



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO CUANTIFICADO A PARTIR DE LAS RAÍCES
DE *Heliopsis longipes* CON EFECTO ANALGÉSICO”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAQUEL BORTOLINI ZAVALA

DIRIGIDA POR:

DRA. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

QUERÉTARO

OCTUBRE 2018

MÉXICO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO CUANTIFICADO A PARTIR DE LAS
RAÍCES DE *Heliopsis longipes* CON EFECTO ANALGÉSICO”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:
RAQUEL BORTOLINI ZAVALA

DIRIGIDA POR:
DRA. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

SINODALES

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Presidente

Dra. Alejandra Rojas Molina

Secretaria

Alejandra Rojas M.

Dr. César Ibarra Alvarado

Vocal

M. en C. Jesús Eduardo Castro Ruiz

Suplente

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Lorca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Octubre 2018

RESUMEN

En la Medicina Tradicional Mexicana se utiliza la especie vegetal *Heliopsis longipes*, conocida como Chilcuague o Raíz de oro para aliviar el dolor. La afinina es una de las moléculas bioactivas predominantes en las raíces de esta especie, la cual presenta actividad fungicida, antimicrobiana, insecticida, antiinflamatoria, diurética, entre otras. En México, no existe una presentación farmacéutica a base de *H. longipes* que cumpla con las regulaciones de calidad que garanticen la seguridad y efectividad de su uso. El objetivo de este proyecto fue obtener un extracto cuantificado a partir de las raíces *H. longipes*. (ECHL). Inicialmente, se determinó el porcentaje de materia extraña, humedad y cenizas en las raíces de *H. longipes*. Se obtuvo un extracto etanólico (EE) de las raíces de *H. longipes*, en el cual se identificó a la afinina como el compuesto marcador. Posteriormente, se desarrolló y validó una metodología analítica para la cuantificación de la afinina en el EE por HPLC para obtener el ECHL. Adicionalmente, se evaluó el efecto analgésico del ECHL en un modelo de dolor orofacial en roedores empleando al Ketorolaco y al Tramadol como controles positivos a una dosis de 30 mg/kg. Finalmente, se determinó la toxicidad del ECHL en el ensayo de *A. salina* y el ensayo de Lorke. El contenido de materia extraña del material vegetal cumplió con la normatividad de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), en tanto que el contenido de humedad fue mayor a lo establecido por la FHEUM. Se desarrolló y validó un método analítico que permitió cuantificar a la afinina como el compuesto marcador para obtener el ECHL. El ECHL tiene un efecto analgésico desde una dosis de 10mg/kg, dicho efecto fue mayor al observado para el ketocorolaco y menor con respecto al Tramadol. La DL₅₀ del ECHL en los ensayos de *A. salina* y de Lorke fue de 100 fue de µg /kg y 1238.3 mg/kg respectivamente, por lo que se le considera un extracto medianamente tóxico. La obtención del ECHL constituye la base para el desarrollo en un futuro de un fitomedicamento con propiedades antinociceptivas.

Palabras clave: Dolor, *Heliopsis longipes*, N-alquilamidas, afinina, HPLC, extracto cuantificado, antinociceptivo.

ABSTRACT

The plant species *Heliopsis longipes*, known as Chilcuague or Root of gold is used in Traditional Mexican Medicine to relieve pain. Affinin is one of the predominant bioactive molecules in the roots of this species, which has fungicidal, antimicrobial, insecticidal, anti-inflammatory and diuretic properties. In Mexico, there is no a pharmaceutical product prepared with *H. longipes* that complies with quality regulations that guarantee the safety and effectiveness of this phytodrug. The objective of this project was to obtain a quantified extract from *H. longipes* roots (ECHL). Initially, the percentage of foreign matter, moisture and ash in the roots of *H. longipes* was analyzed. An ethanolic extract (EE) was obtained from the roots of *H. longipes*, in which affinin was identified as the marker compound. Subsequently, an analytical methodology was developed and validated for the affinin quantitation in the EE by HPLC to obtain the ECHL. Additionally, the analgesic effect of ECHL in an orofacial pain model in rodents was evaluated by using Ketorolac and Tramadol as positive controls at dose of 30 mg/kg for both drugs. Finally, the toxicity of the ECHL was determined in the *A. salina* and the Lorke assays. The foreign matter content of the plant material complied with the Herbalist Pharmacopoeia of the United Mexican States regulations (FHEUM), while the moisture content was higher than that established by the FHEUM. An analytical method was developed and validated to affinin quantitation as the marker compound to obtain ECHL. The ECHL has an analgesic effect from a dose of 10mg/kg, this effect was greater than that observed for ketocorolac and lower in comparison to Tramadol. The LD₅₀ of the ECHL in *A. salina* and Lorke assays were 100 µg/kg and 1238.3 mg/kg, respectively. Consequently, the ECHL is classified as mildly toxic. Obtaining ECHL is the basis for a phytomedicine development with antinociceptive properties in future.

Keywords: Pain, *Heliopsis longipes*, N-alkylamides, affinin, HPLC, quantified extract, antinociceptive.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por mi existencia, a mis padres por su apoyo y amor incondicional, a mi familia en general por formar parte de mi vida. A mis amigas de la maestría por su apoyo, cariño, enseñanzas y consuelo. A todos mis compañeros del laboratorio y demás personas involucradas en el desarrollo y culminación de este trabajo en especial: M.C. Ronna Delgado Altamirano, Dra. C. Rosalina Matehuala, Dr.C. Francisco Luna, Lic. Christian Lim y muy especialmente al M.C. Luis Fernando Díaz Peña por su apoyo en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

Por supuesto agradezco también a mi directora de tesis la Dra. Juana Isela Rojas Molina por su apoyo, confianza y esfuerzo, al Comité de sinodales por sus observaciones y tiempo y muy especialmente al Dr.C. Jesús Eduardo Castro Martínez por su apoyo, conocimiento e interés en este trabajo.

“Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás, no hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores”

- E. GALEANO

I. ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	ii
II. ABSTRACT	iv
III. AGRADECIMIENTOS	vi
IV. ÍNDICE GENERAL	vii
V. ÍNDICE DE TABLAS	xvii
VI. ÍNDICE DE FIGURAS	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Definición de dolor	2
2.2 Clasificación	3

2.2.1 Nocicepción	3
2.2.2 Dolor neuropático	3
2.3 Fisiología del dolor	4
2.4 Evaluación y medición del dolor	6
2.5 El empleo de las plantas medicinales en la terapéutica tradicional con efecto analgésico	6
2.5.1 Plantas medicinales asociadas con efectos analgésicos en el género <i>Heliopsis</i>	7
2.6 Generalidades botánicas de <i>Heliopsis longipes</i>	8
2.7 Compuestos bioactivos identificados en <i>Heliopsis longipes</i>	10
2.8 Afinina	12
2.9 Estudios sobre la bioactividad de <i>Heliopsis longipes</i>	13
2.9.1 Mecanismos de acción de la afinina	14
2.10 Fitofármacos	14

2.10.1 Categorización de los fitofármacos	15
2.10.2 Características de calidad de los fitofármacos	16
2.10.3 Regulaciones sanitarias para los fitofármacos	17
2.10.4 Extractos elaborados a base de especies vegetales	20
2.11 Importancia de la sinergia en los compuestos de extractos cuantificados	22
2.12 Pruebas de análisis	23
2.12.1 Material vegetal	23
2.12.1.1 Cuantificación de materia extraña	23
2.12.1.2 Análisis de pérdida de peso por el método de secado	23
2.12.1.3 Cuantificación de cenizas totales	24
2.12.2 Extracto cuantificado	25
2.12.2.1 Identificación y cuantificación del compuesto marcador químico	25

2.12.2.2 Validación del método analítico para la identificación y cuantificación del compuesto marcador químico	26
2.12.3 Pruebas de control de calidad para los extractos cuantificados	28
2.12.3.1 Pruebas de estabilidad del extracto cuantificado	28
2.12.3.2 Análisis de metales pesados	28
2.12.3.3 Identificación de pesticidas	28
2.12.3.4 Análisis microbiológico	29
2.12.4 Pruebas farmacológicas para la evaluación del efecto analgésico de extractos	30
2.12.5 Toxicidad	31
2.12.5.1 Toxicidad aguda	32
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
5. HIPÓTESIS	37

6. OBJETIVOS	38
6.1 Objetivo general	38
6.2 Objetivos específicos	38
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 Materiales	38
7.1.1 Especímenes biológicos	38
7.1.1.1 Material vegetal	38
7.1.1.2 Animales	38
7.1.2 Compuestos químicos y solventes	39
7.2 Métodos	41
7.2.1 Material vegetal	41
7.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal	41

7.2.1.2 Cuantificación de materia extraña	41
7.2.1.3 Análisis de pérdida de peso por el método de secado	41
7.2.1.4 Cuantificación de cenizas totales	42
7.2.2 Extracto cuantificado	43
7.2.2.1 Preparación del extracto etanólico	43
7.2.2.2 Preparación de las muestras de los extractos de <i>Heliopsis longipes</i> para su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	43
7.2.2.3 Preparación del estándar del marcador químico	43
7.2.2.4 Condiciones cromatográficas para el análisis del marcador químico	44
7.2.2.5 Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico	44
7.2.3 Validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico	44
7.2.3.1 Validación del sistema	45
7.2.3.1.1 Linealidad	46

7.2.3.1.2 Límite de detección y límite de cuantificación	46
7.2.3.1.3 Precisión	46
7.2.3.1.4 Adecuabilidad	46
7.2.3.2 Validación del método	46
7.2.3.2.1 Linealidad	46
7.2.3.2.2 Exactitud	47
7.2.3.2.3 Repetibilidad y precisión intermedia	47
7.2.3.3 Estabilidad de la muestra	47
7.2.3.4 Cuantificación de la afinina	48
7.2.4 Determinación del efecto analgésico del extracto cuantificado de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	48
7.2.5 Evaluación de la toxicidad aguda y letalidad del extracto cuantificado de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i> mediante el ensayo de letalidad para <i>Artemia salina</i> y ensayo en ratones	50
7.2.5.1 Ensayo de letalidad para <i>Artemia salina</i>	50

7.2.5.2 Toxicidad aguda en ratones	50
8. RESULTADOS Y DISCUSION	53
8.1 Determinación de humedad, materia extraña y cenizas de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	53
8.2 Rendimiento del extracto etanólico	54
8.3. Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico	55
8.4. Identificación y cuantificación del compuesto marcador químico	56
8.5 Validación del método analítico para la cuantificación de afinina por HPLC	56
8.5.1 Validación del sistema	57
8.5.1.1 Linealidad	57
8.5.1.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación	58
8.5.1.3 Precisión	57
8.5.1.4 Adecuabilidad	59

8.5.2 Validación del método	61
8.5.2.1 Linealidad y exactitud	61
8.5.2.2 Precisión	64
8.5.2.2.1 Repetibilidad	64
8.5.2.2.2 Precisión intermedia	66
8.5.3 Estabilidad analítica de la muestra	67
8.5.4 Cuantificación de afinina en las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	70
8.6 Determinación del efecto analgésico del extracto cuantificado de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	72
8.7 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto cuantificado de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i> mediante <i>Artemia salina</i> y ensayo en ratones	74
8.7.1 Ensayo de letalidad para <i>Artemia salina</i>	74
8.7.2 Toxicidad aguda en ratones	76
9. CONCLUSIONES	78
10. REFERENCIAS	80
11. ANEXOS	95

II. ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1. Clasificación científica de <i>Heliopsis longipes</i> (Chilcuague)	9
Tabla 2. Pruebas de seguridad y calidad para los fitofármacos	18
Tabla 3. Parámetros de desempeño estadístico	27
Tabla 4. Esquema de administración para la metodología de Lorke	34
Tabla 5. Listado de reactivos químicos utilizados para el desarrollo y análisis químico, farmacológico y toxicológico del extracto cuantificado	40
Tabla 6. Condiciones de estabilidad del extracto cuantificado	47
Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos de las raíces de <i>H. longipes</i>	55
Tabla 8. Parámetros óptimos para el desarrollo de la validación	58
Tabla 9. Datos para la evaluación de linealidad del sistema	101
Tabla 10. Valores obtenidos para la determinación de la precisión del sistema	58
Tabla 11. Datos para la estimación del parámetro de adecuabilidad	59
Tabla 12. Parámetros de desempeño	60
Tabla 13. Áreas obtenidas para la linealidad del método	60
Tabla 14. Parámetros estadísticos evaluados para la linealidad del método	61

Tabla 15. Porcentajes de recobro calculado a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas, para la linealidad del método	63
Tabla 16. Porcentajes de recobro calculados a partir de las cantidades de afinina y recuperadas, para la repetibilidad del método	64
Tabla 17. Parámetros estadísticos evaluados para la repetibilidad del método	65
Tabla 18. Áreas obtenidas para la evaluación de la precisión intermedia	66
Tabla 19. Parámetros estadísticos calculados para la evaluación de la precisión intermedia	66
Tabla 20. Estabilidad del analito, áreas obtenidas en las diferentes condiciones y tiempo	67
Tabla 21. Diferencia absoluta de la estabilidad	69
Tabla 22. Concentración de afinina en diferentes condiciones y tiempo	69
Tabla 23. Concentración de afinina en el extracto etanólico seco	70
Tabla 24. Relación de ratones muertos con las diferentes dosis de ECHL	71

III. ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Etapas del proceso denominado dolor	5
Figura 2. Escala analógica visual del dolor	7
Figura 3. a) Flores y b) raíces pertenecientes al género <i>Heliopsis</i>	9
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Heliopsis</i>	10
Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos bioactivos identificados en <i>H. longipes</i>	12
Figura 6. Estructura química de la afinina identificada en <i>H. longipes</i>	13
Figura 7. Proceso de obtención de un fitofármaco	16
Figura 8. Procedimiento para la determinación del efecto antinociceptivo del ECHL. a) 15 min de adaptación, b) Administración <i>i.p.</i> del extracto etanólico ,Ketorolaco y Tramadol, c) Administración de una solución al 2.5 % de formalina por vía orofacial , d) Observación de la conducta dolorosa por un período total de 5 min para la primera fase del estudio y por 15-40 min para la segunda fase	50
Figura 9. Cromatograma correspondiente al estándar de afinina 45 µg/mL (línea negra) y al extracto etanólico de las raíces de <i>H. longipes</i> 1 mg/mL (línea azul)	56
Figura 10. Curva de calibración para la linealidad del sistema	57
Figura 11. Curva de calibración para la linealidad del método	62
Figura 12. Exactitud del método	63
Figura 13. Estabilidad del ECHL	70

- Figura 14.** Efecto analgésico del ECHL y comportamiento bifásico de la formalina (círculo rojo, fase neurogénica, círculo morado, fase inflamatoria) 72
- Figura 15.** Efecto analgésico del extracto cuantificado de *H. longipes* 75
- Figura 16.** Toxicidad del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* en *Artemia salina* 77
- Figura 17.** Toxicidad del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* en roedores 79

ACRÓNIMOS

CFA Adyuvante Completo de Freund

COFEPRIS Comisión Federal para el Riesgo Sanitario

DE₅₀ Dosis Efectiva Media

DL₅₀ Dosis Letal Media

DOF Diario Oficial de la Federación

ECHL Extracto Cuantificado de *Heliopsis Longipes*

EMA European Medicines Agency

FHEUM Farmacopea Herbal de los Estados Unidos Mexicanos

HPLC High Performance Liquid Chromatography

IASP International Association for the Study of Pain

OMS Organización Mundial de la Salud

MGA Monografía General de Análisis

SNC Sistema Nervioso Central

SNP Sistema Nervioso Periférico

MGS Mouse Grimace Scale

1. INTRODUCCIÓN

El dolor es una experiencia sensitiva desagradable que se desarrolla ante la presencia de diferentes estímulos como un mecanismo de defensa y protección del organismo, a través de la secreción de varias sustancias químicas que actúan en el sistema nervioso central y periférico (Crusiani y Nieto; 2006).

En la Medicina Tradicional existen diversas especies vegetales que se utilizan para el tratamiento del dolor. Una de ellas es la especie *Heliopsis longipes* conocida con el nombre común de Chilcuague o Raíz de oro. Esta planta es endémica de los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí y es utilizada de manera tradicional para aliviar el dolor bucal y muscular, así como un agente insecticida y condimento en los alimentos (López, 2007; Cilia-López *et al.*, 2008).

Dentro de los compuestos químicos identificados en la especie *H. longipes*, se destaca la afinina (amida olefínica), la cual presenta efecto antifúngico, insecticida, antibacteriano, analgésico, afrodisíaco, antiinflamatorio, vasodilatador y analgésico entre otros (Ríos *et al.*, 2007; Cilia-López *et al.*, 2010; Déciga-Campos *et al.*, 2010; Déciga-Campos *et al.*, 2012).

Diversos estudios dentro y fuera de nuestro grupo de investigación han mostrado evidencias de la actividad farmacológica de la afinina, razón por la cual puede ser considerada como un compuesto con alto potencial para poder emplearse en el desarrollo de un fitomedicamento que cumpla con las regulaciones necesarias para asegurar su eficacia y seguridad.

Con base en lo anteriormente señalado, el objetivo de este proyecto consiste en obtener un extracto cuantificado a partir de las raíces de la especie *H. longipes*. En primer término, se desarrollará y validará el método analítico para la identificación y cuantificación de un marcador químico, utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y, posteriormente, se evaluará el efecto analgésico, tóxico y letal del extracto cuantificado en modelos animales (Castañón *et al.*, 2001).

2. ANTECEDENTES

En la Medicina Tradicional existen diversas especies vegetales que se utilizan para el tratamiento del dolor. Una de ellas es la especie *Heliopsis longipes* conocida con el nombre común de Chilcuague o Raíz de oro. Esta planta es endémica de los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí y es utilizada de manera tradicional para aliviar el dolor bucal y muscular, así como un agente insecticida y condimento en los alimentos (López, 2007; Cilia-López *et al.*, 2008).

Dentro de los compuestos químicos identificados en la especie *H. longipes*, se destaca la afinina (amida olefínica), la cual presenta efecto antifúngico, insecticida, antibacteriano, analgésico, afrodisíaco, antiinflamatorio, vasodilatador y analgésico entre otros (Ríos *et al.*, 2007; Cilia-López *et al.*, 2010; Déciga-Campos *et al.*, 2010; Déciga-Campos *et al.*, 2012).

Diversos estudios dentro y fuera de nuestro grupo de investigación han mostrado evidencias de la actividad farmacológica de la afinina, razón por la cual puede ser considerada como un compuesto con alto potencial para poder emplearse en el desarrollo de un fitomedicamento que cumpla con las regulaciones necesarias para asegurar su eficacia y seguridad.

2.1 Definición de dolor

De acuerdo a la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, International Association for the Study of Pain) se puede definir al dolor como “Una experiencia sensitiva y emocional desagradable que se asocia a una lesión tisular (destrucción celular con liberación de sustancias bioquímicas) real o posible, o que se describe como tal”, involucrando por lo tanto, procesos sensoriales y emocionales (Crusiani y Nieto, 2006).

La capacidad de experimentar dolor tiene como función proteger al organismo de estímulos nocivos. Cuando la lesión tisular es inevitable se produce un conjunto de cambios en el sistema nervioso (central y periférico) responsable de la percepción del dolor (Crusiani y Nieto, 2006; Bader *et al.*, 2010).

2.2 Clasificación

Las principales clasificaciones del dolor se han llevado a cabo con base en el mecanismo fisiopatológico del dolor (nociceptivo o neuropático), su duración (crónico, agudo, intercurrente) y su etiología (maligno o no maligno) (OMS, 2002).

2.2.1 Nocicepción

El dolor de tipo nociceptivo involucra la activación de receptores denominados nociceptores, mediante estímulos térmicos, mecánicos o bioquímicos. Dichos receptores se encuentran localizados en tejido cutáneo, articulaciones, músculos y en las paredes de las vísceras que captan los estímulos dolorosos y los transforman en impulsos eléctricos (OMS, 2002; McMahon y Koltzenberg, 2007).

Existen tres tipos de receptores nociceptivos:

- Mecanorreceptores: estimulados por presión.
- Termorreceptores: responden a temperaturas extremas.
- Receptores polimodales: sensibles a estímulos nociceptivos, mecánicos, térmicos y químicos (McMahon y Koltzenberg, 2007).

El dolor nociceptivo se subdivide a su vez en dolor somático y visceral de acuerdo a la localización de dichos receptores. Su función es alertar al individuo sobre algún estímulo peligroso en el medio ambiente. Adicionalmente, es el responsable de una hipersensibilidad en el área afectada, con el fin de evitar el uso del tejido dañado, contribuyendo a la reparación del tejido tisular (Bader *et al.*, 2010).

2.2.2 Dolor neuropático

El dolor inadaptativo, patológico o neuropático es provocado por daño estructural y disfunción neuronal en el sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP), incluyendo afecciones metabólicas y traumáticas e infecciones isquémicas, tóxicas o inmunitarias (OMS, 2012).

Este tipo de dolor no se asocia a algún estímulo nocivo ni al proceso de cicatrización, ya que se genera por la lesión del sistema nervioso (nervios periféricos, sistema nervioso central, etc.). Su tratamiento debe incluir las áreas farmacológicas, psicológicas y rehabilitadoras, ya que se trata en sí de una enfermedad (Crusiani y Nieto, 2006; Bader *et al.*, 2010).

2.3 Fisiología del dolor

El proceso denominado dolor comprende varias etapas que se muestran en la **Figura 1** y las cuales se señalan a continuación:

- **Activación y sensibilización periférica:** Hace referencia a la activación y sensibilización de los nervios periféricos. En esta fase, el estímulo nociceptivo se transforma en un impulso eléctrico (potencial de acción), teniendo lugar la transducción.
- **Transmisión:** El potencial de acción viaja a través de la fibra nerviosa estimulada hasta la denominada segunda neurona, localizada en el asta dorsal de l
 - a médula ósea.
 - **Modulación:** Se produce en el asta dorsal de la médula, intervienen las proyecciones de las fibras periféricas y las fibras descendentes de centros superiores. En esta etapa los analgésicos tienen la capacidad de modificar la transmisión del impulso nervioso. La transmisión de potencial de acción depende de la actividad de moléculas transmisoras denominadas neurotransmisores, como son: glutamato y aspartato (excitadores del SNC), ácido gamma-aminobutírico (inhibidor del SNC), sustancia P (excitador lento), péptidos opioides endógenos, serotonina, noradrenalina, etc.
- **Integración:** Es el reconocimiento e interpretación del potencial de acción por parte de los centros superiores en las diferentes porciones del sistema nervioso (SN), como son la formación reticular bulbar y mesencefálica, donde se integran las reacciones emocionales y de comportamiento. En el tálamo se encuentran los componentes sensoriales y afectivos, los cuales se proyectan a las áreas corticales. Por último, en la corteza se integran los componentes sensoriales, afectivos y cognitivos (McMahon y Koltzenberg, 2007).

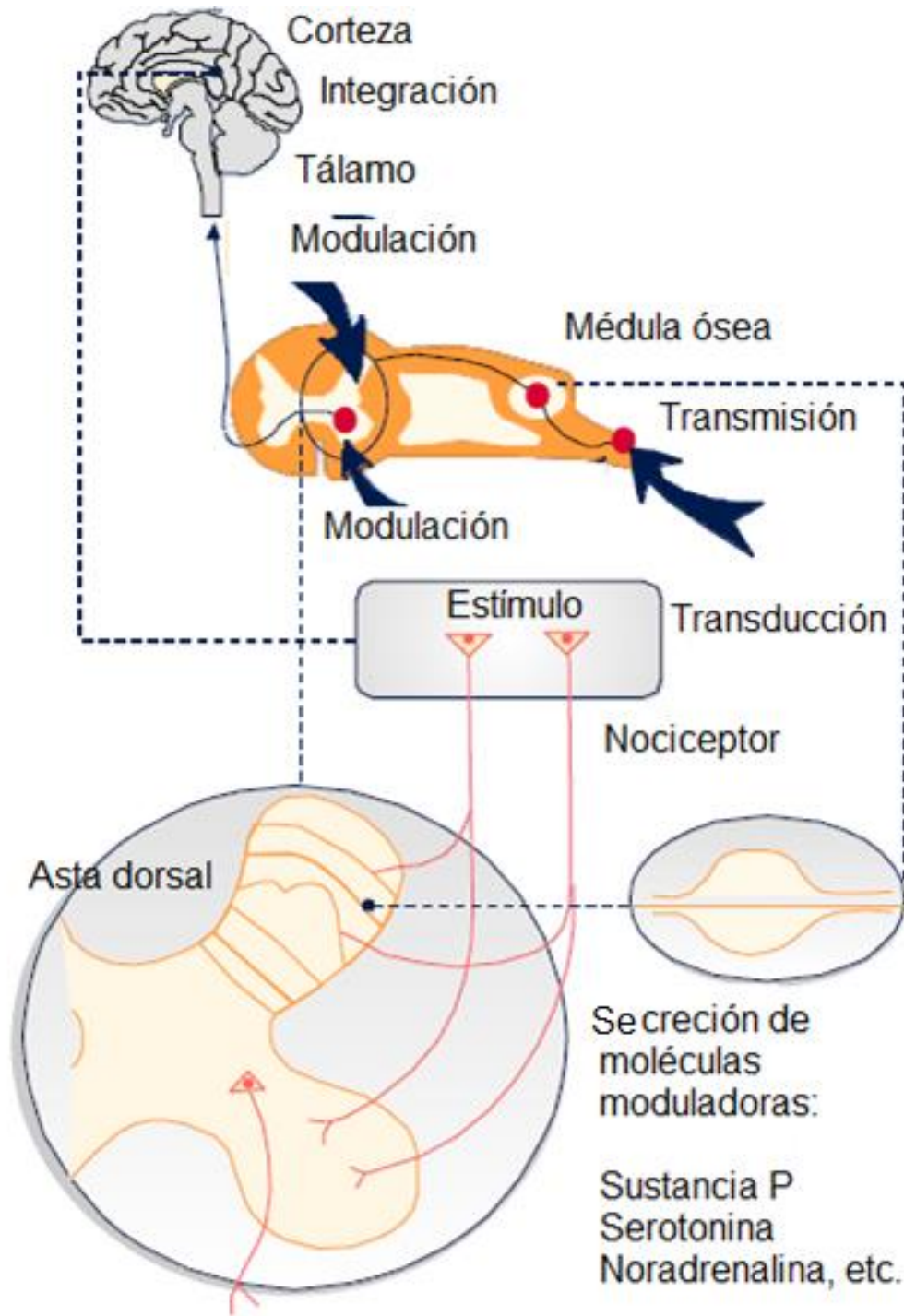


Figura 1. Etapas del proceso denominado dolor. Fuente: Modificada de: Villoria y Román, 2000.

2.4 Evaluación y medición del dolor

Para realizar una adecuada evaluación del dolor, se necesita diferenciar entre el umbral de percepción del dolor (intensidad primaria con la que se distingue dolor después de un estímulo doloroso), el umbral de dolor importante (intensidad insoportable) y el grado de tolerancia al dolor, que se determina individualmente influenciado por varios factores (Serrano-Atero *et al.*, 2002).

Serrano-Atero y colaboradores (2002), mencionan que las evaluaciones del dolor se pueden llevar a cabo mediante varios sistemas, entre los principales se encuentran los siguientes:

- Escala numérica.
- Escalas descriptivas simples o escalas de valoración verbal.
- Escala visual analógica.
- Escala de expresión facial.
- Escala de Andersen.

Dentro de las escalas de valoración para el dolor, el método subjetivo más empleado es el que se lleva a cabo a través de una escala analógica visual (EAV como se muestra en la **Figura 2**), calificando de manera verbal la intensidad del dolor o evaluando aspectos emocionales, afectivos, cognitivos y sociales por tener una mayor sensibilidad de medición (Bader *et al.*, 2010).

2.5 El empleo de las plantas medicinales en la terapéutica tradicional con efecto analgésico

Las culturas prehispánicas desarrollaron un gran conocimiento sobre las plantas medicinales. Dicho conocimiento es la base de la Medicina Tradicional vigente hasta nuestros días, representando así una conexión entre el pasado y el presente (OMS, 2000).

El uso de las plantas medicinales en nuestro país es común en todas las poblaciones, lo cual se debe a la naturaleza pluriétnica de su población en respuesta

a la búsqueda de alternativas naturales para uso médico en padecimientos de una amplia gama (Castañón *et al.*, 2001).

Entre las condiciones a las cuales se les busca dar tratamiento mediante el uso de plantas medicinales, se encuentra la sensación de dolor en sus diversos tipos, por ejemplo: el dolor bucal. Entre las plantas que se han utilizado para esta condición se encuentran las siguientes: *Acacia cornigera* (Cornizuelo), *Rauvolfia tetraphilia* (Hierba cancerina) y las pertenecientes al género *Heliopsis* (Escamilla *et al.*, 2015).

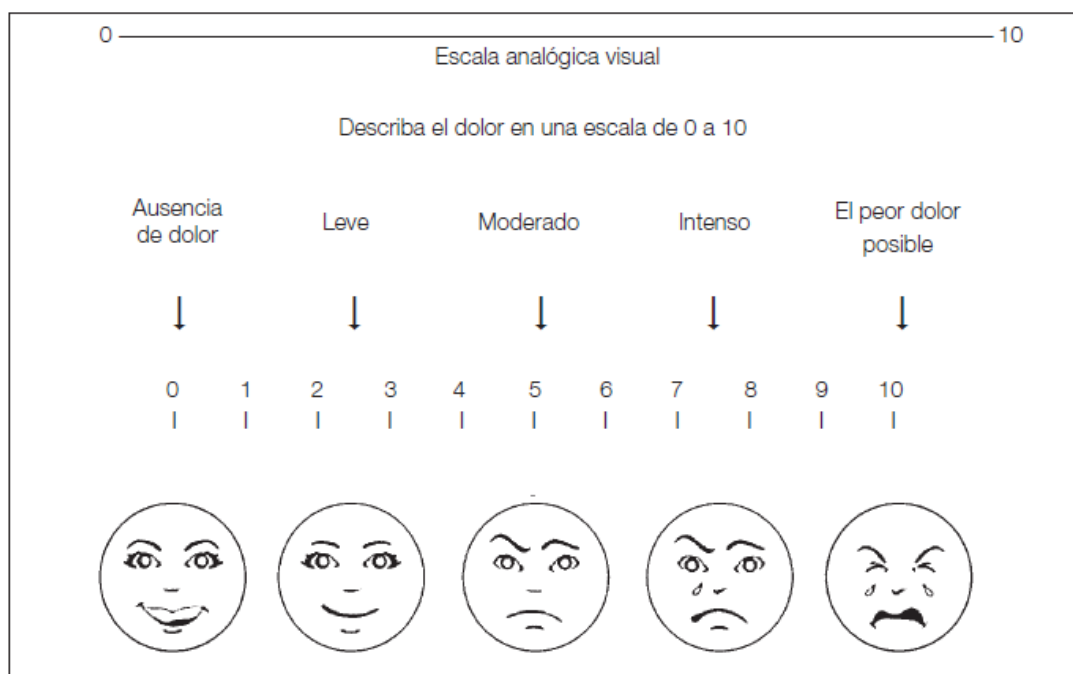


Figura 2. Escala analógica visual del dolor. Fuente: Modificada de: Bader *et al.* (2010).

2.5.1 Plantas medicinales asociadas con efectos analgésicos en el género *Heliopsis*

Dentro del género *Heliopsis*, existe una especie denominada *H. longipes*, a la cual también se le atribuyen actividades antiinfecciosas en los aparatos respiratorio y digestivo. Dicha especie fue la primera en la que se reportó la presencia de una

alcamida oleofínica (afinina), la cual se acumula en sus raíces en grandes cantidades: hasta 1 % del peso seco total de la raíz (López, 2007).

2.6 Generalidades botánicas de *Heliopsis longipes*

La planta *H. longipes* pertenece a la familia *Asteraceae* (subdividida en dos subfamilias: *Lactucoideas* y *Asteroideas*), la cual está compuesta por 23,000 especies distribuidas en 12 tribus de una gran diversidad biológica. Esta planta tiene una distribución geográfica que abarca desde las regiones polares hasta los trópicos. Se caracteriza por poseer flores conformadas por una inflorescencia, hermafroditas, unisexuales o estériles (Castro, 2009; Hernández, 2009).

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu *Heliantheae*, la cual es la tercera más numerosa a nivel mundial, ya que consta de 2,500 especies agrupadas en 189 géneros. Se diferencia de otros géneros debido a la localización y características de sus flores (fértils y liguladas). Desde el punto de vista antropocéntrico el uso de estas plantas se ha limitado a dos especies: *Heliopsis helianthoides* y *Heliopsis longipes* (Castro, 2009; Hernández, 2009).

H. longipes es una planta herbácea. Sus tallos son semileñosos con una longitud de 20 a 70 cm de altura. Las hojas por su parte son opuestas y ovaladas con 2 a 4 cm de largo, aserradas y con pecíolos cortos; sus cabezuelas son pedunculadas y de color amarillo (**Figura 3 a**). Por último, sus raíces miden de 15 a 30 cm de largo (**Figura 3 b**). Las generalidades botánicas referentes a *H. longipes* (Chilcuague) se muestran en la **Tabla 1** (Hernández, 2009).



a)



b)

Figura 3. a) Flores y b) raíces pertenecientes al género *Heliopsis*.

Fuente: Modificada de: Castro, 2009.

Tabla 1. Clasificación científica de *H. longipes* (Chilcuague) (Castro, 2009).

Clasificación científica	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Tribu	<i>Heliantheae</i>
Género	<i>Heliopsis</i>
Especie	<i>longipes</i>

H. longipes (Chilcuague) es endémico de la región conformada por secciones de la Sierra de Álvarez y la Sierra Gorda, donde coinciden los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro, dicha localización se muestra en la **Figura 4** (Cilia-López *et al.*, 2008).

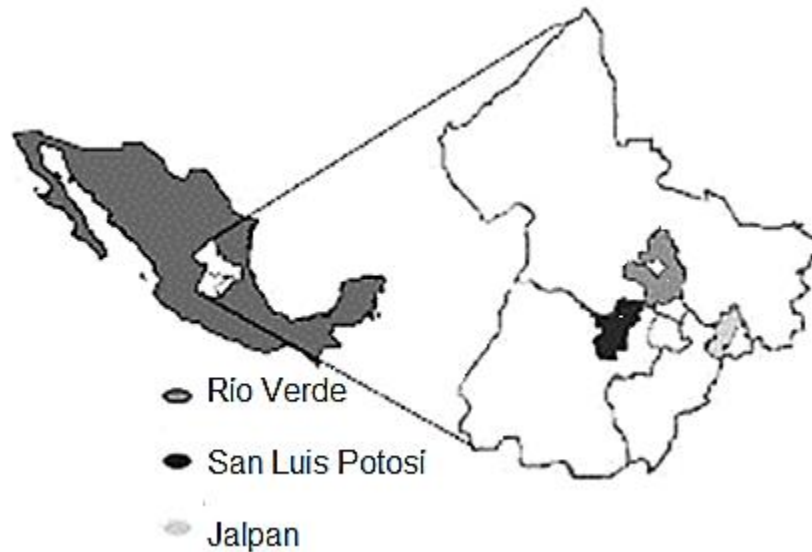


Figura 4. Distribución geográfica de *Heliopsis*. Fuente: Modificada de: Cilia-López *et al.*, 2008.

2.7 Compuestos bioactivos identificados en *Heliopsis longipes*

Los compuestos mayoritarios presentes en los extractos de plantas del género *Heliopsis* son alcanidas. Dichos compuestos están constituidos por la unión de un ácido graso (la longitud de la cadena puede variar de ocho a dieciocho carbonos generalmente alifáticos o lineales) y una amina (Hernández, 2009).

Las alcanidas abarcan cerca de 200 compuestos ampliamente distribuidos, ya que se les puede encontrar en varios especímenes que van desde los líquenes hasta las plantas con flores, hallándoseles incluso en las semillas, raíces o follaje (Castro, 2009). En la familia *Asteraceae* (a la que pertenece *H. longipes*), las alcanidas resultan de la ligadura combinatoria de alquilaminas aparentemente derivadas de reacciones de descarboxilación de aminoácidos con ácidos grasos de cadenas de mediana y corta longitud, derivados de la ruta de los policétidos (Christensen y Lam, 2011).

Entre las funciones de las alcanidas, se encuentran la regulación del crecimiento y desarrollo de una planta, actuando directamente sobre las células que las sintetizan o viajando a otros tejidos, por lo cual se denominan fitohormonas. La acción de una fitohormona depende de su nivel de concentración en los tejidos de la planta (López, 2007).

Recientemente, se ha demostrado que diversas alcanidas producidas por las plantas interactúan con los receptores cannabinoides de mamíferos, mostrando una gran afinidad, pues en ellos se identificó una proteína membranal con características de receptor, la cual se ha perfilado como la responsable de dirigir las respuestas celulares de las alcanidas (López, 2007).

De acuerdo al tipo de enlaces que contengan, las alcanidas se dividen en: alcanidas olefínicas (tienen sólo dobles ligaduras) y alcanidas acetilénicas con al menos una triple ligadura. Así mismo, existen alcanidas que presentan anillos homo o heterocíclicos (Hernández, 2009).

Dentro de las alcanidas, la afinina es el principal componente de *H. longipes*; sin embargo, se han identificado otros compuestos (**Figura 5**) en menor concentración como son: un éster de borneol (compuesto **1**), así como otras alcanidas: N-isobutil-8,10-dienoico-3Z-undecenamida (compuesto **2**), N-isobutil-sin-8,9-dihidroxi-2E,6Z-decadienamida undecenamida (compuesto **3**) y N-isobutil-sin-6,9-dihidroxi-2E,7E-decadienamida undecenamida (compuesto **4**) (Hernández, 2009; López-Martínez, 2011).

También se han identificado compuestos volátiles de acuerdo al trabajo propuesto por Aguilar *et al.* (2015), quienes identificaron 28 compuestos en el extracto de las raíces de *H. longipes*, correspondientes al 10 % del total del extracto, de los cuales el 53.6 % corresponde a monoterpenos, el 25 % a sesquiterpenos, el 7.1 % a diterpenos, el 7.1 % a compuestos oxigenados hidrocarbonados y el 7.1 % a ésteres.

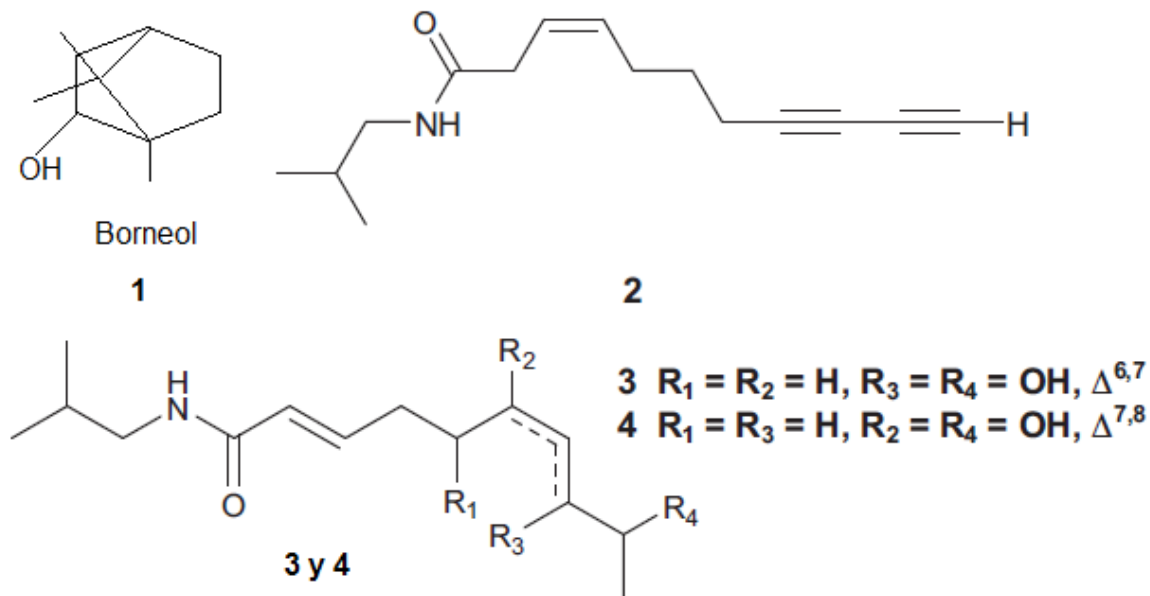


Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos bioactivos identificados en *H. longipes*. Fuente: Modificada de: Hernández, 2009.

2.8 Afinina

Dentro de los compuestos aislados en *H. longipes*, el mayoritario lo constituye la denominada afinina (**Figura 6**). Dicho compuesto se aisló en el año de 1945 por Acre, Jacobson y Haller (López-Martínez, 2011) y su estructura química ha sido elucidada, mediante la técnica de ^1H y ^{13}C NMR (Resonancia Magnética Nuclear) (Correa y Rocket, 1970; Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

La afinina es una isobutilamida alifática insaturada (N-isobutil-2E, 6Z, 8E-decatrienamida) de apariencia aceitosa de color amarillo, textura viscosa, soluble en disolventes no polares y prácticamente insolubles en soluciones ácidas y alcalinas. Entre las características físicas y químicas de la afinina se pueden mencionar las siguientes: Punto de ebullición de 114 °C a 0.2 mm Hg de presión, un punto de fusión de 23 °C y peso molecular de 221.33 g/mol. Está compuesta por 75.96 % de carbono, un 10.47 % de hidrógeno, 33 % de nitrógeno y 7.235 % de oxígeno (Hernández, 2009).

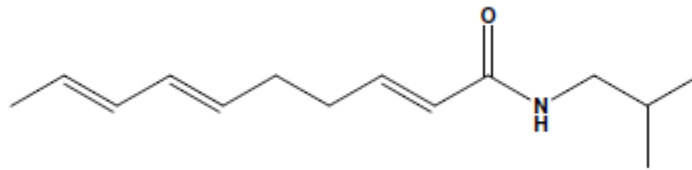


Figura 6. Estructura química de la afinina identificada en *H. longipes*. Fuente: Modificada de: Hernández, 2009.

2.9 Estudios sobre la bioactividad de *Heliopsis longipes*

H. longipes posee una gran cantidad de efectos biológicos, muchos de los cuales son atribuidos a la afinina, entre los que se pueden mencionar su efecto larvicida (10-14 $\mu\text{g/mL}$) (Hernández-Morales *et al.*, 2015), antimicrobiano (25-300 $\mu\text{g/mL}$), bacteriostático (25 mg/mL), inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli*, *Saccharomyces*, *Pseudomonas solanacearum* y *Bacillus subtilis* (Molina-Torres *et al.*, 1999), analgésico con una $\text{DE}_{50} = 1 \text{ mg/kg}$ vía intraperitoneal en ratones (Ríos *et al.*, 2007; Cilia-López *et al.*, 2010), antinociceptivo con una $\text{DE}_{50} = 6.98 \text{ mg/kg}$ vía oral (p.o) y una $\text{DE}_{50} = 36 \pm 5 \text{ mg/kg}$ vía i.p. en ratones (Déciga-Campos *et al.*, 2010; Déciga-Campos *et al.*, 2012), antiinflamatorio (90-180 μM en la línea celular de macrófagos) (Wu *et al.*, 2008) y una $\text{DE}_{50} = 0.8 \text{ mg/kg}$ en roedores (Hernandez *et al.*, 2009), ansiolítico (3-30 mg/kg i.p. en ratones) (Déciga-Campos *et al.*, 2012) y diurético (800 mg/kg p.o. en ratones) (Gerbino *et al.*, 2016).

A *H. longipes* también se le han atribuido propiedades vasodilatadoras (Dubey *et al.*, 2013; Castro-Ruiz *et al.*, 2017), anticonvulsionantes, afrodisíacas, antiarrugas y antioxidantes (Demarne y Passaro, 2009; Abeytiri *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2016).

Así mismo, la acción antiparasitaria de la afinina es bien conocida (Cilia-López *et al.*, 2010). La actividad fungicida de este compuesto también ha sido evaluada, observándose que el desarrollo micelial de dos especies de *Sclerotium* (*S. cepivorum* y *S. rolfsii*.) se inhibió completamente (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000).

2.9.1 Mecanismos de acción de la afinina

El efecto antinociceptivo de la afinina se ha atribuido a diversos mecanismos de acción que incluyen la activación de los sistemas opioide, gabaérgico, serotoninérgico y la participación de la vía del NO/GMP_C/K_{ATP} (óxido nítrico/guanosínmonofosfato cíclico/canales de potasio dependientes de ATP) (Ríos *et al.*, 2007; Déciga-Campos *et al.*, 2010). Con respecto a su efecto antiinflamatorio, la afinina se ha vinculado con la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas, las cuales son necesarias para la síntesis de moléculas mediadoras de la inflamación como son las prostaglandinas entre otras (Hernández *et al.*, 2009; Cariño-Cortés *et al.*, 2010).

Con respecto al proceso de absorción de la afinina, se ha demostrado que permea por difusión pasiva a través de cultivos monocapa de células Caco-2 (10 µg/mL). De la misma manera, existen evidencias de que la afinina es capaz de permear la piel, la mucosa oral y posteriormente llegar a la sangre y cruzar la barrera hematoencefálica en grandes cantidades (~ 98 %) (Veryser *et al.*, 2014; Veryser *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que otra alcaloide, la capsaicina, (con estructura química semejante a la afinina), puede unirse a los denominados receptores de potencial transitorio vanilloides subtipo 1 (TRPV1), los cuales están presentes en fibras nerviosas responsables de la sensación del dolor en el SNC. Los receptores TRPV1 se han asociado a procesos inflamatorios, de hiperalgesia, dolor neuropático y visceral, incontinencia urinaria, tos crónica y el síndrome del intestino irritable (Caterina *et al.*, 1999; Szallasi *et al.*, 2007; Rahman, 2014).

2.10 Fitofármacos

A la afinina, el compuesto bioactivo más abundante en *H. longipes*, se le atribuyen múltiples efectos biológicos. De igual manera, existe una gran cantidad de sustancias químicas extraídas o derivadas de plantas medicinales con fines terapéuticos, las cuales son estudiadas por la ciencia denominada fitoterapia (Urbina, 2012).

Una de las finalidades de la fitoterapia es el desarrollo de medicamentos naturales y tradicionales, los cuales se definen como aquellos que en su composición contienen principios activos o partes obtenidas directamente o mediante procesos específicos de vegetales, minerales o animales cuyo uso se justifica por la práctica de la medicina tradicional, o bien, por estudios científicos que validen su uso (OMS, 2011).

2.10.1 Categorización de los fitofármacos

De acuerdo al número de extractos vegetales que lo compongan, los fitofármacos se pueden dividir en monopreparado o preparado de combinación. Algunas características que deben poseer los fitofármacos para ser considerados como tales, son las siguientes:

- Contener como principio activo preparaciones vegetales, las cuales son en su mayoría extractos estandarizados, que no deben poseer efectos terapéuticos antagonistas.
- Elaborar en preparaciones galénicas (gotas, comprimidos, grageas, cápsulas o cremas).
- Comprobar sus efectos farmacológicos mediante experimentos y su eficacia clínica mediante estudios clínicos y en la práctica médica (OMS, 2011; Urbina, 2012).

En la **Figura 7** se muestra de una manera simplificada el proceso de obtención de un extracto vegetal.

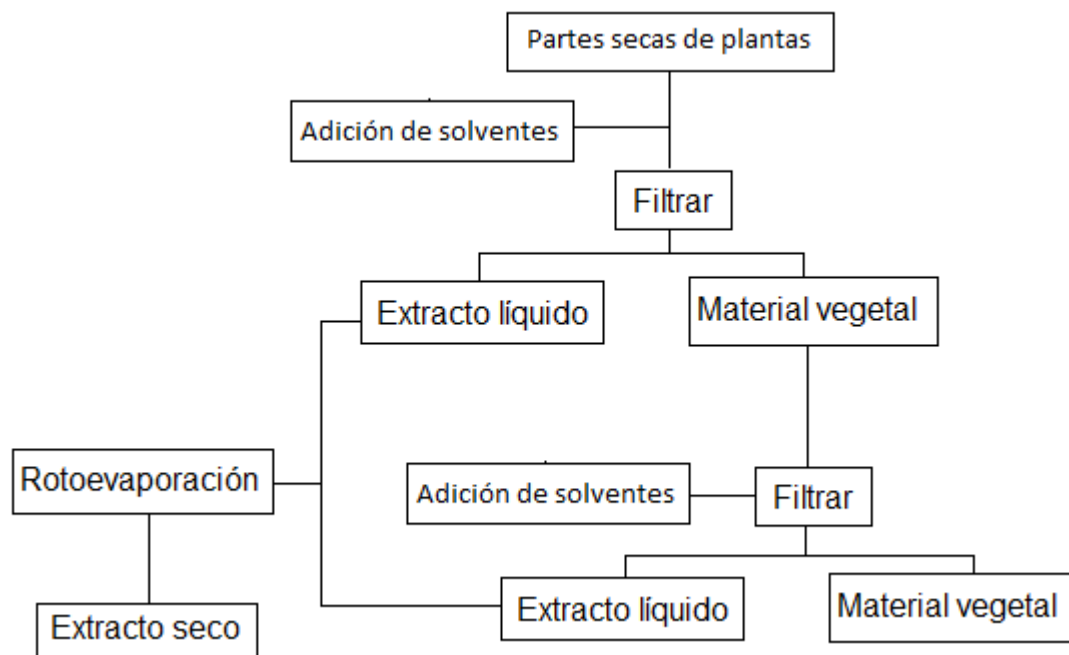


Figura 7. Proceso de obtención de un extracto vegetal. Fuente: Modificada de: Hernández, 2009.

2.10.2 Características de calidad de los fitofármacos

De acuerdo con Urbina (2012), los fitofármacos deben cumplir con la estandarización de algunas variables, esto con el objetivo de garantizar su calidad y su reconocimiento como fitofármacos. Dentro de estos criterios podemos mencionar los siguientes:

- Certificación de la especie botánica utilizada.
- Definición de la porción de la planta que se utiliza en la fabricación del extracto.
- Determinación de los factores ambientales
- Establecimiento de las condiciones de la cosecha: tiempo adecuado para cosechar cada planta.
- Comprobación de hierbas libres de contaminación: hongos, bacterias, insectos, entre otros.

- Existencia de un procedimiento de control de calidad de los procesos de cosecha que aseguren el producto final, su estabilidad y tiempo de duración en los estantes de venta.
- Estándarización de los extractos: Conocimiento de los principios activos de la planta medicinal que se utiliza como la base del extracto que compone el fitofármaco.
- Conocimiento de los solventes empleados, los materiales secos utilizados y las condiciones de extracción.

2.10.3 Regulaciones sanitarias para los fitofármacos

En México alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales (Ocegueda *et al.*, 2005). El mayor número de dichas especies no cuentan con una evaluación química, farmacológica o clínica, por lo cual, las autoridades mexicanas, basándose en las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han buscado la creación de monografías oficiales, en donde se proporcione información científica acerca de la seguridad, eficacia y calidad de las plantas medicinales. Dichas monografías se compilan en la denominada Farmacopea Herbal de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

Este documento marca la pauta de calidad e inocuidad que deben tener las preparaciones farmacéuticas realizadas a partir de plantas, indicando que los extractos vegetales deben prepararse de acuerdo con la FHEUM y a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), incluyendo los suplementos vigentes. En caso de que en ésta no aparezca la información, podrá recurrirse a farmacopeas de otros países cuyos procedimientos de análisis se realicen conforme a especificaciones de organismos especializados u otra bibliografía científica reconocida internacionalmente; tal es el caso de las normativas marcadas por la OMS (Castañón *et al.*, 2001).

En la **Tabla 2** se muestran las diferentes pruebas a las que deben ser sometidos los fitofármacos para garantizar su calidad de acuerdo a las especificaciones de la FEUHM y la OMS.

Tabla 2. Pruebas de seguridad y calidad para los fitofármacos.

Institución o norma oficial	Pruebas de calidad y seguridad		
FEUHM	Análisis de materia extraña, pérdida de peso y humedad en el material vegetal.	Análisis microbiológico, de metales pesados y plaguicidas en el fitofármaco.	
OMS	Características fisicoquímicas del material vegetal.	Estabilidad, metales pesados, plaguicidas y efectos farmacológicos del fitofármaco.	Análisis de toxicidad aguda y subaguda.

Existen normas publicadas en el Diario Oficial de la Federación para la regulación complementaria de dichos productos. Algunas de estas normas son las siguientes:

La Norma Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011 indica las buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios (DOF, 2011).

La Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012 hace referencia al etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios (DOF, 2012).

Finalmente, la Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002 indica la instalación y operación de la farmacovigilancia (DOF, 2002).

Por su parte, la Secretaría de Salud regula y controla el fomento sanitario, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), confiriéndole las siguientes actividades:

- El control y vigilancia de los establecimientos de salud.
- La prevención y el control de los efectos nocivos de los factores ambientales en la salud del hombre.
- La salud ocupacional y el saneamiento básico.
- El control sanitario de productos, servicios, su importación y exportación, así como de los establecimientos dedicados al proceso de los productos.
- El control sanitario del proceso, uso, mantenimiento, importación, exportación y disposición final de equipos médicos, prótesis, agentes de diagnóstico, insumos de uso odontológico, materiales quirúrgicos, de curación y productos higiénicos, así como de los establecimientos dedicados al proceso de los productos.
- El control sanitario de la publicidad de las actividades, productos y servicios.
- El control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y sus componentes.
- La sanidad internacional.
- El control sanitario de las donaciones y trasplantes de órganos, tejidos y células de seres humanos (COFEPRIS, 2015).

También es importante recordar que aunque los fitofármacos suelen tener un amplio margen terapéutico, no están exentos de probables efectos adversos, interacciones y contraindicaciones. Por tal motivo, la evaluación de la seguridad

debe sustentarse, siempre que sea posible, en pruebas científicas que evalúen sus posibles acciones tóxicas (González-Lavaut *et al.*, 2004).

2.10.4 Extractos elaborados a base de especies vegetales

De acuerdo a la definición de la farmacopea herbolaria, se considera un extracto a la forma farmacéutica obtenida por la acción de un disolvente (alcohol) en diversas concentraciones sobre el material vegetal seco (Castañón *et al.*, 2001).

Existen varios tipos de extractos: fluidos (disolvente alcohol), blandos y secos (20 - 40 % y 8 % de agua, respectivamente) (Castañón *et al.*, 2001).

De acuerdo a instituciones regulatorias extranjeras como la European Medicines Agency (EMA) existen criterios comunes para la diferenciación entre los diferentes preparados de los medicamentos a base de plantas (extractos estandarizados y cuantificados), que permiten garantizar una descripción precisa y coherente de las sustancias activas presentes en ellos, mediante una descripción cualitativa y cuantitativa de los marcadores químicos. Un marcador químico se define como aquel compuesto químico (de estructura conocida) presente en algún preparado vegetal que puede o no presentar actividad farmacológica, cuya presencia y concentración pueden ser utilizados como parámetro de calidad para el material vegetal (Songlin *et al.*, 2008; EMA, 2009; Xin-Yue *et al.*, 2013).

Los extractos cuantificados son aquellos en los cuales la concentración de los marcadores químicos presentes en el extracto se ajusta a un rango establecido, lo cual se lleva a cabo mediante una mezcla de lotes de especímenes vegetales utilizados en el proceso de fabricación (EMA, 2009).

Por su parte, los extractos estandarizados se definen como aquellos preparados, a los cuales se les ha realizado un ajuste en el contenido de algún constituyente con actividad terapéutica conocida. Dicha concentración se encontrará dentro de un margen aceptable y los ajustes se lograrán, mediante la adición de excipientes (EMA, 2009).

Para ambas preparaciones, existen una serie de datos mínimos que se deben conocer, como son:

- Nombre de la sustancia utilizada, obtenida de plantas
- Estado físico de la preparación de hierbas
- Cantidad de la preparación herbal genuina
- Nombre y cantidad del o de los constituyente(s) con actividad terapéutica conocida (extractos estandarizados)
- Nombre y cantidad (dado como rango) de los marcadores activos (extractos cuantificados) (EMA, 2009).

A continuación se muestran ejemplos de la información que debe contener un extracto cuantificado y un extracto estandarizado.

- Extracto cuantificado

Materia vegetal: Corteza de sauce (Género *Salix*).

Volumen total del extracto 3 mL (de varias especies del género *Salix*: *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill y *S. fragilis* L.).

Rango de concentración de los marcadores químicos (derivados salicílicos totales calculados como salicina): 1.5 – 1.7 %. Es decir, 3 mL de extracto contienen de 0.45 a 0.51 mL de derivados salicílicos totales, calculados como salicina (EMA, 2009).

- Extracto estandarizado

Materia vegetal: Hoja de Senna (Género *Cassia*)

Volumen total del extracto: 1.3 mL

Rango de concentración de los marcadores químicos (glicósidos de hidroxirraceno, calculados como senósido B): 2.55 %

Cantidad de la sustancia auténtica a base de plantas: 85 – 96 %

Excipientes para el ajuste: 4 – 15 %

Esto quiere decir que, 1.3 mL de extracto contienen 1.10 mL – 1.25 mL de *Cassia senna*, correspondiente a 0.33 mL de glicósidos de hidroxirraceno, calculados como senósido B (EMA, 2009).

En el caso particular de la planta *H. longipes* sus extractos pueden ser añadidos a la pasta de dientes y utilizados como analgésicos orales en geles (como Buccaldol® e Indolphar®) o como una crema antiarrugas que puede sustituir al Botox en aplicaciones cosméticas, ya que la afinina inhibe las contracciones en los músculos subcutáneos, especialmente los de la cara (Demarne y Passaro, 2009; Veryser *et al.*, 2014). También hay algunos productos antienvjecimiento (Gatuline®, SYN®-COLL, ChroNOline™) que contienen afinina. Existen alrededor de 30 patentes que describen productos que se hacen de una variedad de especies de plantas que contienen afinina (Haw y Keng, 2003).

2.11 Importancia de la sinergia en los compuestos de extractos cuantificados

Existen varios ejemplos del efecto sinérgico entre componentes de extractos, sugiriendo que éstos tienen un mayor efecto farmacológico que los compuestos en su forma pura, ya que, teniendo en cuenta que la actividad biológica puede ser el resultado de la combinación de varios compuestos, el proceso de aislamiento puede conducir a la pérdida o reducción de la misma (Carmona y Soares, 2013).

Una de las ventajas de las plantas medicinales es su composición, la cual es muy compleja. Sus componentes tienen múltiples actividades farmacológicas y las posibles explicaciones a este fenómeno incluyen sinergia, una biodisponibilidad mejorada, efectos acumulativos, o simplemente las propiedades aditivas de los constituyentes (Carmona y Soares, 2013).

Entre los ejemplos que evidencian la sinergia entre los compuestos de un extracto podemos mencionar que la actividad antiespasmódica de *Cannabis* es mejor que el efecto que provoca su componente mayoritario: trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol en una dosis equivalente; o el efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria potenciado de varias mezclas de Ginkólido A y Ginkólido B, presentes en extractos de *Ginkgo biloba* (Zuardi *et al.*, 1982; Williamson y Evans, 2009).

Algunos otros estudios fueron realizados por Chicca *et al.* (2009), los cuales desarrollaron experimentos, evaluando extractos de *Echinacea purpurea* para el tratamiento de infecciones respiratorias superiores, evidenciando que existe una respuesta sinérgica entre dichos extractos.

2.12 Pruebas de análisis

De acuerdo a los documentos regulatorios en materia de preparados farmacéuticos provenientes de productos herbolarios existentes en el país (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos de México), las preparaciones farmacéuticas a partir de compuestos vegetales deben someterse a ciertas pruebas básicas de evaluación, relacionadas con el control de calidad, ya que el material vegetal no es inocuo y al tener un efecto terapéutico, su uso de manera incorrecta involucra riesgos para la salud (Castañón *et al.*, 2001).

Dichas metodologías y especificaciones se engloban en las monografías generales de análisis de la farmacopea herbolaria (MGA-FH). Los análisis básicos que deben evaluarse en los materiales provenientes de plantas medicinales, comprenden la identificación de materia extraña, plaguicidas, metales pesados y microorganismos (Castañón *et al.*, 2001).

Adicionalmente, se pueden evaluar los efectos farmacológicos y toxicológicos del extracto, así como la estabilidad del compuesto marcador químico bajo condiciones extremas de temperatura.

2.12.1 Material vegetal

2.12.1.1 Cuantificación de materia extraña

La cuantificación de materia extraña se encuentra especificada en la Monografía General de análisis de la Farmacopea Herbolaria MGA-FH-0030.

Se define la materia extraña como:

- Otras partes de la planta medicinal empleada.

- Cualquier organismo, parte o producto del mismo, diferente a los nombrados en la definición del fitofármaco.
- Mezclas adicionales de minerales (piedras, tierra, arena y polvo) adheridos a las plantas.

La materia vegetal debe estar libre de contaminación por hongos, insectos y desechos fecales animales.

Durante el almacenamiento, los productos deben ser guardados en un lugar limpio e higiénico. Antes de moler el material vegetal se debe retirar la tierra, el polvo, las piedras, la arena u otras materias inorgánicas (Castañón *et al.*, 2001).

2.12.1.2 Análisis de pérdida de peso por el método de secado

La evaluación de pérdida de peso por secado se encuentra especificada en la MGA-FH 0080 relativa a agua y materia volátil.

Un exceso de agua en el material vegetal puede fomentar el crecimiento de agentes biológicos contaminantes, como los hongos o agilizar el deterioro por exceso de humedad. El procedimiento descrito en dicha monografía, determina tanto materia volátil como contenido de agua.

La evaluación de pérdida de peso por secado puede realizarse a temperaturas de 100-105 °C o en un desecador con pentóxido de fósforo a presión atmosférica y temperatura ambiente por un período específico de tiempo (Castañón *et al.*, 2001).

2.12.1.3 Cuantificación de cenizas totales

La determinación de cenizas en el material vegetal, se establece en el apartado MGA-FH-0060.

Las cenizas que quedan después de la calcinación, se determinan mediante tres metodologías:

Cenizas totales. Cuantifica la materia fisiológica y de origen externo (arena y tierra).

Cenizas insolubles en ácido. Se obtienen a partir de las cenizas totales, hirviéndolas en ácido clorhídrico y calcinando el material resultante nuevamente para la cuantificación de sílice.

Cenizas solubles en agua. Se obtiene restando el peso de las cenizas totales y el residuo obtenido después de tratar las cenizas totales con agua (Castañón *et al.*, 2001).

2.12.2 Extracto cuantificado

2.12.2.1 Identificación y cuantificación del compuesto marcador químico

De acuerdo a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), los marcadores químicos son constituyentes o grupos definidos químicamente de los componentes de un medicamento a base de plantas que pudieran o no tener la actividad terapéutica, cuya presencia y concentración pueden ser utilizados como parámetro de calidad para el material vegetal. En virtud de lo anterior, se busca que los marcadores químicos, tengan algunas características como son las siguientes: 1) tener una presencia constante en especímenes de la especie vegetal, 2) ser abundante, 3) tener actividad biológica y finalmente, 4) poder ser detectado y cuantificado de manera sencilla, específica y sensible (Songlin *et al.*, 2008; EMA, 2009; Xin-Yue *et al.*, 2013).

Los marcadores químicos deben utilizarse en diversas etapas del desarrollo y fabricación de una medicina herbaria para la autenticación y/o diferenciación de especies, recolección y cosecha, o como parámetros de calidad, estabilidad o diagnóstico de intoxicación. Lo anterior a fin de garantizar la seguridad y eficacia de los fitofármacos, mediante el desarrollo de un patrón químico único formado por la presencia de ciertos marcadores químicos en cada especie vegetal (Songlin *et al.*, 2008).

2.12.2.2 Validación del método analítico para la identificación y cuantificación del compuesto marcador químico

La validación consiste en proporcionar una metodología de medición (método analítico) de un componente determinado (analito) que demuestre, de manera confiable, que cumple con los requisitos para la aplicación analítica deseada, garantizando la calidad final del sistema o producto que se analiza (García *et al.*, 2012).

La validación de métodos analíticos es fundamental en el desarrollo de una nueva formulación, ya que de acuerdo a lo estipulado en las buenas prácticas, tanto de fabricación como de laboratorios, es necesario que todos los métodos estén validados (García *et al.*, 2012).

El factor más importante durante la validación es siempre el criterio del profesional, el cual se debe aplicar después de analizar todos los factores involucrados en el sistema de análisis: instrumentación, sustancias relacionadas, tipo de muestra, etc. (García *et al.*, 2012).

Los documentos y normas oficiales que marcan la obligación de validar los métodos analíticos, son las siguientes:

- Reglamento de insumos para la salud.
- NOM-059-SSA1-1993. Referente a: Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (DOF, 1993).
 - NOM-164-SSA1-1998. Referente a: Buenas prácticas de fabricación para fármacos (DOF, 1998).
 - NOM-073-SSA1-2005. Referente a: Estabilidad de medicamentos (DOF, 2005; García *et al.*, 2012).

Los métodos analíticos se clasifican en función de su propósito analítico en:

- a) Cuantificación del analito.
- b) Establecer la presencia del analito a un límite.

c) Identificar el analito.

En un método se pueden evaluar diversos parámetros de desempeño estadístico dependiendo de su aplicación analítica. Dichos parámetros se indican en **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros de desempeño estadístico

Aplicación analítica / Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ valoración	Identificación
Precisión/ Adecuabilidad del sistema	SI	NO
Linealidad del sistema	SI	NO
Especificidad	SI	SI
Exactitud y repetibilidad	SI	NO
Linealidad del método	SI	NO
Precisión del método o precisión intermedia	SI	NO
Límite de cuantificación	SI	NO
Robustez	NO	NO
Tolerancia	NO	NO
Estabilidad analítica de la muestra	SI	SI
Límite de detección	NO	SI

2.12.3 Pruebas de control de calidad para los extractos cuantificados

2.12.3.1 Pruebas de estabilidad del extracto cuantificado

El parámetro de especificidad evalúa la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes presentes. Para lo anterior, la muestra se somete a condiciones para favorecer la inestabilidad del analito en estudio. Dichas condiciones incluyen: altas temperaturas (70-120 °C) o 20 °C por debajo del punto de fusión, exposición a luz UV o fluorescente, humedad relativa y ajuste del pH de 1 a 2 y de 10 a 12 (García et al., 2012).

2.12.3.2 Análisis de metales pesados

Cuantificación de metales pesados, señalado en la MGA-FH-0160.

La contaminación con metales pesados puede ser atribuida a varias causas, entre las que se incluyen: contaminación ambiental y trazas por plaguicidas (Castañón *et al.*, 2001).

2.12.3.3 Identificación de pesticidas

Residuos de plaguicidas, referenciado en la MGA-FH-0150.

Los límites permisibles de plaguicidas acumulados durante las fumigaciones en los cultivos, se determinan de acuerdo a las recomendaciones de la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Castañón *et al.*, 2001).

Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura y composición química (organoclorados, organofosforados, etc.), o a su uso (insecticidas, fungicidas, etc.) (Castañón *et al.*, 2001).

A pesar de los altos niveles de plaguicidas presentes en el material vegetal, solamente pequeñas cantidades permanecen después de un proceso de extracción (Castañón *et al.*, 2001).

Los plaguicidas con mayor acción residual son los compuestos clorados y fosforados; por esta razón, el material vegetal debe ser analizado para identificar la presencia de cloro y fósforo unidos orgánicamente (Castañón *et al.*, 2001).

2.12.3.4 Análisis microbiológico

Determinación de microorganismos de acuerdo a lo establecido en la MGA-FH-0170.

El material vegetal posee generalmente un gran número de bacterias o moho provenientes del suelo o como parte de la microflora propia de cada planta, predominando las bacterias aerobias formadoras de esporas. La identificación de *Escherichia coli* y de mohos es un indicativo de la calidad en las técnicas de producción y cosecha (Castañón *et al.*, 2001).

La presencia de aflatoxinas es peligroso para la salud, por lo cual es necesario descartar su presencia en los compuestos vegetales (Castañón *et al.*, 2001).

El análisis de microorganismos específicos engloba la identificación de enterobacterias y otras bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) (Castañón *et al.*, 2001).

La cuenta total de aerobios viables se realiza mediante las técnicas de filtración por membrana, conteo en placa y dilución en serie para los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Castañón *et al.*, 2001).

Se busca detectar la posible presencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

De acuerdo con Castañón *et al.* (2001) los límites microbianos establecidos para los compuestos vegetales son los siguientes:

- Bacterias aerobias, máximo 10^5 por gramo.
- Levaduras y hongos, máximo 10^3 por gramo.
- *Escherichia coli*, máximo 10 por gramo.
- Otras enterobacterias, máximo 10^3 por gramo.

- Salmonellas, ninguna.

2.12.4 Pruebas farmacológicas para la evaluación del efecto analgésico de extractos

El uso de animales para el estudio de algunos comportamientos representa un problema, ya que es difícil interpretar lo que a menudo son evaluaciones subjetivas como el dolor; sin embargo, un gran número de análisis se ha llevado a cabo en estudios preclínicos para el desarrollo de nuevos fármacos. Los primeros estudios para la evaluación de dolor han incluido la inducción de estímulos nocivos, mediante calor o agentes químicos como formalina o ácido acético. Dichos estudios contabilizan ciertos movimientos o comportamientos del animal como son: los saltos y movimientos o lamidas de la parte anatómica donde se le aplicó el agente químico (Barrett, 2015).

Algunos de los fármacos más utilizados para su evaluación en modelos animales (changos, ratas, ratones y ardillas) son los antiinflamatorios no esteroideos, los anticonvulsivos, los antidepresivos y los opioides (Barrett, 2015; McIntery *et al.*, 2016).

Los modelos más utilizados para la evaluación del dolor son: aquellos que buscan evaluar el dolor neuropático, inflamatorio o dolor por quemaduras, los cuales se llevan a cabo en ratas o ratones (Abdullahi *et al.*, 2014).

Los modelos para la evaluación del dolor inflamatorio se basan en la aplicación de una sustancia inflamatoria en la pata trasera del animal. Las sustancias más utilizadas son: el adyuvante completo de Freund (CFA) que es una emulsión de agua en aceite, la cual contiene una suspensión inactivada y seca de *Mycobacterium butyricum*, que produce edema e inflamación que aparecen a las 2-6 h después de la aplicación, con una duración de 1-2 semanas, resultando en hiperalgesia térmica y mecánica. Otra sustancia inflamatoria ampliamente utilizada es la carragenina, la cual está constituida por una mezcla de polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas, los cuales inducen hiperalgesia térmica y

mecánica en un período más largo con una duración de varias horas a semanas (Abdullahi *et al.*, 2014).

Existen otras sustancias menos comunes como la capsaicina, formalina, aceite de mostaza, zimosano y veneno de abeja; sin embargo, sus efectos son a menudo de corta duración. La inyección de formalina en la pata, por ejemplo, es dosis-sensible y conduce a una respuesta hipoalésgica en la región inyectada (Abdullahi *et al.*, 2014).

Los modelos para la evaluación del dolor neuropático involucran una alteración en la función y/o anatomía del nervio. Dentro de estos modelos podemos mencionar los siguientes: la ligación de los nervios espinales, lo cual produce hipersensibilidad dentro de las 24 h después de la cirugía y alodinia e hiperalgesia persistentes al menos por 16 semanas. Otro modelo es el de neuritis inflamatoria ciática, el cual consiste en la colocación de un catéter que permita la aplicación directa de una sustancia inflamatoria en el nervio ciático, lo cual provoca alodinia por un período hasta de 24 h posteriores al procedimiento (Gazda *et al.*, 2001).

Los modelos para la evaluación de dolor por quemaduras incluyen la exposición a quemaduras por contacto con sondas de latón a una presión y temperatura constantes, placas de metal hueco a través de las cuales circula agua caliente en el dorso o la pata trasera del animal, provocando alodinia, edema e hiperalgesia hasta por 14 días (Summer *et al.*, 2007).

2.12.5 Toxicidad

Normalmente, los bioensayos utilizados para evaluar la toxicidad involucran organismos vivos que permiten realizar mediciones experimentales sobre toxicología, efectos no cancerígenos, genotoxicidad, carcinogenicidad, así como la reproducción y el desarrollo causados por agentes químicos en sistemas biológicos, ofreciendo resultados fiables, rápidos y a bajo costo (Musa, 2012; Ávalos-Soto *et al.*, 2014; Teke y Kuete, 2014).

Uno de los bioensayos más comunes, es el ensayo de letalidad para *Artemia salina*. El género *Artemia* está compuesto por varias especies, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, *Artemia franciscana* Kellogg y *Artemia partenogenética* Bowen y Sterling, distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, las cuales pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35 °C (Oriela y Lazo, 2010).

El ensayo de *Artemia salina* permite evaluar la toxicidad a corto plazo, mediante la determinación de la DL₅₀ (Dosis Letal Media) de un amplio rango de muestras química y farmacológicamente diversas, entre ellas los extractos crudos, las fracciones y los compuestos puros aislados de plantas; además, permite la comparación entre varias partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales (McLaughlin y Lingling, 1998 y Oriela y Lazo, 2010). Algunas de las ventajas de este ensayo radican en el hecho de que se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y emplea pequeñas cantidades de muestras (2-20 mg o menos) (Oriela y Lazo, 2010). Adicionalmente, este ensayo puede utilizarse en paralelo con bioensayos, donde se utilicen ratones para la predicción de la toxicidad oral aguda de extractos de plantas (Oriela y Lazo, 2010 y Ávalos-Soto *et al.*, 2014).

2.12.5.1 Toxicidad aguda

La toxicidad aguda se refiere a los efectos adversos que se manifiestan tras la ingestión o absorción cutánea de una sola dosis de una sustancia o múltiples dosis en un plazo de 24 horas, o una sola exposición por inhalación ininterrumpida en un corto período de tiempo (Teke y Kuete, 2014).

En la mayoría de los ensayos de toxicidad aguda, a cada animal de ensayo se le administra una sola dosis (relativamente alta) de la sustancia problema; posteriormente se observan a los sujetos de estudio durante 1 o 2 semanas en busca de efectos relacionados con el tratamiento. Algunas pruebas de toxicidad aguda están diseñadas para determinar la dosis letal media (DL₅₀) que se define

como la dosis que es letal para el 50 % de los animales en estudio (Amenya *et al.*, 2014; Teke y Kuete, 2014).

En 1983, Dietrich Lorke desarrolló una metodología para la determinación de la DL_{50} de diversos productos químicos agrícolas e industriales, utilizado para todas las vías de administración. Esta metodología buscaba utilizar el menor número de animales posible por dosis. Se basaba en la determinación de un rango de dosis que produjeran un efecto toxicológico (10, 100 y 1000 mg/kg) y sobre la base de estos resultados se administraban dosis específicas adicionales para la determinación de la DL_{50} , utilizando solamente 3 animales por dosis. Los resultados mostraban si una sustancia era muy tóxica, tóxica, menos tóxica, o sólo ligeramente tóxica. Se determinó que sustancias más tóxicas que 1 mg/kg era tan tóxicas que no era importante calcular la DL_{50} exactamente, al igual que DL_{50} mayores a 5,000 mg/kg no eran de interés práctico. En base a una gran serie de experimentos, Lorke desarrolló un esquema de dosificación de acuerdo a los resultados de la primeras dosis (10, 100 y 1000 mg/kg), dicho esquema se muestra a continuación en la **Tabla 4** el período de observación se extendía por 14 días, durante los cuales se monitoreaba el peso de los ratones. Dicho análisis se daba por terminado con la muerte de los ratones o cuando estos recuperaban el peso que presentaban antes de empezar el estudio, el cual se llevaba a cabo después de 5 días de adaptación. Al final, todos los ratones debían sacrificarse y examinarse para determinar anomalías en los órganos internos (Lorke, 1983). La clasificación de las sustancias de acuerdo a su DL_{50} (mg/kg) es la siguiente: extremadamente tóxico $DL_{50} = \leq 10$, tóxica $DL_{50} = 10-100$, moderadamente tóxica $DL_{50} = 100-1000$ y ligeramente tóxica $DL_{50} = \geq 1000$ (Lorke, 1983).

En el género *Heliopsis longipes* existen estudios sobre su efecto tóxico agudo, determinándose una $DL_{50} = 113$ mg/kg o 288 mg/kg en modelos animales (Cariño *et al.*, 2010 ; Déciga-Campos *et al.*, 2012).

Tabla 4. Esquema de administración para la metodología de Lorke

Dosis mg/kg primera fase			Dosis segunda fase			
10	100	1000		1600	2900	5000
0/3	0/3	0/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	1/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	2/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

3. JUSTIFICACIÓN

En México, existe una gran cantidad de plantas medicinales que se utilizan de manera tradicional para el tratamiento de muchos padecimientos, las cuales carecen de algún tipo de regulación sanitaria que garantice su eficacia y la seguridad de su uso con base en evidencias científicas.

Para regular el uso de este tipo de fitoterapias, se han creado varias normas y documentos, en donde se enfatiza la importancia de realizar pruebas de análisis con carácter físico, químico, farmacológico, microbiológico y toxicológico. Dichas pruebas son importantes para poder garantizar la seguridad en el empleo de especímenes vegetales sin que se ponga en riesgo la salud de las personas que consumen estos productos. El desarrollo de estas evaluaciones tiene como resultado la elaboración de un fitomedicamento, el cual garantiza que contiene la cantidad necesaria del o los principios activos a los cuales se les atribuye el efecto farmacológico esperado.

Dentro de las plantas con potencial para desarrollar un fitomedicamento, se puede mencionar a la especie *Heliopsis longipes*, ya que es ampliamente utilizada de manera tradicional como un agente analgésico, además de poseer otras actividades biológicas entre las que se puede mencionar su efecto antiparasitario y antibacteriano, debido a que contiene una alta concentración de un compuesto denominado afinina, uno de los constituyentes mayoritarios al que se le atribuyen muchas de las propiedades anteriormente señaladas.

El primer paso para el desarrollo de un fitomedicamento consiste en obtener un extracto cuantificado a partir de la especie vegetal de interés. Por lo anterior, en este proyecto se propone desarrollar y validar un método analítico que permita identificar y cuantificar el o los compuestos a los que se les atribuye el efecto analgésico, además de la realización de pruebas farmacológicas y toxicológicas que garanticen su eficacia y seguridad.

El desarrollo de este fitofármaco busca enfatizar el uso medicinal con bases científicas de especies mexicanas (entre ellas *Heliopsis longipes*) para la

generación de productos de calidad sin impactos ecológicos negativos (peligro de extinción) para dichas especies, debido a que en un futuro, dichos fitofármacos se realizarán a partir de especímenes vegetales cosechados bajo condiciones controladas. Así mismo, se busca el desarrollo de productos que tengan un menor costo al tratarse de un producto nacional, cuyo desarrollo implica la generación de empleos, contribuyendo con ello al crecimiento económico nacional.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La concentración del compuesto marcador presente en el extracto cuantificado, obtenido a partir de las raíces de *H. longipes*, está relacionado con su efecto analgésico?

5. HIPÓTESIS

El efecto analgésico del extracto cuantificado, obtenido a partir de las raíces de *H. longipes*, aumenta de manera proporcional con el incremento de la concentración del compuesto marcador.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Obtener un extracto cuantificado a partir de las raíces de *H. longipes* con efecto analgésico.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Identificar y cuantificar, de manera preliminar, a la afinina (marcador químico) en el extracto cuantificado, obtenido a partir de las raíces de *H. longipes*.

6.2.2 Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la cuantificación del marcador químico seleccionado en el extracto cuantificado de *H. longipes*.

6.2.3 Determinar el efecto analgésico del extracto cuantificado, obtenido a partir de *H. longipes*, mediante ensayos *in vivo*.

6.2.4 Determinar la toxicidad y la seguridad del extracto cuantificado, obtenido a partir de *H. longipes*, mediante ensayos *in vivo*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

7.1.1 Especímenes biológicos

7.1.1.1 Material vegetal

Las raíces de *H. longipes* se obtuvieron del municipio de Peñamiller, ubicado en el estado de Querétaro. El material vegetal se secó a temperatura ambiente por 3 días y se almacenó en bolsas cerradas en un lugar oscuro hasta su utilización.

7.1.1.2 Animales de experimentación

Se utilizaró ratones machos CD1 de 25 a 30 g de peso (6 meses) proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro. Los animales experimentales se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz y oscuridad, con libre acceso a alimento y agua (dieta isocalórica, alimento estándar y agua purificada), temperatura y humedad controladas (22 °C y 55 %) con control de ruido (> 85 dB), ventilación controlada (15-18 recambios de aire por hora). Finalmente, los sujetos de estudio se colocaron dentro de cajas de acrílico de 25 x 35 cm. La limpieza y cambio de cama sanitaria se realizó diariamente con materiales esterilizados. Los animales experimentales fueron sometidos a un período de adaptación en el bioterio general del área de Q.F.B de la Facultad de Química, antes de iniciar las pruebas farmacológicas. Los sujetos se mantuvieron en ayuno 12 h previas al inicio de las pruebas farmacológicas y se sacrificaron al terminar el período de experimentación en una cámara de CO₂. Se siguieron los lineamientos sobre el manejo adecuado de animales de experimentación señalados en las normas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-02.

7.1.2 Compuestos químicos y solventes

Los reactivos, solventes y compuestos farmacológicos necesarios para el desarrollo de los procedimientos experimentales se enlistan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Listado de reactivos químicos utilizados para el desarrollo y análisis químico, farmacológico y toxicológico del extracto cuantificado

Nombre del reactivo	Marca	No. de catálogo	Grado
Agua	J.T Baker	4220-20	Reactivo
Alcohol etílico	Fermont	06063	Reactivo
Alcohol etílico	Fermont	H6122	HPLC
Agua	Fermont	H5052	HPLC
Acetonitrilo	Fermont	H6002	HPLC
Formalina (Buffer)	HYCEL	7935	Reactivo
Ketorolaco	Pharma life®	-	Inyectable
Tramadol	Pharma life®	-	Inyectable
Solución salina al 0.9 %	Pisa®	Solución CS PiSA®	Inyectable
Levadura	SOLBIOSA	S071004	Reactivo
Agua de mar (artificial)	GOLDEN BELL	43036	Reactivo
Tween 80	Sigma	C5758	Reactivo
Tritón-100	Sigma	X-100	Reactivo
Ácido clorhídrico	J.T Baker	953502	Reactivo

7.2 Métodos

7.2.1 Material vegetal

7.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal

Una vez recolectado el material vegetal se colocó en bolsas herméticas para protegerlas del medio ambiente y contaminantes externos. Posteriormente, dicho material se colocó en un lugar limpio y seco para su deshidratación de manera natural.

7.2.1.2 Cuantificación de materia extraña

Se pesó una muestra de material (250 g), se esparció en una capa delgada y se separó en grupos la materia extraña, sea por inspección visual o tamizando con una malla 250 (No 230 USA). Se pesó la materia extraña y se calculó el porcentaje de ésta de acuerdo a la fórmula que se señala a continuación por cada 100 g de material vegetal. El límite permisible será del 2 % (Castañón *et al.*, 2001).

$$\text{Materia extraña (\%)} = \frac{\text{g de materia extraña}}{\text{peso de material vegetal (100 g)}} \times 100$$

7.2.1.3 Análisis de pérdida de peso por el método de secado

Determinación gravimétrica

Se colocaron 2 g de material vegetal en una cápsula de porcelana, previamente seca y a peso constante. Se secó la muestra en un horno a una temperatura de 100 a 105 °C hasta que dos pesadas consecutivas no difirieran por más de 5 mg. Se calculó la pérdida de peso de acuerdo a la siguiente fórmula (Castañón *et al.*, 2001).

$$\begin{aligned} & \text{Pérdida de peso (\%)} \\ & = \frac{\text{g de materia vegetal y cápsula} - \text{g de materia vegetal y cápsula seca}}{\text{g de materia vegetal y cápsula}} \times 100 \end{aligned}$$

7.2.1.4 Cuantificación de cenizas totales

Cenizas totales

Se colocaron 2 g de muestra vegetal, en un crisol previamente calcinado y a peso constante. Se calcinó aumentando gradualmente la temperatura de 500 °C a 600 °C hasta observar un residuo blanco. Dicho residuo se enfrió en un desecador y se pesó. Se calculó el contenido de cenizas totales con la fórmula que se describe a continuación (Castañón *et al.*, 2001).

$$\text{Cenizas totales (\%)} = \frac{\text{g de materia vegetal y crisol calcinado}}{\text{g de materia vegetal y crisol}} \times 100$$

Cenizas insolubles en ácido

Al crisol que contenía las cenizas totales, se adicionaron 25 mL de ácido clorhídrico (1 M), se cubrió con un vidrio de reloj y se hirvió ligeramente durante 5 min. Se enjuagó el vidrio de reloj con 5 mL de agua caliente y se adicionó este líquido al crisol. Se recogió el material insoluble en un papel filtro y se lavó con agua caliente hasta que el filtrado fuera neutro. Se transfirió el papel filtro al crisol original, se secó en una placa de calentamiento y se incineró hasta peso constante. Se dejó enfriar el residuo en un desecador durante 30 min y se pesó (Castañón *et al.*, 2001). Se calculó el contenido de cenizas insolubles en ácido con la siguiente fórmula:

$$\text{Materia extraña (\%)} = \frac{\text{g de cenizas y crisol calcinado}}{\text{g de cenizas totales y crisol}} \times 100$$

Cenizas solubles en agua

Al crisol que contenía las cenizas totales, se adicionaron 25 mL de agua y se mantuvo en ebullición por 5 minutos. Se enfrió la materia insoluble en un papel filtro. Se lavó con agua caliente y se incineró en un crisol durante 15 min a una temperatura que no excediera los 450 °C (Castañón *et al.*, 2001). Se calculó el contenido de cenizas solubles de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas solubles en agua (\%)} = \frac{\text{g de cenizas y crisol calcinado}}{\text{g de cenizas totales y crisol}} \times 100$$

7.2.2 Extracto cuantificado

7.2.2.1 Preparación del extracto etanólico

Se pesaron raíces secas del material vegetal y se pulverizaron en un molino de cuchillas con una criba de 0.5 mm. Después, se utilizó el mismo material vegetal para la extracción de los principios activos por maceración con etanol grado reactivo en una relación 1:10 (w/v) a temperatura ambiente; se sonicó 15 min en un baño ultrasónico a 25 °C. El líquido obtenido se concentró a vacío con un rotoevaporador (60 °C y a 60 mbar) hasta sequedad. Posteriormente, el extracto se almacenó a 4 °C, cubierto de la luz hasta su utilización (Cilia-López, 2010).

7.2.2.2 Preparación de las muestras de los extractos de *Heliopsis longipes* para su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para la preparación de las muestras y su posterior análisis por HPLC, el liofilizado del extracto etanólico de *H. longipes* se resuspendió en etanol grado HPLC con la cantidad necesaria de solvente para tener la concentración de 1 mg/mL. Se debió sonicar si era necesario. Todas las soluciones se filtraron en acrodiscos con tamaño de poro de 0.45 µm y diámetro de 25 mm de diámetro (Agilent Technologies) (Bae *et al.*, 2010; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.2.3 Preparación del estándar del marcador químico

En estudios anteriores se ha determinado a la afinina como un excelente marcador químico, ya que cumple con las características que una molécula debe tener para ello. Por esta razón, se eligió a la afinina como el compuesto marcador químico (Aguilar *et al.*, 2015).

Se realizó su identificación y cuantificación en el extracto etanólico de *H. longipes*, mediante la comparación de tiempos de retención (Tr) y área bajo la curva del pico arrojado en el análisis por HPLC de un estándar de afinina (Aguilar *et al.*, 2015).

Se realizó una curva de calibración de un estándar de afinina, para lo cual se pesó 1 mg del estándar de afinina, el cual se disolvió en metanol (1 mL) grado HPLC

para obtener una solución con una concentración inicial de 1 mg/mL. Posteriormente, se obtuvieron diluciones para obtener soluciones desde una concentración de 15 hasta 90 µg/mL. Todas las soluciones se filtraron en acrodiscos (Bae *et al.*, 2010). Las curvas de calibración se obtuvieron al graficar el área del pico correspondiente al pico del estándar con respecto a la concentración del mismo estándar. A partir de estas curvas de calibración, se realizó la cuantificación de la afinina en el extracto analizado (Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.2.4 Condiciones cromatográficas para el análisis del marcador químico

El análisis de la afinina se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca WATERS 600E, equipado con un detector Ultravioleta-Visible (UV-VIS) de arreglo de diodos (WATERS modelo 2998), con un rango de detección de 190 a 800 nm (Waters, 2003).

7.2.2.5 Estándarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico

Se utilizó el equipo HPLC antes mencionado, y se empleó una columna KROMASIL100-C18 con un tamaño de partícula de 3.0 µm (150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno) (Waters, 2017). Se utilizó el modo de inyección manual con un volumen de 30 µL. La elución se realizó con un gradiente isocrático de acetonitrilo (50 %, solvente A) y agua acidificada (10 % HCl) (50 %, solvente B), con flujo de 1 mL/min y un tiempo de corrida de 10 min, registrando la detección en una longitud de onda (λ) de 236 nm con una resolución de 1.2 nm. Es importante mencionar que las condiciones de operación del equipo se modificaron en función de las características de la muestra, a fin de obtener resultados óptimos (Bae *et al.*, 2010; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3 Validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico

La validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico se llevó a cabo con base en los criterios establecidos por la Guía

de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. De acuerdo a dicho documento, fue necesario determinar los parámetros estadísticos que se mencionan en los siguientes apartados (García *et al.*, 2012).

7.2.3.1 Validación del sistema de análisis

7.2.3.1.1 Linealidad

La evaluación de la linealidad del sistema se llevó a cabo mediante la construcción de una curva de calibración con 6 concentraciones diferentes del estándar, partiendo de una concentración de 1 mg/mL. Para lo anterior, se realizaron diluciones para preparar soluciones desde una concentración de 15 µg/mL hasta 90 µg/mL. Se graficó el área del pico correspondiente a los picos de un mismo estándar en 6 réplicas con respecto a la concentración del mismo estándar en cada dilución. Por medio de un análisis de regresión lineal simple, se determinó la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (b_1), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza ($IC \beta_1$). Para que estos criterios fueran aceptables, $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.99$, $b_1 \neq 0$, $b_0 = 0$ y el $IC \beta_1$ no debía incluir al cero. Las fórmulas se indican en el anexo B (Bae *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3.1.2 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente ser cuantificada, a su vez, el límite de cuantificación (LC) es la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud. Los límites de detección y de cuantificación del marcador químico se obtuvieron a partir de los datos generados con la curva de calibración construida para la determinación de la linealidad. Las fórmulas se muestran en el anexo B (Bae *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3.1.3 Precisión

La precisión del sistema se llevó a cabo mediante el análisis de 6 réplicas de una misma solución de afinina (40 µg/mL). Se obtuvieron las áreas de los picos, así como el promedio (\bar{y}), la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). Siendo requisito de validación un valor menor de 2 % para el CV (Bae *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3.1.4 Adecuabilidad

Este parámetro se utilizó para verificar el funcionamiento del sistema con base en criterios pre-establecidos. Se realizó la inyección por quintuplicado de una solución de 60 µg/mL obteniendo las respectivas respuestas analíticas mediante las cuales se calculó el CV, el cual no debía exceder un valor del 2 % (Castillo-Ortega, 2009).

7.2.3.2 Validación del método de análisis

7.2.3.2.1 Linealidad

Para esta evaluación fue necesaria la construcción de una curva de calibración del extracto analizado, con 3 concentraciones del estándar de afinina (15, 30 y 45 g/mL). Se evaluó cada concentración por triplicado. Los resultados de la cantidad adicionada *versus* cantidad recuperada fueron analizados mediante una regresión lineal para determinar los siguientes parámetros: la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (b_1), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$), el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ y el coeficiente de variación (CV_{XY}). Para que estos criterios sean aceptables, $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.99$, $b_1 \neq 0$, $b_0 = 0$, ($IC(\beta_1)$) no debe incluir el cero, ($IC(\beta_0)$) debe incluir el cero, $IC(\mu)$ en el intervalo de 98-102 % y CV_{XY} menor a 2 %. Las fórmulas que se utilizaron se presentan en el anexo B (Bae *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3.2.2 Exactitud

La exactitud se determinó analizando por triplicado placebos analíticos independientes con una concentración de 650 µg/mL de extracto enriquecidos con 30, 45 y 60 µg/mL de afinina . La diferencia entre el área bajo la curva correspondiente a la afinina adicionada versus el área de afinina recuperada se expresó en terminos de % de recobro, el cual debería encontrarse en el intervalo de 98 a 102 %. La fórmula se indica en el anexo B (Bae *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3.2.3 Repetibilidad y precisión intermedia

La determinación de la repetibilidad se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada para la linealidad del método, con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recobro. El valor del CV debía ser menor al 2 % y el del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro, calculada con una $t_{0.975, 5} = 2.571$, debía encontrarse entre 98 y 102 %.

La precisión intermedia se llevó a cabo mediante la evaluación de 1 muestra de afinina (60 µg/mL) realizando tres inyecciones de la misma, en dos días diferentes y por dos analistas distintos. Se determinó el CV, el cual debía ser menor al 2 % para que el método se considerara preciso (Bae *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2015).

7.2.3.3 Estabilidad de la muestra

La evaluación de la estabilidad de la muestra se llevó a cabo mediante el registro de los picos en el cromatograma del estándar (afinina) (1 mg/mL) antes y después de someterla a ciertas condiciones, las cuales se muestran en la **Tabla 6**. La concentración de afinina se cuantificó en los tiempos 0 h, 21 h y 48 h, así como, 8 y 15 días. De igual manera que en otros parámetros, la señal debía corresponder únicamente al analito de interés (García *et al.*, 2002).

Tabla 6. Condiciones de estabilidad del extracto cuantificado (García *et al*, 2002).

Factor de evaluación	VARIANTES	
Temperatura	26° C	4° C
Luz natural	Presencia	Ausencia

7.2.3.4 Cuantificación de la afinina

Para determinar la cantidad de afinina presente en las raíces de *Heliopsis longipes* se empleó el extracto que se obtuvo con la metodología descrita anteriormente. Se obtuvo la respuesta analítica, misma que se interpolo en la curva de calibración de la linealidad. A partir de la ecuación de regresión se calcularon los µg afinina/gramo de extracto, de acuerdo a la siguiente ecuación (Castillo-Ortega, 2009) :

$$\mu\text{g afinina/ g de extracto} = ((\text{Área} - b_0) / m) \times (\text{FD}) \times (\text{g de extracto})$$

7.2.4 Determinación del efecto analgésico del extracto cuantificado de las raíces de *Heliopsis longipes*, mediante el ensayo de formalina

La evaluación del efecto analgésico del extracto de *H. longipes* se llevó a cabo mediante el ensayo de formalina en un modelo animal en este caso ratones de la cepa CD1. Se dió a los animales el acceso libre al alimento estándar, agua embotellada, ambiente climatizado y habitación con un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas. Los sujetos se sometieron a un ayuno de doce horas antes de los experimentos con agua *ad libitum*. Se evaluaron 6 grupos de 4 ratones CD1 cada uno de entre 25-30 g: 3 dosis de extracto etanólico, un grupo control negativo o vehículo (Tween 80 al 8 % en solución salina) y dos grupos control positivo (Ketorolaco y Tramadol). Los sujetos de estudio se colocaron en un cilindro de cristal transparente con un diámetro de 20 cm por un período de 30 min de adaptación y reducción del estrés para poder observar su comportamiento de manera normal, al

cual se le adaptó una cámara de video para poder grabar el comportamiento de los ratones y poder realizar el análisis posterior del video, mediante el programa Solomon Coder Beta 17.03.22 (Santos *et al.*, 2015).

Posterior al período de adaptación, se administraron intraperitonealmente (*i.p.*) el vehículo y el extracto etanólico de acuerdo a las siguientes dosis: extracto (el cual fue suspendido en Tween 80 al 8 % en solución salina al 0.9 %) 10, 30 y 100 mg/kg en un volumen de 20 μ L. Al grupo control negativo se le administró por la misma vía (*i.p.*) un volumen similar de vehículo, mientras que a los grupos control positivo se les administró una dosis de 30 mg/kg de Ketorolaco y Tramadol vía *i.p.* (De la Rosa *et al.*, 2017).

Una vez transcurridos 20 min, a todos los grupos se les administró subcutáneamente 20 μ L de una solución al 2.5 % de formalina (formaldehído con una pureza de 37 % en solución salina) por vía orofacial (labio superior derecho lateral a la nariz) (Santos *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; De la Rosa *et al.*, 2017) con una aguja de calibre 27. Este volumen y concentración de formalina fue seleccionado porque mostró una respuesta bifásica relacionada con la nocicepción. Dicho procedimiento se muestra en la **Figura 8** (Falcão *et al.*, 2016).

Se contaron los segundos totales durante los cuales el animal se frotó el área inyectada con sus patas delanteras o traseras (número de acicalamientos), por un período de 40 min, con estos datos se elaboró una gráfica para cada uno de los tratamientos. Al final del experimento los animales se sacrificaron por decapitación.



a)

b)

c)

d)

Figura 8. Procedimiento para la determinación del efecto antinociceptivo del ECHL. **a)** 15 min de adaptación, **b)** Administración *i.p.* del extracto etanólico ,Ketorolaco y Tramadol, **c)** Administración de una solución al 2.5 % de formalina por vía orofacial , **d)** Observación de la conducta dolorosa por un período total de 5 min para la primera fase del estudio y por 15-40 min para la segunda fase

7.2.5 Evaluación de la letalidad y toxicidad aguda del extracto cuantificado de las raíces de *Heliopsis longipes*, mediante el ensayo de letalidad para *Artemia salina* y ensayo en ratones

7.2.5.1 Ensayo de letalidad para *Artemia salina*

- **Eclosión de los huevos.**

Para eclosionar los huevecillos de *A. salina*, se colocaron 37 g de sal de mar y 0.005 g de levadura de cerveza en 500 mL de agua destilada, se disolvió y se aforó a un litro. Se pesaron 0.5 g de huevecillos de *A. salina* y se depositaron en un vaso de precipitados junto con el total del agua de mar artificial. Se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Se iluminó uno de los lados del vaso con una lámpara de 20 watts de luz blanca y se cubrió el resto con papel aluminio. Se incubaron los huevecillos por 48 h para su posterior uso. Se usó como control positivo TRIX-100 (10 %) ($LC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$) La DL_{50} se calculó mediante el

tratamiento estadístico Probit del programa MATLAB R 2016^a (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Ávalos-Soto *et al.*, 2014).

- **Evaluación del extracto**

Se realizaron soluciones de los extractos a concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000 µg/mL en viales que contenían 5 mL de agua de mar artificial y 10 larvas; se realizaron tres réplicas por concentración. Después de 24 h, se contaron el número de larvas muertas. La muerte de las larvas se estableció por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo una lente de aumento. El valor de DL₅₀ se calculó usando el método de análisis estadístico Probit con el programa estadístico Matlab (Oriela y Lazo, 2010).

Los extractos vegetales se clasifican de acuerdo a su DL₅₀ de la siguiente manera: DL₅₀ por encima de 1000 µg / ml no son tóxicos, DL₅₀ de 500 a 1000 µg / ml son tóxicos bajos, los extractos con DL₅₀ de 100 -500 µg / ml son tóxicos para el medio, mientras que los extractos con DL₅₀ de 0 -100 µg / ml son altamente tóxicos (Clarkson *et al.*, 2004).

7.2.5.2 Toxicidad aguda en ratones

Los experimentos se realizaron en ratones machos CD1 (peso corporal de 25 a 30 g). Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Los sujetos de estudio se sometieron a un ayuno de doce horas antes de los experimentos.

El extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* seco se suspendió en Tween 80 al 8 % en solución para obtener las siguientes concentraciones: 10, 100, 600, 1000, 1200 y 1600 mg/kg de extracto seco/kg de peso. Las concentraciones se administraron por vía intra peritoneal en un volumen de 0.2 mL/10 g de peso corporal.

Los ratones se trataron en dos fases (grupos de 3 ratones por concentración), de acuerdo a lo propuesto por Lorke, 1983, Ngueguim *et al.*, 2015 y Zakari y Kubmarawa, 2016. Durante la primera fase (1-14 días), se administraron en una

sola dosis las concentraciones de: 10, 100 y 1000 mg/kg, durante la fase dos (1-14 días), se les administraron dosis de 600, 1200 y 1600 mg/kg.

En ambas fases los ratones se observaron durante las 11 primeras horas después de la administración de las dosis correspondientes, a las 24 horas y diariamente durante un período de 14 días cada fase, a fin de determinar la mortalidad y observar efectos tóxicos y/o cambios en el comportamiento (piloerección, aparición de heces, sensibilidad al sonido y al tacto, movilidad, acicalamiento de extremidades, salivación, el estiramiento de todo el cuerpo, debilidad, sueño, dificultad respiratoria y muerte). Al final del experimento los animales se sacrificaron por decapitación.

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de humedad, materia extraña y cenizas de las raíces de *Heliopsis longipes*

De acuerdo a lo establecido por la FHEUM es primordial llevar a cabo una caracterización fisicoquímica del material vegetal, a partir del cual se pretenda desarrollar un preparado vegetal para consumo humano, ya que estos parámetros garantizan la calidad de dicho preparado al dar información sobre la pureza, seguridad y composición fitoquímica del material vegetal utilizado para su preparación (Abey Siri, *et al.*, 2013). Dentro de las características que se deben determinar se encuentran la materia extraña, la humedad y las cenizas totales e insolubles en medio ácido y agua (FHEUM, 2001). En la **Tabla 7** se muestran los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos mencionados con anterioridad, para las raíces de *H. longipes*.

La cantidad de materia extraña debe ser menor al 2 % de la cantidad total del material vegetal analizado con el fin de garantizar la calidad del mismo. El análisis de la materia extraña arrojó un porcentaje de 0.79 % el cual está dentro del límite establecido por la FHEUM para clasificar el material vegetal libre de contaminantes extraños. Un alto contenido de humedad presente en el material vegetal (≥ 10 %) podría ser un factor para el crecimiento de microorganismos tales como hongos, por lo cual es recomendable llevar a sequedad el material vegetal para su almacenamiento (FHEUM, 2001). Las raíces de *H. longipes* presentaron un contenido de humedad correspondiente al 11.16 % de su peso seco, esto debido posiblemente a que el proceso de sequedad consistió en dejar reposar las raíces a temperatura ambiente sin hacer uso de otros métodos de secado (uso de horno o estufa, a temperaturas de 105°C, Abey Siri, *et al.*, 2013) como aquellos que utilizan altas temperaturas para lograr una mayor pérdida de agua. El contenido de cenizas del material vegetal representa el contenido de impurezas inorgánicas (carbonatos, fosfatos, silicatos, óxidos, sílice) que pueden tener un origen fisiológico (oxalatos y silicatos de calcio) representados por las cenizas insolubles en ácido y no fisiológico

(arena, suelo, adulterantes, etc.) que tiene gran importancia para determinar la pureza del material vegetal (Gami y Parabia, 2010).

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos de las raíces de *H. longipes*

Contenido de humedad (%)	Materia Extraña ≤ 2	Contenido de cenizas (%)		
		Cenizas totales	Cenizas insolubles en agua	Cenizas insolubles en ácido
11.16 \pm 0.28	0.79 \pm 0.09	8.45 \pm 0.07	7.53 \pm 0.2	6.75 \pm 0.14

8.2 Rendimiento del extracto etanólico

Existe una gran cantidad de metodologías para la extracción de extractos, así como diversos solventes con diferentes polaridades y características fisicoquímicas que tienen influencia en la naturaleza fisicoquímica de los extractos. Una de las variables que se ven modificadas por el tipo de metodología y solventes, es el rendimiento que se obtiene del extracto. En este trabajo se implementó una metodología de sonicación por 15 min del material vegetal en presencia del solvente (etanol), con el fin de incrementar el rendimiento del extracto. Dicha metodología tuvo como variable la frecuencia de la sonicación, ya que una porción de la materia vegetal se sonicó solamente una vez, mientras que otra porción se sonicó una vez diariamente por 7 días consecutivos. El rendimiento del extracto etanólico seco fue de 39 mg de extracto seco/g de material vegetal seco para la metodología donde el extracto se sonicó por varios días, mientras que para la metodología donde el extracto solamente se sonicó un día el rendimiento fue de 38 mg de extracto seco /g de material vegetal seco. El rendimiento total del extracto con ambas metodologías fue de 40.3 g de extracto seco /kg de material vegetal seco, estos resultados demuestran que la metodología por sonicación (15 min) representa una herramienta

útil para aumentar el rendimiento del extracto etanólico, ya que permite que las células vegetales se rompan más fácilmente y los compuestos puedan ser extraídos de manera mas eficiente. Si se comparan estos resultados con los rendimientos obtenidos mediante otras metodologías y solventes como son los utilizados por Déciga-Campos *et al.* (2010) quienes utilizaron maceración con acetona por 6 días y obtuvieron un rendimiento de 16.08 g/Kg, o bien, con los rendimientos obtenidos por Castro-Ruiz *et al.* (2017) quienes realizaron extractos con diclorometano y etanol mediante maceración por 7 días obteniendo rendimientos de 19 y 17 g/Kg respectivamente, es evidente que el rendimiento aumentó en más de un 200 %, lo cual representa que el proceso de extracción se ha optimizado con respecto a lo reportado en la literatura.

8.3 Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico

Antes de llavar a cabo el proceso de validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico fue necesario determinar las condiciones óptimas de separación de dicho compuesto. Los parámetros establecidos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Parámetros óptimos para el desarrollo de la validación

Variables cromatográficas	
Método	Isocrático
Flujo	1 mL/min
Composición fase móvil	50% Acetonitrilo- 50% Agua acidificada
Tiempo de retención	6.7 minutos

8.4. Identificación y cuantificación del compuesto marcador químico

La identificación de la afinina dentro del cromatograma del extracto seco de las raíces de *H. longipes*, se realizó mediante la comparación entre el cromatograma de un estándar de afinina y el cromatograma correspondiente al extracto seco. Los dos cromatogramas se muestran en la **Figura 9**.

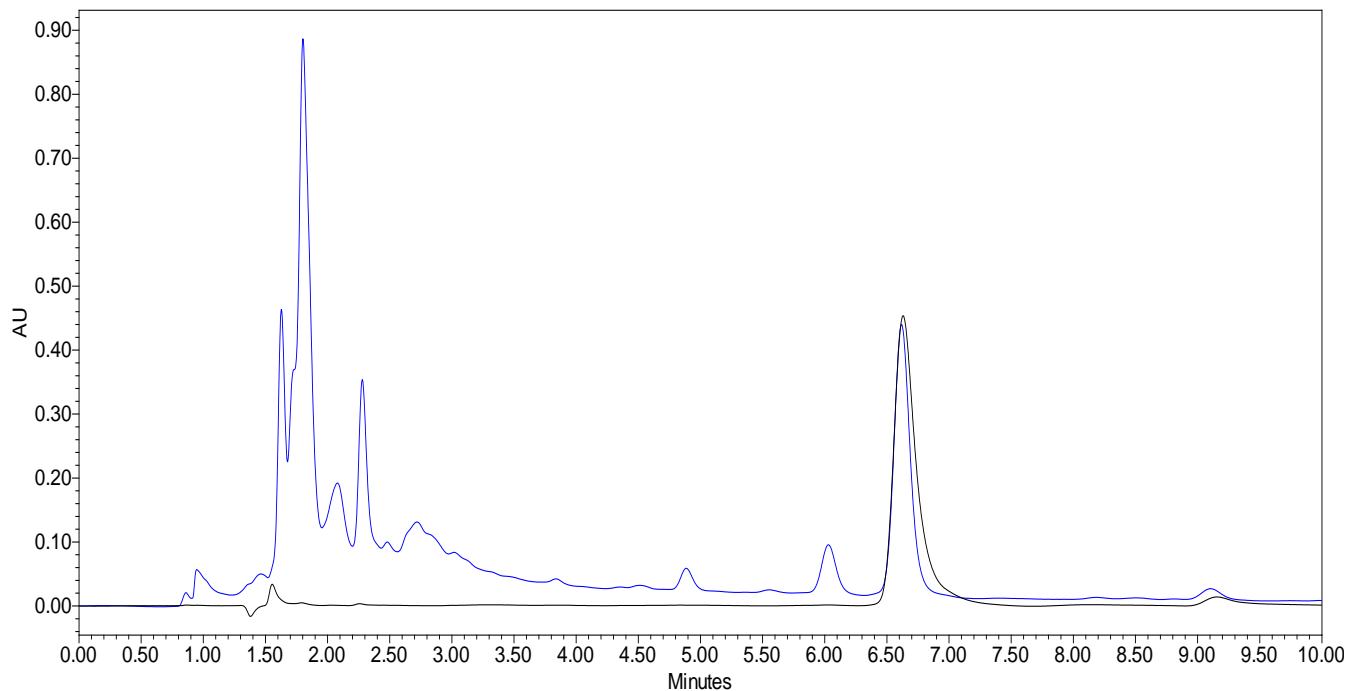


Figura 9. Cromatograma correspondiente al estándar de afinina 45 $\mu\text{g/mL}$ (línea negra) y al extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* 1mg/mL (línea azul)

8.5 Validación del método analítico para la cuantificación de afinina por HPLC

En la validación del sistema se evaluaron los siguientes parámetros estadísticos para el sistema de análisis: linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), precisión y adecuabilidad, mientras que para la validación evaluación del método de análisis se determinó la linealidad, la precisión intermedia, exactitud y repetibilidad, además se evaluó la estabilidad del extracto bajo ciertas condiciones. Todos los cromatogramas se muestran en el anexo C.

8.5.1 Validación del sistema

8.5.1.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad se analizaron 6 concentraciones del marcador químico. La curva de calibración para la linealidad del sistema se muestra en la **Figura 10**, así como los valores de las áreas con los cuales se construyó dicha curva se muestran en la **Tabla 9** (anexo C).

De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la guía de validación de métodos analíticos, el sistema muestra un comportamiento lineal, ya que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no incluye el cero, estos resultados se muestran en la **Tabla 10**.

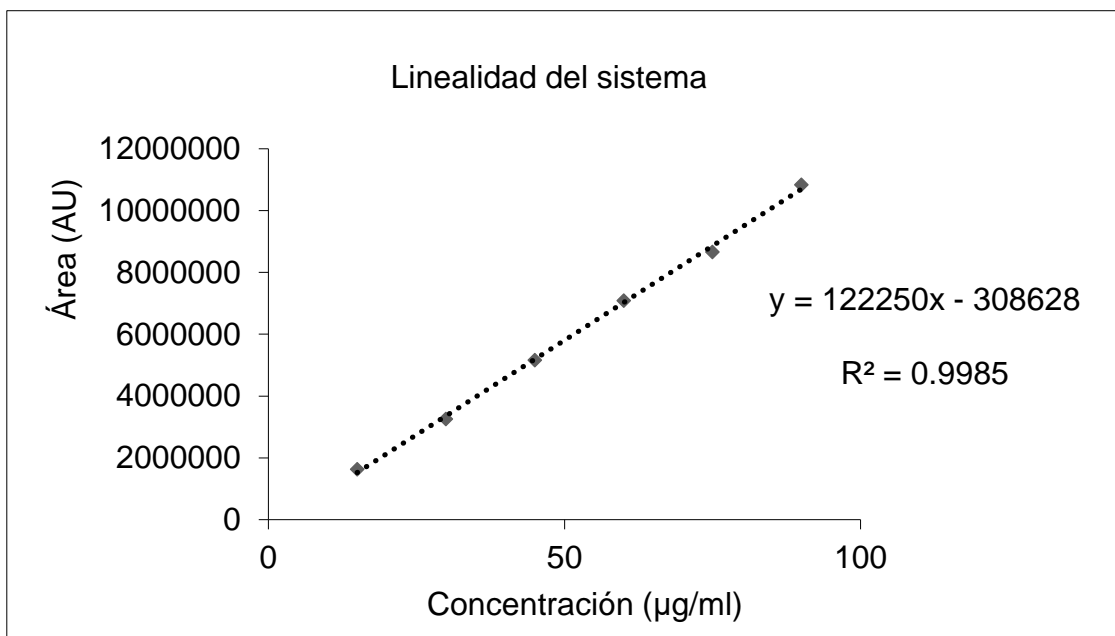


Figura 10. Curva de calibración para la linealidad del sistema. En cada concentración se analizó una $n = 6$

Tabla 10. Parámetros estadísticos evaluados para la linealidad del sistema

Parámetros	Valores
b₁	122 250
b₀	-308 628
r²	0.998
S_{y/x}	304548.065
S b₁	1981.389
(IC(β₁))	126276.184 - 8223.815

8.5.1.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Los LD y LC calculados a partir de la curva de calibración, con precisión y exactitud aceptables son: 8.22 µg/mL y 24.91 µg/mL respectivamente.

8.5.1.3 Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea de una referencia. Los valores propios para la determinación de la precisión del sistema se representan en la **Tabla 11**. Dichos valores son aceptables ya que mostraron un coeficiente de variación (CV) menor al 2 %.

Tabla 11. Valores obtenidos para la determinación de la precisión del sistema.

# Inyección	Área (AU)
1	9 182 082
2	9 201 631
3	9 091 125
4	9 107 193
5	9 326 159
6	9 281 684
Promedio	9 201 558.4
S	103 737.398
% CV	1.127

8.5.1.4 Adecuabilidad

Los datos para estos cálculos se presentan en la **Tabla 12**, los cuales se encontraron dentro de los límites establecidos en la FEUM, ya que su coeficiente de variación no excede el 2 %. Así mismo, en la **Tabla 13** se presentan los parámetros estadísticos complementarios de este análisis .

Tabla 12. Datos para la estimación del parámetro de adecuabilidad

# Inyección	Área (UA)
1	14 273 884
2	13 850 811
3	14 041 408
4	13 657 823
5	13 783 751
Promedio	13 833 448
S	160 065
% CV	1.157

Tabla 13. Parámetros de desempeño.

Parámetro	Valor obtenido	Límite
Tiempo de retención (min)	6.8	-
Tiempo muerto (min)	0.83	-
Factor de capacidad (k')	15.1412	≥ 2
Número de platos teóricos (N)	517.84	-

8.5.2 Validación del método

8.5.2.1 Linealidad y exactitud

Los datos obtenidos para determinar la linealidad y exactitud del método se muestran en la **Tabla 14**. Así mismo, en la **Figura 11** se presenta la curva de calibración para determinar la linealidad del método en donde los datos muestran un comportamiento lineal y donde se puede observar una buena correlación entre las áreas obtenidas con respecto a sus respectivas concentraciones.

Tabla 14. Áreas obtenidas para la linealidad del método

# Inyección	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área (AU)
1	30	6 865 165
2	30	6 977 976
3	30	6 734 651
4	45	9 674 476
5	45	9 642 121
6	45	9 443 398
7	60	13 690 186
8	60	13 319 120
9	60	13 187 681

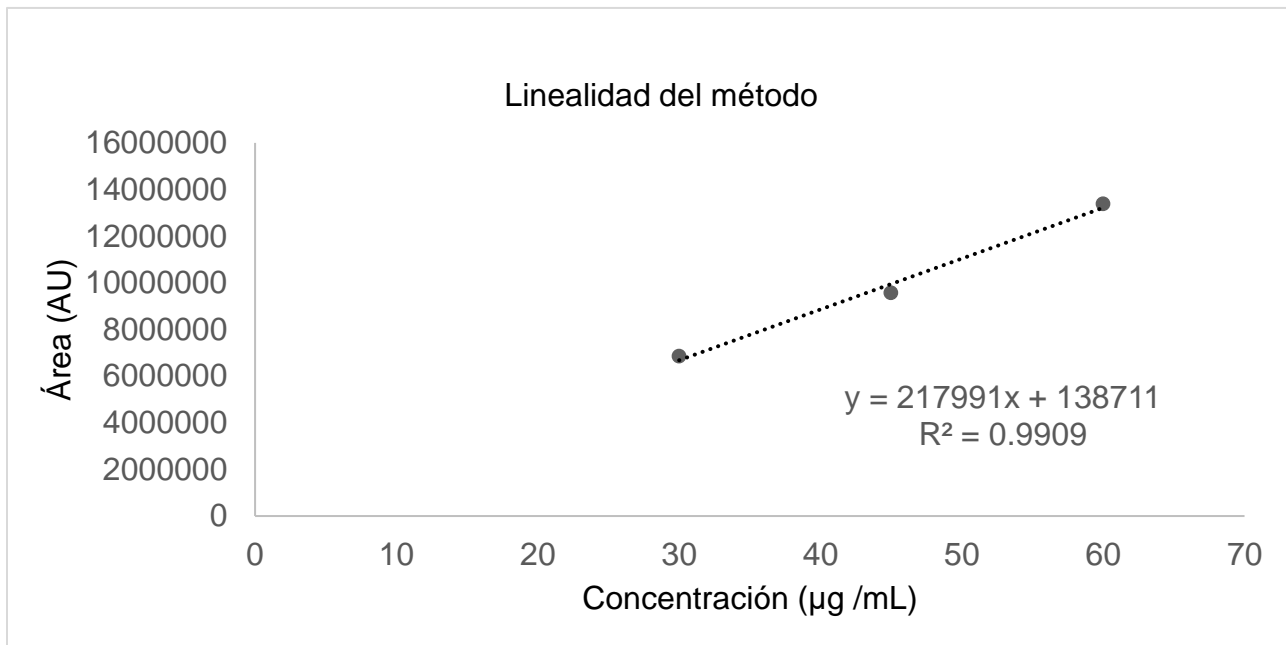


Figura 11. Curva de calibración para determinar la linealidad del método

Adicionalmente, se realizó el análisis estadístico para obtener los datos que se requieren para determinar la linealidad del método, los cumplen con los criterios de aceptación, en donde se observó que el coeficiente de determinación (r^2) resultó mayor a 0.98, el intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) no incluye el cero, el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC(β_0) y el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC(β_0) incluyen el cero, el coeficiente de variación CV_{XY} no es mayor a 2 % y el intervalo de confianza para la medida poblacional IC(μ) se encuentra en el intervalo de 98-102% (**Tabla 15**). El intervalo de confianza para la pendiente y para la media poblacional se calcularon a partir del valor de la t de student, determinada con base en tabla estadística de distribución t .

$$t_{0.975, n-2} (\text{IC} (\beta_1)) = 2.36$$

$$t_{0.975, n-1} (\text{IC}(\mu)) = 2.306$$

Tabla 15. Parámetros estadísticos evaluados para determinar la linealidad del método

Parámetros	Valores
β_1	138711
β_0	217991
r^2	0.9909
IC (β_1)	0.9913-1.0086
IC(β_0)	-0.9739 -0.9735
IC(μ)	99.3656- 100.5942
% CV _{x/y}	0.31533

Los valores para la evaluación de la exactitud del método (porcentaje de recobro), se encuentran dentro del rango de 98-102 % los datos se muestran en la **Tabla 16**, siendo esto un indicativo de la exactitud del método propuesto la gráfica correspondiente se muestra en la **Figura 12**.

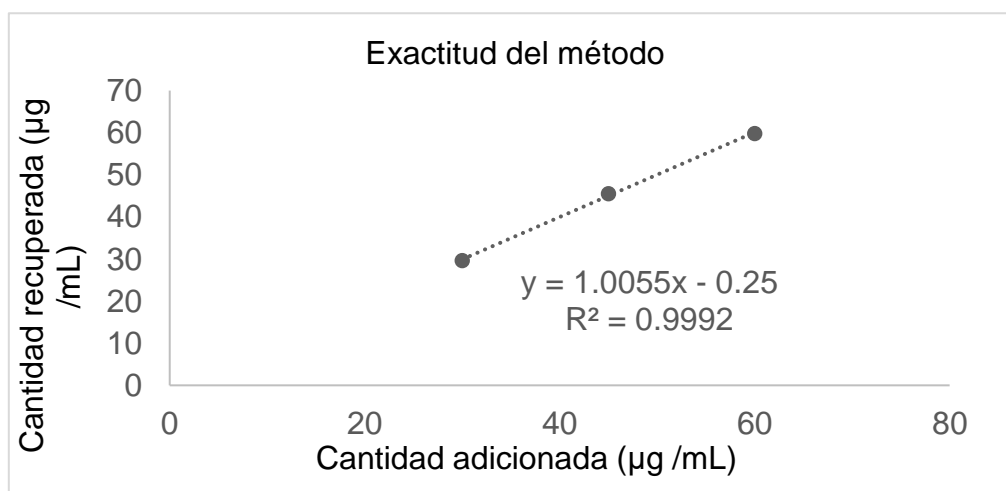


Figura 12. Exactitud del método

Tabla 16. Porcentajes de recobro calculado a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas, para la exactitud del método.

Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada (µg/ml)	Área (AU)	Área extracto + analito	Porcentaje de Recobro (98-102 %)
1	30	7 064 512	10 584 322	98.89
2	30		10 603 192	99.16
3	30		10761 594	101.4
4	45	9 612 080	13 021 750	98.04
5	45		13 279 337	100.72
6	45		13 394 768	101.92
7	60	12 685 961	16 089 640	98.46
8	60		16 372 496	100.69
9	60		16 501 122	101.71
Extracto	650	3 597 775		

8.5.2.2 Precisión

La precisión del método incluyó la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia.

8.5.2.2.1 Repetibilidad

La determinación de la repetibilidad se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada para la linealidad del método, con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recobro, los datos se muestran en la **Tabla 17**. El valor del CV resultó

menor al 2 % y el del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro, calculada con una $t_{0.975, 5} = 2.571$, se encontró entre 98 y 102 %; estos resultados que se resumen en la **Tabla 18** y con los cuales se demuestra que el método es repetible.

Tabla 17. Porcentajes de recobro calculados a partir de las cantidades de afinina y recuperadas, para la repetibilidad del método.

Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada (µg/ml)	Área (AU)	Área extracto + analito	Porcentaje de Recobro (98-102 %)
1	75	16501 901	20 423 714	101.96
2	75		19 761 246	98
3	75		19 967801	99.2
4	75		20 180 018	100.48
5	75		20 139 573	100.24
6	75		20 352 898	101.53
Extracto	650	3 597 775		

Tabla 18. Parámetros estadísticos evaluados para la repetibilidad del método

Parámetros	Valores
Promedio	101.097
S	0.598
% CV	0.592
IC(μ)	100.476 - 100.918

8.5.2.2.2 Precisión intermedia

La precisión se realizó analizando la misma muestra de referencia en dos días y por dos analistas diferentes, usando los mismos instrumentos y equipos. Los resultados se muestran en la **Tabla 19**, los cuales demuestran que el método es preciso, obteniendo así un CV menor al 2 % **Tabla 20**.

Tabla 19. Áreas obtenidas para la evaluación de la precisión intermedia

Analista	1	2
Área (AU)	10 764 527	10 521 781
Día 1	10 611 833	10 536 115
	10 404 002	10 498 076
Día 2	10 627 855	10 571 144
	10 690 031	10 761 164
	10 552 290	10 204 188

Tabla 20. Parámetros estadísticos calculados para la evaluación de la precisión intermedia.

Parámetros	Valores
Promedio	10 561 917.2
S	154 754.973
% CV	1.465

8.5.3 Estabilidad analítica de la muestra

El proceso de estabilidad analítica de la muestra se llevó determinando la concentración de afinina en muestras independientes a partir de una muestra del extracto, los datos de las áreas obtenidas se muestran en la **Tabla 21**.

El análisis se realizó por triplicado para cada una de las siguientes condiciones: temperatura ambiente (26 °C) con luz y sin luz y 4 °C con luz y sin luz.

Los resultados se reportaron en los siguientes intervalos de tiempo de 0, 21, 48 h; así como 8 y 15 días. Se calculó la media aritmética del análisis inicial, de cada condición de almacenaje y la diferencia absoluta de la muestra aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d|$), la cual debía ser menor a un 2 %.

Se realizó el análisis estadístico para evaluar la estabilidad de la afinina. Como se especifica en los criterios de aceptación, la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición no debía exceder el 2 % . Se observó que a los 8 días esta diferencia excede el 2 % lo cual indica que la muestra no es estable en este tiempo, dichos datos se muestran en la **Tabla 22**. Estos resultados son similares a los obtenidos por Castillo, 2009 y Aguilar, *et al.*, 2015 los cuales indicaron que el extracto pierde su estabilidad a los 8 días en todas las condiciones probadas. El análisis estadístico por ANOVA de dos vías ya que se realizó la comparación entre

dos variables, el tiempo y las diferentes condiciones de almacenamiento, con una prueba *post hoc* de Tukey con una $p= 0.05$ utilizando el programa Graph Pad Prism para establecer la diferencia entre la concentración de afinina en el extracto, demuestra que no existe diferencia significativa entre la concentración de afinina a lo largo de los 15 días de monitoreo y bajo las diferentes condiciones a las que se sometió el extracto. En un análisis estadístico secundario utilizando el análisis estadístico por ANOVA de una vía (solamente se compararon las diferentes variables de almacenamiento), con una prueba *post hoc* de Tukey con una $p= 0.05$ utilizando el programa Graph Pad Prism se muestra que existe una diferencia significativa entre el extracto almacenado a temperatura ambiente en presencia de luz (TA luz) en comparación con el extracto almacenado a 4 °C en obscuridad (**); así como entre el extracto almacenado a 4 °C en obscuridad y el extracto almacenado a esta misma temperatura y en presencia de luz (*). Los resultados se muestran en la **Figura 13** y la **Tabla 23**. Estos resultados indican que la mejor condición de almacenamiento para el extracto cuantificado consiste en mantenerlo en un recipiente aislado de la luz y a baja temperatura (4°C), ya que dicha condición es en la cual se mantiene una mayor cantidad de afinina. Sin embargo, como se observó en los diferentes análisis la diferencia en la concentración de afinina no es significativa, de tal manera que el extracto es estable a diferentes condiciones de almacenamiento en un tiempo de 15 días.

Tabla 21. Estabilidad del analito, áreas obtenidas (AU) en las diferentes condiciones y tiempo

Condiciones	0 hrs	21 hrs	48 hrs	8 días	15 días
T. am luz	4496711	4201554	4220407	4196844	4198022
	4128508	4233017	4208534	4227256	4263358
	4017976	4208620	4214249	4219089	4181807
Promedio	4214398.33	4214397.00	4214396.67	4214396.33	4214395.67
T. am sin luz	4196159	4215602	4213679	4232045	4220937
	4351996	4205021	4291377	4267117	4280197
	4192258	4319788	4235354	4241244	4239269
Promedio	4246804.33	4246803.67	4246803.33	4246802	4246801
T. 4 °C luz	4200775	4224684	4237950	4258493	4210769
	4099933	4296942	4243677	4187808	4265583
	4399553	4178633	4218631	4253955	4223902
Promedio	4233420.33	4233419.67	4233419.33	4233418.67	4233418
T. 4 °C sin luz	4177743	4330710	4330949	4303593	4296707
	4399932	4305228	4306620	4329814	4303356
	4312431	4254165	4252533	4256692	4290035
Promedio	4296702	4296701	4296700.67	4296699.67	4296699.33

T. am luz= Temperatura ambiente con luz, T. am sin luz= Temperatura ambiente sin luz, T. 4 °C= Temperatura de 4 °C con luz, T. 4 °C sin luz = Temperatura de 4 °C sin luz

Tabla 22. Diferencia absoluta de la estabilidad

Diferencia absoluta ≤ 2			
21 hrs	48 hrs	8 días	15 días
1.330	1.660	2.000	2.660
0.663	1.003	2.333	3.333
1.003	1.278	2.102	2.174
1	1.33	2.33	2.67

Tabla 23. Concentración de afinina en diferentes condiciones y tiempo

Condiciones	0 hrs	21 hrs	48 hrs	8 días	15 días
T. am luz	39.30748	36.89310	37.04732	36.85458	36.86421
	36.29559	37.15047	36.95020	37.10335	37.39866
	35.39144	36.95090	36.99695	37.03654	36.73157
Promedio	36.99817	36.99816	36.99816	36.99815	36.99815
T. am obs.	36.84897	37.00802	36.99229	37.14252	37.05166
	38.12371	36.92146	37.62785	37.42941	37.53640
	36.81706	37.86025	37.16959	37.21777	37.20161
Promedio	37.26325	37.26324	37.26324	37.26323	37.26322
4 °C Luz	36.88673	37.08231	37.19082	37.35886	36.96848
	36.06185	37.67337	37.23767	36.78066	37.41686
	38.51273	36.70561	37.03279	37.32174	37.07591
Promedio	37.15377	37.15376	37.15376	37.15376	37.15375
4 °C obs.	36.69833	37.94960	37.95155	37.72778	37.67145
	38.51583	37.74115	37.75254	37.94227	37.72584
	37.80007	37.32346	37.31011	37.34413	37.61688
Promedio	37.67141	37.67140	37.67140	37.67139	37.67139

T. am luz= Temperatura ambiente con luz, T. am sin luz= Temperatura ambiente sin luz, T. 4 °C= Temperatura de 4 °C con luz, T. 4 °C sin luz = Temperatura de 4 °C sin luz

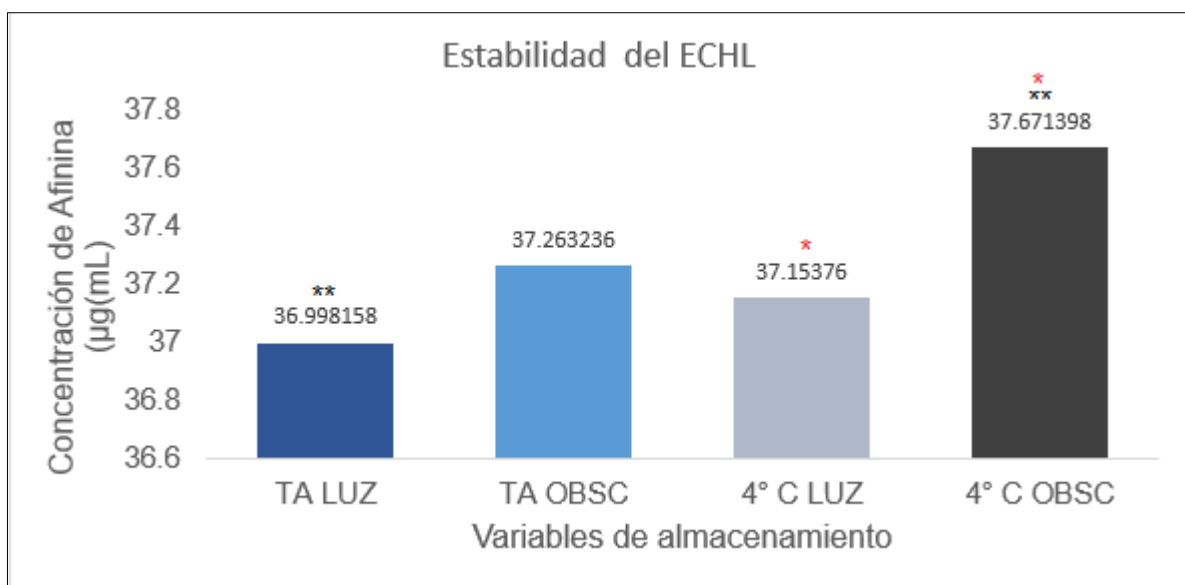


Figura 13. Estabilidad del ECHL

8.5.4 Cuantificación de afinina en las raíces de *Heliopsis longipes*

Para llevar a cabo la cuantificación de afinina, se utilizó una ecuación generada con la curva de calibración para la evaluación de la linealidad del método, la cantidad de afinina se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g afinina/ g de extracto} = ((\text{Área} - b_0) / m) \times (\text{FD}) \times (\text{g de extracto}).$$

$$b_0 = 308628$$

$$m = 122250$$

$$\text{FD} = 1 \text{ ml}$$

Cantidad de extracto: 1 gramo

En la **Tabla 24** se resume la cantidad de afinina contenida en el extracto. La concentración de afinina fue de 36.99 $\mu\text{g/}$ gramo de extracto.

Tabla 24. Concentración de afinina en el extracto etanólico seco

# Inyección	Área (AU)	μg afinina / gramo de extracto
1	4496711	36.99 μg afinina / gramo de extracto
2	4128508	
3	4017976	
Promedio	42.14398.33	

8.6 Determinación del efecto analgésico del extracto cuantificado de las raíces de *Heliopsis longipes*

Para la evaluación del efecto analgésico del extracto cuantificado se compararon 3 dosis del extracto etanólico (10, 30 y 100 mg/kg) de *H. longipes* versus analgésicos de uso común como el Ketorolaco perteneciente a la familia de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y el Tramadol perteneciente a la familia de los opiáceos. Los experimentos llevados a cabo consistieron en cuantificar el tiempo que los animales en experimentación presentaban el comportamiento de dolor inducido con formalina en la zona orofacial con los diferentes tratamientos, estos

datos se muestran en la **Figura 14**, en donde se observan claramente las dos fases de dolor (neurogénica e inflamatoria) provocadas por la formalina. La primera es una fase neurogénica, relacionada con la liberación de un mediador de la sensación dolorosa, la sustancia P, así como el neurotransmisor glutamato y la activación de los canales TRPA1 (activado por estímulos térmicos por debajo de los 18 °C) y TRPV1 (activado por estímulos térmicos mayores a los 42° C y capsaicina) expresados en los nociceptores, después de esta fase se presenta un pequeño período de quietud, seguido por la segunda fase relacionada con la liberación de mediadores inflamatorios como bradicidina y prostaglandinas (Nomura, *et al.*, 2013).

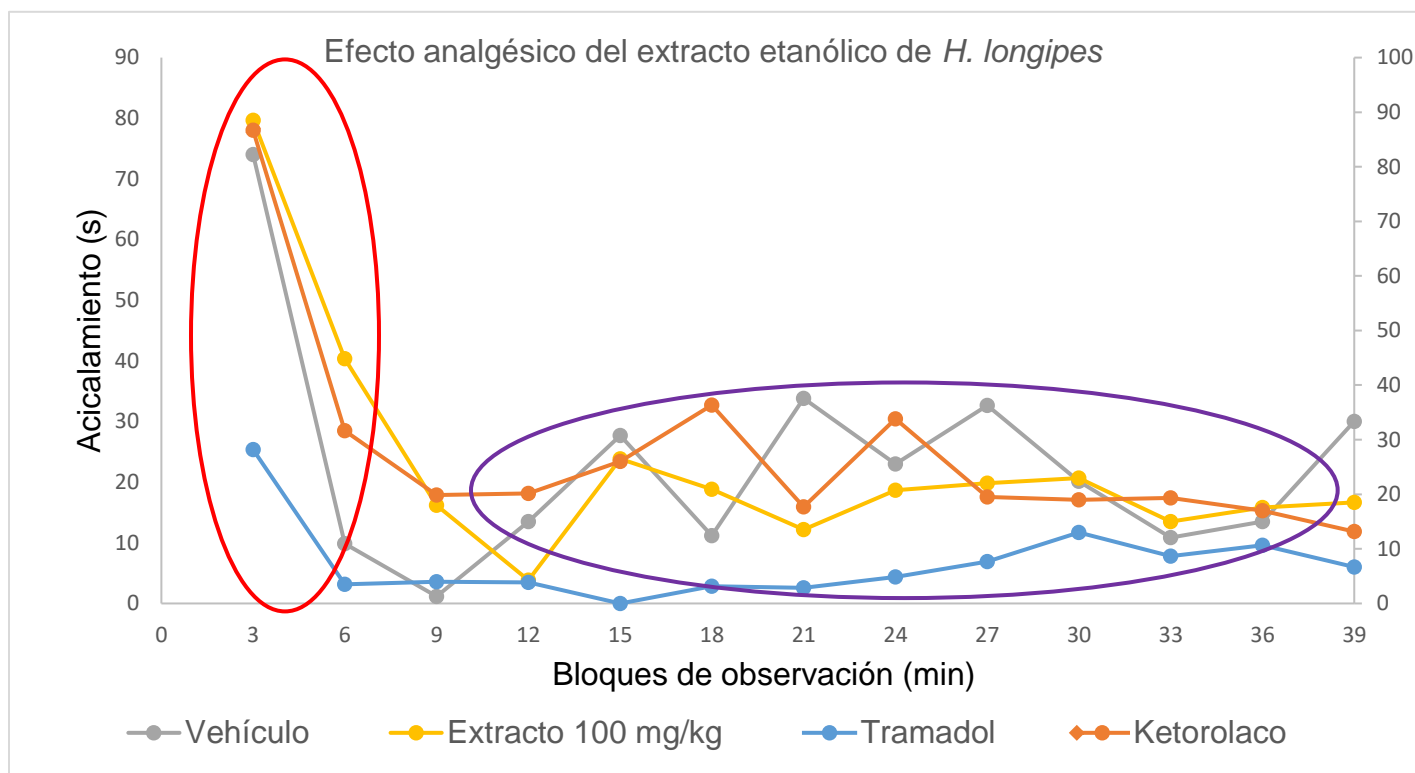


Figura 14. Efecto analgésico del ECHL y comportamiento bifásico de la formalina (círculo rojo, fase neurogénica, círculo morado, fase inflamatoria)

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante una prueba ANOVA de una vía, posteriormente los datos se sometieron a una prueba *post hoc* de Tukey con una $p = 0.05$ utilizando el programa Graph Pad Prism. Dicho análisis

demonstró que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) (***) entre el el número de acicalamientos de los animales a los cuales se les administró el vehículo y las diferentes concentraciones de extracto cuantificado de *H. longipes*, el Tramadol y el Ketorolaco (***) como se muestra en la **Figura 15**. Esto significa que el vehículo no redujo la sensación de dolor inducido por la Formalina, tal como se esperaba, en tanto que los analgésicos evaluados y las diferentes concentraciones del extracto administrados a los sujetos experimentales si redujeron esta sensación. Al realizar la comparación de los tratamientos entre sí, se observa que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el número de acicalamientos entre los animales a los cuales se les suministró el Ketorolaco y el extracto cuantificado a las dosis administradas de 10, 30 y 100 mg/kg, observándose que el extracto a las tres diferentes dosis redujeron significativamente la sensación de dolor en comparación con el Ketorolaco. Con respecto al Tramadol, dicho fármaco fue el que presentó mayor efecto analgésico del dolor orofacial inducido por la formalina en los sujetos de estudio. Se observó que el extracto cuantificado no redujo significativamente ($p < 0.05$) el número de acicalamientos en las tres dosis evaluadas en comparación con el Tramadol. De la misma manera, no se detectaron diferencias significativas en el efecto analgésico del extracto cuantificado en las tres dosis administradas a los animales experimentales ($p < 0.05$).

Con base en el análisis estadístico podemos argumentar que el efecto analgésico del extracto no se modificó al incrementarse la dosis administrada, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de extracto. Como ya se mencionó anteriormente, el efecto analgésico del Ketorolaco resultó significativamente menor al observado para las diferentes concentraciones del extracto cuantificado de *H. longipes*; en tanto que el efecto analgésico del Tramadol fue mayor ($p < 0.05$) en comparación con el que se observó para el extracto cuantificado en las diferentes concentraciones evaluadas. Estos resultados son similares a lo reportado por Cilia-López, *et al.* (2010) quienes mencionan que la administración de un extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* a una dosis de 10 mg/kg mostró un efecto analgésico en ratones similar al Ketorolaco administrado en una dosis de 6 mg/kg al reducir significativamente ($p < 0.001$) los espasmos

inducidos por la administración intraperitoneal de ácido acético al 3 %. Sin embargo, es importante mencionar que el efecto analgésico del extracto cuantificado a una dosis de 10 mg/kg fue mayor que el efecto analgésico del Ketocorolaco administrado en una dosis de 30 mg/kg. En este sentido, es muy probable que la vía de administración puede influir en la concentración que el extracto alcanza en el torrente sanguíneo y este factor a su vez, modificar la potencia que tendrá dicha sustancia (García, 2010).

El estudio del mecanismo de acción involucrado en el efecto analgésico del extracto etanólico de *H. longipes* y de la afinina se ha abordado con diferentes enfoques. Uno de ellos es el propuesto por Déciga-Campos, *et al.* (2010) quienes mencionan que los receptores opioides involucrados en la modulación del dolor pudieran estar siendo activados por la afinina. Estos autores observaron que la afinina y el extracto etanólico administrados a ratones vía intraperitoneal en dosis de 1 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente, tienen un efecto analgésico al retardar la respuesta al dolor de los animales experimentales (acicalamiento de las extremidades) después de ser sometidos a un estímulo térmico. En este sentido se ha señalado que el efecto analgésico de una sustancia durante el ensayo del plato caliente, donde se induce un estímulo térmico al sujeto de estudio, es atribuido a la inhibición de receptores al dolor localizados directamente en el sistema nervioso central, específicamente en la médula espinal, núcleo parabraquial, núcleo hipotalámico y columna vertebral reduciendo la liberación de neuropéptidos provocada durante la nocicepción bifásica creada por la formalina (Ojewole, 2006; Cilia-López, *et al.*, 2010; Déciga-Campos, *et al.*, 2010), la cual, también podría actuar directamente sobre los canales TRPA1 y TRPV1 expresados en los nociceptores (Luccarini, *et al.*, 2006; McNamara, *et al.*, 2007). Así mismo, Rios *et al.* (2007) señalan que la afinina puede inducir la liberación de ácido γ -aminoburírico (GABA) en cortes de cerebro de ratón.

Por otra parte, se ha evidenciado que la afinina inhibe la producción de las proteínas de expresión de NO e iNOS, así como la producción de citoquinas inflamatorias (isoleucinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α), prostaglandinas y la ciclooxigenasa 2 (COX 2) (Lalone, *et al.*, 2007; Wu, *et al.*, 2008), lo cual le confiere su efecto antiinflamatorio

y analgésico. En otros estudios se ha demostrado la interacción que existe entre otro tipo de alcanida como la capsaicina, cuya estructura es muy similar a la afinina, con los receptores vaniloides de potencial transitorio del tipo 1 (TRPV1), los cuales están presentes mayoritariamente en el ganglio dorsal del nervio trigémino que se localiza en el área orofacial, y tiene dentro de sus funciones la regularización de la sensación dolorosa (De la Rosa, *et al.*, 2017), lo que sugiere que la afinina puede estar actuando sobre estos receptores.

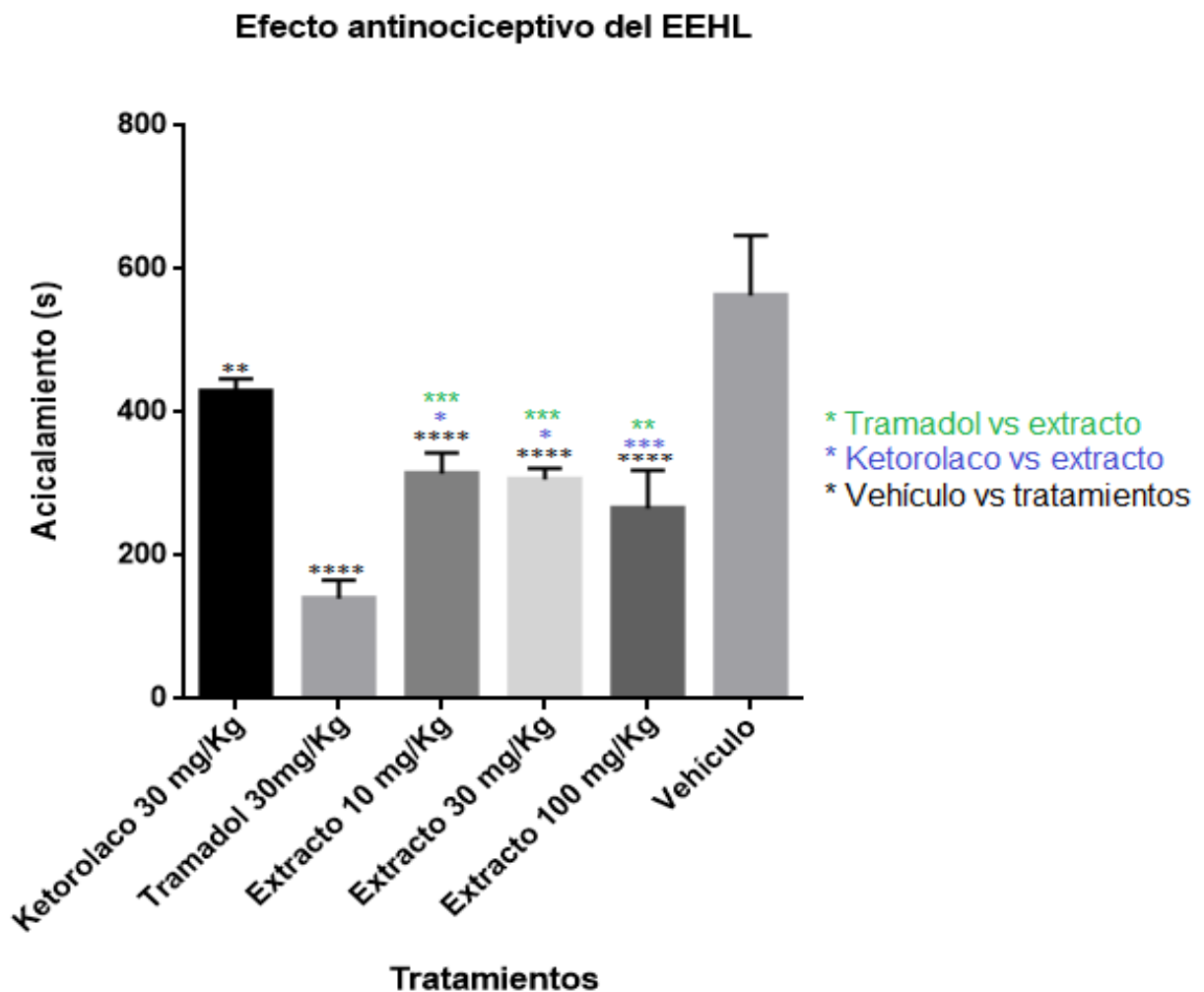


Figura 15. Efecto analgésico del extracto cuantificado de *H. longipes*

8.7 Evaluación de la toxicidad aguda y letalidad del extracto cuantificado de las raíces de *Heliopsis longipes* mediante el ensayo de letalidad para *Artemia salina* y ensayo en ratones

8.7.1 Ensayo de letalidad para *Artemia salina*

El bioensayo de *Artemia salina*, es una de las bioherramientas más versátiles y sensibles para determinar la toxicidad de una gran cantidad de sustancias, entre ellas las de origen vegetal (Pino y Lazo, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos con el ensayo se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀) del extracto cuantificado que resultó de 100 µg/ml **Figura 16**. La dosis reportada en este mismo ensayo, realizado por Gutiérrez *et al.* (1996) fue de 58.65 µg/ml, la cual resulta casi un 50 % por debajo de la reportada en este trabajo, esto podría deberse a las variaciones que existen entre las metodologías de la preparación del extracto, ya que los autores anteriormente señalados utilizaron otros solventes (metanol, cloroformo) y los días de maceración no son claros ya que los autores no muestran una metodología completa, por lo cual, esto podría estar modificando el efecto tóxico del extracto. De acuerdo a Clarkson *et al.*, 2004, la DL₅₀ de este extracto lo coloca en la categoría de tóxico, para productos vegetales; sin embargo, estos datos no son similares a los obtenidos en otro tipo de modelo *in vivo* (roedores), posiblemente a la gran diferencia que existe anatómicamente entre los especímenes y las vías de administración, ya que mientras en el modelo de *A. salina* la sustancia se disuelve en el medio, suponiendo que la vía de administración sería oral, en modelos con roedores la vía de administración podría ser intraperitoneal (*i.p.*), modificando la absorción (consiste en la trayectoria que sigue un fármaco desde su lugar de administración hasta circulación sistémica) y concentración plasmática del extracto. Los cambios en la absorción de un fármaco están estrechamente relacionados con la intensidad y duración del efecto, en este caso se podría inferir que estos factores están afectando el efecto tóxico del extracto (Goodman y Gilman, 2007).

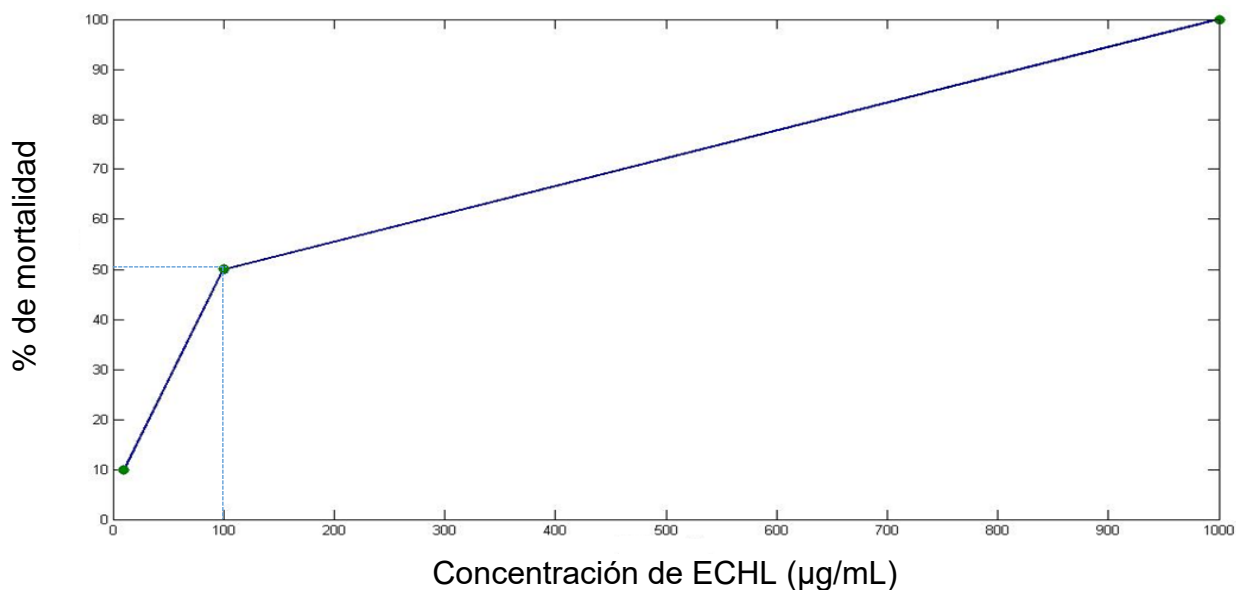


Figura 16. Toxicidad del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* en *Artemia salina*

8.7.2 Toxicidad aguda en ratones

Como parte de los estudios de preliminares para la toxicidad se utilizó el modelo *in vivo* con roedores según lo estipulado por Lorke, 1983, esta metodología involucró dos fases de experimentación. Durante la primer fase (10, 100, 600 y 1000 mg/kg) con las dosis más bajas no se observaron alteraciones en el comportamiento, solamente piloerección con duración de algunos minutos para volver a un estadio normal, mientras que la dosis más alta provocó desorientación, dificultad motriz, piloerección y convulsiones que llevaron a la muerte en un período de 10 minutos posteriores a la administración. En la segunda fase (1200 y 1600 mg/kg) se presentaron severas alteraciones en el comportamiento de los ratones, dificultades para moverse de manera normal, temblores, piloerección y finalmente convulsiones que condujeron a la muerte en períodos de 5 minutos después de la administración, evidenciando la acción del extracto sobre el sistema nervioso central, al generar la actividad desordenada e incontrolada de las neuronas (Goodman y Gilman, 2007; Guyton, 2001). Con los datos de las muertes obtenidas **Tabla 24**, con las diferentes dosis, se obtuvo una DL₅₀ de 1238.2 mg/kg (**Figura 17**) de peso corporal por vía *i.p.*. Esta DL₅₀ es mayor a las obtenidas en el grupo de estudio de Cariño-Cortés *et al.*

(2010) con una $DL_{50} = 288$ mg/kg por vía oral y en el grupo de Déciga-Campos *et al.*, (2007) con una $DL_{50} = 62.14$ mg/kg vía *i.p.*, esto podría deberse a las diferentes metodologías en la preparación del extracto (tipos de solventes, metodologías de extracción y tiempos de maceración) lo cual conlleva diferencias en la concentración de compuestos con efecto farmacológico como es el caso de la afinina, además de las modificaciones mencionadas anteriormente que implican las diferentes vías de administración. Además, los datos de DL_{50} están influenciados por varios factores dependientes de los animales de experimentación como son: especie, cepa, edad, sexo, dieta, vía de administración, entre otras, motivo por el cual la DL_{50} no puede ser considerada como una constante biológica (Lorke, 1983).

Tabla 24. Relación de ratones muertos con las diferentes dosis de ECHL

Concentración extracto [mg/kg]	No. muertes
10	0/3
100	0/3
600	0/3
1000	1/3
1200	2/3
1600	2/3
Control	0/3

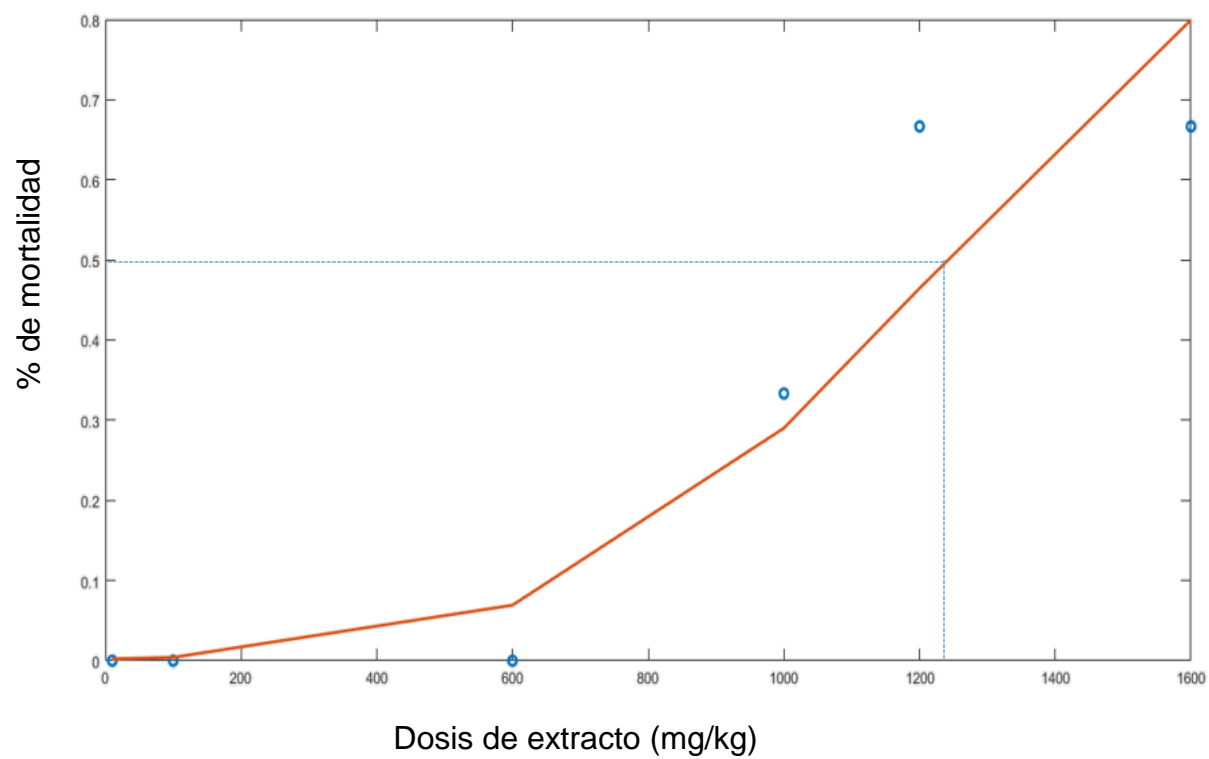


Figura 17. Toxicidad del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* en roedores

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo un extracto etanólico cuantificado a partir de las raíces de *H. longipes*, como un paso previo a la generación de un fitomedicamento. Para ello, se llevaron a cabo pruebas fisicoquímicas a la materia prima, determinándose que el contenido de materia extraña en el material vegetal cumple con el criterio de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) que establece un valor menor al 2%. Por el contrario, la cantidad de humedad del material vegetal resultó mayor a lo establecido en la FHEUM (> 10 %), por lo que es necesario implementar un método de secado más eficiente para disminuir el porcentaje de agua en las raíces. En lo que respecta a la cantidad de cenizas en las raíces de la planta, se observó que el contenido de materia inorgánica es abundante. Sin embargo, cabe destacar que en la FHEUM, no se encuentran establecidos los límites máximos permitidos para este componente. Los parámetros analizados en las raíces de *H. longipes* podrán contribuir a la elaboración de una ficha informativa acerca de las características de este material vegetal ampliamente utilizado en la Medicina Tradicional Mexicana.

Se estableció la metodología para la obtención del extracto etanólico a partir de las raíces de *H. longipes*, implementándose el uso de ondas de ultrasonido para promover la ruptura de las membranas vegetales y la liberación de los diversos compuestos de interés presentes en las raíces hacia el solvente de extracción, obteniéndose un rendimiento de 40 g de extracto/kg de materia vegetal seca, resultando mayor en un 200 % al reportado previamente en la literatura.

Se desarrolló y validó una metodología por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la identificación y cuantificación de la afinina como marcador químico. Dicha metodología permitió determinar que por cada gramo de extracto se obtienen 36.99 µg de afinina, por lo que constituye una herramienta analítica para el control de calidad en el desarrollo y obtención de un extracto estandarizado a partir de las raíces de *H. longipes* con efecto analgésico.

Se demostró que el extracto cuantificado obtenido a partir de las raíces de *H. longipes* tiene un efecto analgésico en un modelo de dolor orofacial, observándose que a una dosis de 10mg/kg de peso corporal, el efecto antinociceptivo es mayor que el observado para el ketocorolaco a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal.

Se determinaron las DL₅₀ en el extracto cuantificado de *H. longipes* mediante el ensayo de *Artemia salina* (100 µg /kg) y con el ensayo de Lorke en roedores (1238.3 mg/kg), dichos valores permiten clasificar al extracto en la categoría de sustancias con una toxicidad media.

Con base en lo anteriormente señalado, el extracto etanólico de *H. longipes* puede posicionar a esta especie vegetal como una alternativa para el tratamiento del dolor orofacial.

10. REFERENCIAS

Abeyasiri, G. R. P. I., Dharmadasa, R. M., Abeysinghe, D. C., Samarasinghe, K. (2013). Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Spilantes acmella* Murr. (*Asteraceae*), a natural remedy for toothache. *Ind Crop Prod.* 50: 852–856.

Abdullahi, A., Amini-Nik, S., Jeschke, M. G. (2014). Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci.* 71: 3241–55.

Aguilar, M. I., Castillo, N. E., Alvarado, L. C., Duarte, L. G., Ríos, G., Ramiro, R. M. Y. (2015). HPLC Determination of the alkaloid affinin in fresh and dry roots of *Heliopsis longipes* (*Asteraceae*) and HS-SPME-GC-MS-TOF analysis of volatile components. *Food Anal Methods.* 9 (6): 1807-1813.

Amenya, H. Z., Gathumbi, P. K., Mbaria, J. M., Thaiyah, A. G., Thoithi, G. N. (2014). Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. *J Ethnopharmacol.* 154 (3): 593-599.

Ávalos, Soto. J., Treviño, N. J. F., Verde, S. M. J., Rivas, M. C., Oranday, C. A., Moran, M. J., Serrano, G. L. B., Morales, R. M. E. (2014). Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Rev Mex Cienc Farm.* 45 (3): 39-44.

Bader, P., Echtele, D., Fonteyne, V., Livadas, K., Meerleer, D. G., Borda, A. P., Papaioannou, E. G., Vranken, J. H. (2010). Guía clínica sobre el tratamiento del dolor. Página electrónica: uroweb.org/wp-content/uploads/16-GUIA-CLINICA-TRATAMIENTO-DOLOR1.pdf. Fecha de consulta: 5 de diciembre del 2016.

Bae, S. S., Ehrmann, B. M., Etefagh, K. A., Cech, B. N. (2010). A Validated Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Method for Quantification of Spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr *Phytochem Anal.* 21: 438–443.

Barrett, E. J. (2015). The pain of pain: Challenges of animal behavior models. *Eur J Pharmacol.* 753: 183-190.

Benarba, B., Pandiella, A., Elmallah, A. (2016). Anticancer activity, phytochemical screening and acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Aristolochia longa* L. *J Pharm Phytopharmacol Res.* 6 (1): 20-26.

Bharat, G. M. H., Parabia. (2009). Pharmacognostice valuation of bark and seeds of *Mimusops Elengi* l. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2 (4)110-113.

Bo, L., Yuxia, J., Yi, X., Yuan Yuan, Wu., Jiyong, Youngyu, T. (2011). Safety evaluation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) flower extract: Assessment of mutagenicity, and acute and subchronic toxicity in rats. *J Ethnopharmacol.* 133: 583–590.

Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio., J. A., Ortiz, M. I., Sánchez-Gutiérrez, M., García-Reyna, P. B., Cilia-López, V. G., Pérez-Hernández, N., Moreno, E., Ponce-Monter., H. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *J. Ethnopharmacol.* 130: 216–221.

Carmona, F., Soares, P. A. M. (2013). Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Rev Bras Farmacogn.* 23 (2): 379-385.

Castañón, R. R., Belsasso, G. De León-Ma, Y. M. E., Frenk, M. J., González, P. E., Lomelín, C. G., Moctezuma, B. G., Ruelas, B. E., Tapia, C. R., Uribe, E. R., Conyer, T. R., Guensberg, L. A., Ruelas, B. E. (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos Cap 1._En: Listado de Monografías: MGA-FH-0030. Cuantificación de materia extraña 30-34, MGA-FH-0060. Cuantificación de cenizas totales 34-36, MGA-FH-0080. Análisis de pérdida de peso por el método de secado 37-34, MGA-FH-0150. Identificación de pesticidas 35-42, MGA-FH-0160. Cuantificación de metales pesados 42-53, MGA-FH-0170 Determinación de microorganismos 53-60. Ed: Secretaría de Salud, México, D.F, 30-60.

Castillo-Ortega, E. N. (2009). Tesis de grado: “Desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de afinina en la planta medicinal *Heliopsis longipes* (*Compositae*)”. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, D.F., México.

Castro, G. V. (2009). Monografía de la raíz de oro, chilcuague, *Heliopsis longipes* A. gray. Página electrónica: <http://www.tlahui.com/medic/medic29/chilcuague.pdf>. Fecha de consulta: 3 de Octubre del 2016.

Castro-Ruiz, J. E., Rojas-Molina, M. A., Luna-Vázquez, F. J., Rivero-Cruz, F. T., García-Gasca, T., Ibarra-Alvarado, C. (2017). Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis longipes*, Induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *J Mol Sci.* 18 (1).

Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 398: 436–441.

Chicca, A., Raduner, S., Pellati, S., Stropem, T., Altmann, K. H., Schoop, R. (2009). Synergistic immunopharmacological effects of N-alkylamides in Echinacea purpurea herbal extracts. *Int Immunopharmacol.* 9: 850-858.

Christensen, L. P. y Lam, J. (2011). Acetylenes and related compounds in *Astereae*. *Phytochem Lett.* 30: 2453-2476.

Cilia-López, V. G., Aguirre-Rivera, J. R., Reyes-Agüero, J. A., Juárez-Flores, B. I. (2008). Etnobotánica de *Heliopsis Longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Bol Soc Bot Méx.* 83: 81-87.

Cilia-López, V. G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., Reyes-Agüero, J. A. (2010). Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharm Biol.* 48 (2): 195-200.

Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M. G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P.I., 2004. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *J Ethnopharm.* 92, 177-191.

COFEPRIS. (2015). Atribuciones, funciones y características de la COFEPRIS. Página electrónica: <http://www.cofepris.gob.mx/cofepris/Paginas/AtribucionesFuncionesYCaracteristicas.aspx>. Fecha de consulta: 17 de noviembre del 2016.

Correa, J., Roquet, S. (1971). Multiple NMR analysis of the affinin. *Organic Magnetic Resonance.* *Org Magn Resonance.* 3: 1-5.

Crusiani, R. A., Nieto, M. J. (2006) Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. *Rev Soc Esp Dolor.* 5: 312-327.

Déciga-Campos, M., Rivero, C. I., Arriaga, A. M., Castañeda, C. G., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 110: 334–342.

Déciga-Campos, M., Ríos, M. Y., Aguilar-Guadarrama, A. B. (2010). Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Med.* 76: 665–670.

Déciga-Campos, M.; Arriaga-Alba, M.; Ventura-Martínez, R.; Aguilar-Guadarrama, B.; Ríos, M. Y. (2012). Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin. *Drug Dev Res.* 73: 130–137.

De la Rosa-Lugo, V., Acevedo-Quiroza, M., Déciga-Campos, M., Ríos M. Y. (2017). Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *J Pharm Pharmacol.* 1-12.

Demarne, F., Passaro, G. (2009). Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition. US Patent No. 7,531, 193 B2.

DOF. (1993). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.:<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/059ssa13.html> Fecha de consulta: 4 de Marzo del 2017.

DOF. (1998). NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos. Página electrónica: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/164ssa18.html> Fecha de consulta: 5 de Marzo del 2017.

DOF. (1999). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Página electrónica: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf> Fecha de consulta: 21 de Marzo del 2017.

DOF. (2002). NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Página electrónica: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>. Fecha de consulta: 13 de Febrero del 2017.

DOF. (2005). NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos (modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996). Página electrónica: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html> Fecha de consulta: 20 de Febrero del 2017.

DOF. (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios. Página electrónica: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4676/salud/salud.html> Fecha de consulta: 23 de octubre del 2016.

DOF. (2012). Norma Oficial Mexicana NOM--072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios. Página electrónica: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5278341&fecha=21/11/2012 . Fecha de consulta: 16 de noviembre del 2016.

DOF. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002, Instalación y operación de la Farmacovigilancia. Página electrónica: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php%3Fcodigo%3D5284236%26fecha%3D07/01/2013. Fecha de consulta: 9 de octubre del 2016.

Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S. A., Saha, S. (2013). Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. *Adv Pharmacol. Sci.* Article ID 423750.

Duffy, S.S., Perera, C.J., Makker, P.G., Lees, J.G., Carrive, P. and Moalem-Taylor, G. (2016). Peripheral and central neuroinflammatory changes and pain behaviors in an animal model of multiple sclerosis. *Front Immunol.* 7.

Escamilla, P. B., Moreno, P., Casasola, P. (2015). Plantas medicinales de La Matamba y El Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz. Cap 1: En: Principales plantas medicinales. Ed: Instituto de Ecología A. C. (INECOL), Xalapa, Veracruz, México. pp. 26-34.

EMA. (2009). Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations 1 in herbal medicinal products 2 /traditional herbal medicinal products. Página electrónica: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003272.pdf. Fecha de consulta: 4 de noviembre del 2016.

Falcão, R. E. A., De Souza, R. A., Camara, C. A., Quintans, J. S. S., Santos, P. L., Correia M. T. S., Silvac, T. M. S., Lima, A. A. N., Quintans-Júnior, L. J., Guimarães, A. G. (2016). Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents. *Rev Bras Farmacogn.* 26: 203–208.

García, G. A. (2010). Tesis de grado: “Farmacocinética de las boroxazolidonas de glicina, glutamato y aspartato y su relación con la actividad farmacológica central” : Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F.

García, Ma. A., Soberón, E., Córtes, M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., Alcántara, A., Chárvel, A., Mota, R., Gárzan, A. (2012). Métodos Analíticos Guía de validación. Cap 8: En: Determinaciones, metodologías y criterios de aceptación. Ed: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. México, D.F. pp. 15-50.

Gazda, L. S., Milligan, E. D., Hansen, M. K., Twining, C. M., Poulos, N. M., Chacur, M. (2001). Sciatic inflammatory neuritis (SIN): behavioral allodynia is paralleled by peri-sciatic proinflammatory cytokine and superoxide production. *J Peripher Nerv Syst.* 6: 111–129.

Gerbino, A., Schena, G., Milano, S., Milella, L., Barbosa, A., Armentano, F., Procino, G., Svelto, M., Carmosino, M. (2016). Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. *PLoS ONE.*11, e015602.

González-Lavaut, J. A., Prieto-González, S.; Garrido-Garrido, G.; Molina-Torres, J. (2004). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 35 (1): 119-36.

Goodman & Gilman's.(2007). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Cap. 2: Farmacocinética: la dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos, Cap. 14. En: Neurotransmisión y Sistema nervioso central.Undécima edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana, 1-21; 501-505.

Guyton, A. C., Hall, J. E. (2001). Tratado de Fisiología Médica. Cap: IX El sistema nervioso: A. Principios Generales y fisiología de la sensibilidad.Ed. McGraw-Hill, 10a ed. 791-793.

Gutierrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benitez, T. Luna, B., Ramirez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine*.2 (4): 341-347.

Haw, A. B., Keng, C. L. (2003). Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bioinsecticide plant, through proliferation of multiple shoots. *J Appl Hort*. 5: 65–68.

Hernández, C. M. (2009). Tesis de grado: Evaluación del efecto de la afinina presente en extractos de *Heliopsis longipes* en la recuperación de ápices de vainilla sometidos a tratamientos con crioprotectores”. Universidad Veracruzana.Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz.

Hernández, I., Márquez, L., Martínez, I., Dieguez, R., Delporte, C., Prieto, S., Molina, T., J., Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. *J Ethnopharmacol*. 124: 649–652.

Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Carranza-Álvarez, C., Gómez-Luna, B. E., Alvarado-Sánchez, B., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J. (2015). Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *J Asia Pac Entomol*. 18: 227–231.

LaLone, C. A., Hammer, K. D., P, Wu. L., Bae, J., Leyva, N., Liu, Y., Solco, A. K. S., Kraus, G. A., Murphy, P. A., Wurtele, E. S., Kim, O. K., Seo, KII., Widrlechner, M. D., Birt, D. F. (2007): Echinacea species and alkaloids inhibit prostaglandin E2 production in RAW264.7 mouse macrophage cells. *J Agric Food Chem* 55: 7314–7322.

Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L.,

Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., van den Maagdenberg, A. M.J. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 7(6): 447-449.

López, B. J. (2007). Alcamidas: Hacia la nueva era agrícola. *Revista Ciencia y Desarrollo*. 33 (205): 60-67.

López-Martínez., S., Aguilar-Guaderrama, B., Ríos, M. Y. (2011). Minor alkalamides from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (*Asteraceae*) fresh roots. *Phytochem Let*. 4: 275–279.

Lorke, Dietrich. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch Toxicol*. 54: 275-287.

McIntyre, M. K., Clifford, J. L., Maani, C. V., Burmeister, D. M. (2016). Progress of clinical practice on the management of burn-associated pain: Lessons from animal models. *Burns*. 42 (6): 1161-1172.

McLaughlin, L. J., Lingling, L. R. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J*. 32: 513-524.

McMahon, S., Koltzberg, M. (2007). Tratado del dolor. Cap 3: En. Fisiología del dolor. Ed. Elsevier. California, Estados Unidos, 526-745.

McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J, Bautista., D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M, Fanger, C. M. (2007). TRPA1 mediates formalin –induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 13525-13530.

Miller, A.L., Leach, M. C. (2015). The mouse Grimace Scale: A clinically useful tool. *PLOS ONE*. 10(9): e0136000.

Miller, A. L., Kitson, G. L., Skalkoyannis, B., Flecknell, P., Leach, M. C. (2016). Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Anim Behav Sci*. 181:160-165.

Mittal A, Gupta M, Lamarre Y, Jahagirdar B. (2016). Quantification of pain in sickle mice using facial expressions and body measurements. *Blood Cells Mol Dis*. 57: 58-66.

Molina-Torres, J., García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J Ethnopharmacol*. 64: 241–248.

Musa, A. A. (2012). Cytotoxicity activity and phytochemical screening of *Cochlospermum tinctorium* Perr Ex A. Rich Rhizome. *JAPS*. 2 (7): 155-159.

Ngueguim, T. F., Djouwoug, N. C., Donfack, J. H., Gounoue, K. R., Mbatchou, A., Kamtchouing, P., Dimo, T. (2015). Acute and sub-acute toxicity of a lyophilised aqueous extract of the aerial part of *Spilanthes africana* Delile in rats. *J Ethnopharmacol*. 72: 145–154.

Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Diversitas*. 62:12-15.

Ojewole, J., A., O. (2006): Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. & C.A. Mey. (Hypoxidaceae) corm ["African potato"] aqueous extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 103: 126–134.

OMS. (2000). Situación Reglamentaria de los Medicamentos. Página electrónica: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jwhozip58s/>. Fecha de consulta: 10 de diciembre del 2016.

OMS. (2002). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Página electrónica: www.who.int/medicinedocs/en/d/Js4930s/ Fecha de consulta: 27 de Enero del 2017.

OMS. (2011). Normas para medicamentos naturales, tradicionales y HOMEOPÁTICOS BOLIVIA. Página electrónica: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js18840es/>. Fecha de consulta: 6 de diciembre del 2016.

OMS. (2012). Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas. Página electrónica: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19116es/s19116es.pdf>. Fecha de consulta: 27 de octubre del 2016.

Oriela, P. P., Lazo, F. J. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev Protección Veg.* 22 (1): 34-43.

Rahman, A. (2014). Studies in Natural Products Chemistry. Cap. 3. En: Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy. Rios, M. A. y Olivo, H. F. Ed. Elsevier. Amsterdam, Países Bajos. pp. 80-121.

Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia.* 34 (2): 207-215.

Ríos, M. Y.; Aguilar-Guadarrama, A. B.; Gutiérrez, M., D., C. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J Ethnopharmacol.* 110: 364–367.

Santos, P. L., Araújo, A. A. S., Quintans, J. S. S., Oliveira, M. G. B., Brito, R. G., Serafini, M. R., Menezes, P. P., Santos, M. R. V., Alves, P. B., De Lucca Júnior, W., Blank, A. F., La Rocca, V., Almeida, R. N., Quintans-Júnior, L. J. (2015). Preparation, characterization, and pharmacological activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) leaf essential oil of β -Cyclodextrin inclusion complexes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015: 1-12.

Serrano–Atero, J., Caballero, A., Cañas, P. L., García-Saura, C., Serrano–Álvarez, J., Prieto, J. (2002). Valoración del dolor. *Rev Soc Esp.* 9: 94-108.

Silva, J. C., Macedo, L., Souza, G. R., Oliveira-Junior, R. G., Lima-Saraiva, R. G., Lavor, E. M., Silva, M. G., Souza, M. T., Bonjardim, L. R., Quintans-Júnior, L. J., Mendes, R. L., Almeida, J. (2016). Orofacial antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Z Naturforsch C.* 71 (7-8): 209-14.

Songlin, L., Quanbin, H., Chunfeng, Q., Jingzheng, S., Chuen, L. C., Hongxi, X. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Am J Chin Med.* 3 (7): 1-16.

Summer, G. J., Dina, O. A., Levine, J. D. (2007). Enhanced inflammatory hyperalgesia after recovery from burn injury. *Burns.* 33: 1021–1026.

Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., Eid, S. R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 6 (5): 357-72.

Teke, G., N., Kuete. V. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. (2014). Cap. 10 En: Acute and Subacute Toxicities of: African Medicinal Plants. Ed: Elsevier insights, Londres, Inglaterra. pp. 277-322.

Urbina, S., A., R. (2012). Tesis de grado: "Elaboración de un fitofármaco sólido con propiedades adelgazantes preparado con diferentes dosis a base de alcachofa (*cynara cardunculus var scolymus*), jengibre (*zingiber officinale*) y apio (*apium graveolens*) administrado a personas para comparar su eficacia." Escuela superior politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador.

Veryser, L., Wynendaele, E., Taevernier, L., Verbeke, F., Joshi, T., Tatke, P., De Spiegeleer, B. (2014). N-alkylamides: from plant to brain. *Funct Foods Heal Dis*. 4: 264–275.

Veryser, L., Taevernier, L., Joshi, T., Tatke, P., Wynendaele, E., Bracke, N., Stalmans, S., Peremans, K., Burvenich, C., Risseeuw, M. (2016). Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complement Altern Med*. 16 (177).

Villoria, M. C., Román, G. A. (2000). Tema 2. Bases de la fisiología y fisiopatología del dolor (Neuroanatomía, neurofisiología). Página electrónica: <http://www.catedradeldolor.com/PDFs/Cursos/Tema%202.pdf>. Fecha de consulta: 18 de diciembre del 2016.

Waters. (2003). Waters 600E Multisolvent Delivery System Quick Start Guide. Página electrónica: <http://www.quimica.uns.edu.ar/images/stories/descargas/Manuales%20LIUC/HPLC/HPLC-%20Guia%20de%20Usuario.pdf> Fecha de consulta: 18 de diciembre del 2016.

Waters. (2017). Columnas y accesorios para cromatografía. Página electrónica: http://www.waters.com/waters/partsList.htm?cid=134771861&filter=specname_columnmode|reversed-phase&locale=182 Fecha de consulta: 18 de Abril del 2016.

Williamson, E. M., Evans, F. J. (2009). Cannaboids in clinical practice. *Drugs*. 60: 1305-1374.

Wu, L. C.; Fan, N. C.; Lin, M. H.; Chu, I. R.; Huang, S. J.; Hu, C. Y.; Han, S. Y. (2008). Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J Agric Food Chem*. 56: 2341–2349.

Xin-Yue, S., Ying-Dong, L., Yan-Ping, S., Ling, J. J.C. (2013). Quality control of traditional Chinese medicines: a review. *Chin J Nat Med*. 11(6): 596-607.

Zakari, A., Kubmarawa, D. (2016). Acute Toxicity (LD50) Studies Using Swiss Albino Mice and Brine Shrimp Lethality (LC50 and LC90) Determination of the Ethanol Extract of Stem Bark of *Echinaceae angustifolia*. *Nat Prod Chem Res*. 4(6).

Zuardi, A. W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E, Kamiol, I. G. (1982). Action of canabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. *Phsycofarmacol*. 76: 22-31.

11. ANEXOS

ANEXO A.

Fórmula para la determinación de materia extraña en un material vegetal

$$\text{Materia extraña (\%)} = \frac{\text{g de materia extraña}}{\text{peso de material vegetal (100 g)}} \times 100$$

Fórmula para pérdida de peso en un material vegetal por el método de secado

$$\begin{aligned} \text{Pérdida de peso (\%)} \\ = \frac{\text{g de materia vegetal y cápsula} - \text{g de materia vegetal y cápsula seca}}{\text{g de materia vegetal y cápsula}} \times 100 \end{aligned}$$

Fórmulas para cuantificación de cenizas en un material vegetal

$$\text{Cenizas totales (\%)} = \frac{\text{g de materia vegetal y crisol calcinado}}{\text{g de materia vegetal y crisol}} \times 100$$

Cuantificación de cenizas insolubles en ácido

$$\text{Cenizas insolubles en ácido (\%)} = \frac{\text{g de cenizas y crisol calcinado}}{\text{g de cenizas totales y crisol}} \times 100$$

Cuantificación de cenizas solubles en agua

$$\text{Cenizas solubles en agua (\%)} = \frac{\text{g de cenizas y crisol calcinado}}{\text{g de cenizas totales y crisol}} \times 100$$

ANEXO B.

Fórmulas para determinar los parámetros estadísticos

Parámetro estadístico	Abreviatura	Ecuación
Coefficiente de correlación	R	$r = \sqrt{\frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coefficiente de determinación	r^2	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}$
Coefficiente de variación	CV	$CV = \frac{S}{y} * 100$
Coefficiente de variación de la regresión	$CV_{y/x}$	$CV_{y/x} = \left(\frac{S_{y/x}}{y} \right) * 100$
Desviación estándar	S	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada	S_{b0}	$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de la pendiente	S_{b1}	$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de la regresión	$S_{y/x}$	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$

Diferencia absoluta de medias	$ di $	$ di = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\mu)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-2} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	$IC(\beta_0)$	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S b_0$
Intervalo de confianza para la pendiente	$IC(\beta_1)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-2} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Límite de cuantificación	LC	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S b_0$
Límite de detección	LD	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S b_1$
Media aritmética	$\bar{x}, \bar{y}, \bar{y}_i$	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y}{n}, \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n}$
Ordenada al origen	b_0	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Pendiente	b_1	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Suma de x	$\sum x$	$\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$

Suma de y	$\sum y$	$\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$
Suma al cuadrado de x	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2 = (\sum_{i=1}^n x_i)^2$
Suma al cuadrado de y	$(\sum y)^2$	$(\sum y)^2 = (\sum_{i=1}^n y_i)^2$
Suma de x al cuadrado	$\sum x^2$	$\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$
Suma de y al cuadrado	$\sum y^2$	$\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$
Suma de x por y	$\sum xy$	$\sum xy = \sum_{i=1}^n x_i y_i$
Suma de x por suma de y	$\sum x \sum y$	$\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i$
% de Recobro	%R	$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} * 100$
Factor de capacidad	(k')	$k' = (C_S V_S) / (C_M V_M) = K V_S / V_M$
Número de platos teóricos	(N)	$N_{ef} = L/H = (t'_R/\sigma)^2$

ANEXO C.

Tabla 9. Datos para la evaluación de linealidad del sistema

# Inyección	Concentración (µg/mL)	Área (AU)
1	15	1 534 496
2	15	1 584 506
3	15	1 586 801
4	15	1 681 569
5	15	1 707 540
6	15	1 724 942
7	30	3 242 055
8	30	3 277 266
9	30	3 050 948
10	30	3 412 761
11	30	3 289 103
12	30	3 263 236
13	45	4 950 945
14	45	5 437 154
15	45	5 012 330
16	45	5 675 970
17	45	4 713 430
18	45	5 223 195
19	60	6 748 306
20	60	6 754 009
21	60	7 433 799
22	60	7 203 859
23	60	7 363 655
24	60	7 010 771
25	75	9 141 131
26	75	8 592 962
27	75	8 353 426
28	75	8 899 845
29	75	8 269 741
30	75	8 744 631
31	90	11 543 642
32	90	10 210 821
33	90	10 781 716
34	90	10 788 286
35	90	10 731 556
36	90	11 001 120

Cromatogramas

Validación del sistema y método analítico por HPLC

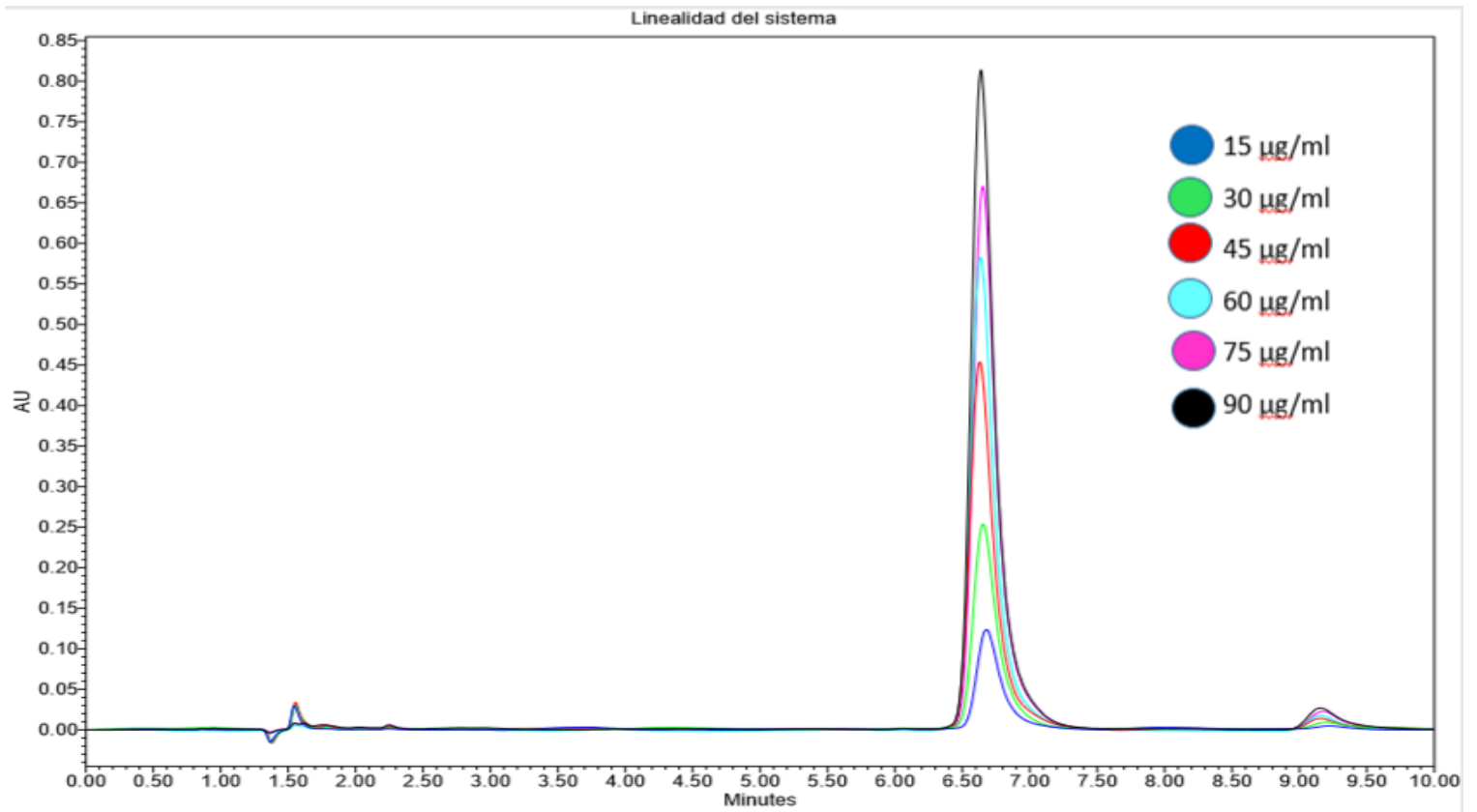


Figura 1. Cromatograma correspondiente a la linealidad del sistema

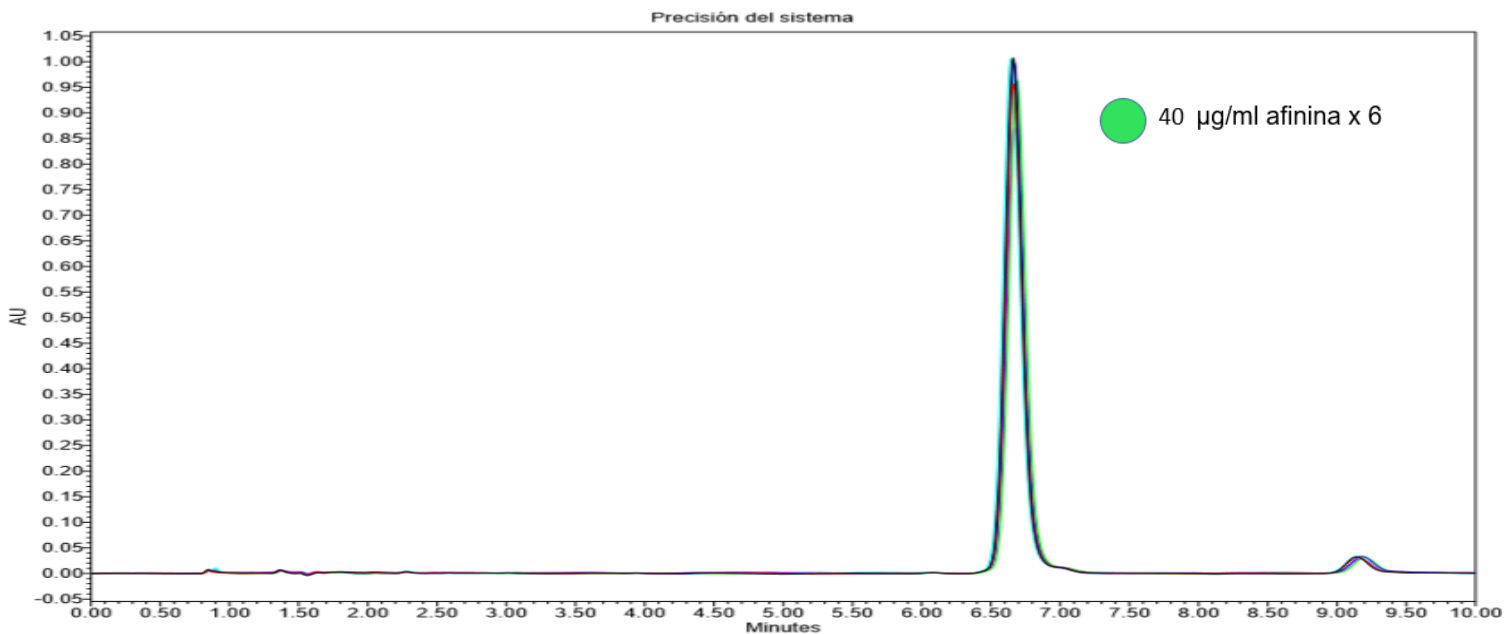


Figura 2. Cromatograma correspondiente a la precisión del sistema

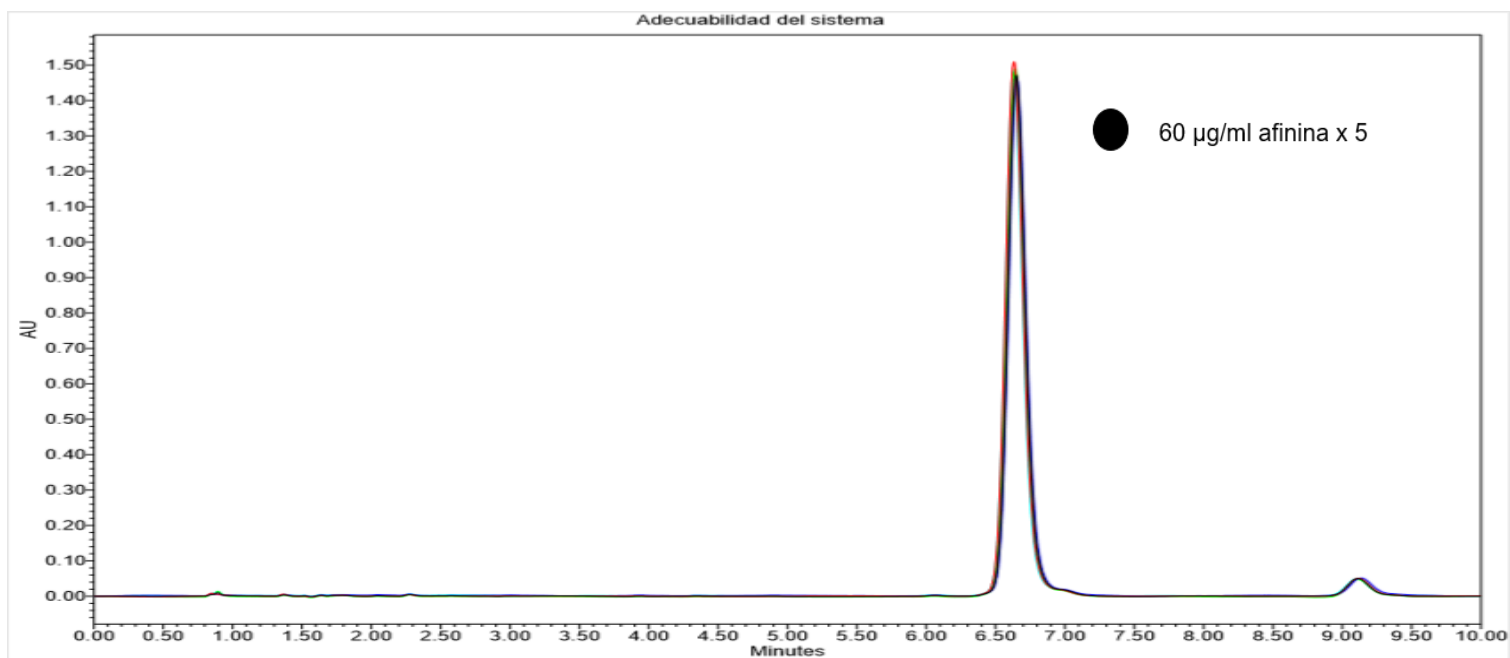


Figura 3. Cromatograma correspondiente a la adecuabilidad del sistema.

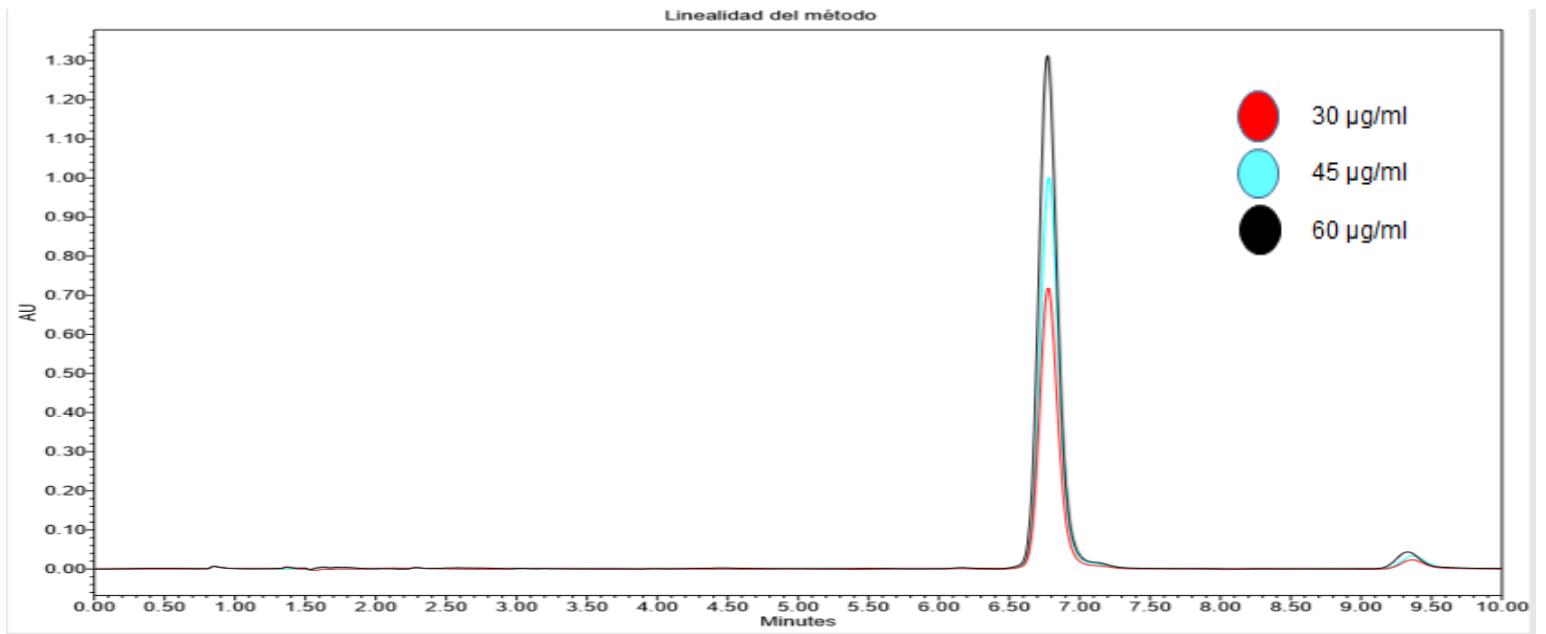


Figura 4. Cromatograma correspondiente a la linealidad del método

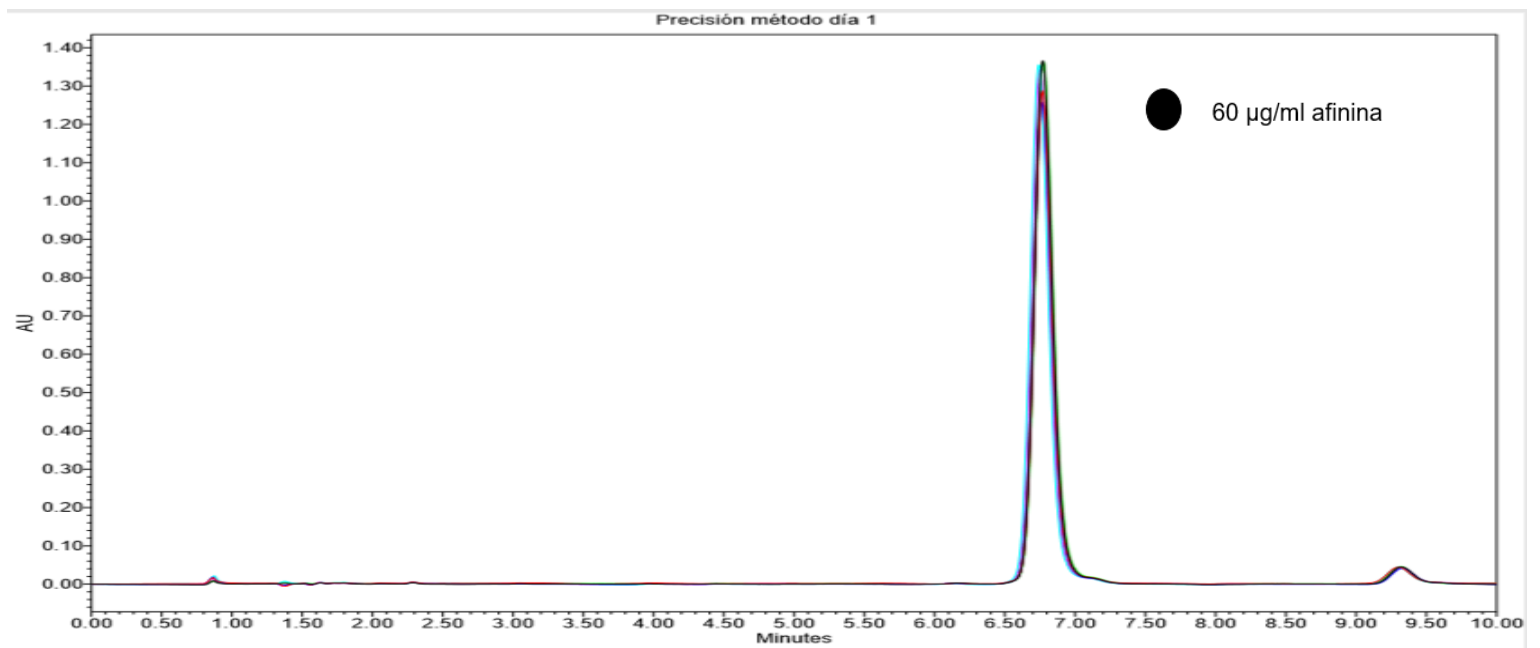


Figura 5. Cromatograma correspondiente a la precisión del método día 1

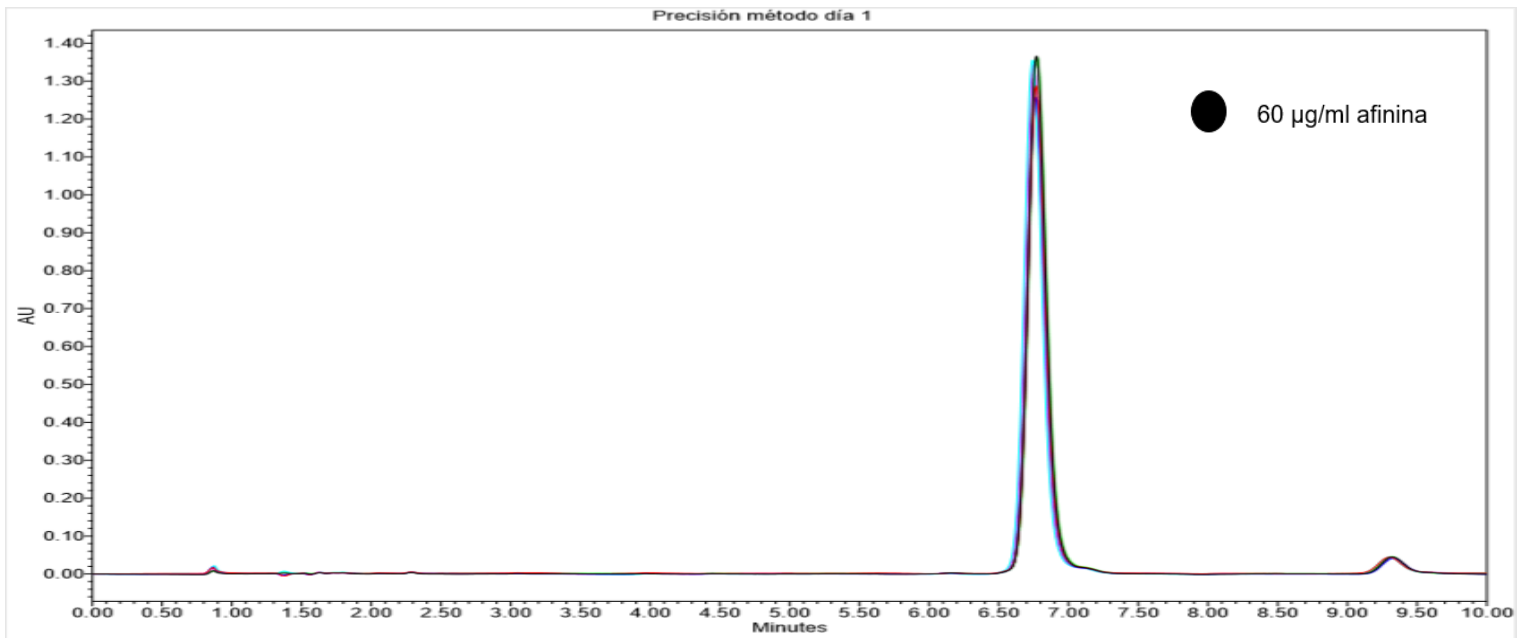


Figura 6. Cromatograma correspondiente a la precisión del método día 2

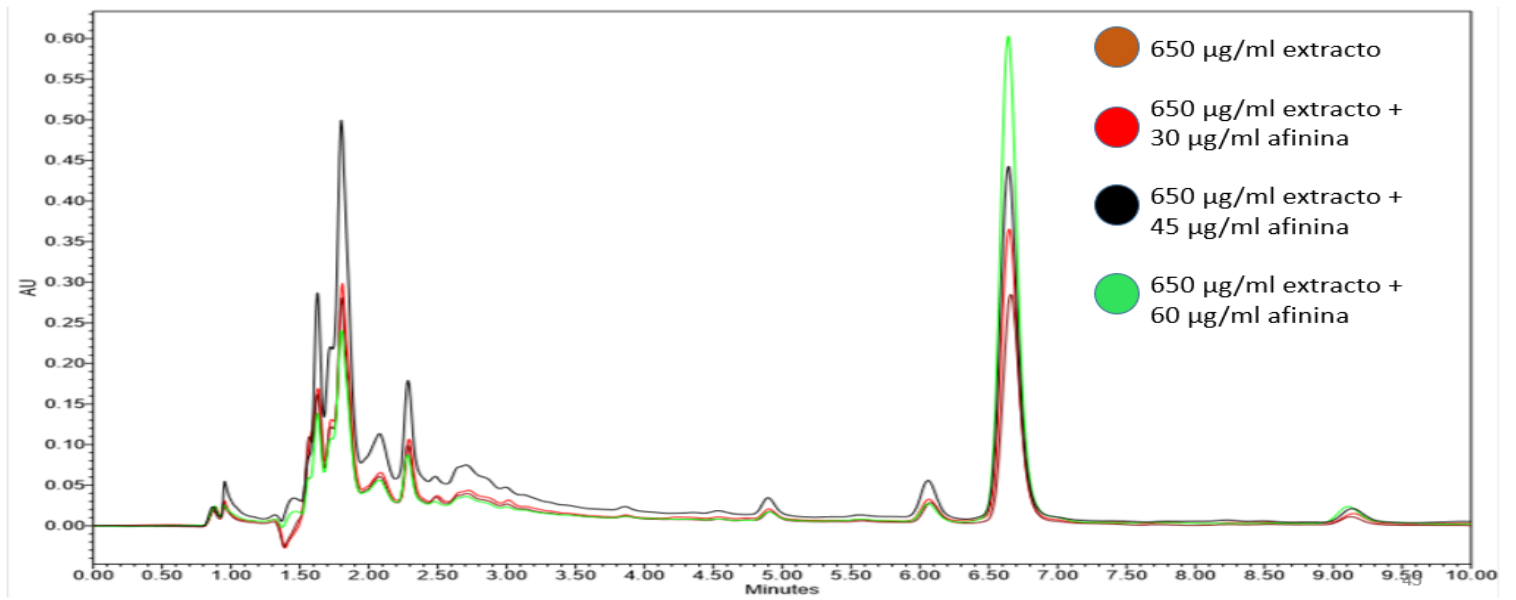


Figura 7. Cromatograma correspondiente a la exactitud del método

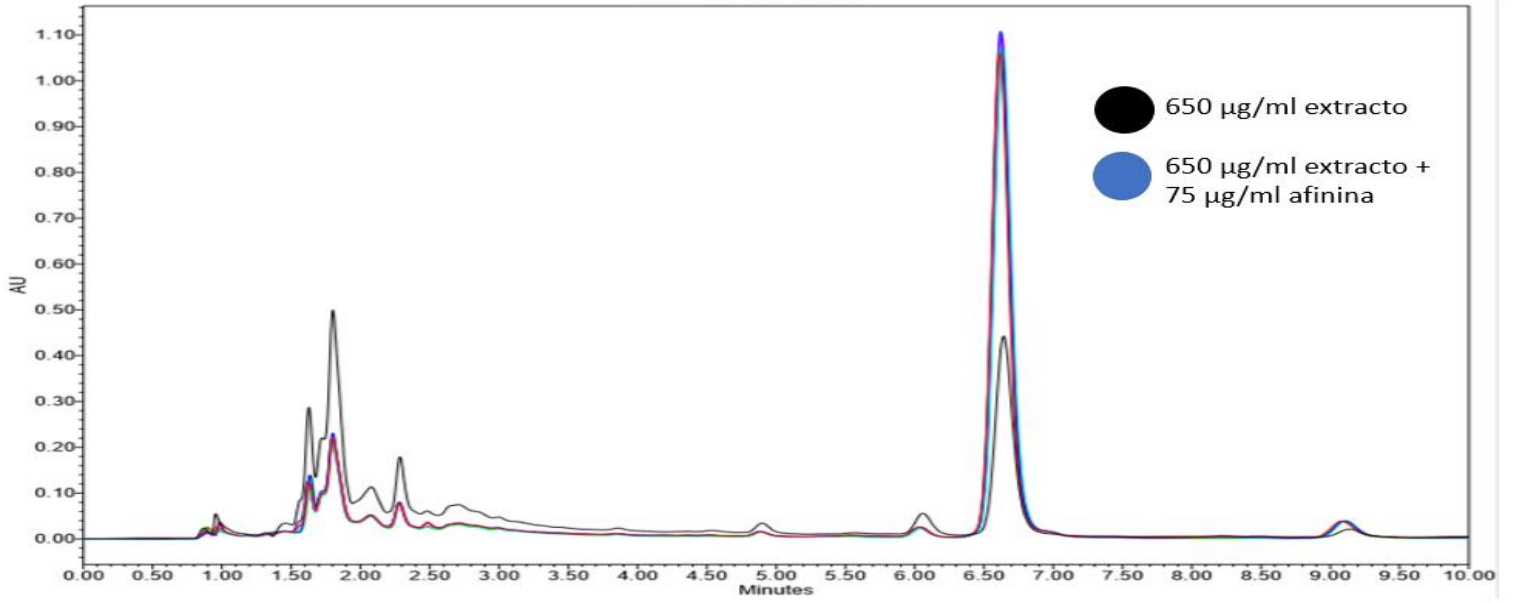


Figura 8. Cromatograma correspondiente a la repetibilidad del método

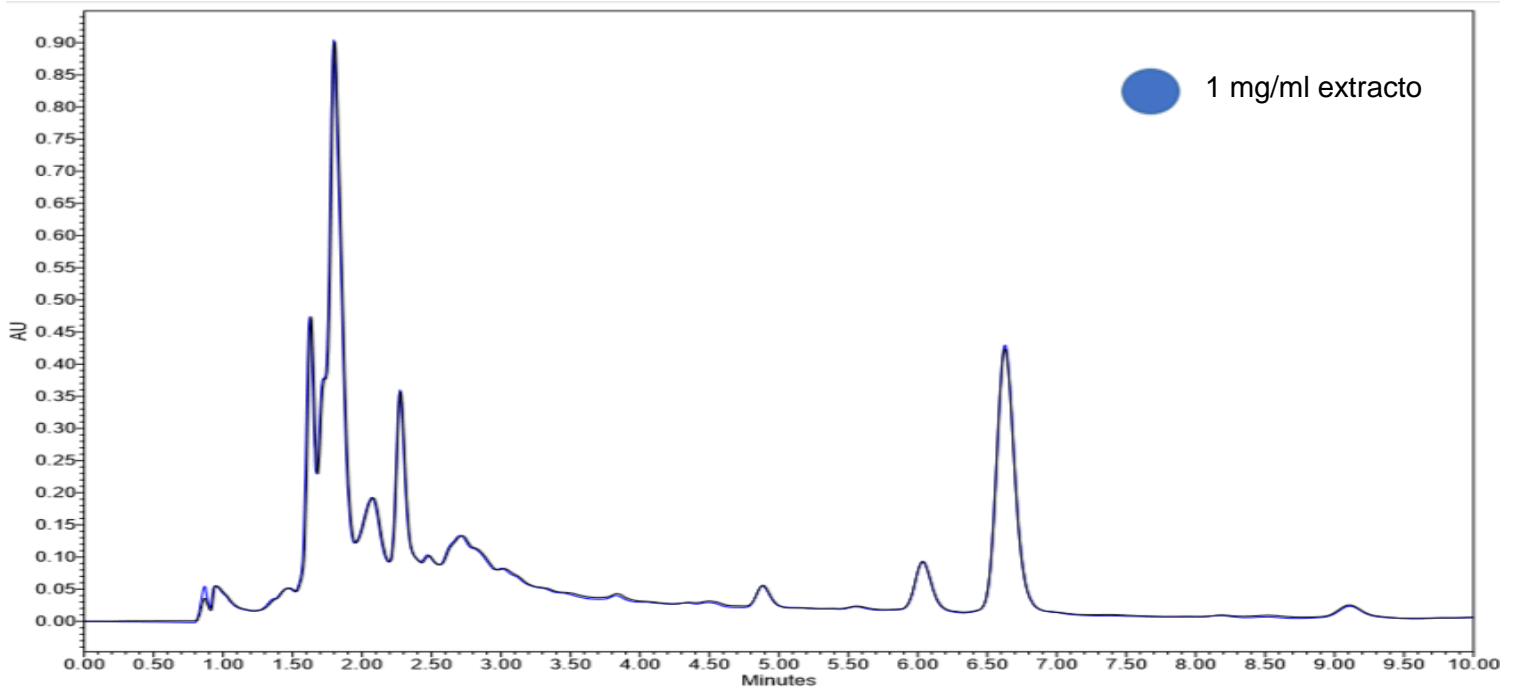


Figura 9. Cromatograma correspondiente a la estabilidad del ECHL 0 hrs

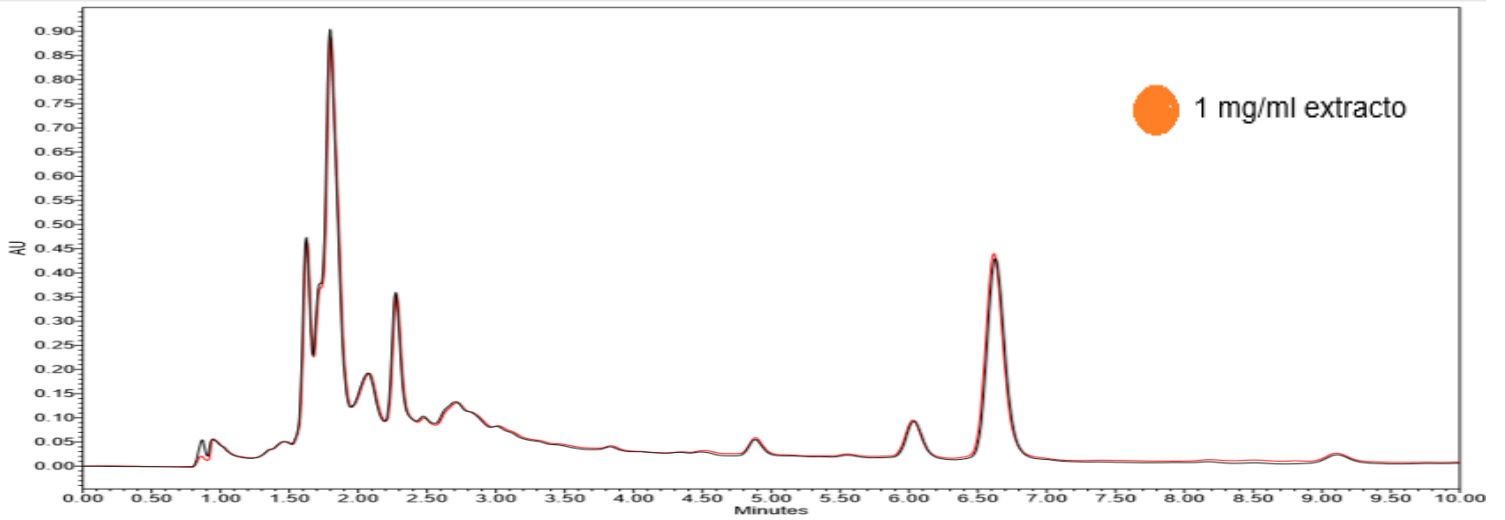


Figura 10. Cromatograma correspondiente a la estabilidad del ECHL 21 hrs

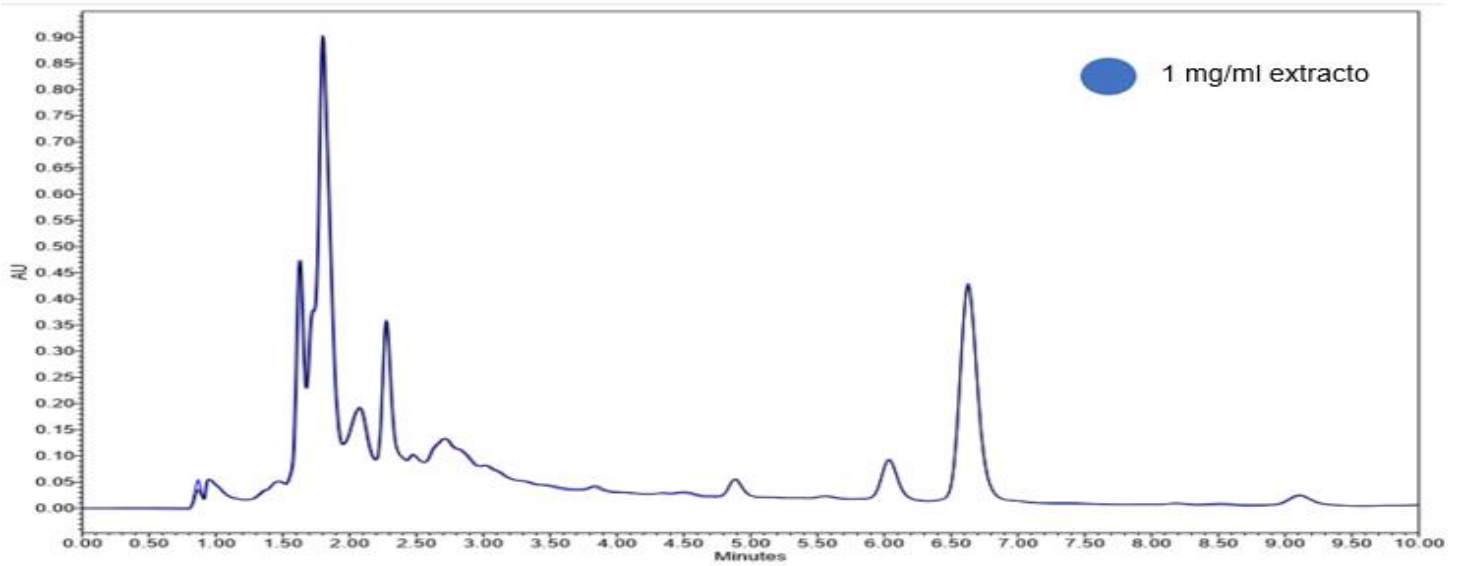


Figura 11. Cromatograma correspondiente a la estabilidad del ECHL 48 hrs

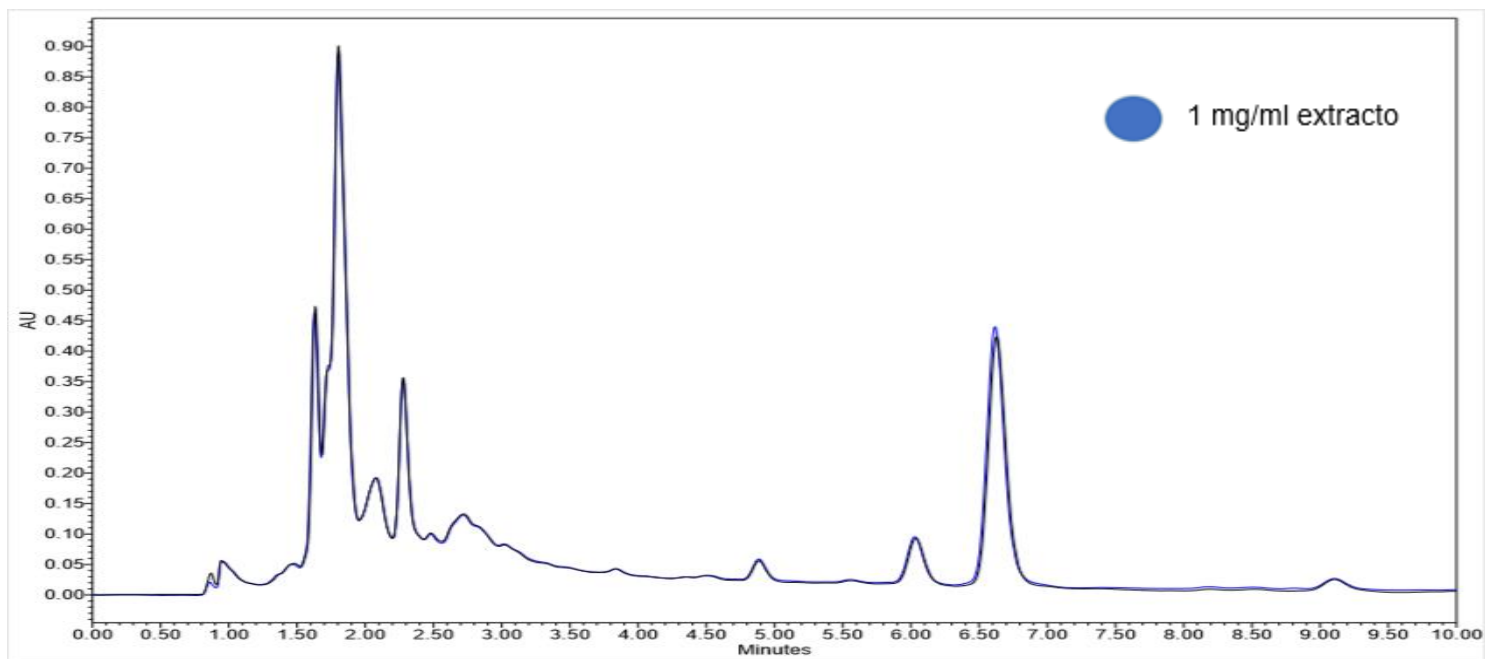


Figura 12. Cromatograma correspondiente a la estabilidad del ECHL 8 días

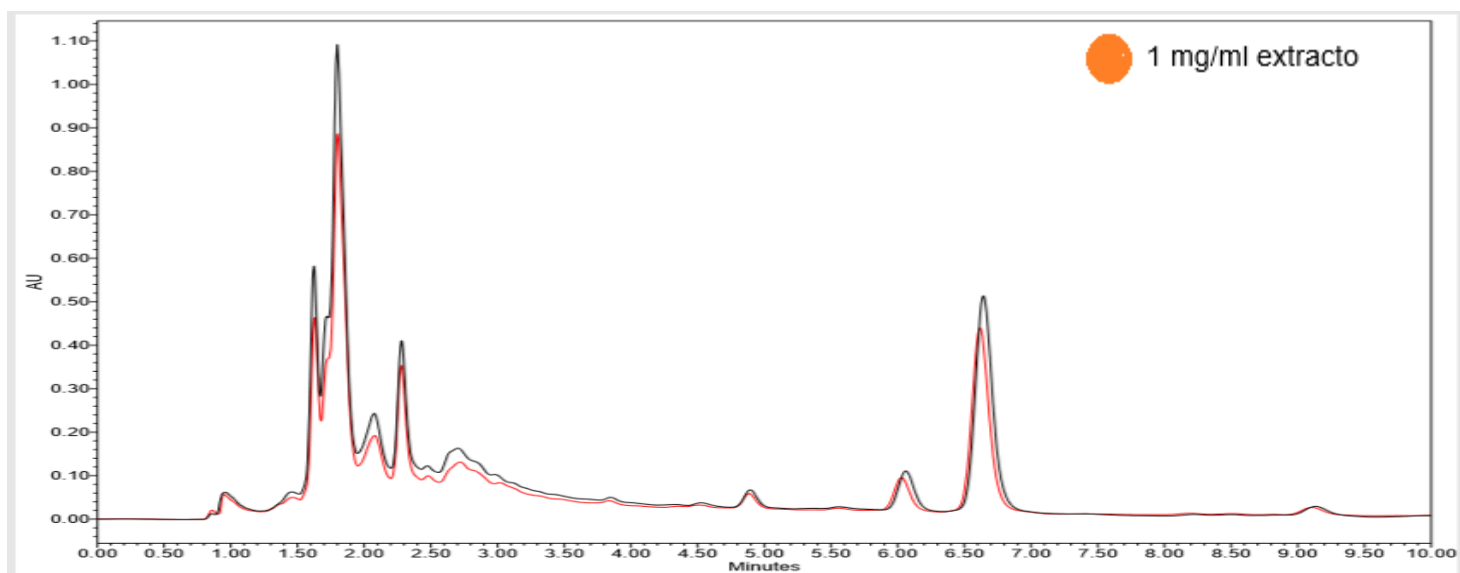


Figura 13. Cromatograma correspondiente a la estabilidad del ECHL 15 días

ANEXO D.

Consideraciones bioéticas

Los modelos animales representan la principal herramienta para la evaluación objetiva del dolor de manera experimental. Al tratarse de seres vivos, los protocolos de experimentación deben estar avalados por comités de bioética que aseguren que los animales serán tratados con integridad y respeto, estableciendo el menor número de animales en los grupos de experimentación y minimizando el sufrimiento, por lo cual, los animales se utilizaron una sola vez.

Por tal motivo, en este protocolo se utilizaron modelos animales para las evaluaciones farmacológicas y toxicológicas avaladas por diversos comités de ética y normativas mexicanas como son:

Comité de uso y cuidado animal de la Universidad del Valle de San Francisco (No. 0004/261011) (Silva *et al.*, 2016).

Comité de uso y cuidado animal de la Universidad Federal de Sergipe (CEPA / UFS, 10/11 y CEPA / UFS número 42/12) (Falcão *et al.*, 2016).

Sociedad Brasileña de Ciencias de los Animales de Laboratorio (SBCAL) e Institutos de Salud (NIH) (Santos *et al.*, 2015).

Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Entrega de Animales (NOM-062-ZOO-1999) y Comité de ética institucional (Protocolo SIP-20170861) (De la Rosa *et al.*, 2017).

Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Farmacéuticos (NIPRD) bajo los principios aceptados para el uso y cuidado de animales de laboratorio (Directiva De 1986; 86/609 / CEE) (Benarba *et al.*, 2016).

Hace más de 50 años, se introdujeron por primera vez el concepto de los 3Rs: la reducción, el refinamiento y la sustitución del uso de los animales en la investigación y las pruebas experimentales, las cuales se consideran cada vez más como un marco para la realización de la ciencia de alta calidad en los sectores académico e

industrial con más énfasis en el desarrollo de enfoques alternativos que evitan el uso de animales. Siguiendo el principio de reemplazo, sin embargo, un área que sigue dependiendo en gran medida de los modelos animales es la referente a la evaluación de la seguridad química, en la que se realizan pruebas de toxicidad para determinar si los productos representan una amenaza para la salud humana o el medio ambiente; esto se debe en gran medida a que los métodos no animales no son realmente capaces de predecir los efectos de los productos químicos en un organismo entero intacto.

La reducción consiste en usar metodologías que minimicen el número de animales utilizados por experimento o la obtención de la mayor cantidad de información posible del mismo número de animales.

El refinamiento se enfoca en la minimización del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que puedan experimentar los animales, evitando el estrés y proveyéndolos de una vivienda apropiada que permita la expresión de comportamientos específicos de la especie.

El alivio eficaz del dolor en los animales de laboratorio depende de la capacidad de reconocer el dolor y evaluar su gravedad. Los métodos tradicionales de evaluación del dolor basados en la monitorización del comportamiento y los signos clínicos (por ejemplo, pérdida de peso) consumen mucho tiempo y pueden tener otras limitaciones (por ejemplo, los signos observados pueden no ser específicos del dolor).

Investigaciones realizadas en el 2010 por el Dr. Jeffrey Mogil y colegas de la Universidad McGill, han demostrado que los cambios en la expresión facial proporcionan un medio fiable y rápido para evaluar el dolor en ratones y ratas. Se han desarrollado "escalas de muecas" para estas especies, basadas en cambios en varias "unidades de acción facial", como estrechamiento de los ojos (ajuste orbital) o cambios en la posición y forma de los bigotes. Estas escalas son avaladas en las investigaciones llevadas a cabo por Duffy *et al.*, 2016, Miller *et al.*, 2015, Miller *et al.*, 2016, Mittal *et al.*, 2016, entre otras.

Cuando las escalas de muecas se usan para evaluar el dolor en tiempo real en el lado de la jaula, cada animal debe ser observado durante un corto período de tiempo para evitar marcar breves cambios en la expresión facial que no están relacionados con el bienestar del animal. Sólo deben usarse con animales despiertos.