÁNICA A MÉDICOS TRADICIONALES

La presente encuesta se realiza con la finalidad de obtener información referente al uso de plantas medicinales en el Centro de Desarrollo de Medicina Indígena Tradicional de Capulálpam de Méndez. Los datos que arroje la encuesta serán de utilidad para el desarrollo de una investigación etnomédica que se realizará en el departamento de Farmacia del posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Su participación es totalmente voluntaria.

#### Datos personales.

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Sexo: F  M  Edad: \_\_\_\_\_ Años de vivir o estar en la localidad: \_\_\_\_\_

Ocupación actual: \_\_\_\_\_

¿Pertenece o sabe de alguna organización de médicos tradicionales?

No  Si  ¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Cuál es su especialidad en la medicina tradicional?: Hierbero \_\_\_\_\_ Curandero \_\_\_\_\_

Partera \_\_\_\_\_ d) Otro \_\_\_\_\_ Años de practicarla: \_\_\_\_\_

¿Aprendió el conocimiento de?: Padres \_\_\_\_\_ Abuelos \_\_\_\_\_ Amigo o conocido \_\_\_\_\_  
Otro medio \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Conoce la planta llamada potonxhiuite? No  Si  Otro nombre: \_\_\_\_\_

Enliste por favor todos los usos que le da a esta planta:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

¿Qué parte de la planta usa? \_\_\_\_\_

¿Cómo la prepara? \_\_\_\_\_

¿Hace cuánto que la utilizó por última vez?

Pocos días

Una semana

Un mes

Seis meses o más



En su perspectiva ¿Qué tan útil es la planta para tratar la fiebre?

Muy útil	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Poco útil
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------

¿Las personas que consumen la planta han manifestado algún malestar? No  Si

¿De que tipo? \_\_\_\_\_

¿Cómo la obtiene? Colecta \_\_\_\_\_ Cultivo \_\_\_\_\_ Comprada \_\_\_\_\_ ¿Dónde la compra? \_\_\_\_\_


Nombre del entrevistador: \_\_\_\_\_

**Figura 42.** Modelo de entrevista semiestructurada para el estudio etnobotánico en el CMIT.

## Proyecto

PRUEBAS DE EFICACIA, SEGURIDAD Y COMPOSICIÓN DE UNA PLANTA SELECTA DE CAPULÁLPAM DE MÉNDEZ,  
OAXACA

Por este medio yo Florencia Hernández Alavez a partir de la información previamente recibida por la M. En C. Erika Vivani Castillejos Ramírez, estoy consciente de los alcances del presente Consentimiento Informado. De forma libre, expreso mi consentimiento para que sea registrada y documentada la información que yo otorgue (documentos escritos, fotos y grabaciones sobre el uso de plantas medicinales en la comunidad de Capulálpam de Méndez) y pueda ser utilizada en la elaboración de productos académicos y materiales de difusión sin fines de lucro.

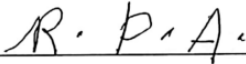
Firma: 

Oaxaca, septiembre de 2019.

## Proyecto

PRUEBAS DE EFICACIA, SEGURIDAD Y COMPOSICIÓN DE UNA PLANTA SELECTA DE CAPULÁLPAM DE MÉNDEZ,  
OAXACA

Por este medio yo Rosaura Altamirano Pérez Alavez a partir de la información previamente recibida por la M. En C. Erika Vivani Castillejos Ramírez, estoy consciente de los alcances del presente Consentimiento Informado. De forma libre, expreso mi consentimiento para que sea registrada y documentada la información que yo otorgue (documentos escritos, fotos y grabaciones sobre el uso de plantas medicinales en la comunidad de Capulálpam de Méndez) y pueda ser utilizada en la elaboración de productos académicos y materiales de difusión sin fines de lucro.

Firma: 

Oaxaca, septiembre de 2019.

**Figura 43.** Ejemplo del consentimiento informado de dos de las especialistas entrevistadas el estudio etnobotánico en el CMIT.





FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA  
OFICIO FQUI/DFARM/101/2019  
Asunto: Solicitud de apoyo para una  
investigación de doctorado



# ACUSE

MARCOS C. COSMES HERNÁNDEZ  
PRESIDENTE MUNICIPAL DE  
CAPULÁLPAM DE MÉNDEZ  
P R E S E N T E

Estimado Sr. Cosmes:

Por este conducto me permito solicitarle de la manera más atenta su autorización y apoyo para que la Maestra Erika Vivani Castillejos Ramírez realice una investigación en la comunidad a su digno cargo. Esta investigación forma parte de sus estudios de doctorado en Ciencias Químicas en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La Maestra Castillejos Ramírez, con número de cuenta 512001854 y credencial de elector número 1765105516132, es una persona originaria del Estado de Oaxaca y de honestidad comprobada. Es Maestra de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca (UABJO), y actualmente recibe capacitación para la investigación de plantas medicinales del estado de Oaxaca en la UNAM con el propósito de continuarlos en la UABJO, y así fortalecer la investigación en el Estado de Oaxaca. La investigación que realizará no persigue fines de lucro; solo pretende generar conocimiento académico que quedará plasmado en una tesis de doctorado y en publicaciones científicas. En ningún momento se perturbará la comunidad; se respetarán los conocimientos y usos relacionados con la naturaleza y cualquier otra manifestación relacionada con su identidad cultural.

La actividad que haría la maestra Castillejos, en caso de obtener su autorización, implica una entrevista a los habitantes de la comunidad de Capulálpam de Méndez para recabar información acerca del uso medicinal de las plantas potonchihuite y chamizo de barrer. La información consiste en el nombre del usuario, su edad, ocupación, la parte de la planta que utiliza, que enfermedades curan, como se utilizan, cuantas veces al día, por cuanto tiempo y, finalmente si han tenido algún malestar después de consumir los preparados. Reiteramos que el proyecto no proporcionará beneficios económicos, y que la utilización de sus conocimientos tradicionales será solo de índole científico; y en todos los casos se garantizará un consentimiento informado previo de los participantes de la comunidad.

Sin otro particular agradezco de antemano el apoyo que nos pueda brindar para llevar a un feliz término los estudios de la Maestra Erika V. Castillejos Ramírez. Aprovecho también la oportunidad para enviarle mis más cordiales saludos.

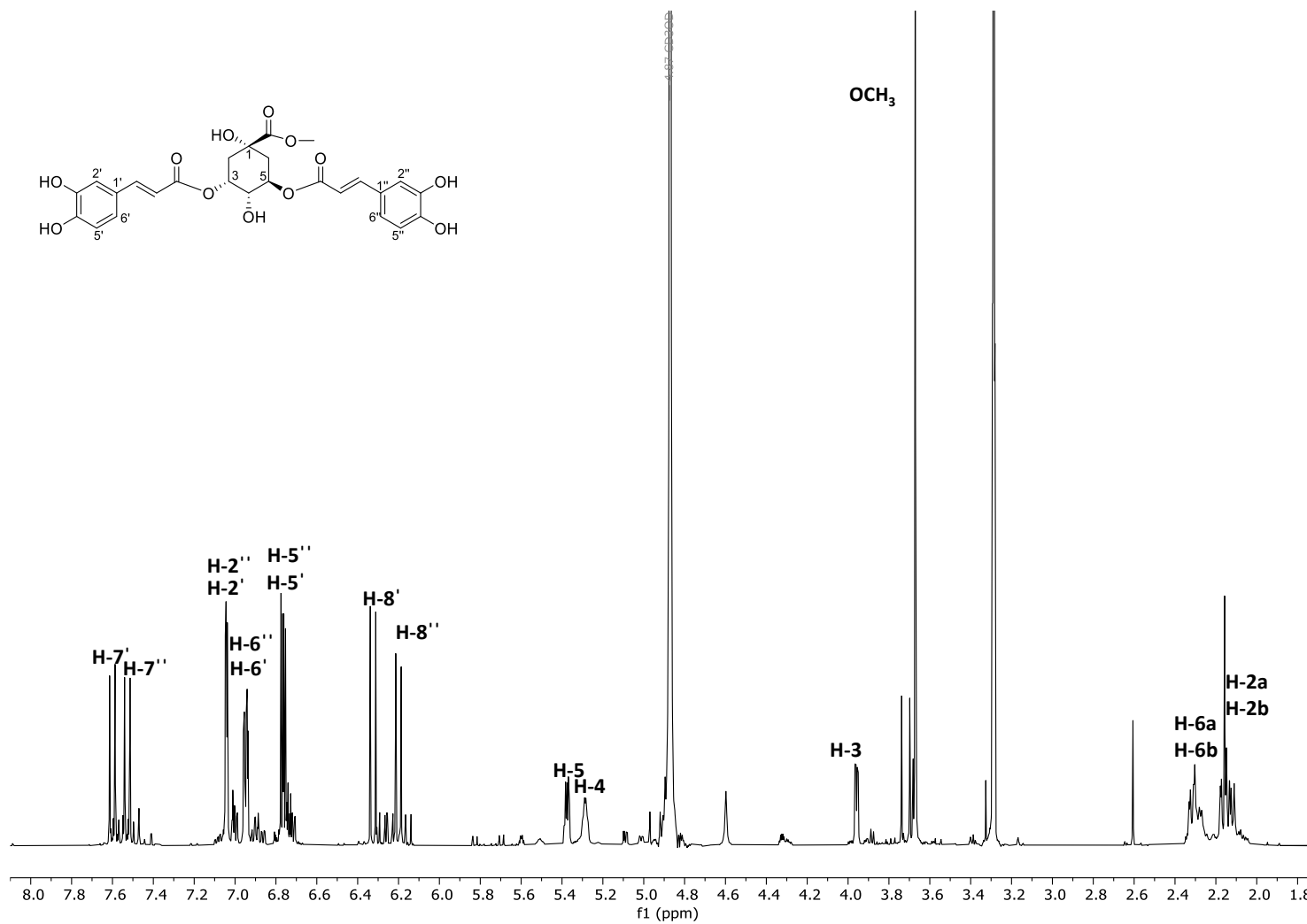
A T E N T A M E N T E  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 27 de junio de 2019

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA  
Facultad de Química, UNAM

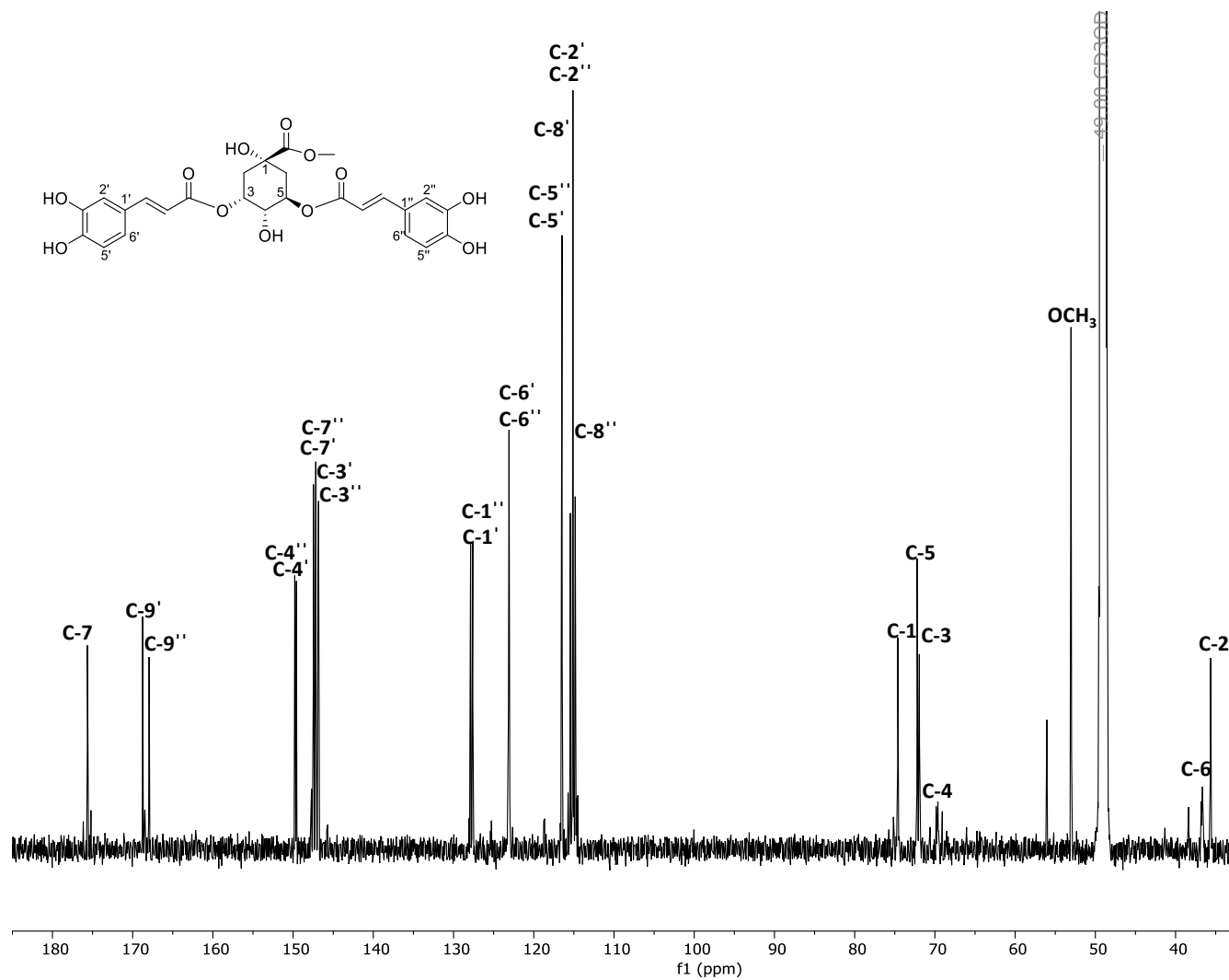


**Figura 44.** Solicitud del permiso correspondiente para la realización de entrevistas en la comunidad de Capulálpam de Méndez.

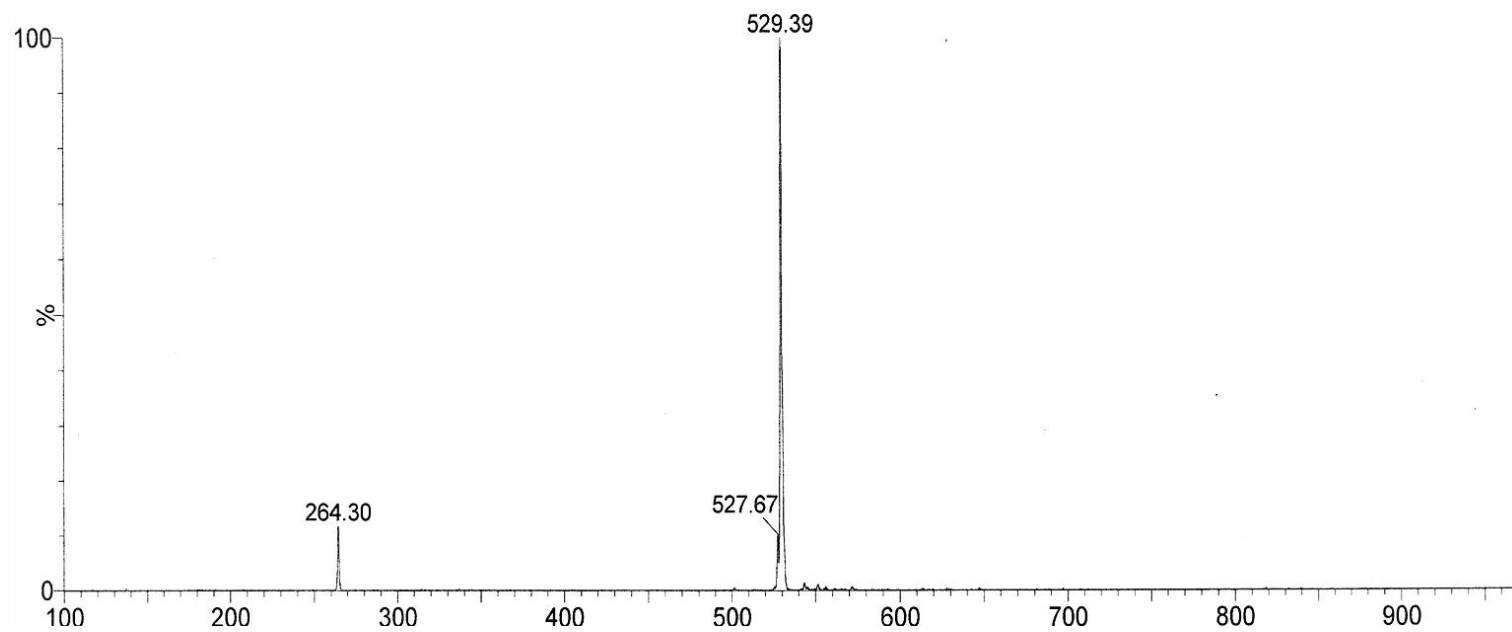
## **Anexo 2**



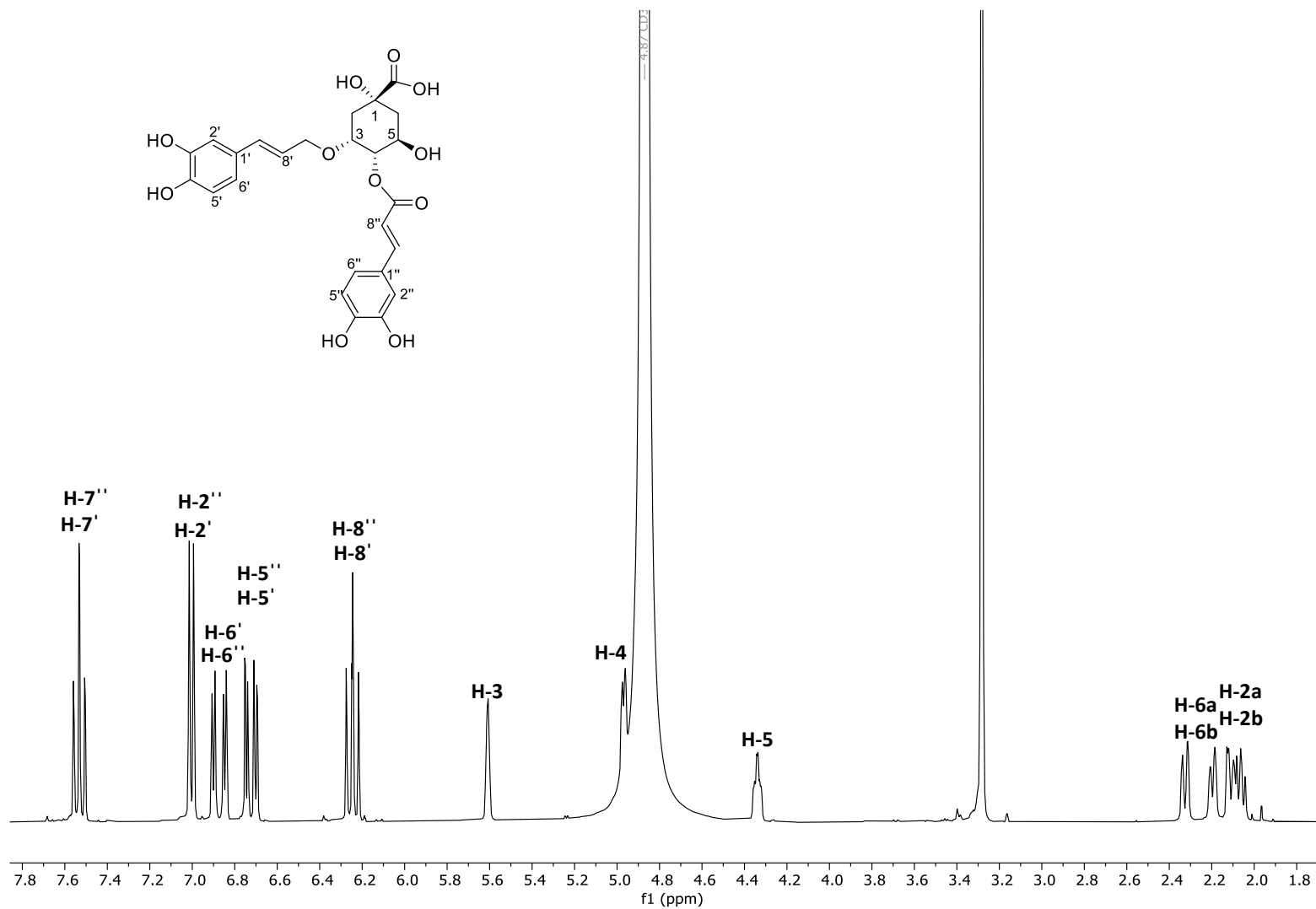
**Figura 45.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (125).



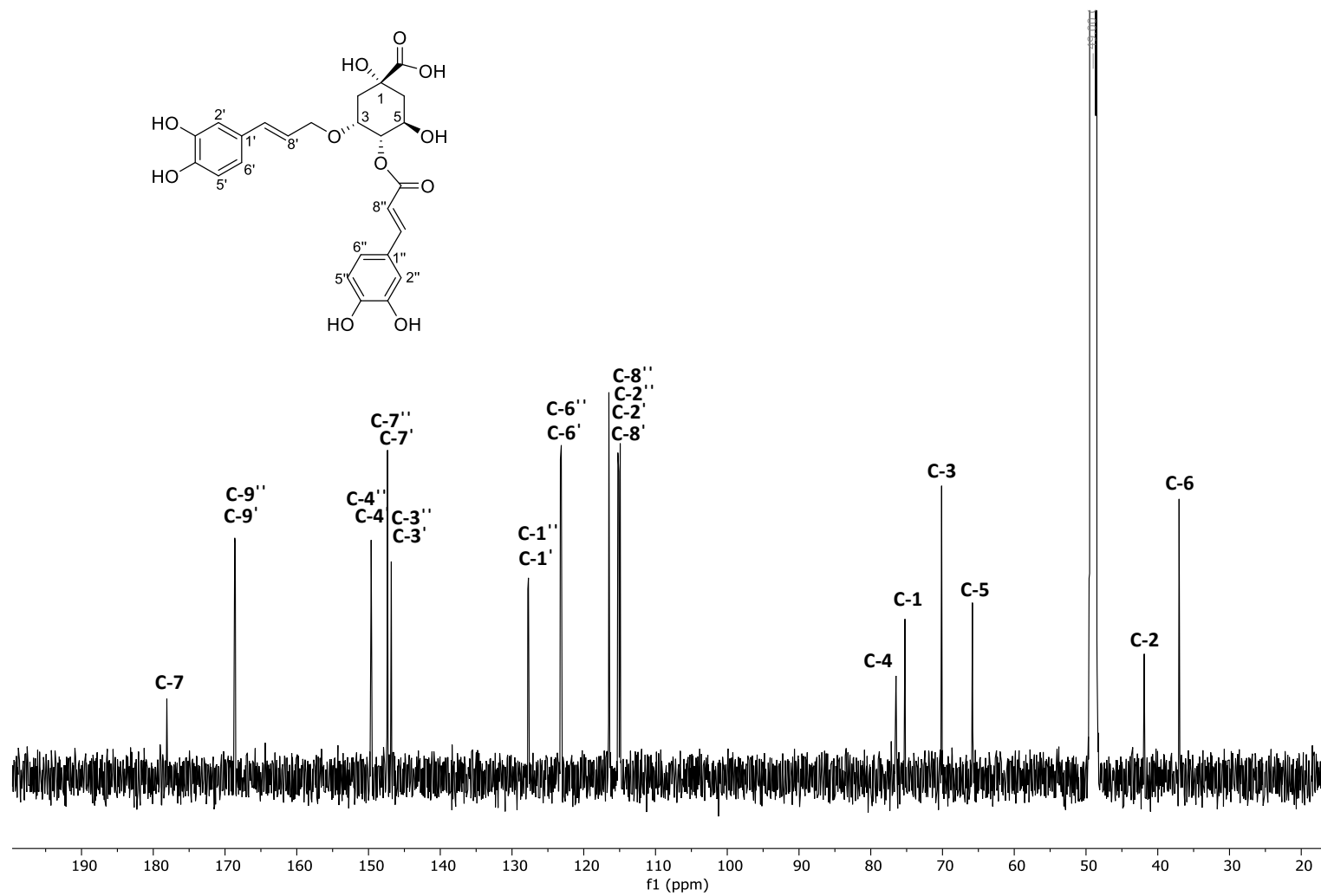
**Figura 46.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (125).



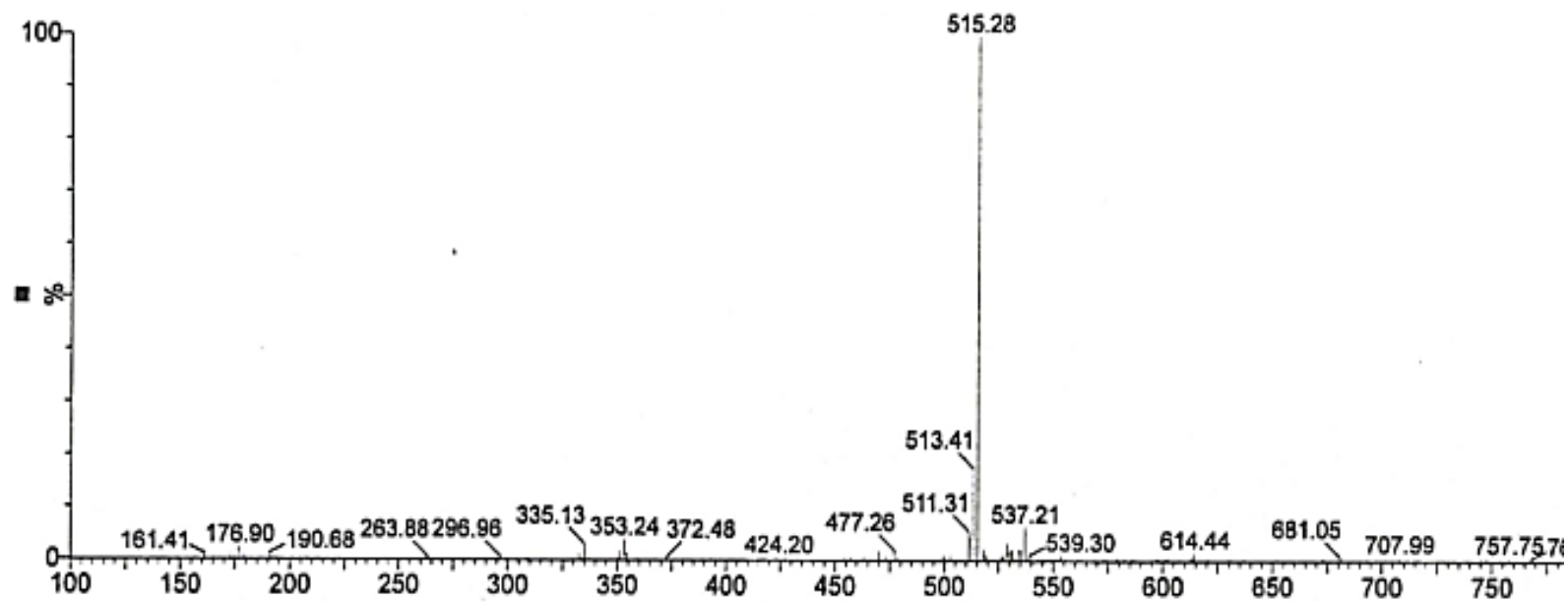
**Figura 47.** Espectro de masas EM- ESI éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**125**).



**Figura 48.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (104).

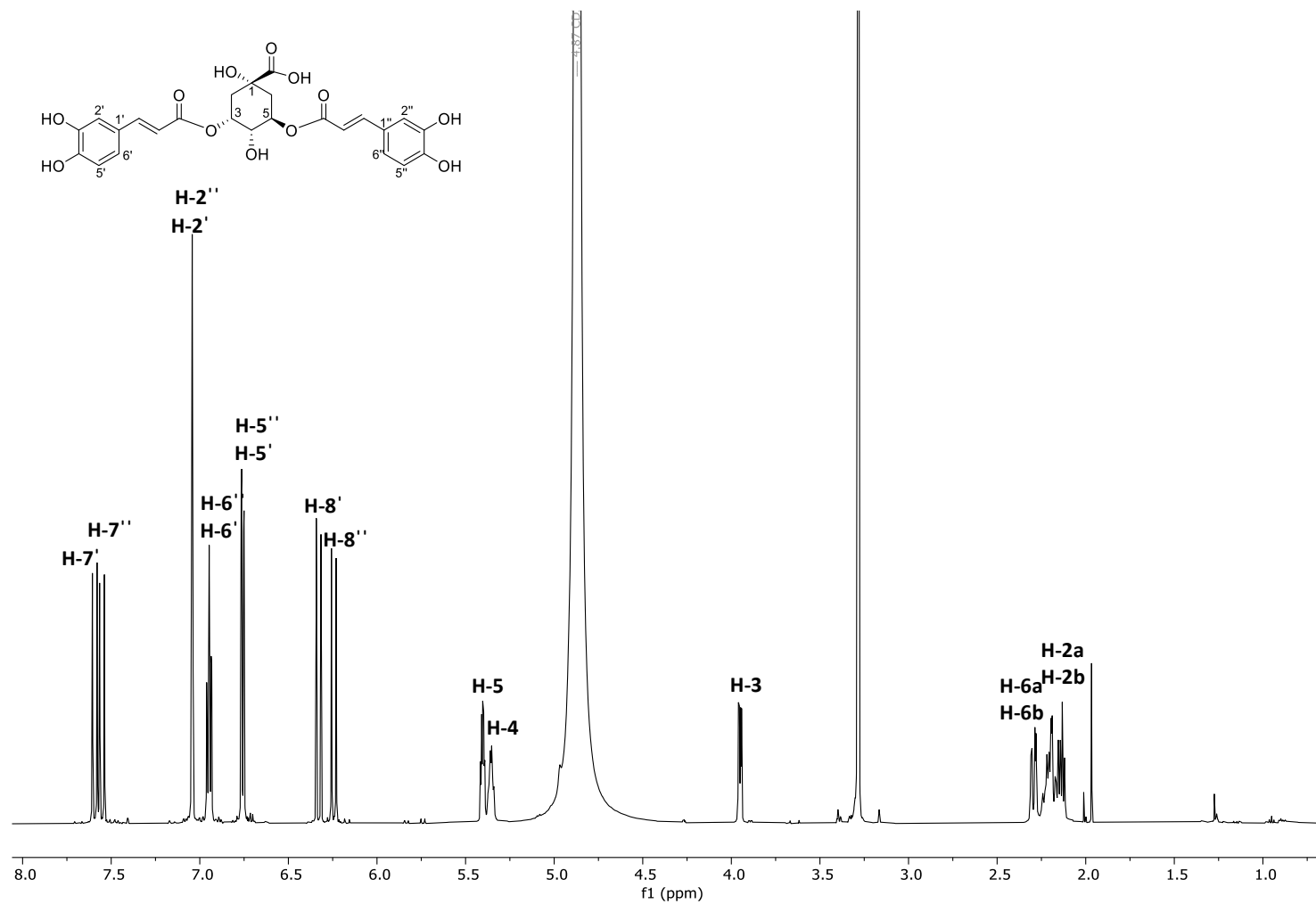


**Figura 49.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (104).



**Figura 50.** Espectro de masas EM- ESI del ácido 3,4-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**104**).





**Figura 51.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del ácido 3,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (**105**).

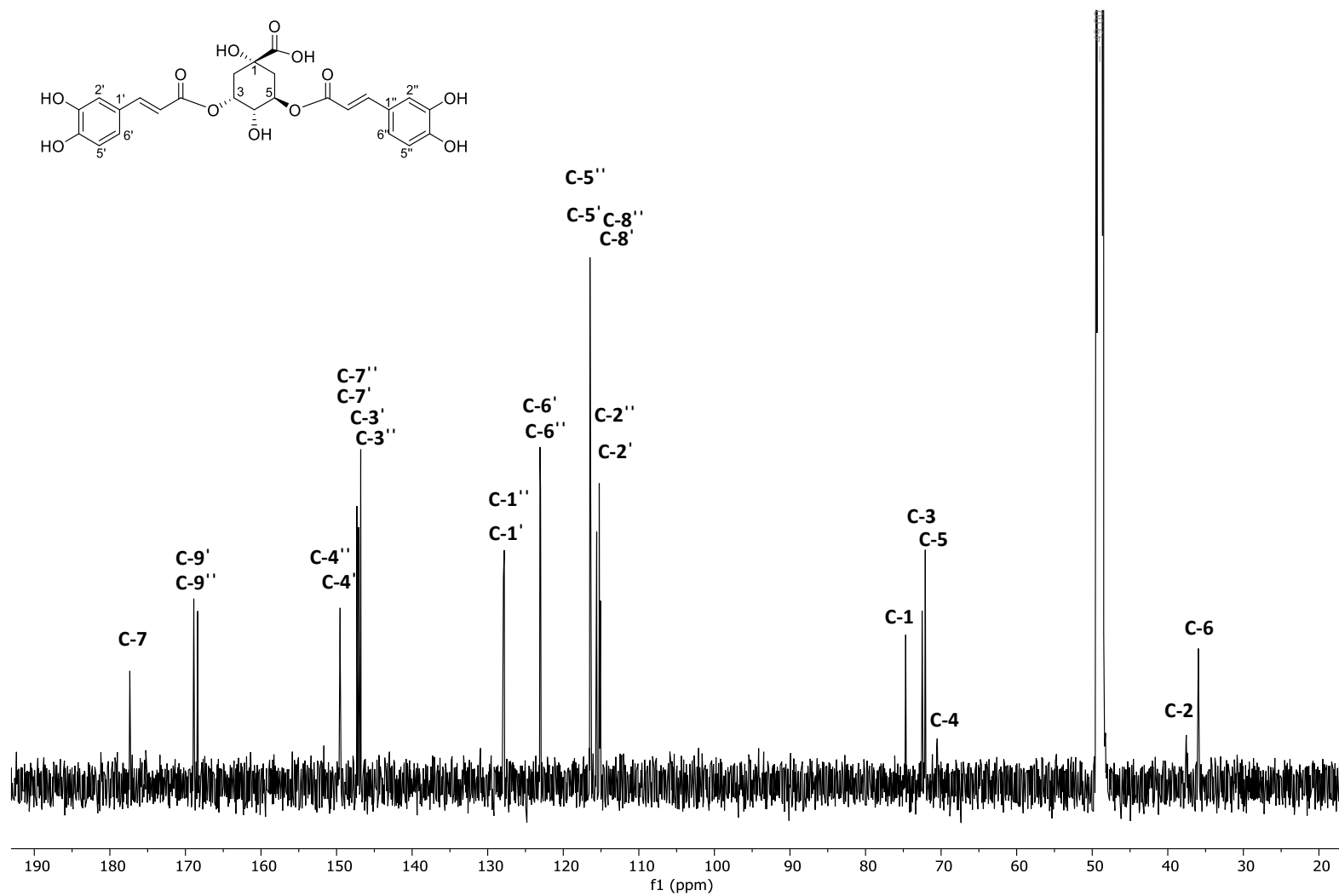


Figura 52. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico (105).

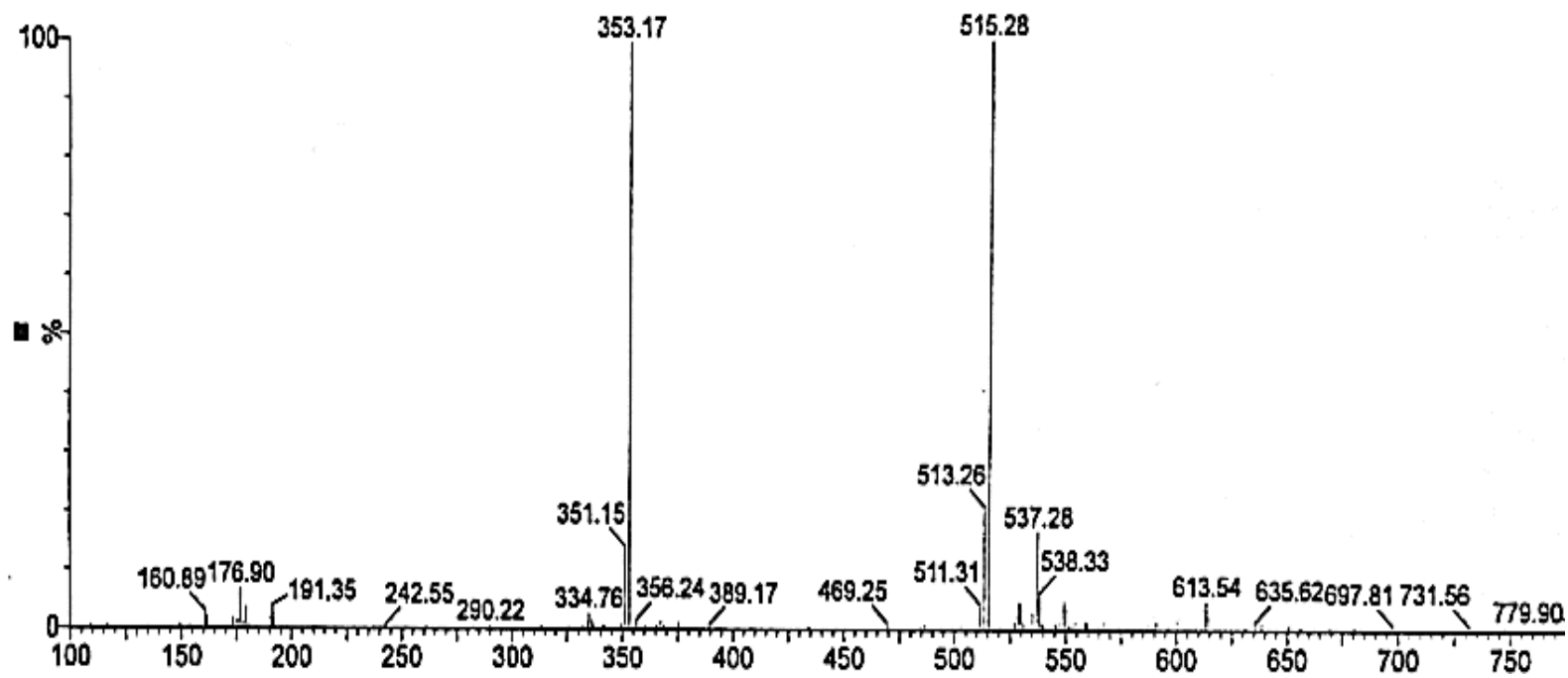
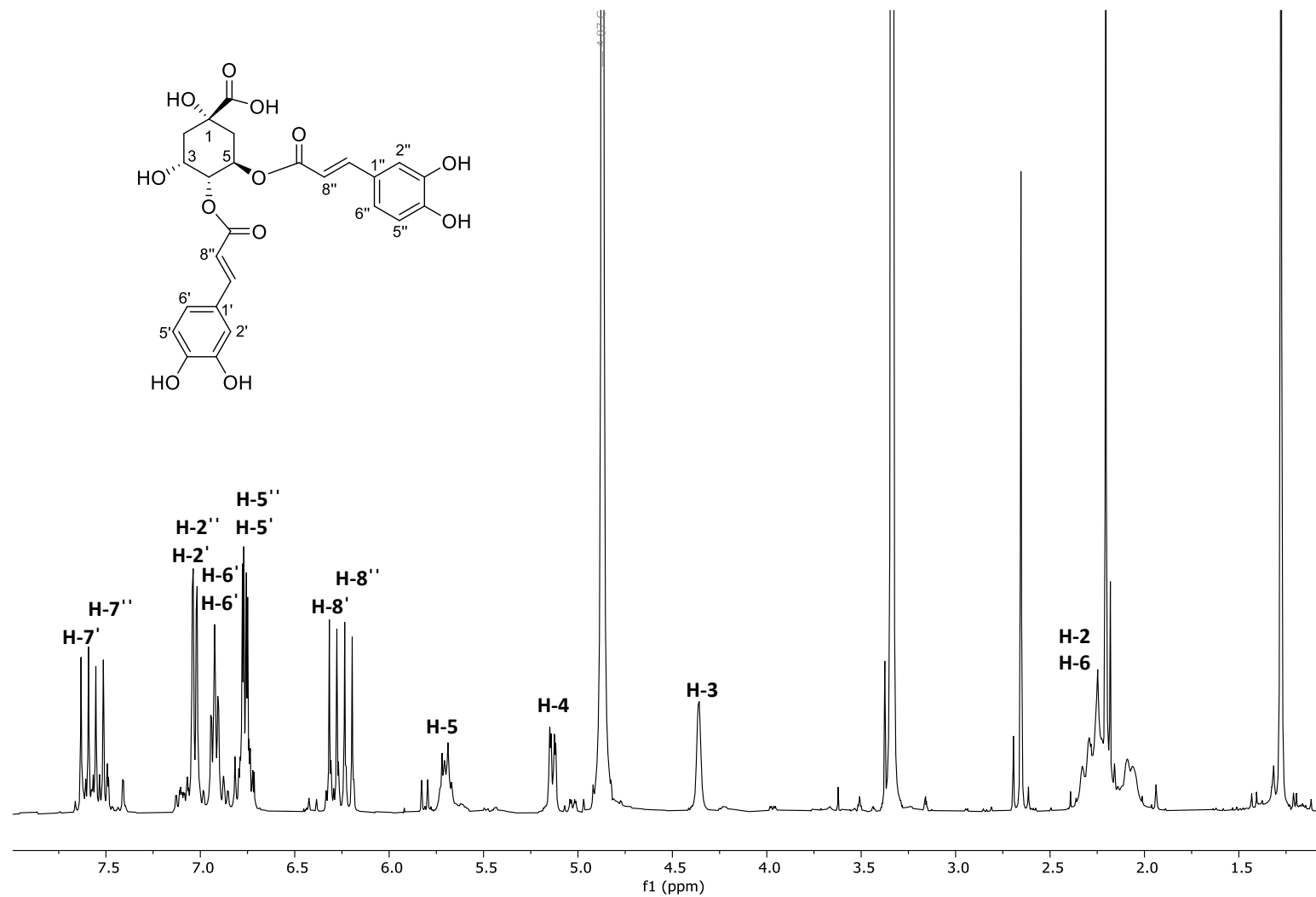


Figura 53. Espectro de masas EM-ESI del ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico (105).



**Figura 54.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del ácido 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (106).

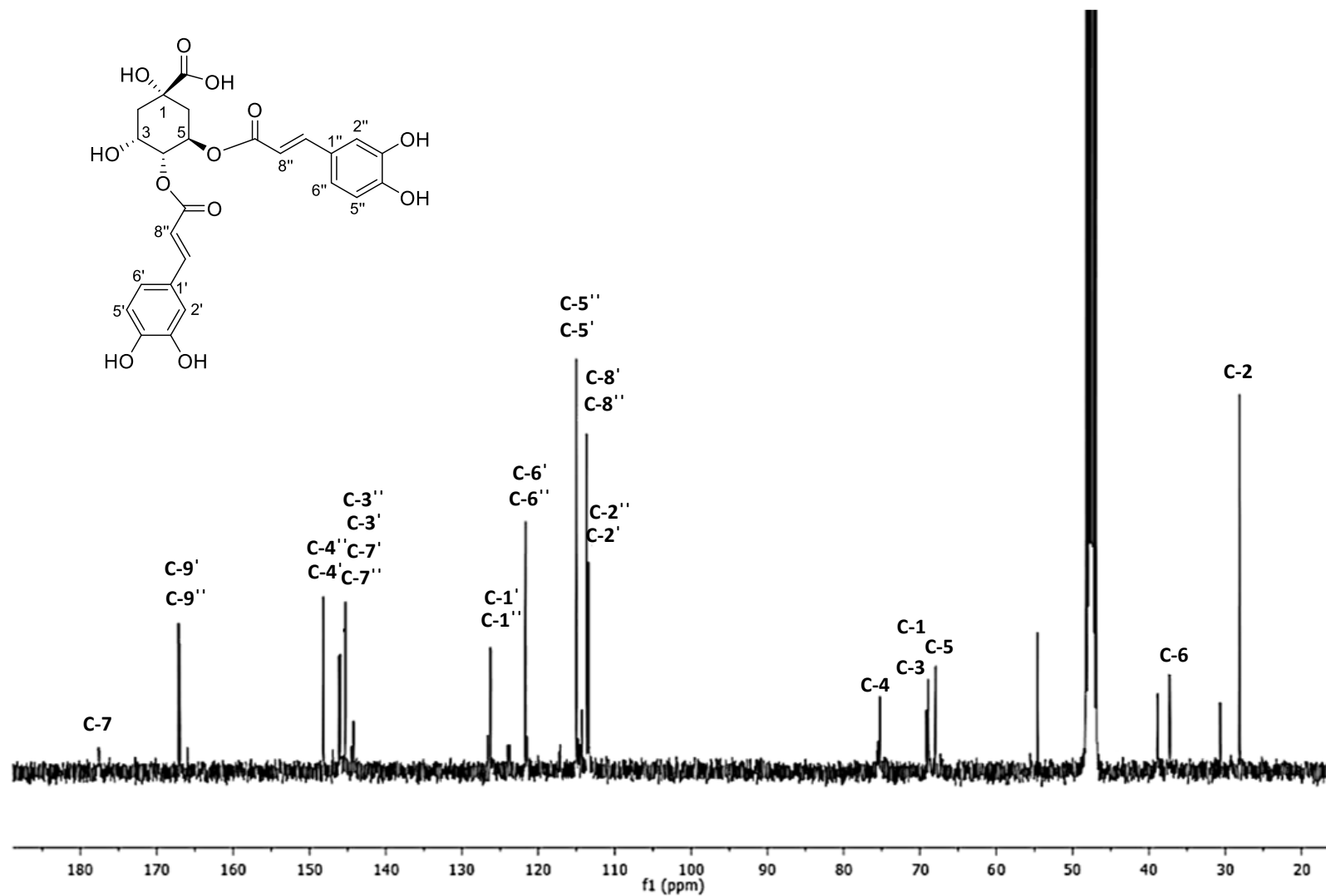


Figura 55. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) de ácido 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (106).

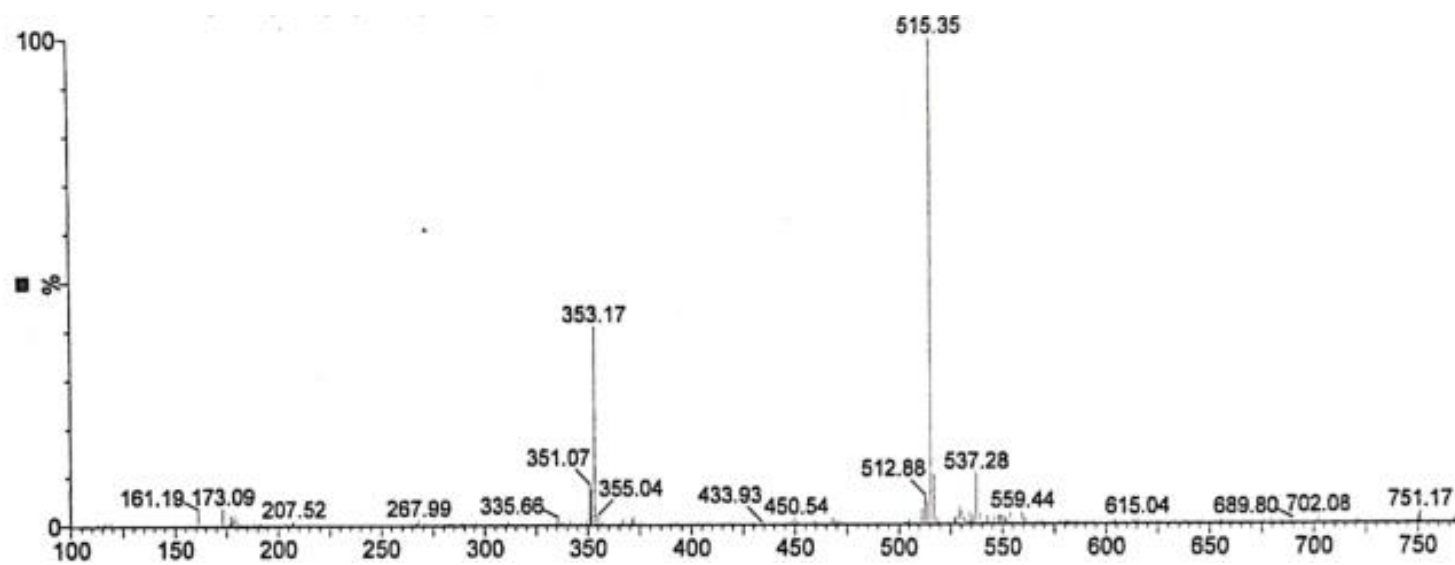
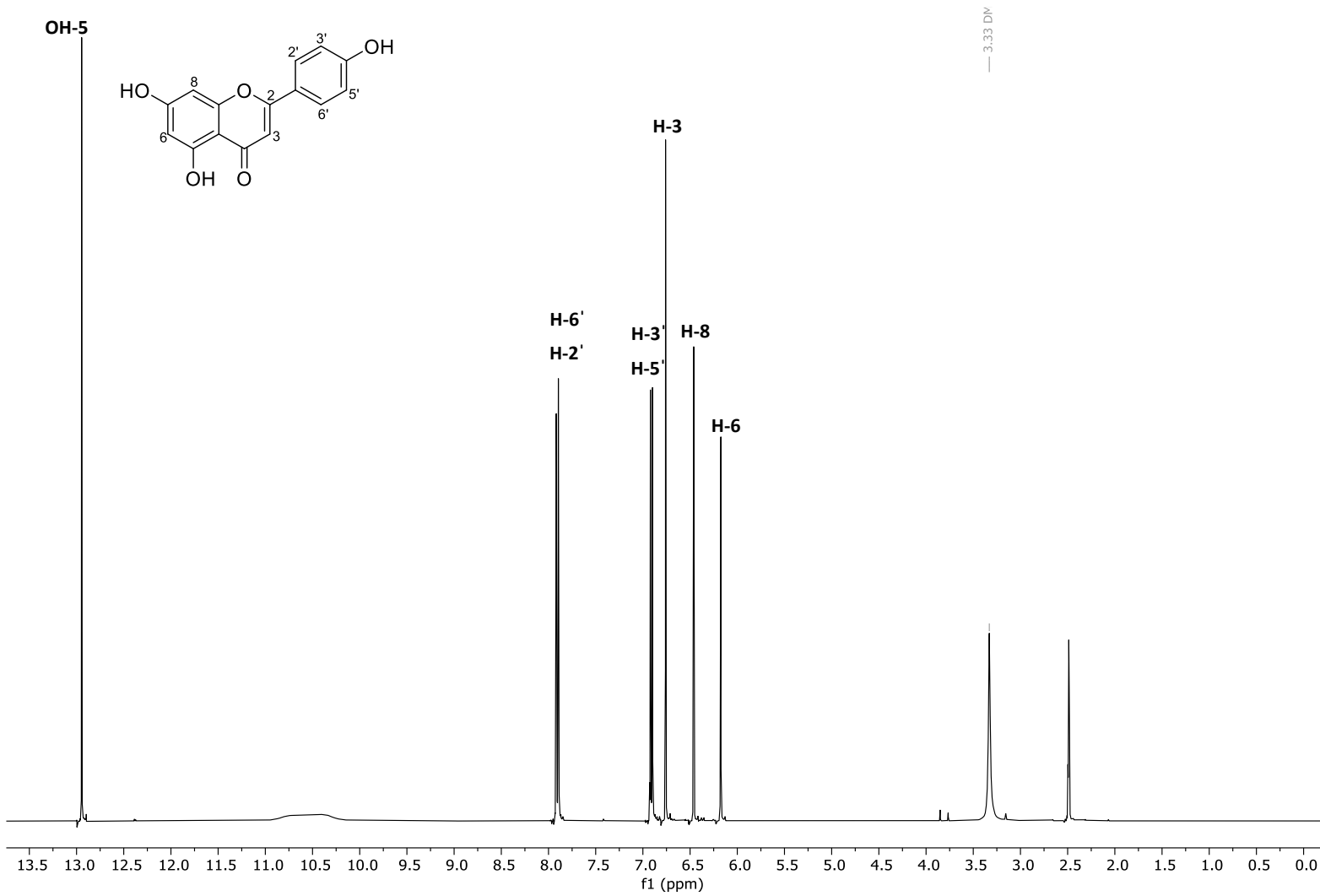


Figura 56. Espectro de masas EM- ESI del ácido 4,5-di-*O*-(*E*)-cafeoilquínico (106)



**Figura 57.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de la apigenina (**97**).

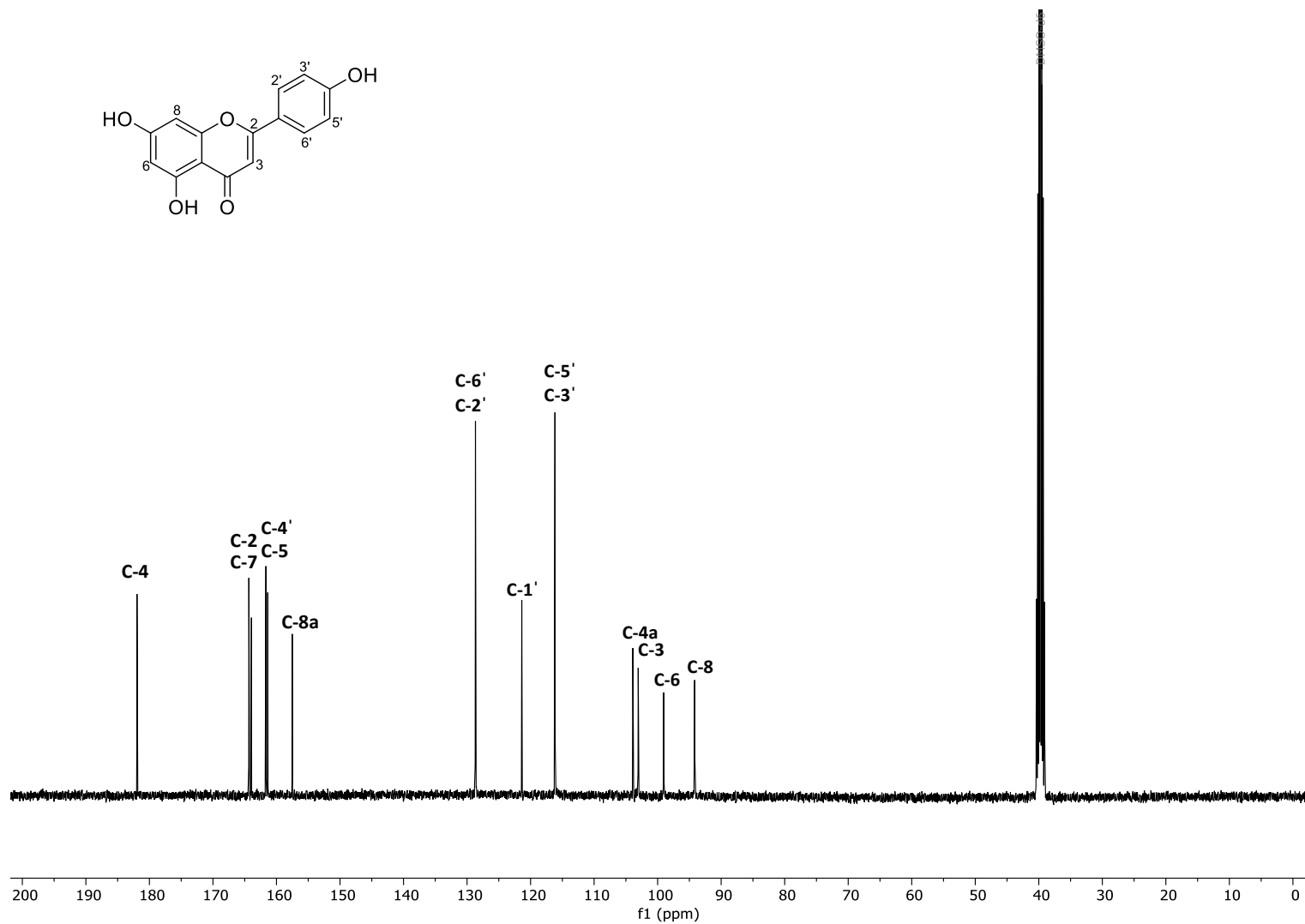
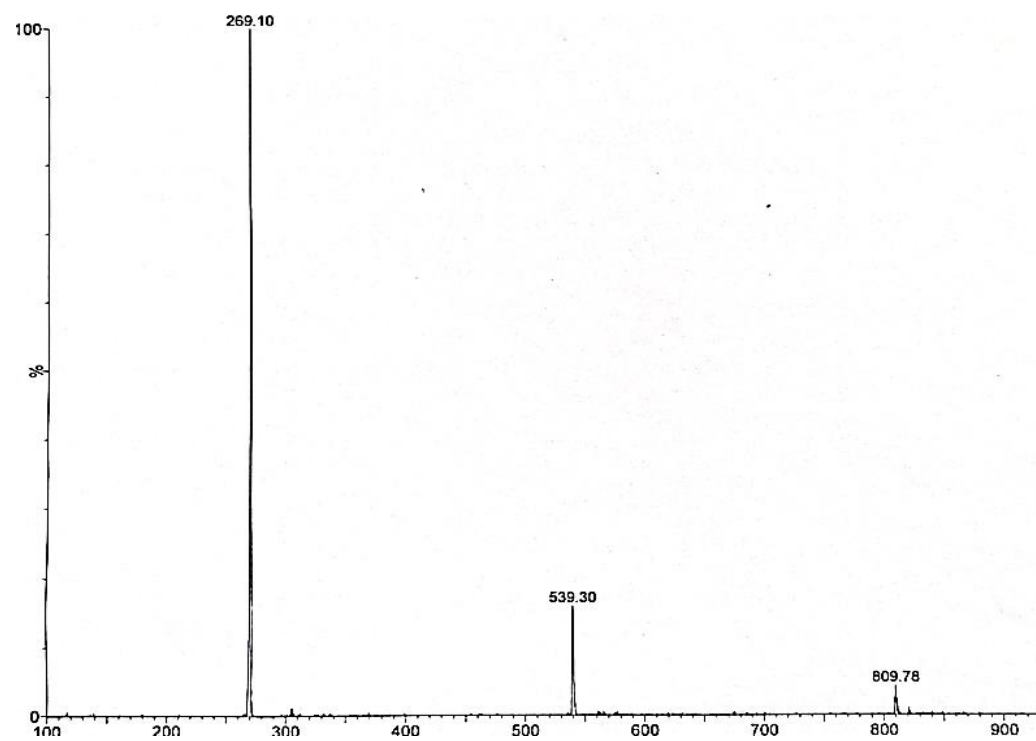
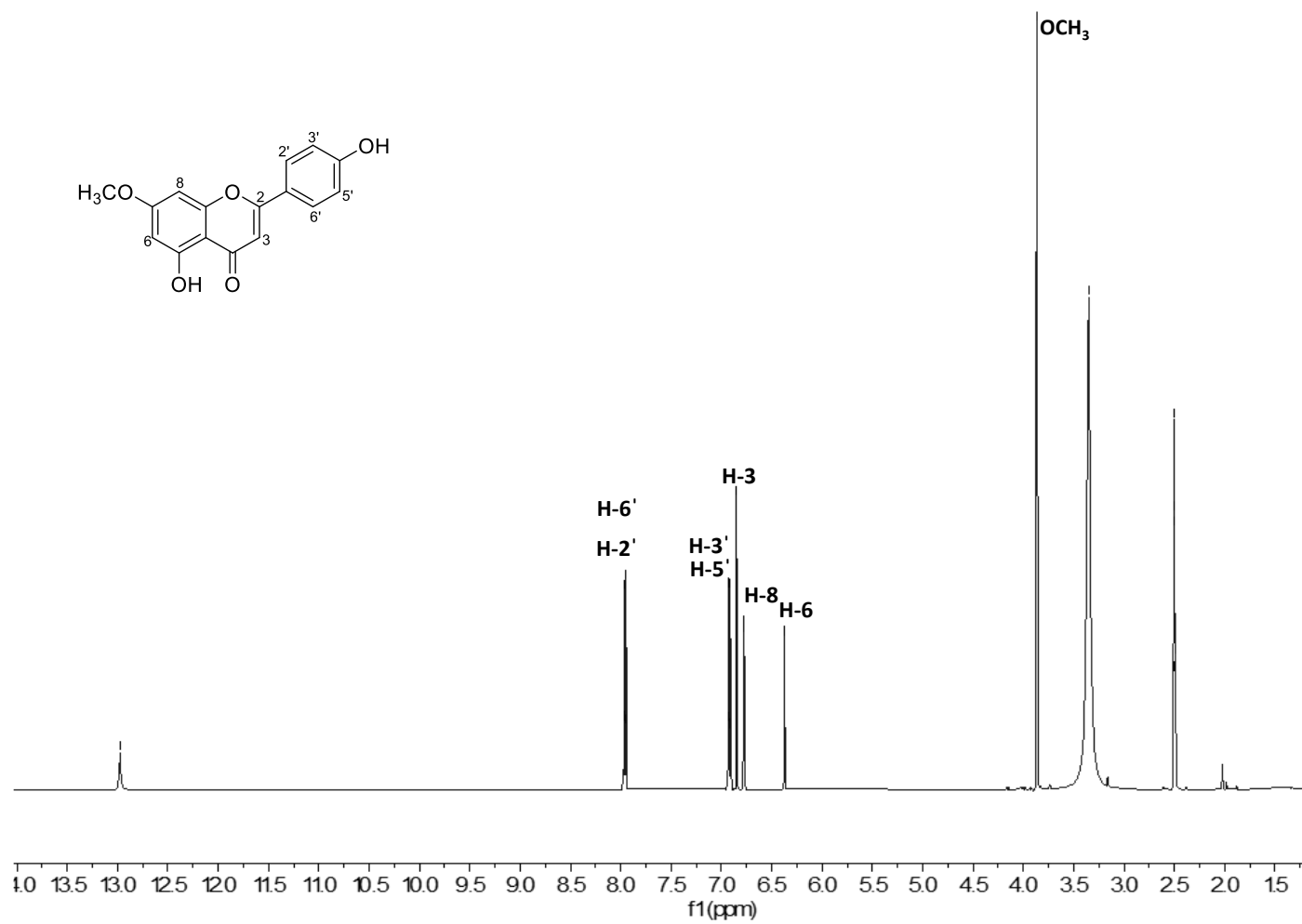


Figura 58. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) de la apigenina (97)

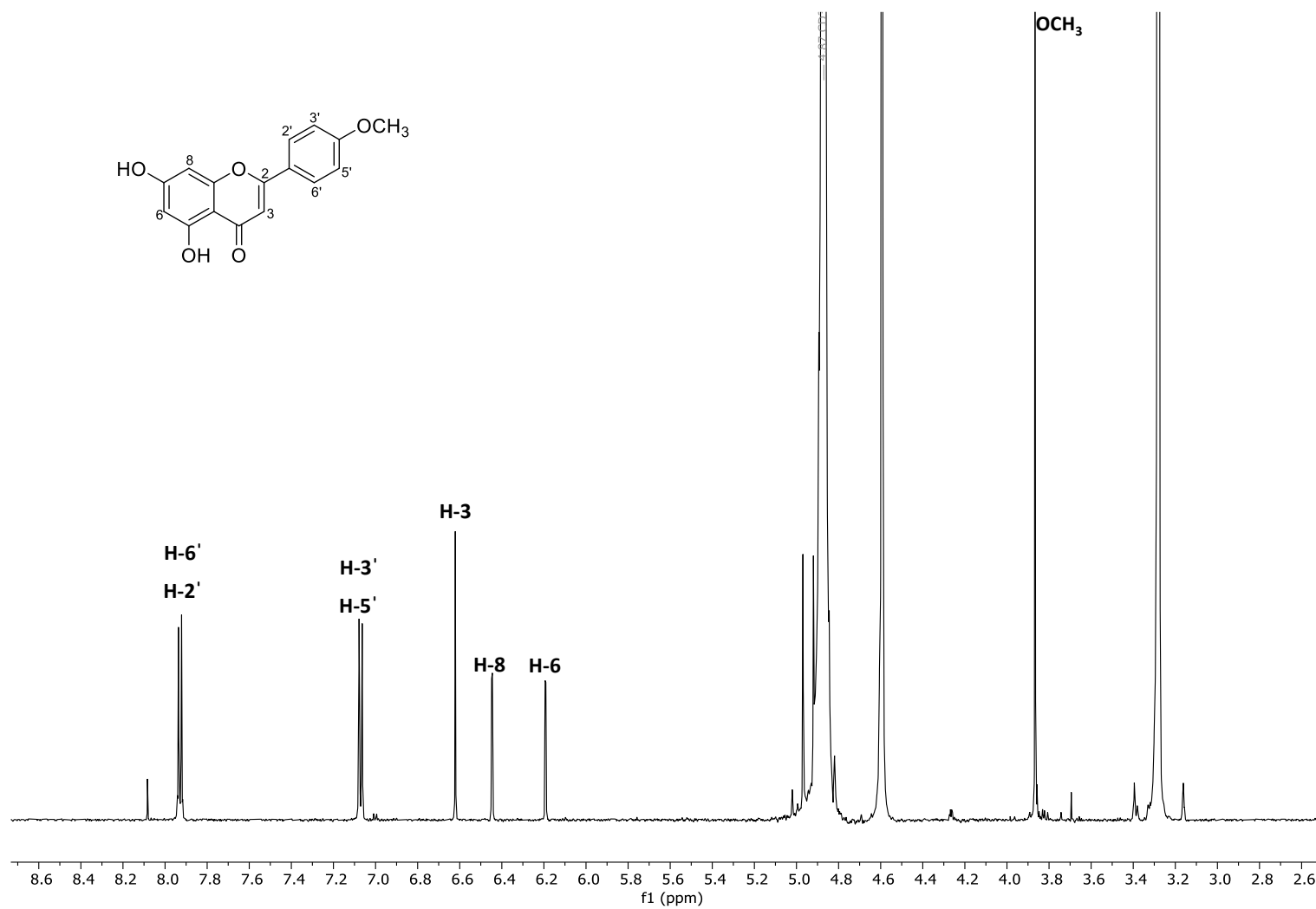




**Figura 59.** Espectro de masas EM- ESI de la apigenina (97)



**Figura 60.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) de la genkwanina (**113**).



**Figura 61.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) de la acetina (126)

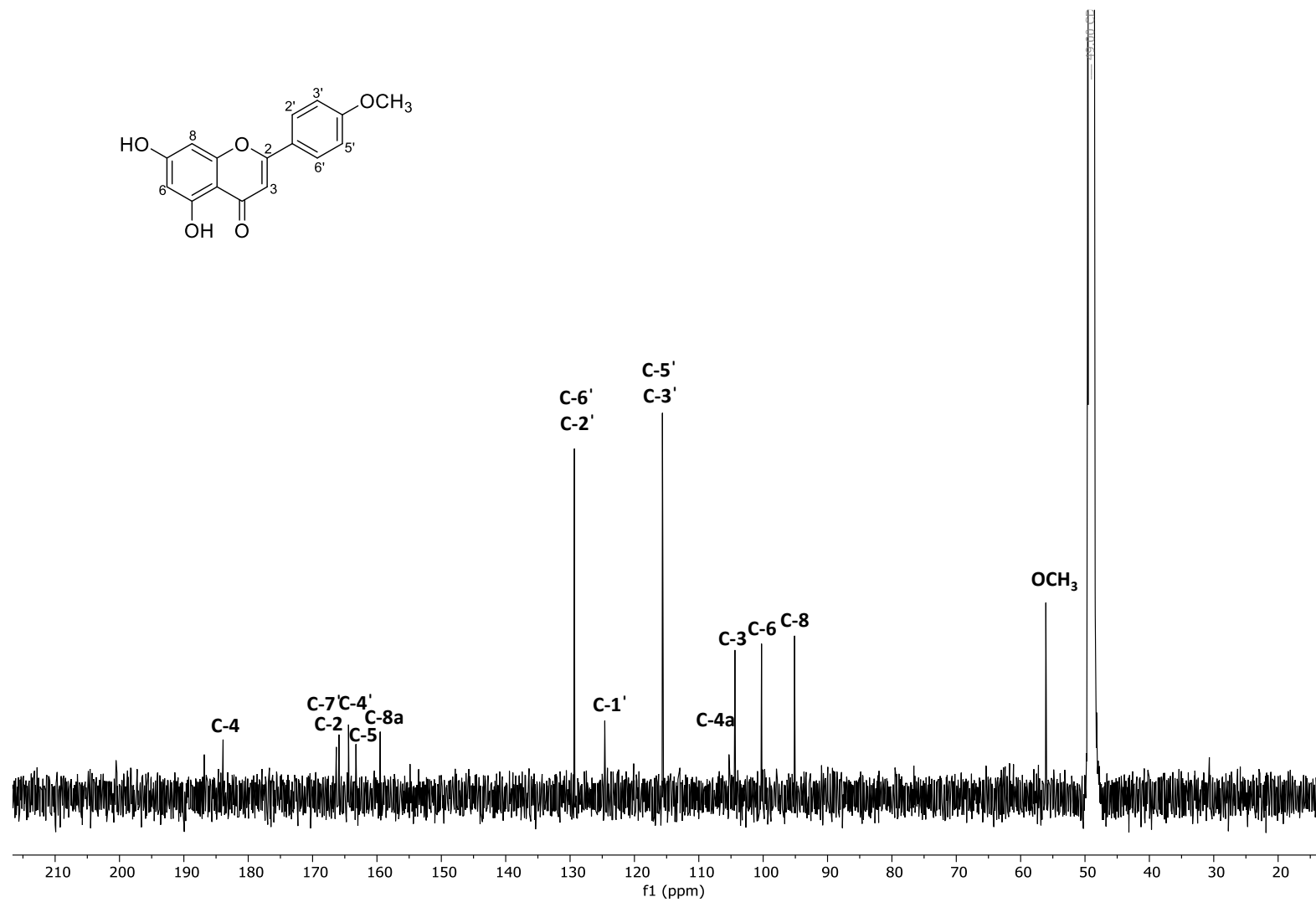
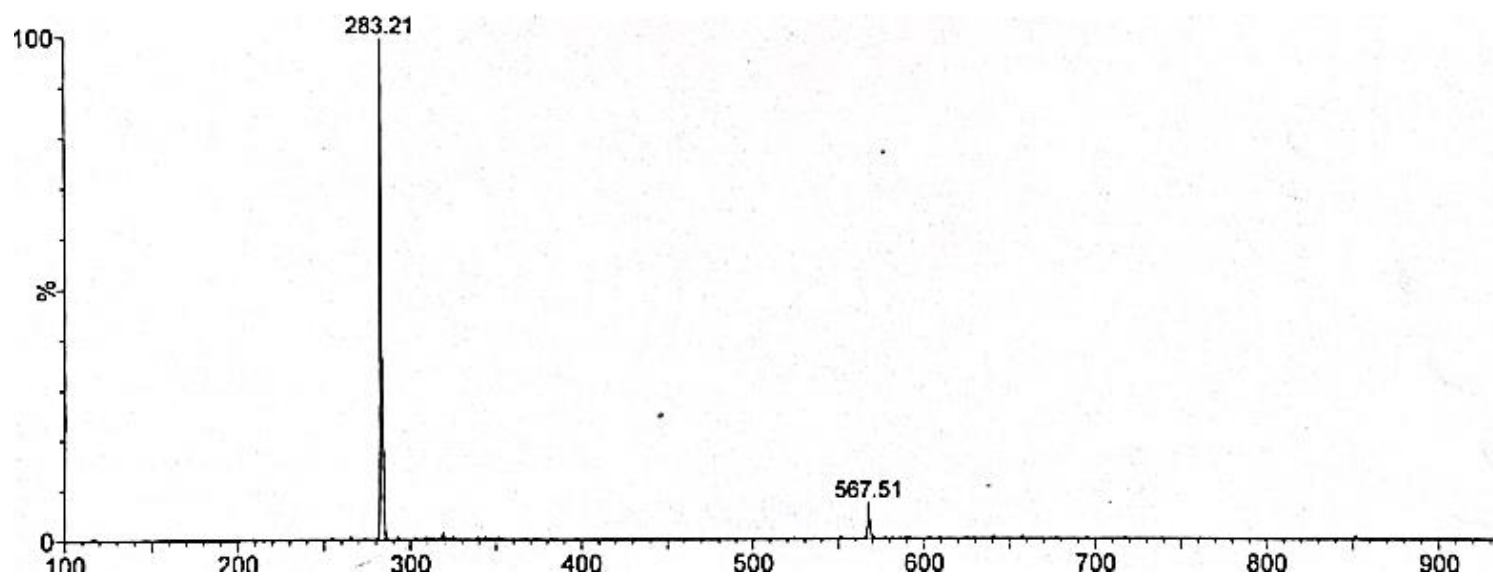
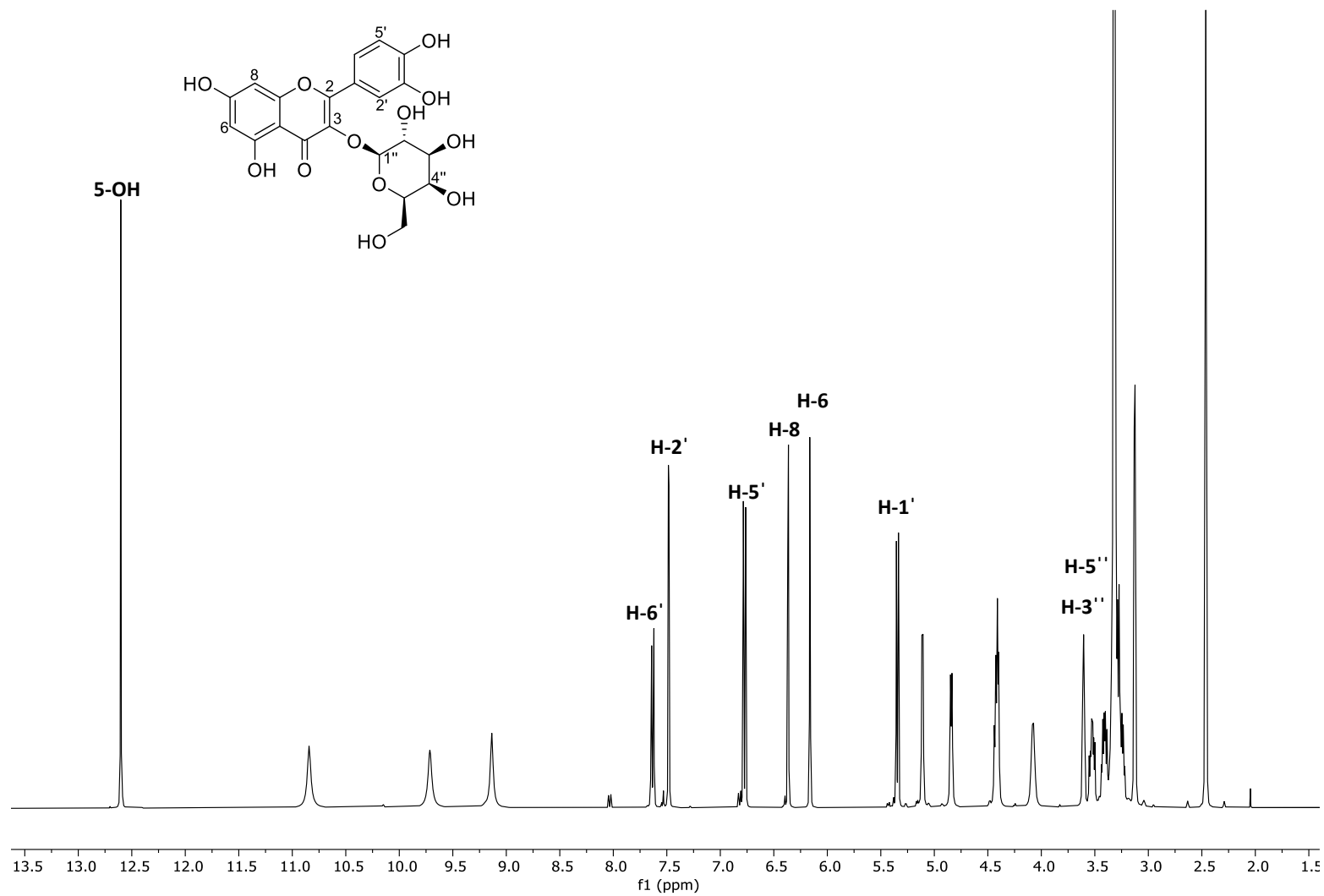


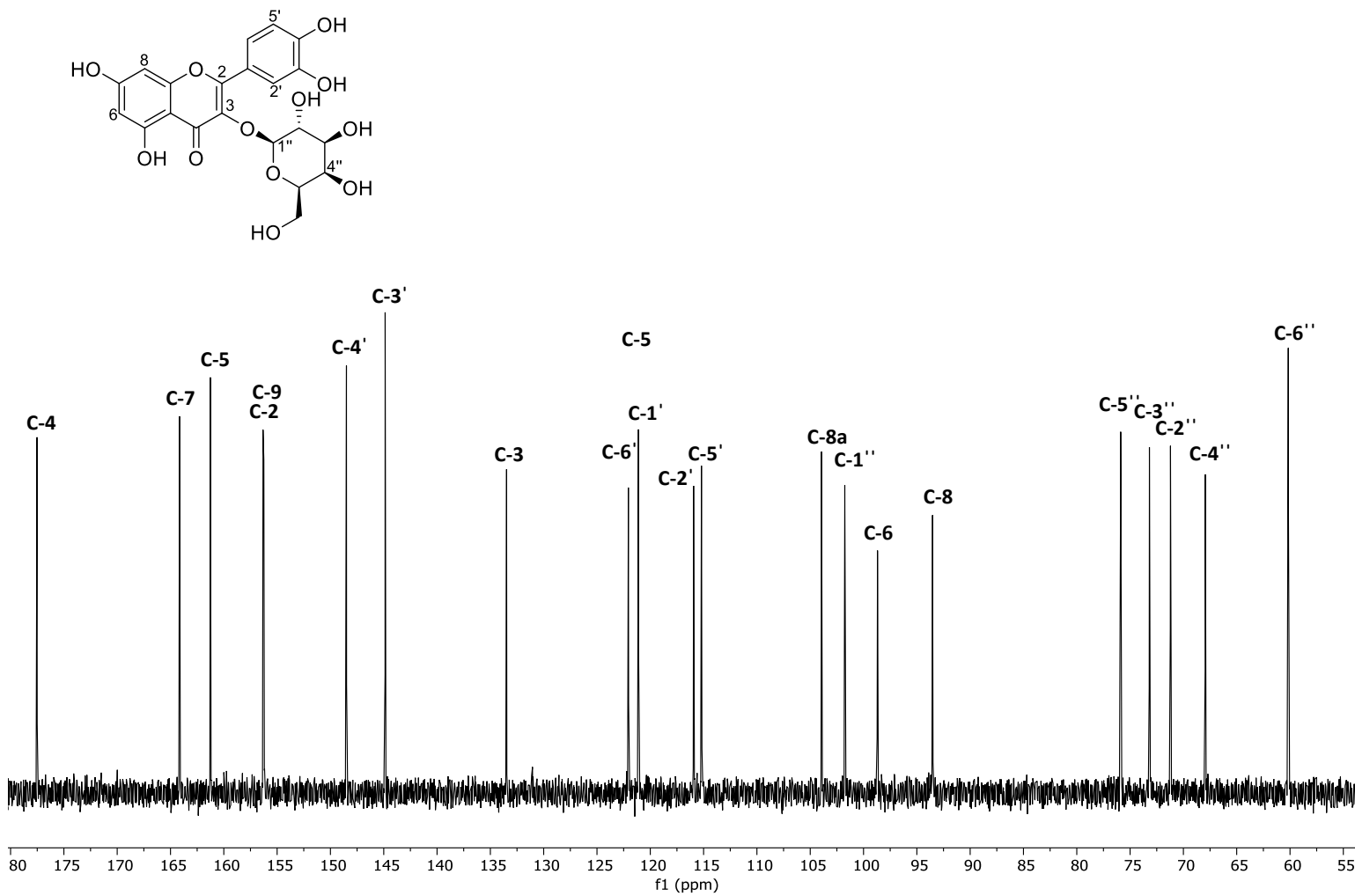
Figura 62. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) de la acetina (126)



**Figura 63.** Espectro de masas EM- ESI de la acetina (**126**).



**Figura 64.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) del hiperósido (**127**).



**Figura 65.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) de hiperósido (**127**).

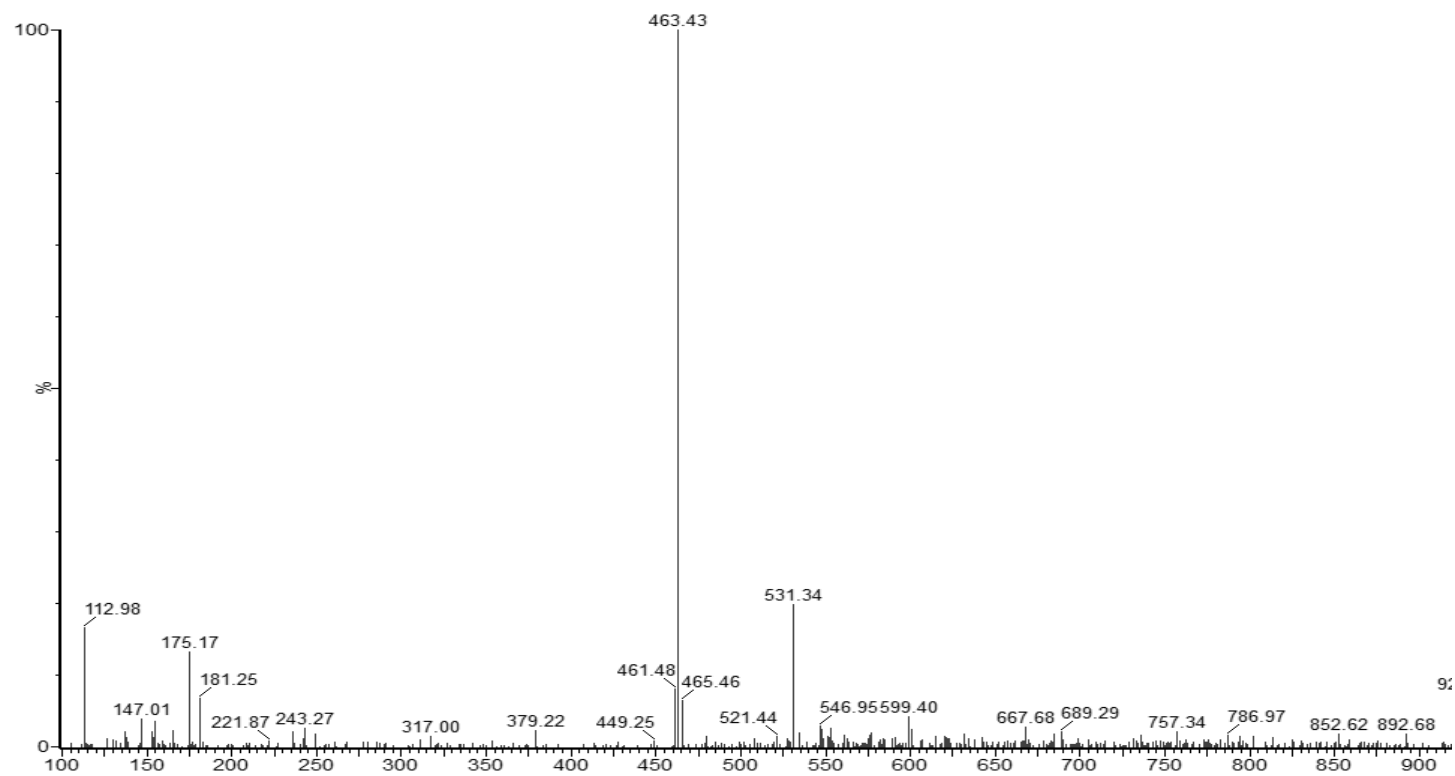
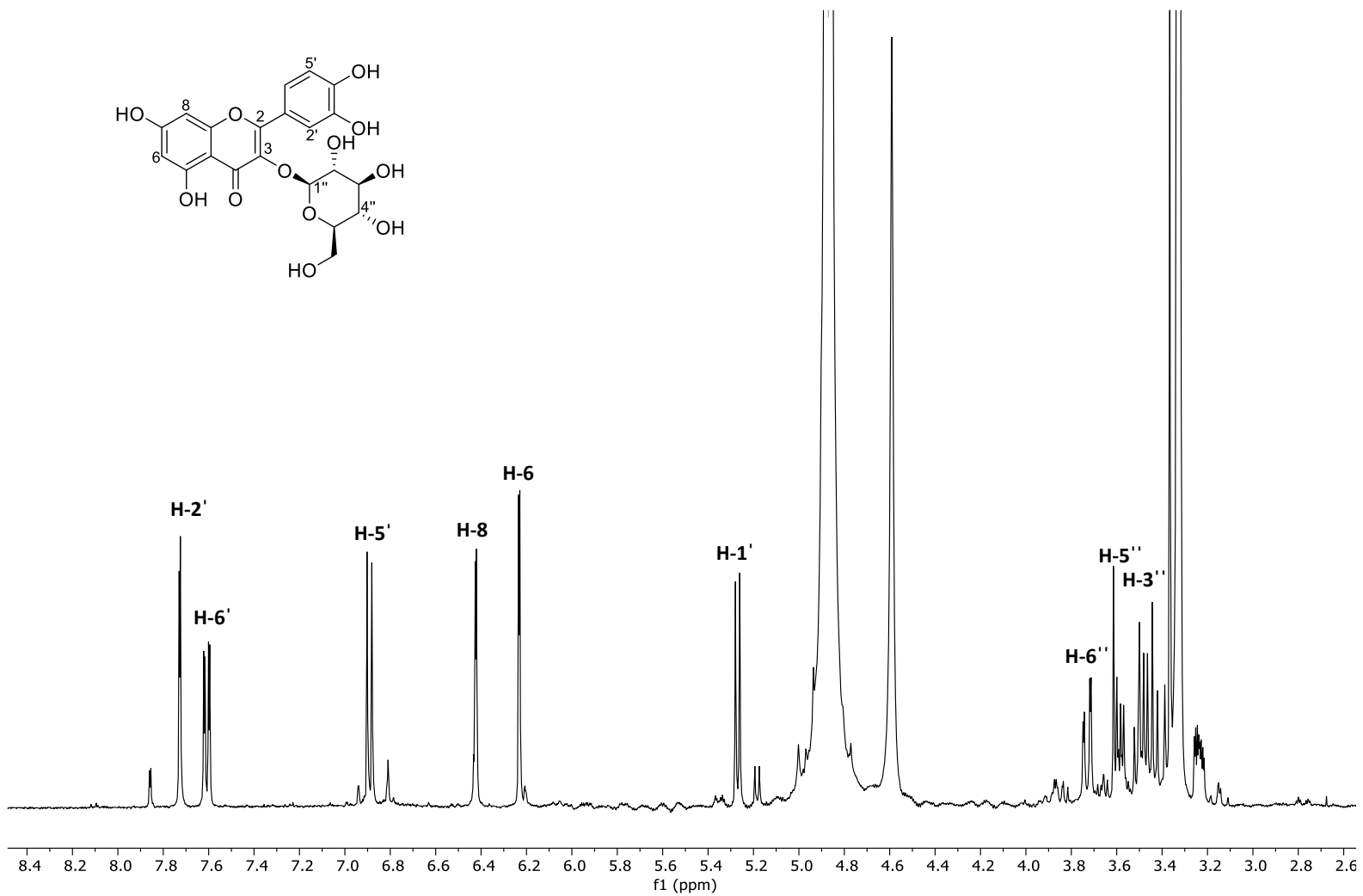


Figura 66. Espectro de masas EM- ESI del hiperósido (127).





**Figura 67.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) de la isoquercitrina (128).

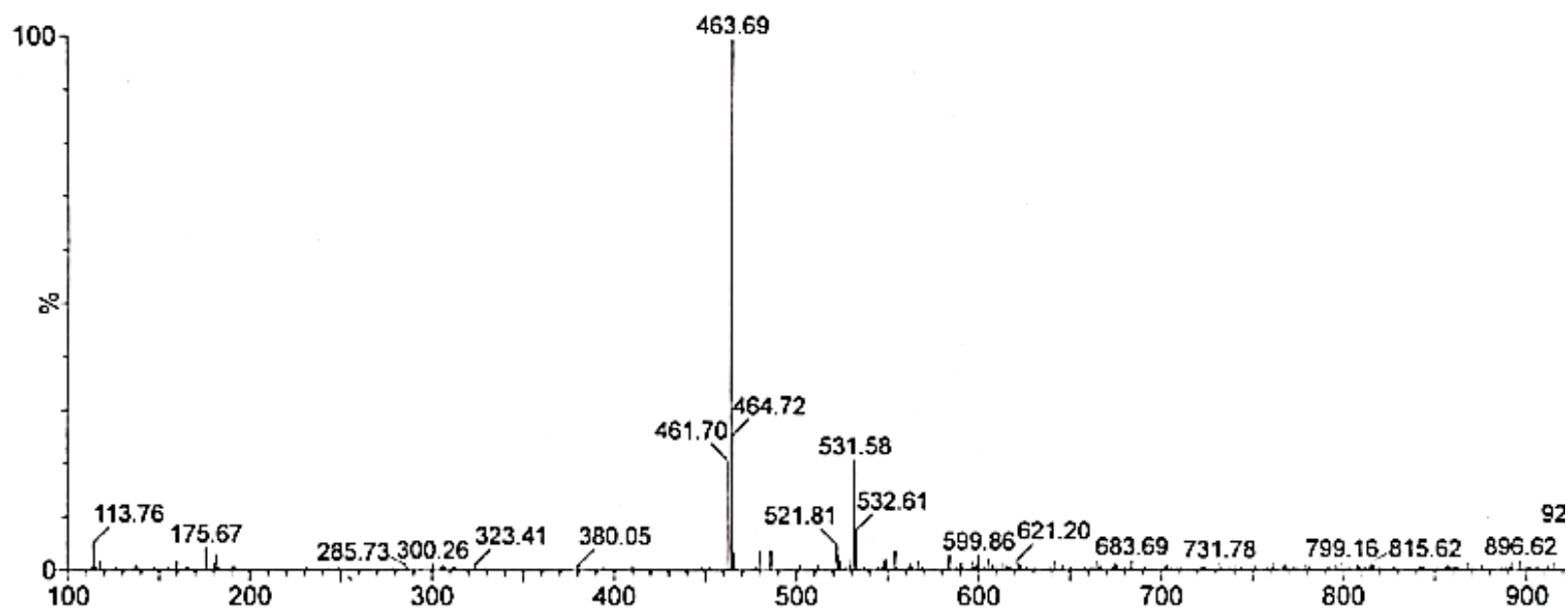
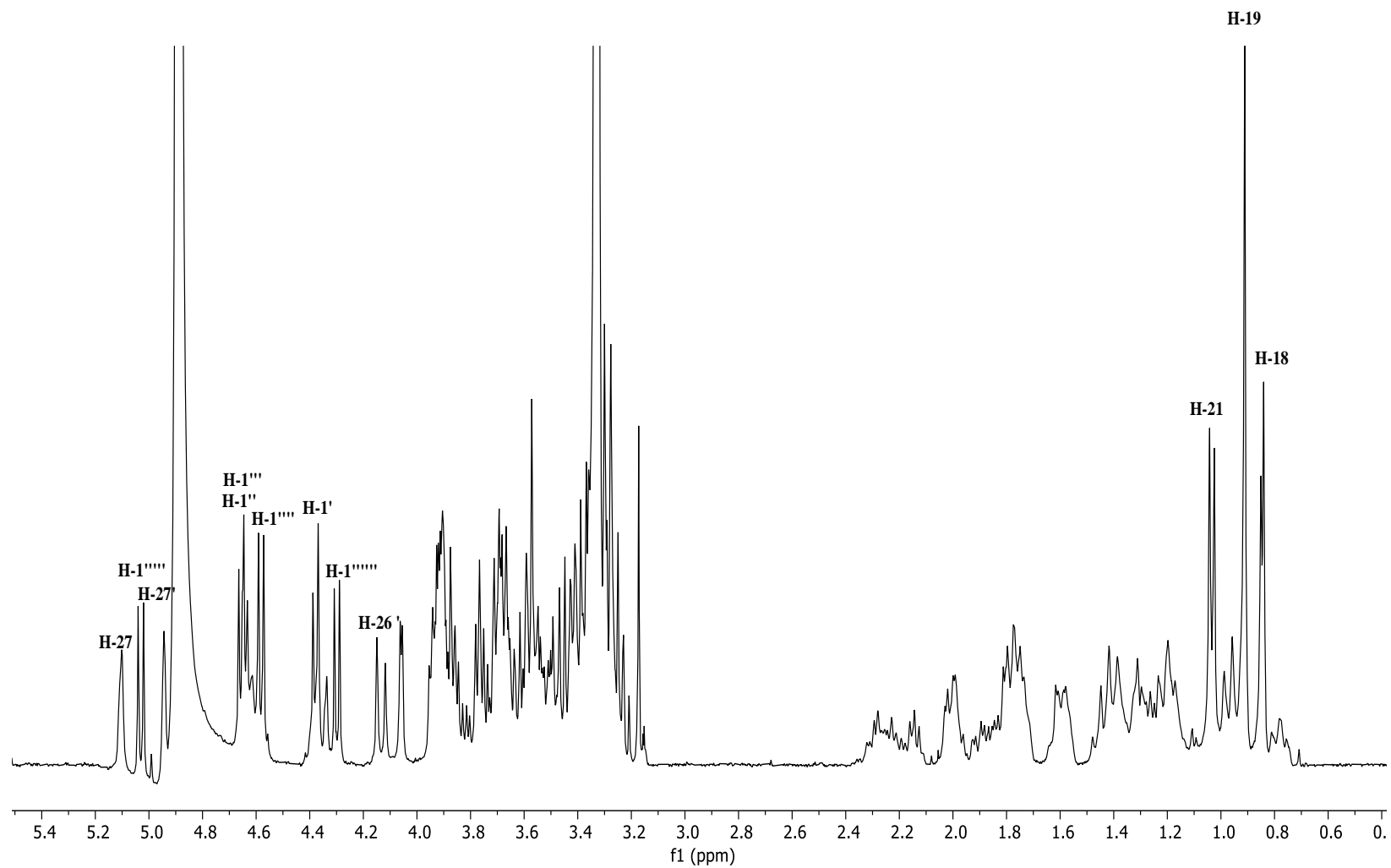


Figura 68. Espectro de masas EM- ESI la isoquercitrina (128).



**Figura 69.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del compuesto **129**.

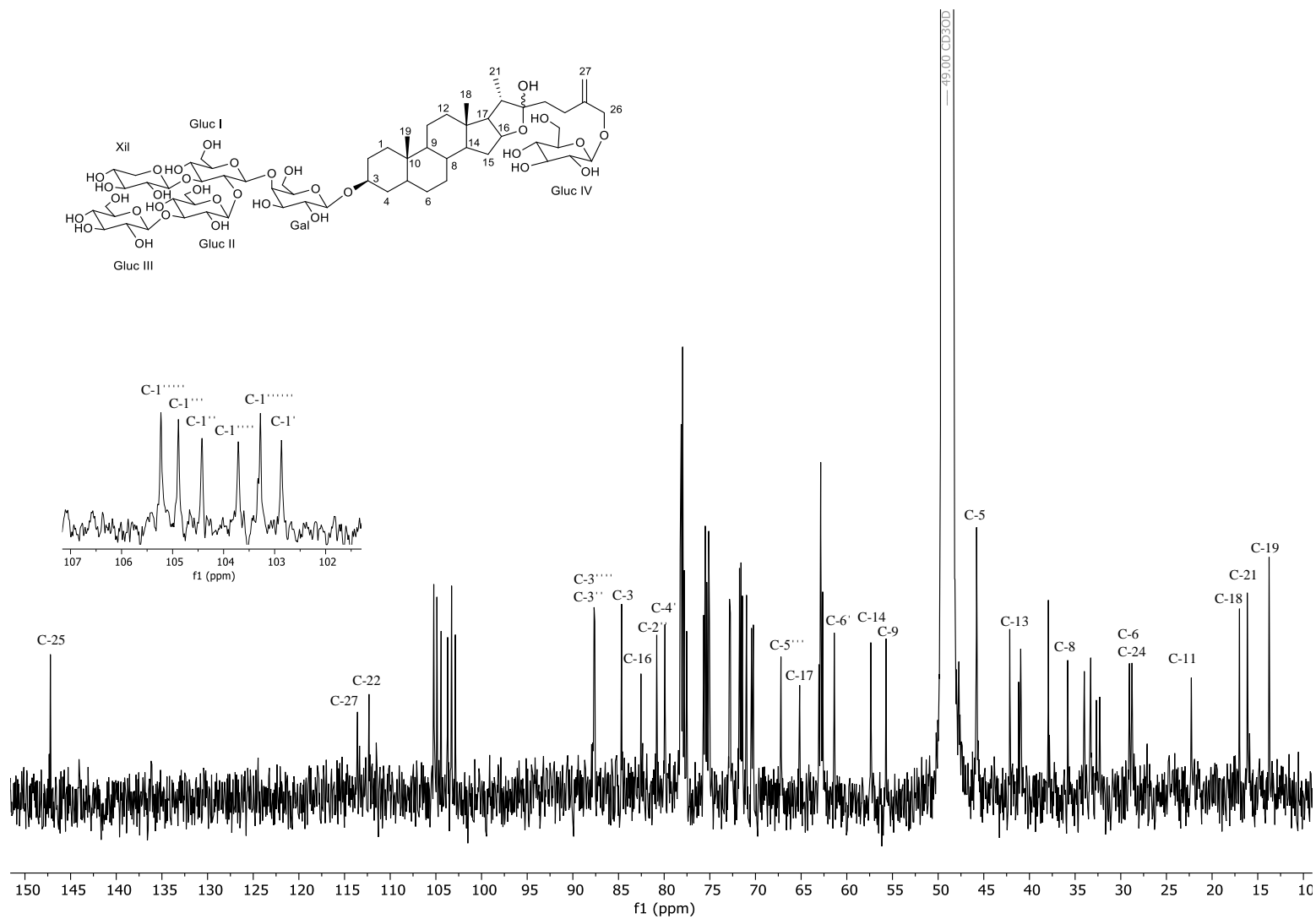
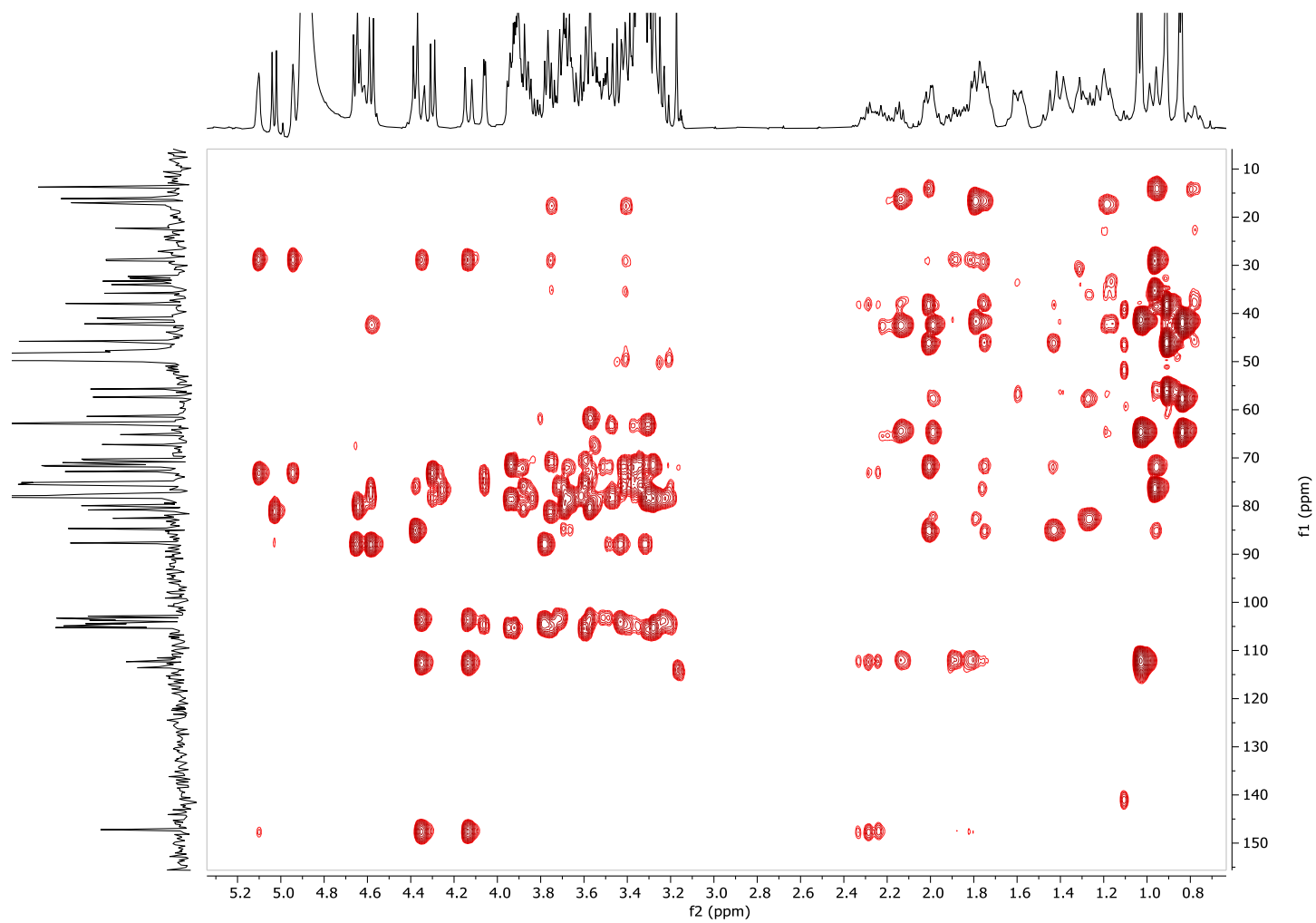
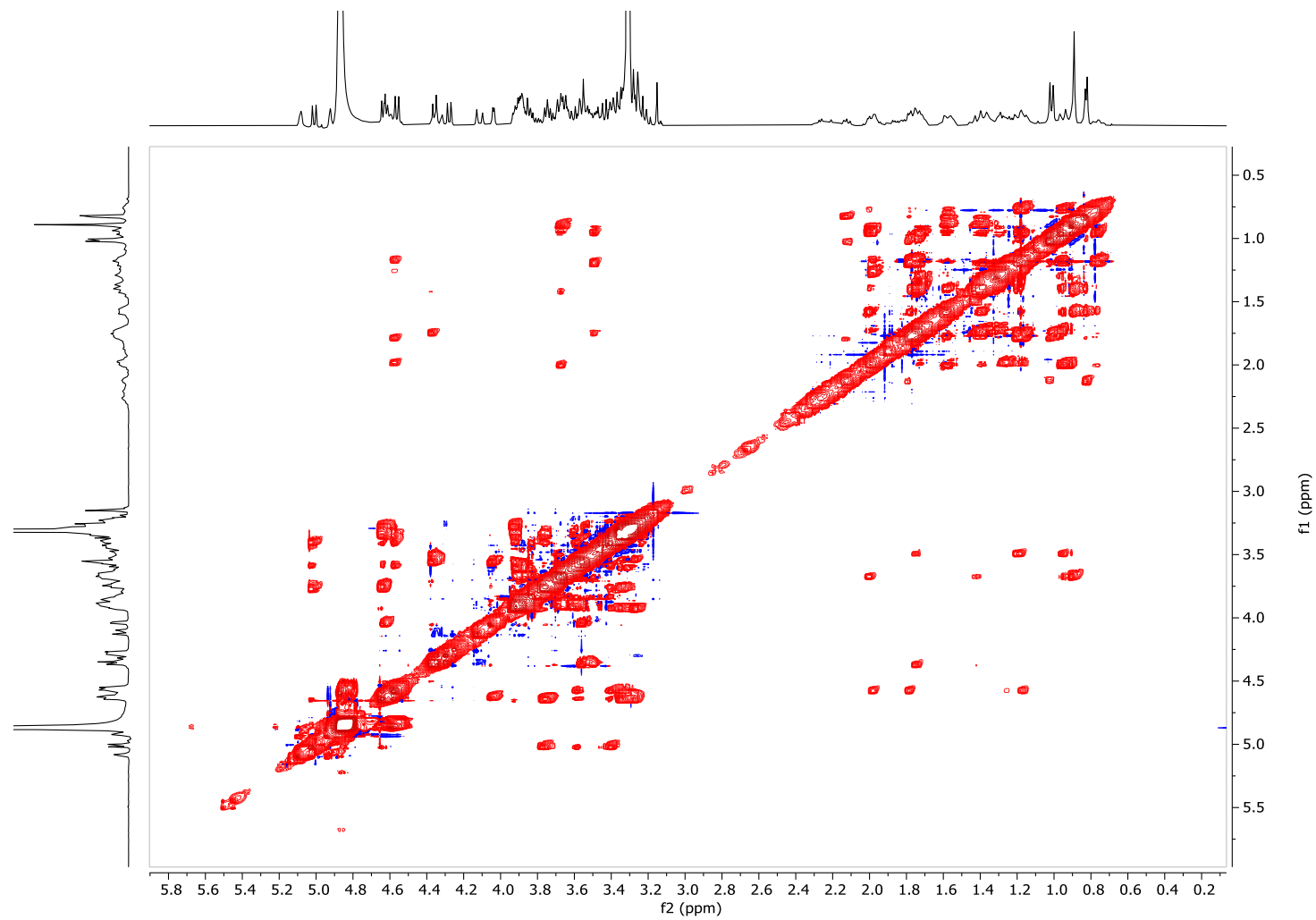


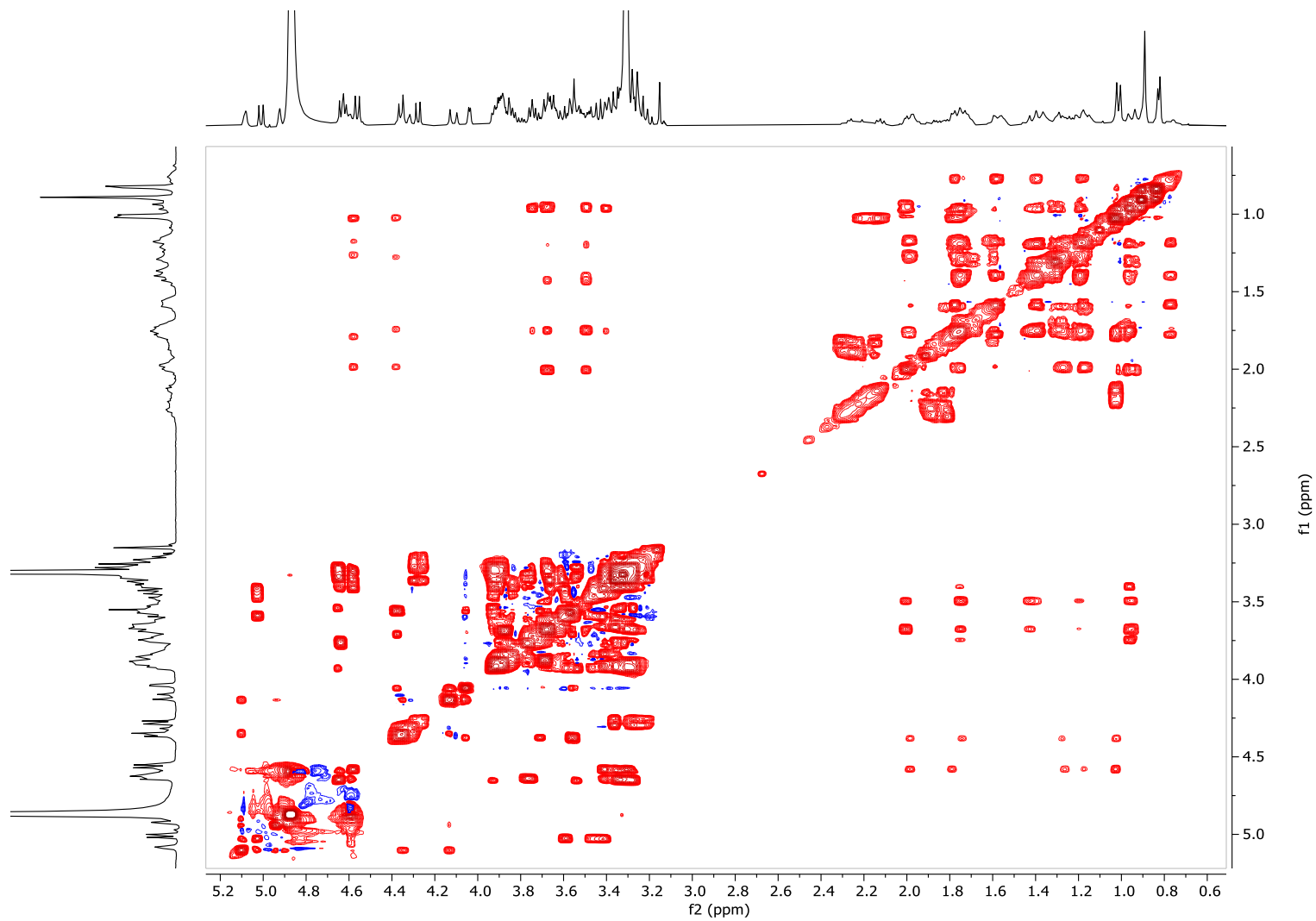
Figura 70. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ) del compuesto 129.



**Figura 71.** Espectro HMBC del compuesto 129.



**Figura 72.** Espectro NOESY del compuesto **129**.



**Figura 73.** Espectro TOCSY del compuesto **129**.

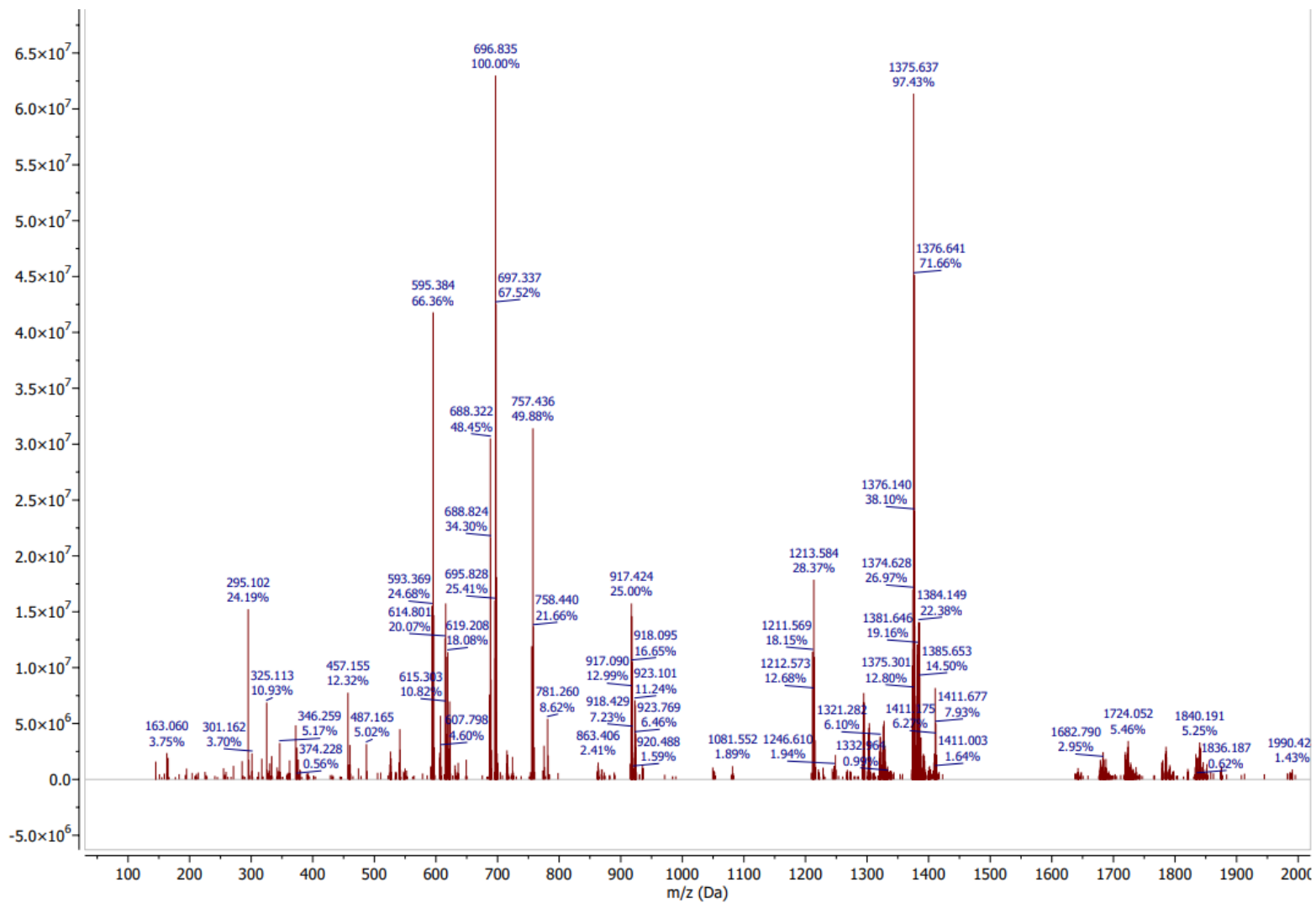
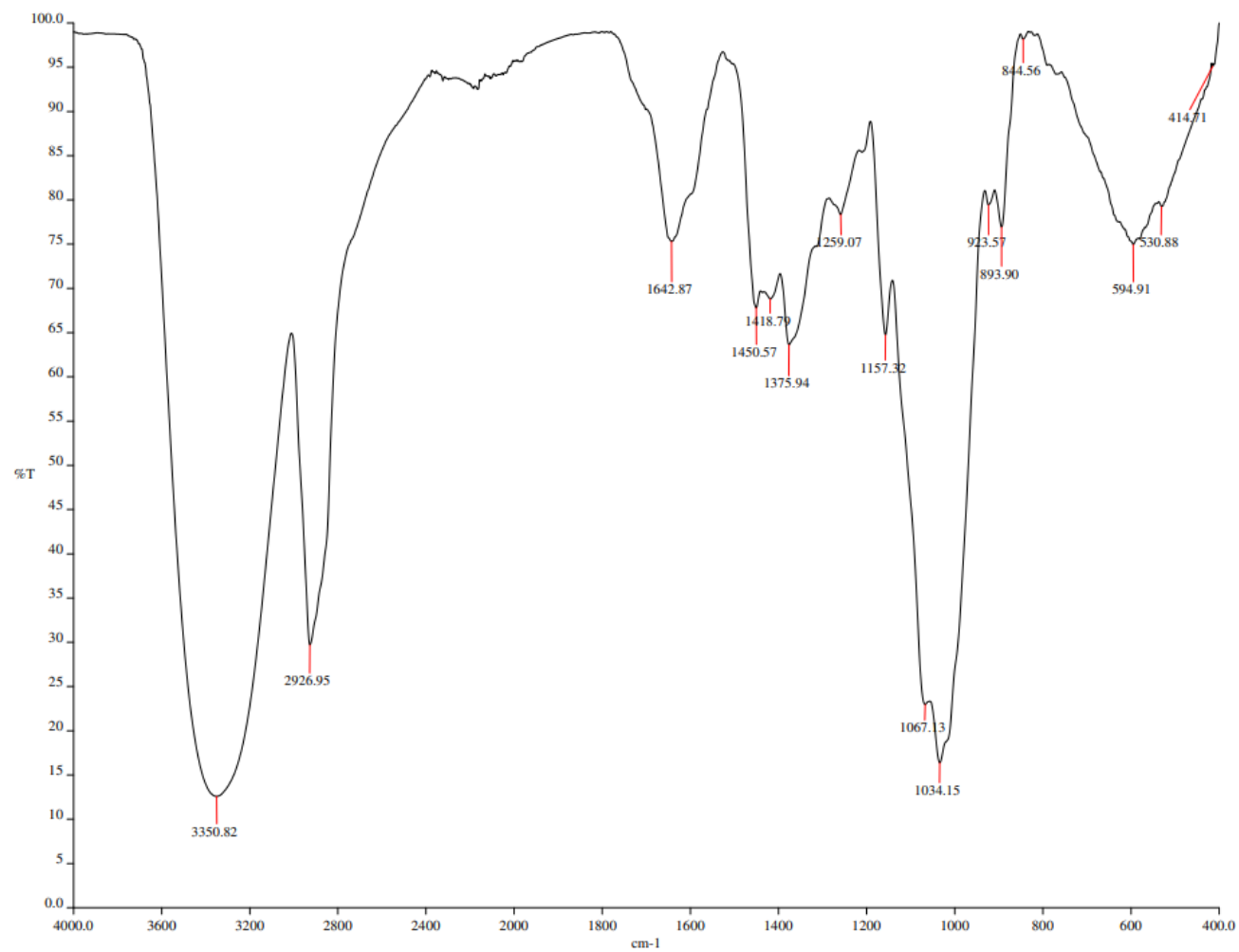


Figura 74. Espectro de masas EM- ESI del compuesto 129.



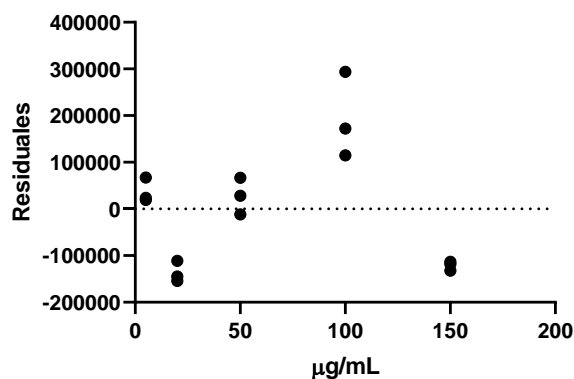


**Figura 75.** Espectro de IR del compuesto **129**.

## **Anexo 3**

**Tabla 21.** Análisis de varianza de la regresión lineal de la linealidad del compuesto **103**.

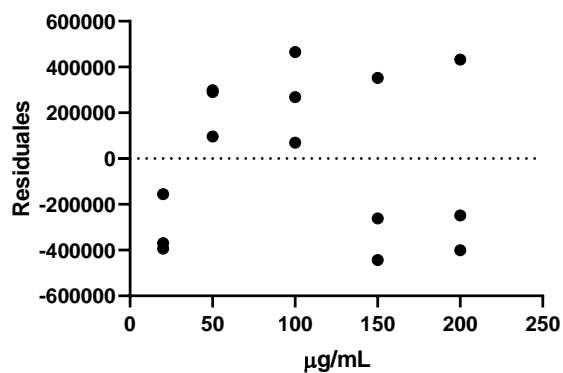
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
Modelo	42866.1	1	42866.1	16455.75
Residuo	33.8641	13	2.60493	
Total (Corr.)	42900.0	14		



**Figura 76.** Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto **103**.

**Tabla 22.** Análisis de varianza de la regresión lineal de la linealidad del compuesto **105**.

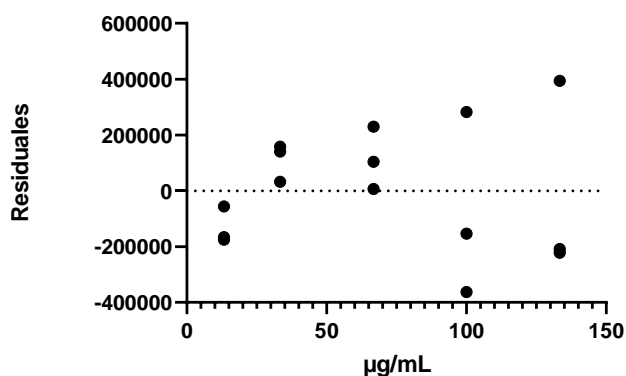
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
Modelo	63778.3	1	63778.3	4562.75
Residuo	181.714	13	13.978	
Total (Corr.)	63960.0	14		



**Figura 77.** Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto **105**.

**Tabla 23.** Análisis de varianza de la regresión lineal de la linealidad del compuesto **106**.

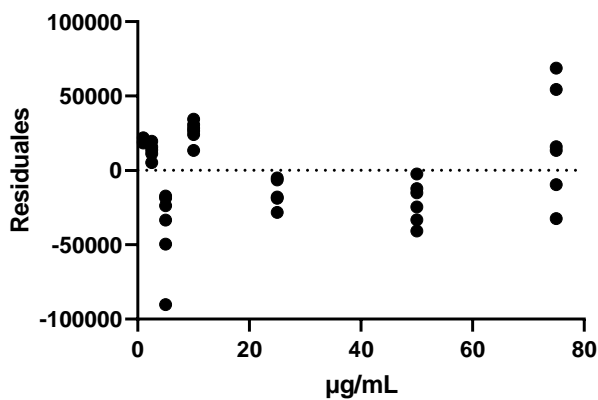
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
<b>Modelo</b>	28323.5	1	28323.5	2982.41
<b>Residuo</b>	123.459	13	9.49685	
<b>Total (Corr.)</b>	28447.0	14		



**Figura 78.** Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto **106**.

**Tabla 24.** Análisis de varianza de la regresión lineal de la linealidad del compuesto **127**.

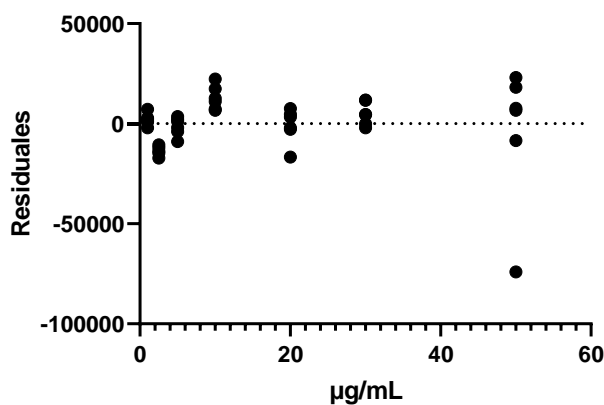
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
<b>Modelo</b>	28946.5	1	28946.5	107822.14
<b>Residuo</b>	10.7386	40	0.268466	
<b>Total (Corr.)</b>	28957.3	41		



**Figura 79.** Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto **127**.

**Tabla 25.** Análisis de varianza de la regresión lineal de la linealidad del compuesto **128**.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
Modelo	11553.9	1	11553.9	136121.23
Residuo	3.39518	40	0.0848794	-
Total (Corr.)	11557.3	41	-	-



**Figura 80.** Gráfica de residuos de la linealidad del compuesto **128**.

**Tabla 26.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método de *B. heterophylla*.

Estadístico	103	105	106
( $b_1$ )	1.008	1.009	1.0205
( $b_0$ )	0.1214	-0.2973	-0.4981
( $R$ )	0.9998	0.9990	0.9998
( $R^2$ )	0.9997	0.9988	0.9997
[IC( $\beta_1$ )]	0.9935 – 1.023	0.973 – 1.035	1.00 – 1.037
[IC( $\beta_0$ )]	-1.241 – 1.484	-4.322 – 3.727	-1.939 – 0.9428

**Tabla 27.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método de *C. dumetorum*.

<b>Estadístico</b>	<b>127</b>	<b>128</b>
<b>(b<sub>1</sub>)</b>	0.9850	1.009
<b>(b<sub>0</sub>)</b>	-0.0228	-0.1075
<b>(R)</b>	0.9999	0.9999
<b>(R<sup>2</sup>)</b>	0.9998	0.9998
<b>[IC(β<sub>1</sub>)]</b>	0.9771 – 0.9929	1.002 – 0.09589
<b>[IC(β<sub>0</sub>)]</b>	-0.3833 – 0.3377	-0.311 – 0.3068

## Article

# Antinociceptive Effect of an Aqueous Extract and Essential Oil from *Baccharis heterophylla*

Erika Castillejos-Ramírez <sup>1</sup>, Araceli Pérez-Vásquez <sup>1</sup>, Rafael Torres-Colín <sup>2</sup>, Andrés Navarrete <sup>1</sup> , Adolfo Andrade-Cetto <sup>3</sup>  and Rachel Mata <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; erikavivani@gmail.com (E.C.-R.); perezva@unam.mx (A.P.-V.); anavarrt@unam.mx (A.N.)

<sup>2</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; rafael.torres@ib.unam.mx

<sup>3</sup> Laboratorio de Etnofarmacología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; aac@ciencias.unam.mx

\* Correspondence: rachel@unam.mx; Tel.: +52-55-5622-5289

**Abstract:** Infusions and poultices prepared from the aerial parts of *Baccharis heterophylla* Kunth (Asteraceae) are widely used in Oaxaca (Mexico) for relieving painful and inflammatory complaints. Therefore, the antinociceptive potential of an aqueous extract (31.6–316 mg/kg, p.o.) and essential oil (30–177 µg/paw, i.pl.) of the plant was assessed using the formalin test. Both preparations inhibited the formalin-induced nociception response (100–316 mg/kg and 100–177 µg/paw, respectively) during the test's second phase. Chemical analysis of the aqueous extract revealed that the major active components were chlorogenic acid (1), 3,4-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (2), 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (3), 4,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (4), 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid methyl ester (5), apigenin (6), genkwanin (7), acacetin (8). Compounds 1–5 and 8 are new for *B. heterophylla*. A high-pressure liquid chromatographic method for quantifying chlorogenic acid (1) and di-caffeoylquinic acids 2–4 in the plant was developed and validated. Analyses of the essential oil and the headspace solid-phase microextraction products, via gas-chromatography-mass spectrometry, revealed that the major volatiles were β-pinene, myrcene, D-limonene, β-caryophyllene, and α-caryophyllene, which have demonstrated antinociceptive properties.

**Keywords:** *B. heterophylla*; Asteraceae; antinociception; infusion; essential oil; quantification; di-caffeoylquinic acids; formalin test



**Citation:** Castillejos-Ramírez, E.; Pérez-Vásquez, A.; Torres-Colín, R.; Navarrete, A.; Andrade-Cetto, A.; Mata, R. Antinociceptive Effect of an Aqueous Extract and Essential Oil from *Baccharis heterophylla*. *Plants* **2021**, *10*, 116. <https://doi.org/10.3390/plants10010116>

Received: 15 December 2020

Accepted: 5 January 2021

Published: 8 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

As in many rural regions of the world, the population of Capulálpam de Méndez, a Zapotec community with well-preserved nature in the state of Oaxaca (Mexico), strongly depends on traditional herbal medicine to meet their primary health care needs [1]. This town has a Traditional Indigenous Medicine Center, which offers healing services to its inhabitants based on regional plants; this practice is firmly anchored in this community's social structure and associated with its ancestral culture and history [2]. Thus, the medicinal plants of Capulálpam de Méndez are an essential part of their lives; accordingly, it is critical to analyze them for the development of evidence-based traditional medicines with known quality, security, and efficacy.

For instituting knowledge-based herbal traditional medicines, whose use is founded on the experience, it is necessary to determine their safety and efficacy using preclinical and clinical assays. When assessing medicinal plants' efficacy, it is crucial to analyze the traditional remedies and their constituents (e.g., flavonoids, terpenoids, phenylpropanoids, alkaloids, or others), considering that usually the efficacy is accomplished with the mixtures of compounds in these preparations. The mixture of compounds might be acting by synergistic multi-target effects, improving pharmacokinetic parameters or other mechanisms.

For quality control of these herbals drugs is important to establish a physicochemical evaluation of crude drug covering aspects, such as selection, macro, and microscopic examination, for detection of the right material, and search of adulterants; qualitative chemical evaluation for identification of single, or a set of constituents (active or not) using chromatography or other analytical procedures; and, finally, quantitative chemical evaluation to estimate the amount of the major classes or constituents, active or not. The processes mentioned involve a wide array of scientific investigations, including physical, chemical, and biological evaluations employing different analytical methods and tools. Altogether, these studies can lead to the development of standardized phytomedicines of good quality [3,4].

One of the medicinal species used in Capulálpam de Méndez for painful and inflammation disorders is *Baccharis heterophylla* Kunth (Asteraceae), a plant widely distributed in Mexico; the aerial parts of this species are consumed in the form of infusions, decoctions, or poultices [5–10]. *Baccharis heterophylla* is known as “chamizo de barrer”, “curacuata”, “jarkatua”, and “hierba de la mula”; among others, and it is also employed widely outside Oaxaca for treating painful complaints. Phytochemical investigations of an exudate from *B. heterophylla* recollected in a not specified location of Oaxaca, Mexico, led to the isolation of different types of secondary metabolites, including flavonoids such as apigenin, genkwanin, and naringenin [11], two triterpenes, oleanolic acid, and maniladiol [11,12], a few sesquiterpenoids and two dimeric clerodanes [13]. Previous pharmacological studies have shown that the CHCl<sub>3</sub>–MeOH (1:1) extract of *B. heterophylla* produced a concentration-dependent inhibition of spontaneous ileum contractions and activated Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride channels in *Xenopus laevis* oocytes [6,14]. However, the species’ efficacy to treat painful complaints, chemical analysis to determine the major compounds of the traditional preparation, and to establish identity and composition tests remain open questions

Based on the above considerations, the aims of this study were: (i) To investigate the preclinical efficacy of an aqueous extract (AE), and essential oil (EO) prepared from the aerial parts of *B. heterophylla* for treating painful ailments, as well as their chemical composition. (ii) To develop an analytical method using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) to quantify the major components of the traditional preparation.

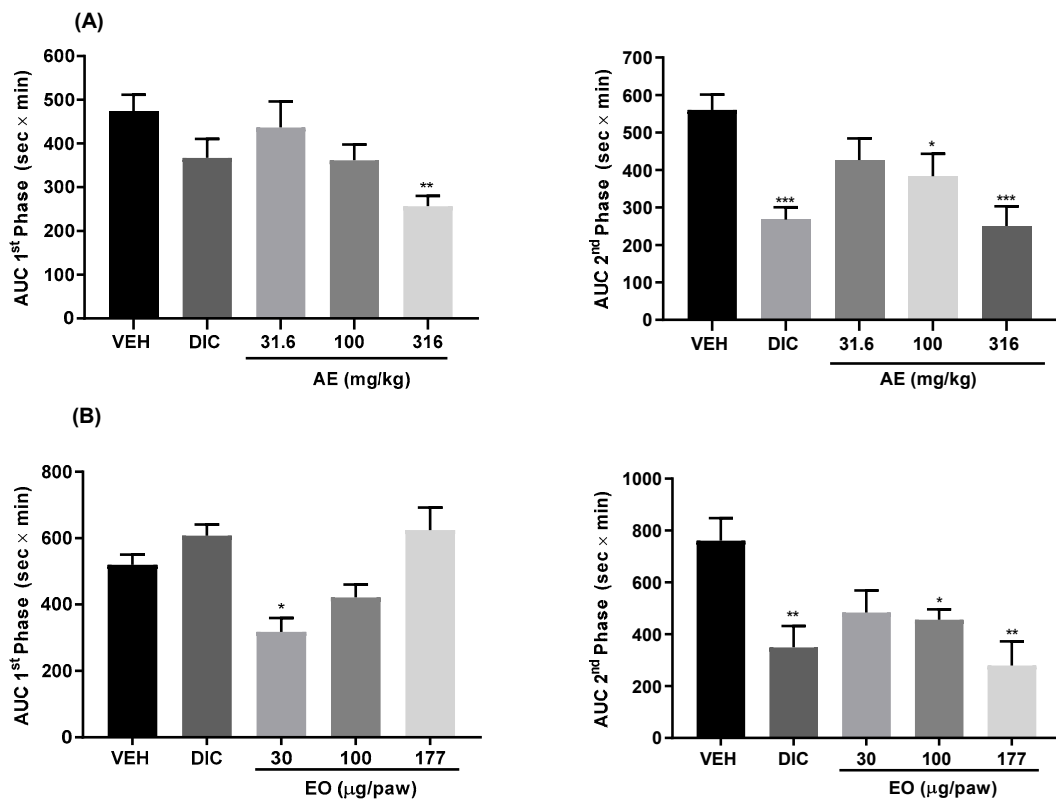
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Antinociceptive Effect of the Aqueous Extract and Essential Oil

The use of infusions and poultices of *B. heterophylla* for treating painful complaints led us to evaluate the antinociceptive activity of an AE and EO obtained from the plant’s aerial parts using the formalin test. This test is regarded as a satisfactory laboratory model for the study of nociception as it encompasses inflammatory, neurogenic, and central mechanisms of nociception. The formalin test is also a useful method for assessing the antinociceptive drugs and elucidating their action mechanisms [15]. The first phase reflects centrally mediated pain with the release of substance P and bradykinin, while the second is due to release of histamine, serotonin, nitric oxide, bradykinin, and prostaglandins [15]. Injection of 2% formalin solution subcutaneously in the hind paw of mice pretreated with vehicle resulted in intense spontaneous licking of the injected paw with a classic biphasic response (Figures S1 and S2, Supplementary Materials). However, oral administration of the infusion (31.6–316 mg/kg) provoked antinociceptive effects in both the first and second phases of formalin-induced nociception; in the first stage (Figure 1A), the effect was only observed at the highest dose (316 mg/kg); the highest responses in the second phase was observed at the doses of 100 and 316 mg/kg, which reduced the licking time significantly. The results were comparable to the action produced by diclofenac (DIC, 50 mg/kg), employed as a positive control drug. On the other hand, intraplantar pretreatment of mice with EO (30–177 µg/paw) also decreased the nociceptive response in both phases of the formalin test (Figure 1B); in the first stage, the highest effect was observed at the concentration of 30 µg/paw, but in the second phase the antinociceptive action was more pronounced at the concentrations of 100 and 177 µg/paw, the results were comparable to the effect produced by positive control (DIC, 100 µg/paw). The overall outcomes suggested that the aqueous



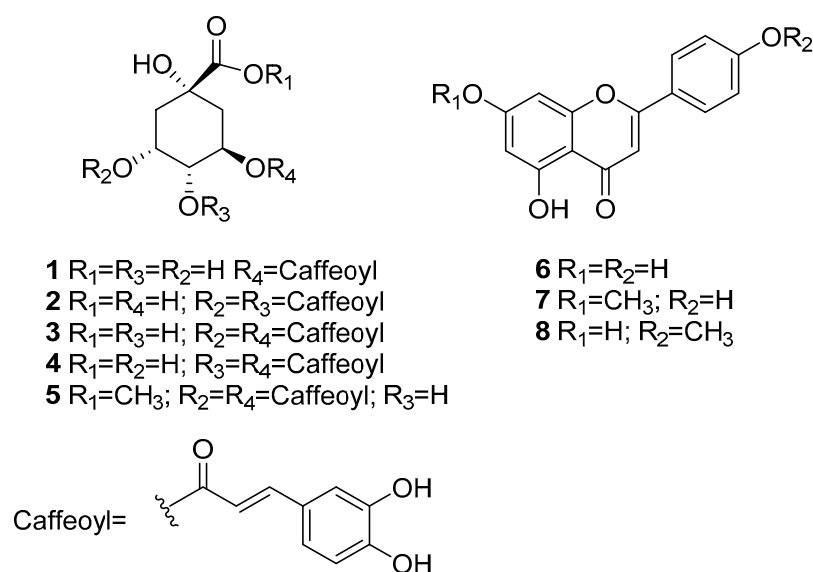
extract and essential oil of *B. heterophylla* exhibited antinociceptive action in both phases of the formalin test.



**Figure 1.** Antinociceptive effect of an aqueous extract (31.6–316 mg/kg) and an essential oil (30–177 µg/paw) from *B. heterophylla* in the formalin test in mice. **(A)** AUC from the time course curve of phase 1 and AUC from the time course curve of phase 2. VEH: vehicle (0.9% saline solution). DIC (50 mg/kg, p.o.). **(B)** AUC from the time course curve of phase 1 and AUC from the time course curve of phase 2. VEH: vehicle (0.9% saline solution). DIC: (100 µg/paw, i.pl.). Each measurement represents the mean ± SEM 6 mice per group. Significantly different from VEH group (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) determined by ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

## 2.2. Chemical Constituents of the Aqueous Extract

Chemical investigation of the aqueous extract afforded eight known compounds (Figure 2), identified as chlorogenic acid (1) [16], 3,4-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (2) [17], 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (3) [16–18], 4,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (4) [16–18], 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid methyl ester (5) [17], apigenin (6) [19], genkwanin (7) [17], and acacetin (8) [20]. The structures of the known compounds were identified by comparing their spectroscopic and spectrometric data with those previously reported or by comparison with authentic samples (Tables S1 and S2, Supplementary Materials). Compounds 1–5 and 8 are reported for the first time in this species.



**Figure 2.** Compounds isolated from *B. heterophylla*'s aqueous extract.

As with other plant's traditional preparations [21–29], the antinociceptive effects of AE could be related to the high content of chlorogenic acid (1), di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acids (2–4), apigenin (6) and acetin (8). Thus, in vivo studies demonstrated that compounds 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (3) and 4,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (4) showed antinociceptive action in the acetic acid-induced writhing model and the hot plate assay in mouse [21,22]. Compounds 1, 3, and 4 significantly inhibited carrageenan-induced rat paw edema [23,24]. In vitro, compound 4 inhibited hypoxia-induced cyclooxygenase-2 (COX-2), expression and cell migration via a TRPV1-mediated pathway [25]; pretreatment of RAW264.7 macrophage cells with a mixture of di-caffeoyl quinic acids or pure 3 suppressed the production of NO, PGE2, and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6) by inhibiting the NF- $\kappa$ B and MAPKs pathways ([26–28] inter alia). On the other hand, flavonoids 6 and 8 showed antinociceptive effects in different models [29].

### 2.3. Volatile Composition Analyses

The volatile components profile of *B. heterophylla* was gathered by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses of EO obtained by hydrodistillation and head space-solid phase microextraction (HS-SPME)-adsorbed compounds. The HS-SPME is a more efficient, quicker, and free-solvent method for analyzing volatile constituents from plants and other matrices [30].

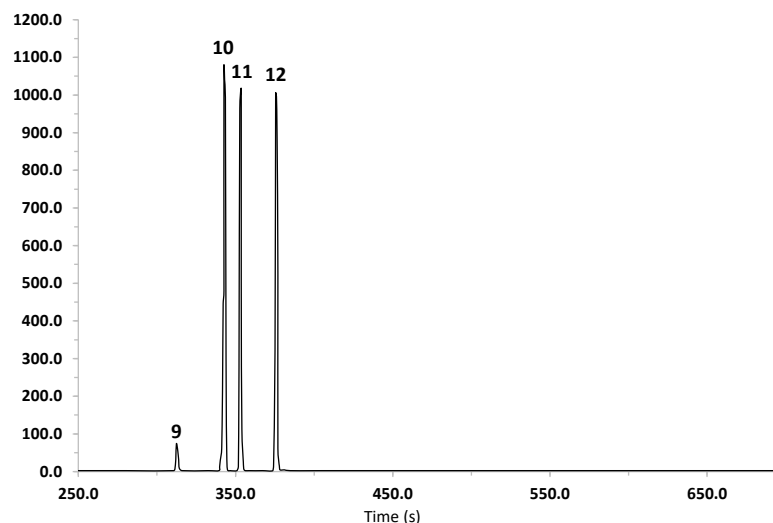
The results of the study of EO are summarized in Table 1 and Figure 3. The EO of *B. heterophylla* is characterized by a high concentration of monoterpenes, such as  $\beta$ -pinene (28.86%), myrcene (29.57%), and D-limonene (36.24%). These results agree with the chemical composition of essential oils reported for other species of the genus *Baccharis* [31].

For the HS-SPME analysis, four fibers were employed, carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), and polydimethylsiloxane (PDMS). As summarized in Table 1, the analysis with these fibers allowed the identification of 13, 13, 14, and 14 compounds, respectively; their relative percentages and retention indexes are also indicated in Table 1.  $\beta$ -Pinene, D-limonene, and myrcene were the major components detected with DVB/CAR/PDMS and CAR/PDMS stationary phases; this composition is consistent with the main compounds detected in EO. On the other hand, cedrene and  $\beta$ -caryophyllene were the most abundant compounds detected with PDMS and PDMS/DVB-coat fibers.

**Table 1.** Volatile constituents from *B. heterophylla* identified by GC-MS obtained by HS-SPME using different fibers and by hydrodistillation.

N°	Compound	<i>I<sub>R</sub></i>	Percent of Each Component				
			EO **	PDMS *	PDMS/DVB *	DVB/CAR/PDMS *	CAR/PDMS *
9	α-Pinene	922	5.34	-	-	-	-
10	β-Pinene	969	28.86	4.29	4.85	10.6	1.97
11	Myrcene	982	29.57	3.43	9.4	27.19	10.53
12	<i>o</i> -Cymene	1016	-	-	-	-	26.71
13	D-Limonene	1019	36.24	4.07	8.82	23.02	26.71
14	<i>p</i> -Cymenene	1081	-	-	-	-	3.18
15	δ-Elemene	1327	-	2.45	1.34	-	-
16	Cedrene	1413	-	19.99	15.62	-	-
17	β-Caryophyllene	1414	-	19.99	15.62	9.25	4.23
18	Isogermacrene D	1422	-	8.51	5.12	1.89	-
19	Aromadendrene	1435	-	3.64	4.01	-	1.92
20	α-Caryophyllene	1447	-	7.37	6.95	1.72	5.03
21	Germacrene D	1454	-	1.14	1.15	-	-
22	γ-Elemene	1470	-	5.6	4.45	8.59	2.7
23	α-Selinene	1479	-	1.04	-	-	-
24	β-Cadinene	1486	-	-	-	-	4.46
25	β-Amorphene	1488	-	-	-	4.77	4.32
26	β-Himachalene	1493	-	9.72	8.46	1.27	-
27	δ-Amorphene	1510	-	-	3.53	4.3	-
28	Calamenene	1511	-	-	-	4.3	3.92
29	α-Cadinene	1525	-	-	-	2.45	1.6
30	α-Calacorene	1531	-	0.39	0.4	0.64	-
Total (%)			100	91.63	89.72	99.99	97.28

*I<sub>R</sub>*: Index retention on a DB-5 column with reference to *n*-alkanes. \* Fibers used for HS-SPME. \*\* Obtained by hydrodistillation.



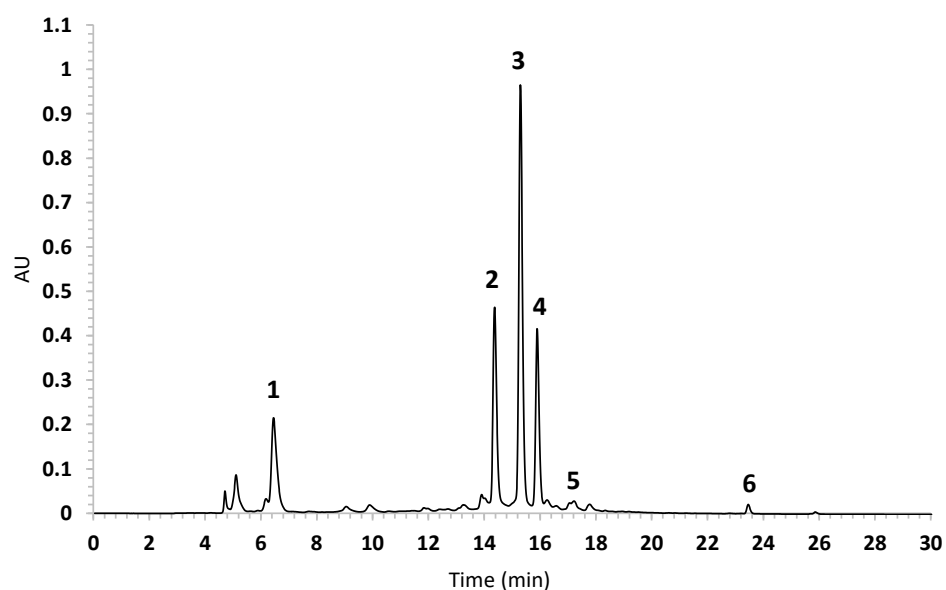
**Figure 3.** Total ion current chromatogram of the components of the essential oil from *B. heterophylla* extracted using hydrodistillation. Peaks are:  $\alpha$ -pinene (9),  $\beta$ -pinene (10), myrcene (11) and D-limonene (12).

Altogether, these results revealed that the mixed polarity DVB/CAR/PDMS fiber was the most suitable to establish the volatile composition of the plant's aerial parts, which is characterized by a high number of hydrocarbons. The total ionic chromatograms of the volatile compounds obtained using this technique are shown in the supplementary materials (Figures S3 and S10).

The major components of the antinociceptive essential oil of *B. heterophylla* are present in several essences, which showed antinociceptive properties [32–36].  $\beta$ -Pinene (0.3 mg/kg) exhibited antinociceptive action in the hot-plate and tail-flick models in rodents [32].  $\alpha$ -Pinene decreased the LPS-induced production of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and inhibited the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) [33]. At a dose of 10 mg/kg, myrcene was effective in the formalin and hot-plate tests [34]. Besides, myrcene and limonene inhibited IL-1 $\beta$ -induced nitric oxide production in human chondrocytes [35]. Finally, limonene exerted anti-inflammatory and antinociceptive effects in vivo (particularly in chemical models of nociception in mice) and in vitro assays mainly by modulating the action of cytokines and participating in pathways that are closely linked to the inflammatory response [36].

#### 2.4. Method Validation

In the present study, chlorogenic and di-caffeoylquinic acids were selected as markers for the quantitative analysis of *B. heterophylla*. The optimal chromatographic separation was achieved with a Waters HPLC equipped with an XBridge BEH Shield RP18 column and a mixture of water containing 0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phase, which was chosen after several trials; the PDA detection wavelength ( $\lambda$ ) was set at 327 nm; under these optimized conditions, an effective resolution was achieved for compounds 1–4. Compounds 1–4 were identified by their retention time and coelution with AE; a representative chromatogram of the AE of *B. heterophylla* (BH-1) is shown in Figure 4. The developed method was validated using compounds 1, 3 and 4 according to the International Conference on Harmonization guideline (ICH) [37], and was successfully applied to determine the content of caffeoylquinic acids in AE prepared from different batches of the plant. The overall results are summarized in Tables 2 and 3.



**Figure 4.** HPLC-PDA chromatogram of *B. heterophylla* aqueous extract under optimized conditions; detection wavelength at 327 nm. Peak identification: 1:  $R_T$  6 min; 2:  $R_T$  14.6 min; 3:  $R_T$  15.6 min; 4:  $R_T$  16.2 min; 5:  $R_T$  17.2 min; 6:  $R_T$  23.6 min.

**Table 2.** Parameters of validation of method for determination of constituents in *B. heterophylla*.

N°	Linear Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Calibration Equation	$R^2$	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision		Recovery (% Mean)
						Intraday (% RSD)	Interday (% RSD)	
1	5–150	$y = 84,372x + 67,400$	0.999	1.5	0.5	0.91	1.32	100.83
3	20–200	$y = 93,446x - 216,607$	0.997	6.6	2.2	1.22	1.8	99.15
4	13.4–133.4	$y = 72,602x - 156,669$	0.996	4.1	1.4	1.96	2.0	100.4

**Table 3.** Contents (mg/g) compounds in four batches of the *B. heterophylla* ( $n = 3$ ).

Compound	$R_T$ (min)	Content (mg/g)			
		BH-1	BH-2	BH-3	BH-4
1	6	$37.9 \pm 3.4$	$39.7 \pm 1.7$	$29.3 \pm 1.8$	$33.9 \pm 2.1$
2 <sup>a</sup>	14.6	$52.4 \pm 1.4$	$61.5 \pm 4.5$	$58.8 \pm 3.4$	$53.1 \pm 1.4$
3	15.6	$104.7 \pm 3.4$	$107 \pm 12.3$	$79.8 \pm 8.4$	$99.6 \pm 4.4$
4	16.2	$42.1 \pm 1.2$	$44.5 \pm 4.3$	$40.6 \pm 4.3$	$29.3 \pm 0.3$

<sup>a</sup> Quantified as 4.

The method's selectivity was determined by comparing the chromatographic profile of AE with the data obtained for the standards, considering the retention time and UV spectra (Figures S4–S6, Supplementary Materials). The linearity was tested by analyzing a series of different concentration ranges: 5 to 150  $\mu\text{g/mL}$  for 1, 20 to 200  $\mu\text{g/mL}$  for 3, and 13.4 to 133.4  $\mu\text{g/mL}$  for 4. In all cases, the value of the determination coefficient ( $R^2$ ) was greater than 0.99. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) values were 0.5  $\mu\text{g/mL}$  and 1.5  $\mu\text{g/mL}$  for compound 1, 2.2  $\mu\text{g/mL}$  and 6.6 for compound 3 and 1.4  $\mu\text{g/mL}$  and 4.1  $\mu\text{g/mL}$  for compound 4. The intraday and interday precision RSDs were no more than 2% while the repeatability variation was no more than 2% (Table 2). Percentage recoveries of the standards are also indicated in Table 2; in each case, a good accuracy was obtained in the range from 99.15% to 100.83% ( $\text{RSD} \leq 2.0\%$ ). Altogether the described previous data revealed that the method was linear, precise and accurate in the range of concentrations evaluated.

The validated method was applied successfully to quantify chlorogenic acid derivatives in four different batches (BH-1, BH-2, BH-3, and BH-4) of the crude drug. The results are presented in Table 3, which shows the content of 1–4 was similar in all batches, where 3,5-di-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid was the major component.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. General Experimental Procedures

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus (Thermo Scientific, Vernon Hills, IL, USA) and are uncorrected. NMR spectra were recorded in a Unity Plus 400 spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA), at either 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 100 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz, in  $\text{DMSO-}d_6$  and  $\text{MeOH-}d_4$ . Data processing was carried out with the software MestReNova version 12.0.0. Mass spectra of the isolates were obtained on an Acquity UHPLC-H Acquity UHPLC-H<sup>®</sup>Class system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a quaternary pump, sample manager, column oven and photodiode array detector (PDA) interfaced with an SQD2 single mass spectrometer detector with an electrospray ion source. IR spectra were recorded using a Spectrum RXI FTIR (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Open column chromatography was carried out on Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Urbandale, IA, USA) and silica gel 60, 70-230 mesh (Merck, Darmstadt, Germany).

#### 3.2. Reagents

HPLC grade acetonitrile and water, and analytical reagent (AR) grade solvents used for the chromatographic processes were purchased from J.T. Baker (Avantor, Radnor, PA, USA). Chlorogenic acid (1), diclofenac, and Tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standards (3 and 4) used in the method validation were isolated from *B. heterophylla* (purities  $\geq 97\%$ ).

#### 3.3. Plant Material

*Baccharis heterophylla* was collected in Capulálpam de Méndez, Oaxaca, México on April 2019 (BH-1). The plant material was identified by Rafael Torres Collin and a voucher specimen (1512112) was deposited at the National Herbarium (MEXU), UNAM, Mexico City. In addition, batches from February, July, and October (BH-2, BH-3 and BH-4 respectively) were collected in the same place and the same year, to analyze their content.

#### 3.4. Preparation of the Aqueous Extract and Essential Oil

Air-dried aerial parts (leaves and stem) of *B. heterophylla* (5 g) were extracted with 250 mL of boiling water for 30 min. The resulting infusion was filtrated and concentrated in vacuo to yield 1.28 g of dry aqueous extract (EA). On the other hand, the infusion was exhaustively partitioned with EtOAc (250 mL  $\times$  3); the combined organic fractions were dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated in vacuo to yield 0.116 g of dry ethyl acetate fraction. This process was repeated as much as needed to obtain 10 g of this fraction.

Essential oil (EO) was prepared by hydrodistillation (3 h), with 200 g of fresh aerial parts and 1.3 L of distilled water, using a Clevenger-type instrument. The hydrodistilled mixture was extracted with dichloromethane (250 mL  $\times$  3); the combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated in vacuo. This procedure was performed in triplicate and the resulting oils (320 mg) were stored at  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  until chemical analysis and pharmacological experiments.

#### 3.5. Pharmacological Study

##### 3.5.1. Animals

Male CD1 mice weighting between 30–38 g were obtained from the Bioterium of the School of Sciences, UNAM. Animals were kept on a 12 h light/dark cycle under controlled temperature ( $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ) and given a standard pellet diet ad libitum until the beginning of each experiment. Animal experimental protocols followed recommenda-

tions of the Mexican Official Norm Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and were in conformity with international ethical guidelines for care and use of laboratory animals. The experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-FQ) of Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/391/19).

### 3.5.2. Antinociceptive Effect

The antinociceptive effect of AE and EO was assessed using the formalin test [38]. All the samples were diluted in the vehicle and animals were divided into groups ( $n = 6$ ). Mice were treated with AE (31.6–316 mg/kg, p.o.), EO (30–170  $\mu\text{g}/\text{paw}$ , i.pl.), diclofenac (positive control, 50 mg/kg, p.o. and 100  $\mu\text{g}/\text{paw}$ , i.pl.) or with vehicle (0.5% Tween 80 in 0.9% saline solution). After 30 min, each animal was received 30  $\mu\text{L}$  of diluted 2% formalin in into the mice dorsal surface of the right hind paw. The biphasic response (licking of the injected paw) induced by the formalin solution was quantified every 5 min during a 30 min period [13]. The doses were logarithmic, and were selected on the basis of previous experimental design for traditional preparations [38].

### 3.5.3. Statistical Analyses

Antinociceptive results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the analysis of area under the curve (AUC, time of licking against time, sec  $\times$  min) of mice ( $n = 6$ ), for phases 1 and 2, and both, or as the mean  $\pm$  S.E.M. of licking time (sec) of mice ( $n = 6$ ) in time courses (Supplementary Materials). Statistical differences were evaluated using either one way ANOVA followed by Dunnett's in the GraphPad Prism software (version 7; GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3.6. Isolation of Compounds

The ethyl acetate fraction (9.5 g) was subjected to column chromatography on Sephadex LH-20, eluting with methanol; 28 (16 mL each) fractions were obtained (F<sub>1</sub>–F<sub>28</sub>). Secondary fraction F<sub>20</sub> was dissolved in MeOH; from this solution precipitated 85 mg of apigenin (6). Column chromatography on Sephadex LH-20 of F<sub>16</sub> (1.20 g), eluting with acetone–MeOH (9:1), rendered 24 fractions (8 mL each): F<sub>16-1</sub>–F<sub>16-24</sub>. Fractions F<sub>16-5</sub>, F<sub>16-10</sub>, and F<sub>16-13</sub> yielded 14 mg of 3, 8 mg of 5 and 5 mg of 4, respectively. Fraction F<sub>17</sub> (50 mg) was subjected to column chromatography on silica gel (50 g), eluting with a gradient of hexane–EtOAc (9:1  $\rightarrow$  0:10) and EtOAc–MeOH (10:0  $\rightarrow$  0:10), 12 fractions of 300 mL each were obtained. From F<sub>17-5</sub>, eluted with hexane–EtOAc (7:3), 9 mg of 7 were obtained. From F<sub>17-6</sub>, eluted with hexane–EtOAc (6:4), crystallized 8 mg of 8. Compounds 1 and 2 were identified by comparison with authentic standards (TLC, HPLC, NMR).

### 3.7. GC-MS Analyses

All analyses by GC-MS were carried out in an Agilent 6890 N (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) series gas chromatograph equipped with a LECO Pegasus 4D time-of-flight mass spectrometer detector (IET International Equipment Trading Ltd., Mundelein, IL, USA). A capillary column DB-5 was used [(5%-phenyl)-methylpolysiloxane, 20 m  $\times$  0.18 mm I.D.; 0.18  $\mu\text{m}$  film thickness]. The oven temperature was set at 40  $^{\circ}\text{C}$  for three minutes, then at 40 to 300  $^{\circ}\text{C}$  at 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and held isothermally at 300  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Compounds were identified using index retention method ( $I_R$ ), by co-injection of the sample with a solution containing the homologous series of *n*-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>27</sub>), and by comparison of their MS fragmentation patterns with those of compounds contained in the spectral database of the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). All determinations were performed in triplicate.

### 3.8. Headspace Solid-Phase Microextraction

Volatile compounds of *B. heterophylla* were extracted using the HS-SPME technique; the extraction procedure was conducted as follows: 50 mg of aerial parts, 2 g of sodium chloride, and 15 mL of water (HPLC grade) were mixed in a hermetically sealed vial. Each fiber (CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB and PDMS) was introduced into the vial and exposed to the headspace of the sample for 15 min, at room temperature, keeping the sample magnetically stirred. After sampling, the SPME fibers were directly inserted into the GC injector port and the fibers thermally desorbed. A desorption time of 2 min at 250 °C was used. Before GC-MS analysis, the fibers were conditioned in the injector of the GC system, according to the instructions provided by the manufacturer. All samples were analyzed in triplicate and the relative proportions of individual components adsorbed to the fibers under these conditions was calculated based on the total ion chromatogram (TIC) peak areas as a percentage of the sum of all peak areas. The GC-MS conditions were described in Section 3.7. The SPME fibers used in this study were purchased from Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA).

### 3.9. HPLC Analyses

All experiments were performed on a Waters HPLC system equipped with a quaternary pump (model 600), photodiode array detector (PDA, model 996), manual injector and an XBridge™ BEH Shield RP18 column, (130 Å, 5 µm, 4.6 mm × 250 mm, Waters) at a flow rate of 0.8 mL/min. The mobile phase consisted of (A) acetonitrile and (B) water (0.1% formic acid) the following gradient elution program was used: 20–40% A for 0–10 min, 40–100% A for 10–23 min, 100% A for 23–24 min, and 100–20% A for 24–28 min, 20% A for 28–30 min, the injection volume was 20 µL. The UV detector was set at a monitoring wavelength of 327 nm. System control, data collection, and data processing were accomplished using Waters Empower 2 chromatography software.

### 3.10. Method Validation

The HPLC method was validated according to the International Conference on Harmonization Guidelines (ICH, 2005) and included a determination of selectivity, linearity, precision, accuracy, LOD, and LOQ. The linearity of the system was performed through the calibration curves of the standards (1, 3, and 4); compounds were accurately weighed (5 mg) and dissolved in 5 mL acetonitrile-water (5 mL, 1:5) to prepare stock solutions at a final concentration of 1 mg/mL. The solutions of the calibration curve were obtained by diluting the stock solution in water, ranging from 5–150 µg/mL for 1, 20–200 µg/mL for 3 and 13.3–133.4 µg/mL for 4. The linearity was assessed estimating the slope, y-intercept, and the determination coefficient ( $R^2$ ) using the least-squares analysis. LOD and LOQ were determined based on the standard deviation ( $\sigma$ ) of the response and the slope (S) from calibration curve constructed with a series of appropriate concentrations for determination of the limits, using the following equations:

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (2)$$

The precision was evaluated using repeatability (intraday) and intermediate precision (interday). Intraday and interday variations were established using six independent replicates of the standard reference of each compound on one and two different days, to determine intraday and interday precision, respectively. In order to study the accuracy of the method, recovery experiments were performed. The samples were spiked with known amounts of the standards, at different concentrations levels (low, medium and high):



**1** (5, 50 and 150 µg/mL), **3** (20, 100 and 200 µg/mL) and **4** (13.3, 66.8 and 133.4 µg/mL). The average recoveries were calculated according to the following formula:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{amount found} - \text{original amount}}{\text{amount spiked}} \times 100 \quad (3)$$

The relative standard deviation (RSD) was calculated for each determination as a measure of precision and repeatability.

#### 4. Conclusions

In summary, the aerial parts of *B. heterophylla* exhibited antinociceptive activity when tested by the formalin assay. The main classes of compounds characterized in the traditional preparation were chlorogenic acid derivatives and flavonoids with known antinociceptive properties. In the case of the essential oil, the activity could be attributed to its high content of antinociceptive monoterpenes. In any case, the pharmacological effects might be achieved via pharmacology synergism and/or polypharmacology. A precise, reliable, and accurate HPLC method for quantifying chlorogenic acid derivatives' content in the infusion of the plant was developed and validated. This methodology will be useful for preparing standardized infusions or other formulations made up of this species. This method will also be proposed as composition test for the monograph of *B. heterophylla* to be included in the new edition of the Mexican Herbal Pharmacopoeia. Altogether, our results tend to support the medicinal use of *B. heterophylla* to treat painful complaints in Mexican folk medicine and contribute to the rational use of this valuable medicinal plant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/1/116/s1>, **Figure S1:** Temporal course of the antinociceptive behavior (the licking time against time) and AUC from the time course curve for the Aqueous Extract (AE, 31.6–316mg/kg). Each measurement represented as mean ± SEM of  $n = 6$ . Significantly different from VEH group (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) determined by ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, **Figure S2:** Temporal course of the antinociceptive behavior (the licking time against time) and AUC from the time course curve for the Essential Oil (EO, 30–177 µg/paw). Each measurement represented as mean ± SEM of  $n = 6$ . Significantly different from VEH group (\*  $p < 0.05$ ) determined by ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, **Figure S3:** Total ion chromatograms of volatile components from *Baccharis heterophylla* obtained by extraction of HS-SPME, **Figure S4:** Representative HPLC chromatogram at  $\lambda = 327$  nm, and UV absorption spectrum (200 to 400 nm) of compound **1**, **Figure S5:** Representative HPLC chromatogram at  $\lambda = 327$  nm, and UV absorption spectrum (200 to 400 nm) of compound **3**, **Figure S6:** Representative HPLC chromatogram at  $\lambda = 327$  nm, and UV absorption spectrum (200 to 400 nm) of compound **4**, **Figure S7:** Calibration curve (area versus concentration) and residual plot for compound **1**, **Figure S8:** Calibration curve (area versus concentration) and residual plot for compound **3**, **Figure S9:** Calibration curve (area versus concentration) and residual plot for compound **4**, **Table S1.**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data of compounds **1–5** (400 and 100 MHz respectively; MeOH- $d_4$ ) from the aerial parts of *Baccharis heterophylla*, **Table S2.**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data of compounds **6–8** (400 and 100 MHz respectively, DMSO- $d_6$ ) from the aerial parts of *Baccharis heterophylla*, **Figure S10:** EI-MS of volatile compounds **9–30** from *Baccharis heterophylla*.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.C.-R. and R.M.; methodology, E.C.-R., A.P.-V., R.T.-C., A.N., A.A.-C. and R.M.; investigation, E.C.-R. and A.P.-V.; resources, A.N., A.A.-C. and R.M.; data curation, E.C.-R. and R.M.; writing—original draft preparation, E.C.-R., A.P.-V. and R.M.; writing—review and editing, R.M.; visualization, E.C.-R.; supervision, A.N., A.A.-C. and R.M.; funding acquisition, R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320 awarded to R.M.

**Institutional Review Board Statement:** The experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-FQ) of Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/391/19).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors recognize the valuable support of Georgina Duarte, Nayeli Lopez Balbiaux and Marisela Gutiérrez Franco, from USAII-Facultad de Química UNAM for recording NMR and Mass spectra. We are indebted to Christian Alan Cabello-Hernández (Facultad de Ciencias, UNAM) for his valuable help for pursuing the animal experimentation. E.C.-R. acknowledges the fellowship from CONACyT (257969) to pursue graduate studies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Heinrich, M. Ethnobotany and its role in drug development. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 479–488. [[CrossRef](#)]
2. Navarro, R.C.; Sánchez, E.Y.P.; Maya, A.P. Aproximación crítica a las políticas públicas en salud indígena, medicina tradicional e interculturalidad en México (1990–2016). *Salud Colect.* **2017**, *13*, 443–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kunle, O.F.; Egharevba, H.O.; Ahmadu, P.O. Standardization of herbal medicines—A review. *Int. J. Biodivers. Conserv.* **2012**, *4*, 101–112. [[CrossRef](#)]
4. Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 97–110. [[CrossRef](#)]
5. Villaseñor, J.L. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* **2016**, *87*, 559–902. [[CrossRef](#)]
6. Rojas, A.; Bah, M.; Rojas, J.I.; Serrano, V.; Pacheco, S. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 367–371. [[CrossRef](#)]
7. Abad, M.J.; Bermejo, P. *Baccharis* (Compositae): A review update. *Arkivoc* **2007**, *7*, 76–96. [[CrossRef](#)]
8. Bello-González, M.Á.; Hernández-Muñoz, S.; Lara-Chávez, M.; Nieves, B.; Salgado-Garciglia, R. Plantas útiles de la comunidad indígena nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica* **2015**, *39*, 175–215. [[CrossRef](#)]
9. Prada, J.; Ordúz-Díaz, L.L.; Coy-Barrera, E. *Baccharis latifolia*: Una Asteraceae poco valorada con potencialidad Química y Biológica en el Neotrópico. *Rev. Fac. Cienc. Bas.* **2016**, *12*, 92–105. [[CrossRef](#)]
10. Martínez-López, J.; Acosta-Ramos, A.; Martínez-Ojeda, E.; Manzano-Méndez, F. Recursos forestales no maderables en dos comunidades zapotecas de la Sierra Juárez de Oaxaca. *Rev. Mex. Cienc. Forestales.* **2016**, *7*, 37–52. [[CrossRef](#)]
11. Wollenweber, E.; Schober, I.; Dostal, P.; Hradetzky, D.; Arriaga-Giner, F.J.; Yatskievych, G. Flavonoids and terpenoids from the exudates of some *Baccharis* species. *Z. Naturforsch. C* **1986**, *41*, 87–93. [[CrossRef](#)]
12. Arriaga-Giner, F.J.; Wollenweber, E.; Schober, I.; Dostal, P.; Braunt, S. 2 $\beta$ -Hydroxyhautriwaic acid, a clerodane type diterpenoid and other terpenoids from three *Baccharis* species. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 719–721. [[CrossRef](#)]
13. Jakupovic, J.; Schuster, A.; Ganzer, U.; Bohlmann, F.; Boldt, P.E. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2217–2222. [[CrossRef](#)]
14. Rojas, A.; Mendoza, S.; Moreno, J.; Arellano, R.O. Extracts from plants used in Mexican traditional medicine activate Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride channels in *Xenopus laevis* oocytes. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 416–421. [[CrossRef](#)]
15. Tjølsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* **1992**, *51*, 5–17. [[CrossRef](#)]
16. Pérez-Vásquez, A.; Aguilar-Cruz, R.; Bye, R.; Linares, E.; Rivero-Cruz, I. UHPLC-MS Analysis of Polyphenols in the Aqueous Extract of *Hydrangea seemannii*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2020**, *30*, 7–11. [[CrossRef](#)]
17. Tamayose, C.I.; Torres, P.B.; Roque, N.; Ferreira, M.J.P. HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity of flavones and chlorogenic acid derivatives from *Moquiniastrum floribundum* (Asteraceae). *S. Afr. J. Bot.* **2019**, *123*, 142–146. [[CrossRef](#)]
18. Silva, E.L.; Lobo, J.F.R.; Vinther, J.M.; Borges, R.M.; Staerk, D. High-Resolution  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Profiling Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of Antidiabetic Compounds in *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae). *Molecules* **2016**, *21*, 782. [[CrossRef](#)]
19. Van Loo, P.; De Bruyn, A.; Buděšínský, M. Reinvestigation of the structural assignment of signals in the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of the flavone apigenin. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 879–882. [[CrossRef](#)]
20. Miyazawa, M.; Hisama, M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2091–2099. [[CrossRef](#)]
21. Dos Santos, M.D.; Gobbo-Neto, L.; Albarella, L.; de Souza, G.E.P.; Lopes, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 545–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Choi, M.Y.; Park, H.J. Antinociceptive effects of 3, 4-Dicaffeoyl Quinic acid of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. *Korean J. Plant Res.* **2007**, *20*, 221–225.
23. Dos Santos, M.D.; Almeida, M.C.; Lopes, N.P.; De Souza, G.E.P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2236–2240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Abdel Motaal, A.; Ezzat, S.M.; Tadros, M.G.; El-Askary, H.I. In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 2864–2870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim, Y.; Kim, J.T.; Park, J.; Son, H.J.; Kim, E.Y.; Lee, Y.J.; Rhyu, M.R. 4, 5-Di-O-Caffeoylquinic Acid from *Ligularia fischeri* Suppresses Inflammatory Responses Through TRPV1 Activation. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 1564–1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Hong, S.; Joo, T.; Jhoo, J.W. Antioxidant and anti-inflammatory activities of 3, 5-dicaffeoylquinic acid isolated from *Ligularia fischeri* leaves. *Food. Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 257–263. [CrossRef]
27. Wan, P.; Xie, M.; Chen, G.; Dai, Z.; Hu, B.; Zeng, X.; Sun, Y. Anti-inflammatory effects of dicaffeoylquinic acids from *Ilex kudingcha* on lipopolysaccharide-treated RAW264. 7 macrophages and potential mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *126*, 332–342. [CrossRef] [PubMed]
28. Tian, D.; Yang, Y.; Yu, M.; Han, Z.Z.; Wei, M.; Zhang, H.W.; Jia, H.M.; Zou, Z.M. Anti-inflammatory chemical constituents of *Flos Chrysanthemi Indici* determined by UPLC-MS/MS integrated with network pharmacology. *Food Funct.* **2020**, *11*, 6340–6351. [CrossRef]
29. Xiao, X.; Wang, X.; Gui, X.; Chen, L.; Huang, B. Natural flavonoids as promising analgesic candidates: A systematic review. *Chem. Biodivers.* **2016**, *13*, 1427–1440. [CrossRef]
30. Campos, F.R.; Bressan, J.; Jasinski, V.C.G.; Zuccolotto, T.; da Silva, L.E.; Cerqueira, L.B. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities. *Chem. Biodivers.* **2016**, *13*, 1–17. [CrossRef]
31. Dawidowicz, A.L.; Szewczyk, J.; Dybowski, M.P. Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials. *Talanta* **2016**, *46*, 195–202. [CrossRef] [PubMed]
32. Liapi, C.; Anifantis, G.; Chinou, I.; Kourounakis, A.P.; Theodosopoulos, S.; Galanopoulou, P. Antinociceptive properties of 1, 8-cineole and  $\beta$ -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1247–1254. [CrossRef] [PubMed]
33. Kim, D.S.; Lee, H.J.; Jeon, Y.D.; Han, Y.H.; Kee, J.Y.; Kim, H.J.; Shin, H.J.; Kang, J.; Lee, B.S.; Kim, S.H.; et al. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am. J. Chin. Med.* **2015**, *43*, 731–742. [CrossRef] [PubMed]
34. Paula-Freire, L.I.G.; Andersen, M.L.; Molska, G.R.; Köhn, D.O.; Carlini, E.L.A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 1220–1224. [CrossRef]
35. Rufino, A.T.; Ribeiro, M.; Sousa, C.; Judas, F.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; Mendes, A.F. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of *E-caryophyllene*, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *750*, 141–150. [CrossRef]
36. Vieira, A.J.; Beserra, F.P.; Souza, M.C.; Totti, B.M.; Rozza, A.L. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *283*, 97–106. [CrossRef]
37. International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: Switzerland. Available online: [http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).pdf](http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).pdf) (accessed on 9 December 2020).
38. Reyes-Pérez, V.; Vásquez, A.P.; Déciga-Campos, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. Antinociceptive Potential of *Zinnia Grandiflora*. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 456–461. [CrossRef]