



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

**“Evaluación antioxidante, antibacteriana y  
antifúngica de metabolitos secundarios de  
*Árnica Montana*”**

Tesis para obtener el título de  
**LICENCIADO QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

Presenta:

**GUERRA MARTINEZ ANLLI LIZBETH**

Director de tesis:

Dr. Alan Carrasco Carballo

Codirector de tesis:

Dr. Jesús Sandoval Ramírez



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FEBRERO 2025



Laboratorio de Elucidación y Síntesis  
en Química Orgánica



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, en las divisiones de Productos Naturales, Antioxidantes y Microbiología bajo la dirección del Dr. Alan Carrasco Carballo, con la asesoría interna del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y metodología por la M. en C. Itzel Paulina Morales Sandoval.

# Permiso de Impresión



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



OFICIO C.Q./CT 012 A/2025

Dr. Henoc Flores Segura  
Director Facultad de Ciencias Químicas  
Presente.

## OFICIO DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Título de la Tesis:

"Evaluación antioxidante, antibacteriana y antifúngica de metabolitos secundarios de *Árnica montana*"

Comisión Revisora:

Presidente: D.C. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno.

Firma: 

Secretario: M.C. Itzel Paulina Morales Sandoval

Firma: 

Vocal: M.C. Félix Luna Morales

Firma: 

Los integrantes de la Comisión Revisora comunicamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de **licenciatura en Químico Farmacobiólogo** que presenta la estudiante **Anlil Lizbeth Guerra Martínez**, bajo la dirección del **DC. Alan Carrasco Carballo** y codirección de **D.C. Jesús Sandoval Ramírez**, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el estudiante presente su defensa y examen, con número de matrícula **201910309**.

Atentamente

Comisión revisora

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 3 de abril de 2025



Facultad de Ciencias Químicas  
Av. San Claudio No. 1 Edificio FCQ 9  
Ciudad Universitaria Col. San Manuel  
(222)2295500 ext. 7390

## DEDICATORIA

A mi papá, por ser mi ejemplo de insistir, persistir, resistir y nunca desistir, ya que gracias a todo el esfuerzo y el sacrificio de todos sus días pude formarme como profesional.

A mi mamá, por todo el infinito amor que ningún ser humano me podrá dar, por el cariño, la paciencia, los desvelos y el apoyo a todos mis sueños.

A mi hermana, por ser una motivación para nunca rendirme.

A Badi, por acompañarme en gran parte del camino y estar en el primer momento, alentándome a seguir mis metas por más grandes que estas parezcan y haber estado en los momentos más difíciles.

A Aaroncito, por acompañarme en los momentos más complicados de toda la carrera, cuidándome, ayudándome, protegiéndome y ser mi rayo de sol en los días lluviosos.

## Agradecimientos

Al Dr. Alan Carrasco Carballo, por abrirme un espacio en LESQO y brindarme la oportunidad de mejorar mis habilidades en el laboratorio, guiarme durante todo el desarrollo y elaboración de esta tesis.

A la M. en C. Itzel Paulina Morales Sandoval, por su paciencia y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

Al Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, por abrirme las puertas y sentirme acompañada y apoyada por los compañeros del laboratorio.

Al Maestro Alberto y Guiee Niza, por guiarme durante la elaboración de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas y a todos los docentes que me transmitieron el amor por esta carrera.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por formarme como profesional y darme la satisfacción de pertenecer a esta gran casa de estudios.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 10 |
| ANTECEDENTES .....   | 12 |
| ÁRNICA MONTANA ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN .....                                 | 12 |
| ESTUDIOS PREVIOS DEL ÁRNICA .....  | 13 |
| ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINALES .....                        | 16 |
| ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PLANTAS MEDICINALES .....                      | 19 |
| ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINALES .....                         | 24 |
| OBJETIVOS .....  | 27 |
| Objetivo general .....   | 27 |
| Objetivos particulares .....   | 27 |
| METODOLOGÍA.....   | 28 |
| Diagrama de la metodología usada.....                                      | 28 |
| Extracción diferencial mediante equipo Soxhlet .....                       | 28 |
| Ensayo DPPH .....  | 29 |
| Ensayo ABTS .....  | 29 |
| Ensayo Contenido Fenolico Total Folin-Ciocalteu .....                      | 30 |
| Ensayo Contenido de Flavonoides Totales.....                               | 30 |
| Evaluación de la actividad antibacteriana de metabolitos secundarios ..... | 31 |
| Evaluación antifúngica de metabolitos secundarios .....                    | 32 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....   | 33 |
| Extracción diferencial por Soxhlet. ....                                   | 33 |
| Ensayo por DPPH.....   | 34 |
| Ensayo ABTS .....  | 37 |
| Resultados del ensayo contenido fenólico total Folin-Ciocalteu.....        | 39 |
| Resultados del ensayo de contenido de flavonoides totales .....            | 42 |
| Resultados del ensayo de evaluación antibacteriana .....                   | 44 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 44 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> .....   | 46 |
| <i>Escherichia coli</i> .....  | 47 |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....   | 49 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| Actividad antifúngica .....   | 51 |
| <i>Geotrichum spp.</i> .....  | 51 |
| <i>Trichoderma spp.</i> ..... | 53 |
| <i>Candida albicans</i> ..... | 54 |
| CONCLUSION .....              | 58 |
| BIBLIOGRAFÍA .....            | 60 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. <i>Árnica montana</i> L. (izquierda): planta entera floreciendo en su hábitat natural; (derecha) primer plano de la cabeza de la flor.....  | 12 |
| Figura 2. Cumarina (2H -cromen-2-ona) (izquierda) y ostenol (derecha). .....  | 20 |
| Figura 3. Estructura y tipos de Flavonoides .....   | 21 |
| Figura 4. Estructura de los taninos (A) hidrolizables y (B) condensados .....   | 22 |
| Figura 5. Estructura de las saponinas que se encuentran en la <i>Chenopodium quinoa</i> ( $\beta$ -amirina).....                                      | 22 |
| Figura 6. Betacaroteno.....   | 23 |
| Figura 7. Ejemplo de Alcaloides .....   | 24 |
| Figura 8. Gráficas de normalidad del porcentaje de inhibición.....  | 35 |
| Figura 9. Porcentaje de inhibición de DPPH con respecto al disolvente. ....   | 36 |
| Figura 10. Gráficas de normalidad del porcentaje de inhibición de la prueba ABTS .....  | 37 |
| Figura 11. Gráfica del porcentaje de inhibición de la prueba ABTS .....   | 39 |
| Figura 12. Gráficas de normalidad del Contenido de compuestos fenólicos totales .....   | 40 |
| Figura 13. Contenido fenólico total mg GA/g de panta con respecto a los disolventes .....   | 41 |
| Figura 14. Gráficas de normalidad del contenido de flavonoides totales.....   | 42 |
| Figura 15. Contenido de flavonoides totales mg Q/g de panta con respecto a los disolventes. ....  | 44 |
| Figura 16. Inhibición de halos (mm) en <i>Staphylococcus aureus</i> por extractos de <i>Árnica Montana</i> a concentración 0.1 mg/ml .....            | 46 |
| Figura 17. Inhibición de halos (mm) en <i>Enterococcus faecalis</i> por extractos de <i>Árnica Montana</i> a concentración 0.1 mg/mL.....             | 47 |
| Figura 18. Gráfica de Inhibición de halos (mm) en <i>Escherichia coli</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> a concentración 0.1 mg/mL .....      | 49 |
| Figura 19. Gráfica de Inhibición de halos (mm) en <i>Pseudomona aeruginosa</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> a concentración 0.1 mg/mL ..... | 50 |
| Figura 20. Inhibición de halos (mm) en <i>Geotrichum spp.</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> a concentración 0.1 mg/mL.....                   | 53 |
| Figura 21. Inhibición de halos (mm) en <i>Trichoderma spp</i> por extractos de <i>Árnica Montana</i> a concentración 0.1 mg/mL .....                  | 54 |
| Figura 22. Inhibición de halos (mm) en <i>Candida albicans</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> a concentración 0.1 mg/mL .....                 | 56 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Pesos obtenidos de extractos de <i>Árnica Montana</i> con respecto al disolvente utilizado por extracción diferencial en Soxhlet .....  | 34 |
| Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney del porcentaje de % inhibición de RL vs. Solventes .....  | 35 |
| Tabla 3. Porcentaje de inhibición del radical ABTS vs. Solventes. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.....   | 38 |
| Tabla 4. Contenido fenólico total vs. disolventes. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. ....   | 40 |
| Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney del contenido de flavonoides totales mg Q/kg de planta con respecto a los disolventes. ....   | 43 |
| Tabla 6. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> ....   | 45 |
| Tabla 7. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de <i>Enterococcus faecalis</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> . .... | 46 |
| Tabla 8. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> .....       | 48 |
| Tabla 9. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de <i>Pseudomona aeruginosa</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> . .... | 49 |
| Tabla 10. Inhibición de halo (mm) en bacterias por extractos de <i>Árnica Montana</i> a concentración 0.1 mg/mL.....   | 50 |
| Tabla 11. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antifúngica de <i>Geotrichum spp.</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> .....          | 52 |
| Tabla 12. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de <i>Trichoderma spp.</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> .....      | 53 |
| Tabla 13. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antifúngica de <i>Candida albicans</i> por extractos de <i>Árnica montana</i> . ....        | 55 |
| Tabla 14. Inhibición de halo (mm) en Hongos por extractos de <i>Árnica Montana</i> a concentración 0.1 mg/mL.....  | 56 |

## RESUMEN

La planta herbácea perenne *Árnica montana* crece de forma silvestre en las zonas montañosas de Europa. Tradicionalmente, ha sido utilizada como remedio herbal, destacándose por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, lo que la hace especialmente eficaz en el tratamiento de heridas y promoción de la cicatrización. Además, esta planta posee actividad cito-protectora y antioxidante, contribuyendo a la regeneración del tejido dañado. La investigación de los metabolitos secundarios de *Árnica montana* es crucial para comprender su potencial terapéutico, especialmente en el desarrollo de formas farmacéuticas para el tratamiento de la piel de personas inmunocomprometidas. Algunos metabolitos secundarios de *Árnica montana* han mostrado poseer propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de terapias dermatológicas; por lo que se determinó la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica de *Árnica Montana*. Se realizaron extracciones consecutivas con 7 disolventes de diferente polaridad (hexano, acetona, diclorometano, etanol, metanol y agua) mediante el equipo Soxhlet, en forma diferencial de menor a mayor polaridad, para continuar con la evaluaciones antioxidantes y antimicrobianas. Esto con el fin de determinar cuáles de estos 7 extractos de *Árnica Montana* presentan propiedades para inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico que intervienen en patologías relacionadas con trastornos de la piel, las cuales son muy frecuentes en la población que presenta diabetes en nuestro país y así poder utilizarse en una forma farmacéutica para fines médicos en la prevención o tratamiento auxiliar en dichos trastornos de la piel. El perfil antioxidante se determinó mediante las pruebas de DPPH, ABTS, contenido fenólico total Folin-Ciocalteu y contenido de flavonoides totales. El extracto de metanol, etanol, acetona y AcOEt destacaron en las pruebas antioxidantes, especialmente DPPH con valores de inhibición superiores al 70% y ABTS con valores cercanos al 89%. Se mostro correlación positiva entre el contenido fenólico total y el contenido de flavonoides, ya que los disolventes más eficaces para extraer fenoles también lo son para los flavonoides. Se evaluó la propiedad antibacteriana en *Staphilococcus aureus*, *Enterococcus Fecalis*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y propiedad antifúngica en *Geotrichum spp.*, *Trichoderma spp.* y *Candida albicans*). Los resultados muestran que hexano es el disolvente óptimo para extraer los compuestos bioactivos de *Árnica montana* con amplio espectro antimicrobiano.

## ABSTRACT

The herbaceous perennial *Arnica montana* grows wild in the mountainous areas of Europe. Traditionally, it has been used as an herbal remedy, standing out for its analgesic and anti-inflammatory properties, which makes it especially effective in treating wounds and promoting healing. In addition, this plant has cytoprotective and antioxidant activity, contributing to the regeneration of damaged tissue. Research on the secondary metabolites of *Arnica montana* is crucial to understand its therapeutic potential, especially in the development of pharmaceutical forms for the treatment of the skin of immunocompromised individuals. Some secondary metabolites of *Arnica montana* have been shown to possess anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial properties, making them promising candidates for the development of dermatological therapies; therefore, the antioxidant, antibacterial and antifungal activity of *Arnica montana* was determined. Consecutive extractions were performed with 7 solvents of different polarity (hexane, acetone, dichloromethane, ethanol, methanol and water) using Soxhlet equipment, differentially from lower to higher polarity, to continue with the antioxidant and antimicrobial evaluations. This in order to determine which of these 7 extracts of *Arnica Montana* have properties to inhibit bacterial and fungal growth involved in pathologies related to skin disorders, which are very common in the population with diabetes in our country and thus be used in a pharmaceutical form for medical purposes in the prevention or auxiliary treatment in such skin disorders. The antioxidant profile was determined by DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu total phenolic content and total flavonoid content. Methanol extract, ethanol, acetone and AcOEt stood out in the antioxidant tests, especially DPPH with inhibition values above 70% and ABTS with values close to 89%. A positive correlation was shown between total phenolic content and flavonoid content, since the most effective solvents for extracting phenols are also effective for flavonoids. The antibacterial property was evaluated on *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Fecalis*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* and antifungal property on *Geotrichum spp.*, *Trichoderma spp.* and *Candida albicans*). The results show that hexane is the optimal solvent to extract the bioactive compounds of *Arnica montana* with broad antimicrobial spectrum.

## ANTECEDENTES

### ÁRNICA MONTANA ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

*Arnica montana* crece en hábitats montañosos y alpinos de Europa continental, hasta aproximadamente 3000 m de altitud, en suelos ácidos pobres en nutrientes. Es una herbácea perenne que forma un rizoma corto, no ramificado, con partes aéreas que crecen hasta 15-60 cm de altura. Tiene raíces sésiles, mayoritariamente hojas opuestas de forma ovada a lanceolada, la mayoría de las cuales forman una roseta basal, que típicamente tiene de una a tres cabezas de flores de color amarillo brillante, de 6 a 8 cm de diámetro, cada una de las cuales consta de numerosos floretes hermafroditas actinómorficos rodeados por una sola fila de 11 a 15 floretes radiales femeninos zigomórficos, en un tallo erguido, escasamente ramificado. Las cabezuelas florales se utilizan ampliamente en la actualidad y es la única parte de la planta escrita en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) bajo el nombre de flor de árnica-*Arnicae* flos. [1]



Figura 1. *Arnica montana* L. (izquierda): planta entera floreciendo en su hábitat natural; (derecha) primer plano de la cabeza de la flor

*Arnica montana* L. (Asteraceae) es una especie de planta medicinal que se ha utilizado durante muchos siglos en la medicina europea. Desde la edad media en adelante, el árnica es mostrado y mencionado en varios libros de hierbas antiguas y ganó importancia como remedio hasta el siglo XVIII y principios del XIX. *A. montana* es la única especie que se encuentra en Europa al sur de Escandinavia. Su distribución es descrita, según Maguire (citando la descripción original de Hegi), como “Europa, hacia el norte hasta Francia, Bélgica, noroeste de Alemania, Dinamarca, Escandinavia (Hustad, 63°N, sur de Noruega), Pomerania, Prusia Occidental, Prusia Oriental, norte y este de Polonia, Lituania, Livonia, Curlandia; en el sur de Europa (solo en gran altitud) hasta Portugal, este y norte de España hasta los Pirineos, hasta el norte de Italia, el norte de los Balcanes y el sur de Rusia”. El botánico español A. de Bolòs y Vayreda estuvo a punto de postular la existencia de dos subespecies de *A. montana*, distinguida por características morfológicas y delimitada por su origen geográfico, subespecie *Montana* presente en las áreas de distribución de Europa

central y oriental. Subespecie atlántica, que se encuentra únicamente en el extremo sur del área occidental, es decir, en la península Ibérica que incluye a Portugal, el norte de España y hasta el suroeste de Francia. Fue informado que las dos subespecies difieren morfológicamente, siendo menos alta y más delgada, con hojas más lanceoladas y cabezuelas algo más pequeñas que la sub. *Montana*. La existencia de las dos subespecies así propuestas han sido posteriormente cuestionadas, ya que las características morfológicas y datos biométricos no permitían una distinción clara.[1]

## ESTUDIOS PREVIOS DEL ÁRNICA

Han sido abordados estudios de comparación detallada entre las propiedades antiinflamatorias del extracto de toda la planta de *Arnica Montana* (*Arnica* planta total) y el extracto derivado únicamente de sus flores (*Arnica* flor). La investigación fue desarrollada en Suiza, Alemania y Taiwán, con el objetivo de confirmar la hipótesis de que el extracto de *Arnica* planta total podría ofrecer una mayor actividad antiinflamatoria que el extracto de *Arnica* flor gracias a su contenido más amplio y diverso de sustancias bioactivas. Los extractos de ambas fuentes fueron obtenidos de plantas cultivadas orgánicamente en Alemania y fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución. Esto permitió identificar y cuantificar compuestos bioactivos clave como sesquiterpenlactonas y timol. Para evaluar la actividad antiinflamatoria, los investigadores emplearon diversos enfoques *in vitro*, entre ellos ensayos celulares donde fue medida la inhibición de NF- $\kappa$ B y la expresión génica de ALOX5 y PTGS2, genes esenciales en la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas. Además, fue llevado a cabo ensayos enzimáticos específicos y análisis en células humanas primarias. La validación *in vivo* se realizó a través de un modelo de inflamación inducida en ratones, evaluando la reducción del edema tras la aplicación tópica de los extractos. Las conclusiones del estudio sugieren que *Arnica* planta total es una alternativa más efectiva para tratar procesos inflamatorios en comparación con extractos basados exclusivamente en flores. Esto es atribuido a su composición química más rica, que podría explicar sus beneficios superiores. Sin embargo, los autores señalan que estos hallazgos, aunque prometedores, deben ser confirmados mediante ensayos clínicos en humanos para evaluar tanto su eficacia como su seguridad.[2]

En un artículo de investigación, es analizado el impacto de la fertilización con nitrógeno sobre las propiedades antioxidantes y anticancerígenas de extractos de *Arnica montana*. Se investigó el efecto de diferentes dosis de nitrógeno, junto con el método de extracción (con agua o etanol) y su influencia en la composición química, la actividad antioxidante y la capacidad de inducir apoptosis en células cancerosas por la *Arnica montana*. Se propuso que la fertilización con nitrógeno modifica la composición de sustancias farmacológicamente activas en la flor *Arnica*, como las lactonas sesquiterpénicas, los flavonoides y el aceite esencial. Las dosis de nitrógeno de hasta 60 kg N ha<sup>-1</sup> aumentaron la concentración de estos

metabolitos secundarios, pero dosis mayores la disminuyeron. Los extractos acuosos y etanólicos mostraron diferentes niveles de actividad antioxidante y anticancerígena, lo que sugiere que el solvente de extracción también es un factor crucial. La investigación también determinó que las dosis bajas de nitrógeno mejoraron significativamente la capacidad de los extractos etanólicos para inhibir la actividad de la lipooxigenasa. Finalmente, se concluyó que la fertilización con nitrógeno es un factor importante para optimizar la producción de *Árnica* con propiedades anticancerígenas. La parcela experimental pertenecía al Departamento de Plantas Industriales y Medicinales de la Universidad de Ciencias de la Vida en Lublin, Polonia. [3]

Es comparada la composición fitoquímica de las tinturas madre homeopáticas de *Árnica montana* preparadas a partir de la planta entera fresca o seca. Al utilizar la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS) fue identificada y cuantificada una amplia gama de metabolitos en las tinturas. Además, fueron encontradas diferencias significativas entre las tinturas preparadas con materia prima fresca y seca, mediante análisis quimiométrico, destacando que los ésteres del ácido cafeoilquínico y ciertos compuestos de *Árnica montana*, como la hidroxisfingosina y los derivados del timol están aumentados en las plantas enteras frescas, mientras que los ésteres del ácido dicafeoilquínico metoxi-oxalilo (MODCQA), especialmente los productos de reordenamiento de Amadori (ARP) están aumentados en las enteras secas. El estudio concluye que el proceso de secado afecta la composición química de las tinturas de *Árnica montana* con implicaciones potenciales para la calidad y la estandarización de los productos herbales medicinales que utilizan esta planta. Las hierbas se recolectaron manualmente durante el verano de 2020 en cinco áreas geográficas diferentes (cuatro áreas en Francia: Massif du Morvan, Massif Central (2 muestras), Ardèche, Auvernia y un área en Alemania: Hesse)[4].

Se analizó el impacto del nitrógeno en la producción y composición química del aceite esencial extraído de las cabezuelas florales de *Árnica chamissonis*. El estudio se enfoca en la importancia de esta planta medicinal, la cual puede ser un sustituto farmacéutico para la *Árnica montana*, especie en peligro de extinción en Europa. Los autores analizaron la cantidad de aceite esencial y sus componentes principales en diferentes niveles de aplicación de nitrógeno en dos tipos de suelo (arenoso y franco). Los resultados mostraron que la aplicación de nitrógeno, junto con el tipo de suelo, influye significativamente en la producción de aceite esencial, así como en la concentración y rendimiento de los componentes clave, como el alfa-pineno, el cumeno, el *p*-cimeno, el germacreno D y el caryophyllene oxide. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para la producción industrial de *Árnica chamissonis* como fuente de sustancias farmacológicamente activas, sugiriendo que el control de la fertilización nitrogenada puede optimizar la producción y composición del aceite esencial. La investigación se llevó a cabo en la Universidad de Ciencias de la Vida en Lublin, en el este de Polonia.[5]

Las propiedades antioxidantes y citoprotectoras de dos plantas medicinales, *Árnica montana* L. (*Árnica*) y *Artemisia absinthium* L. (ajenjo) son debidas a la composición química de extractos etanólicos de estas plantas, ricas en flavonoides y ácidos fenólicos. Además, evalúan su capacidad para combatir el estrés oxidativo en células de fibroblastos de ratón. El estudio utiliza diversos ensayos *in vitro* para medir la actividad antioxidante de los extractos y su efecto sobre la viabilidad celular, la integridad de la membrana y el ciclo celular. Los resultados muestran que los extractos de *Árnica* y ajenjo poseen notable actividad antioxidante y protegen a las células de fibroblastos del daño causado por el peróxido de hidrógeno, un agente oxidante. El estudio proporciona evidencia científica para apoyar el uso tradicional de estas plantas en el tratamiento de afecciones cutáneas. Las plantas utilizadas en la investigación las flores de *A. montana* L y partes aéreas de *A. absinthium* L que provienen del condado de Cluj de Rumania.[6]

Fue investigada la eficacia terapéutica del extracto de *Árnica montana*, conocido como tintura de *Árnica* (AT), en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea en hámster. Fue demostrada la actividad antileishmanial *in vitro* contra diferentes especies de *Leishmania*. El estudio se centra en la efectividad de la AT contra *Leishmania braziliensis* y *L. tropica*, dos especies que causan leishmaniasis cutánea. Los investigadores evaluaron la citotoxicidad *in vitro* y la actividad antileishmanial de la AT y sus componentes activos, las lactonas sesquiterpénicas (STLs) en comparación con el tratamiento estándar con glucantime. Los resultados mostraron que tanto la AT como las STLs poseen alta actividad antileishmanial *in vitro*, y la AT demostró ser eficaz en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea en hámsters infectados con *L. braziliensis* y *L. tropica*. La eficacia de la AT fue superior al tratamiento con glucantime, lo que sugiere que la AT podría ser una alternativa prometedora para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. Los autores concluyen que sus hallazgos justifican la realización de ensayos clínicos con AT en pacientes con leishmaniasis cutánea. Este estudio se llevó a cabo en la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. [7]

También se han explorado las propiedades del aceite esencial extraído de las semillas de la planta *Árnica Montana*. Los autores analizaron la composición química del aceite esencial y evaluaron su efecto sobre dos líneas celulares de gliomas humanos: el astrocitoma anaplásico MOGGCCM y el glioblastoma multiforme T98G. Fue descubierto que el aceite esencial era rico en 2,5-dimetoxi-p-cimeno, un componente que indujo la muerte celular apoptótica en las líneas celulares de glioma, lo que sugiere un potencial terapéutico para el tratamiento de tumores cerebrales. El estudio, que es el primero en examinar la composición y actividad anticancerígena del aceite esencial de los aquenios de *Árnica montana*, destaca la importancia de investigar el potencial medicinal de esta planta. Los aquenios de *Árnica montana* fueron recolectadas de plantas cultivadas en campos experimentales de la Universidad de Ciencias de la Vida en Lublin, Polonia.[8]

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINALES

Los antioxidantes presentes en las plantas medicinales destacan como uno de los componentes más investigados en la actualidad. Este interés científico surge no solo por su diversidad estructural, sino también por su amplio espectro de actividad biológica, que abarca efectos antiinflamatorios, antienvjecimiento, antiateroscleróticos, anticancerígenos y otros mecanismos terapéuticos. Estos compuestos corresponden a metabolitos secundarios químicamente diversos, sintetizados en distintas partes de la planta y en diferentes etapas de su crecimiento, lo que confiere variabilidad a su producción.

Además, el perfil fitoquímico de las plantas medicinales está condicionado por múltiples factores, como:

- El quimiotipo de la especie vegetal.
- El origen geográfico (suelo, altitud, exposición solar).
- Variaciones climáticas estacionales.
- Métodos de recolección, procesamiento y almacenamiento.

Esta heterogeneidad representa un desafío crítico para la estandarización de las plantas medicinales y sus derivados, ya que afecta la consistencia en su calidad y eficacia. Por ello, evaluar cuantitativamente las propiedades antioxidantes de estos recursos naturales así como de los productos obtenidos a partir de ellos se ha posicionado como una estrategia clave para garantizar su reproducibilidad, optimizar su uso terapéutico y validar su seguridad en aplicaciones clínicas o industriales.[9]

Los antioxidantes naturales de las plantas se clasifican en tres clases principales: compuestos fenólicos, vitaminas y carotenoides. Algunos compuestos fenólicos, además de ser los principales compuestos vegetales con actividad antioxidante, también presentan actividades antimicrobianas y antifúngicas y tienen efectos importantes en los sabores y texturas de los productos alimenticios. Los compuestos fenólicos muestran una gran diversidad de estructuras, desde moléculas simples como el ácido ferúlico, vainillina, ácido gálico y ácido cafeico, hasta polifenoles como taninos y flavonoides. En cuanto a las vitaminas, las más importantes incluyen las vitaminas E y C. La primera es una vitamina liposoluble que consiste en un grupo de compuestos químicos formado por cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que incluye los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . El  $\alpha$ -tocoferol puede ser absorbido por el cuerpo humano y se encuentra principalmente en legumbres y cereales. La vitamina C es soluble en agua y está presente de forma natural en muchas frutas y verduras. La mayoría de los carotenoides también se encuentran en frutas y verduras. El  $\beta$ -caroteno, el  $\alpha$ -caroteno, el licopeno y la luteína son los principales carotenoides con actividad antioxidante.[10]

Los principales componentes responsables de las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales son los fenólicos y los terpenos de varias clases. Su distribución en las plantas es diferente en ubicación y cantidad, por consiguiente, varias partes de las plantas como hojas, brotes, flores, tallos, raíces, rizomas, cortezas son utilizadas generalmente con fines medicinales. Además, el tipo de extracción también afecta fuertemente la composición química y las propiedades del producto final. Solo las decocciones, infusiones, tinturas y aceites esenciales están oficialmente aprobados para su aplicación entre los extractos.[9]

Los terpenos se presentan principalmente en los aceites esenciales de plantas medicinales. Su efecto antioxidante es causado por la presencia de dobles enlaces y un grupo hidroxilo fenólico que es típico de los monoterpenos oxigenados como el eugenol, el timol y el carvacrol. Ambos tipos de grupos funcionales donan electrones o protones en reacción con especies radicales centradas en N y O formadas durante condiciones de estrés oxidativo.[9]

Los carotenoides como la luteína, licopeno,  $\beta$ -caroteno son menos comunes como antioxidantes en las plantas medicinales. No contribuyen a las propiedades antioxidantes de las decocciones, infusiones, tinturas y aceites esenciales ya que son insolubles en agua y etanol, que es utilizada para la preparación de estos productos. Sin embargo, la extracción de carotenoides con disolventes no polares o metanol con una purificación posterior en varios pasos es aplicada para el aislamiento de estos antioxidantes y su posterior aplicación en medicina, los tocoferoles y tocotrienoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  son solubles en disolventes orgánicos polares y es posible encontrarlos en tinturas y extractos etanólicos obtenidos de frutos y semillas de plantas medicinales. [9]

El ácido ascórbico es uno de los antioxidantes más abundantes en las plantas. También actúa como cofactor de numerosas enzimas que participan en el metabolismo de las plantas y en condiciones abióticas tienen tolerancia eficaz al estrés. [9]

Muchos factores de extracción juegan papeles importantes en la eficiencia de la extracción, tales como el tipo y concentración del solvente de extracción, temperatura, tiempo y pH de extracción. Entre ellos, el solvente es uno de los factores más influyentes. Numerosos solventes han sido utilizados para la extracción de antioxidantes de alimentos y plantas medicinales. La selección de solventes se basa en la naturaleza química y polaridad de los compuestos antioxidantes a ser extraídos. La mayoría de los fenólicos, flavonoides y antocianinas son antioxidantes hidrosolubles. Los solventes polares y medianamente polares, tales como agua, etanol, metanol, propanol, acetona y sus mezclas acuosas son ampliamente utilizados para la extracción. Los carotenoides son antioxidantes solubles en lípidos, y solventes orgánicos comunes tales como las mezclas de hexano con acetona, etanol, metanol, o mezclas de acetato de etilo con acetona, etanol, metanol han sido utilizados para la extracción[11].

Para extraer antioxidantes de alimentos y plantas medicinales es posible elegir varios procedimientos de extracción, incluidos los métodos de extracción convencionales y los no

convencionales. Los métodos de extracción convencionales son principalmente el baño de agua caliente, la maceración y la extracción Soxhlet, que consumen mucho tiempo y requieren cantidades relativamente grandes de disolventes orgánicos con bajos rendimientos de extracción. Además, el largo proceso de calentamiento, como el baño de agua caliente y la extracción Soxhlet puede conducir a la degradación de los compuestos termolábiles. Para obtener antioxidantes de las plantas de una manera energéticamente eficiente y económicamente sostenible, han sido estudiadas las técnicas de ultrasonido, microondas, líquido presurizado, hidrólisis enzimática, fluidos supercríticos, alta presión hidrostática, campo eléctrico pulsado y descargas eléctricas de alto voltaje como métodos no convencionales. [11]

La evaluación de las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales y de los productos farmacéuticos es realizada habitualmente mediante espectrofotometría y fluorimetría. Los parámetros antioxidantes típicos son los siguientes:[9]

- Capacidad antioxidante de equivalencia de Trolox (TEAC) basada en la capacidad de los antioxidantes para eliminar el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS<sup>•</sup>). [9]
- Capacidad antioxidante basada en la reacción de antioxidantes con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>). [9]
- Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) basada en la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo. [9]
- Potencial antioxidante de captura de radicales totales (TRAP) que refleja la capacidad de los antioxidantes para suprimir la oxidación de 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida, dihidrocloruro (AAPH), o 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (ABAP). [9]
- Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) basada en el efecto antioxidante sobre la peroxidación del ácido linoleico o LDL inducida por Cu (II) o AAPH. [9]
- Contenidos fenólicos totales por reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu basado en la reducción del heteropolianión molibdotungsto-fosfórico a azul de molibdenotungsteno. [9]
- Poder antioxidante férrico-reductor (FRAP) basado en la reducción del complejo 2,4,6-tripiridil-S-triazina de Fe<sup>3+</sup> en reacción con los antioxidantes. [9]
- Capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC) basada en la reducción del complejo Cu (II)-neocuproína por antioxidantes. [9]

Las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales dependen de la planta, su variedad, las condiciones ambientales, las variaciones climáticas y estacionales, las regiones

geográficas de crecimiento, el grado de madurez, las prácticas de cultivo y muchos otros factores como el tratamiento y procesamiento poscosecha. Para la determinación adecuada de la capacidad antioxidante son importantes la técnica de extracción, sus condiciones, el solvente utilizado y la metodología de ensayo particular. [12]

## **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PLANTAS MEDICINALES**

Las plantas de las familias Lamiaceae y Asteraceae son plantas medicinales ampliamente distribuidas en todo el mundo y han sido utilizadas desde la antigüedad con fines medicinales y alimenticios. Históricamente, las plantas medicinales de estas familias se han empleado para aromatizar, conservar alimentos y con fines medicinales debido a sus propiedades bioactivas. Hoy en día, las compañías farmacéuticas están interesadas en la amplia gama de propiedades beneficiosas de estas plantas para desarrollar remedios herbales modernos que son utilizados como reemplazo o complemento de los medicamentos convencionales y para la prevención de enfermedades[13]

El aumento de la resistencia de las bacterias contra los antibióticos actuales dio lugar a numerosos estudios que enfatizaban los agentes antimicrobianos derivados de las plantas. La medicina tradicional se ha convertido en una forma de medicina complementaria y es muy prometedora como fuente de terapia eficaz para las cepas de bacterias resistentes a múltiples fármacos. El desarrollo de la resistencia a los fármacos, así como la aparición de efectos secundarios adversos de ciertos antibióticos ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos, particularmente de plantas medicinales.[14]

*Escherichia coli* es un patógeno con alta frecuencia como causante de infecciones del tracto urinario, así como enfermedades transmitidas por los alimentos, mientras que *Staphylococcus aureus* es la causa más común de enfermedades transmitidas por los alimentos, enfermedades de la piel y de los tejidos blandos. Sin embargo, durante la última década, el patrón cambiante de resistencia de *E. coli* y *S. aureus* ha enfatizado la necesidad de nuevos agentes antimicrobianos. Debido a esto, los investigadores están dirigiendo cada vez más su atención hacia la medicina tradicional. Por lo tanto, hay una serie de informes sobre algunos extractos de plantas y aceites esenciales con actividad antimicrobiana y como fuente de agentes antimicrobianos contra el deterioro de los alimentos y patógenos. [13]

La terapia contra infecciones de la piel y heridas puede ser apoyada por la aplicación de productos naturales provenientes de una amplia variedad de plantas. Estos productos incluyen extractos de plantas enteras, exudados de plantas o sustancias activas aisladas. Las pequeñas sustancias herbales que intervienen en el proceso de curación por infecciones de la piel pueden estar involucradas varios mecanismos con diferentes procesos como actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria; adicionalmente pueden aumentar la regeneración de la piel dañada. La acción multiobjetivo de las medicinas herbales puede

facilitar el tratamiento de infecciones de la piel al actuar sobre los procesos importantes involucrados en la fisiopatología de estas enfermedades. [15]

### Cumarinas

De Souza et al. (2005) probaron 45 derivados de cumarinas en varias especies bacterianas, una de ellas fue *Staphylococcus aureus*. De las cumarinas probadas, el ostenol (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), presente en las plantas del género *Angelica*, mostró actividad antibacteriana e inhibió el crecimiento de *B. cereus* y *S. aureus* en concentración inhibitoria mínima (MIC) de 62,5 a 125 µg/mL. Se ha sugerido que la prenilación en C8 y el grupo OH en C7 aumentan la actividad antibacteriana de las cumarinas. Las cumarinas son componentes principales en las plantas del género *Melilotus*. La actividad antibacteriana de *Melilotus albus* fue investigada por Stefanović et al. (2015). Los extractos con etanol, acetona y acetato de etilo de esta planta fueron activos contra *B. subtilis* y *S. aureus* con MIC de 1,25 mg/mL a 5 mg/mL.[15]

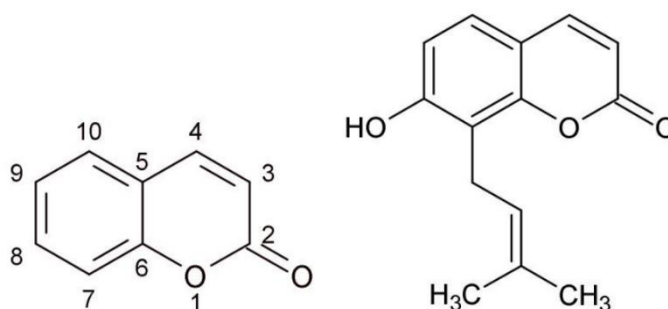


Figura 2. Cumarina (2H -cromen-2-ona) (izquierda) y ostenol (derecha).

### Flavonoides

Los flavonoides representan el grupo más grande de moléculas naturales con efectos antibacterianos. Los flavonoides son metabolitos secundarios, que con muy pocas excepciones, están presentes en todas las plantas verdes y juegan un papel clave para la planta en la protección contra patógenos. Desde el punto de vista químico, es un solo grupo, con estructuras derivadas de la benzo- $\gamma$ -pirona. Los flavonoides tienen un efecto antibacteriano significativo, ya sea solos o en combinaciones sinérgicas. Los flavonoides afectan destructivamente a las bacterias y/o disminuyen su virulencia mediante la actividad de extinción de quórum y actúan sinérgicamente con los antibióticos convencionales, aumentan la susceptibilidad antimicrobiana de algunas bacterias, por ejemplo, mediante la inhibición de la bomba de eflujo. El grupo de flavonoides antibacterianos con CMI inferiores a 10 µg/ml contra las bacterias más comunes incluye sustancias como la rutina, la galangina, la ramnoisorobina, el 2-hidroxilupinifolinol, el 3'-O-metildiplacol, el 2,8-diprenileriodictiol, la hesperetina, la naringenina, la pinocembrina, el dihidrokaempferol, la bartericina A, la

isobavachalcona, la panduratina A, la floretina o la licochalcona A. Es sabido que los flavonoides son eficaces tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. La actividad antibacteriana de los flavonoides radica principalmente en su interacción con la membrana celular bacteriana, donde alteran las bicapas de fosfolípidos, inhiben la cadena respiratoria y la síntesis de ATP.[15]

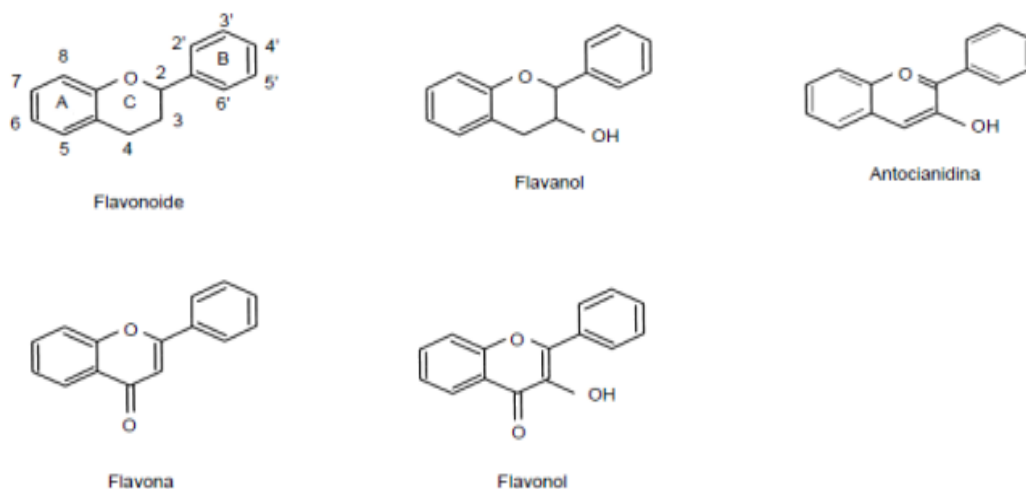


Figura 3. Estructura y tipos de Flavonoides

Los taninos son metabolitos secundarios importantes que son encontrados en diferentes formas, especialmente en las plantas. Los taninos condensados e hidrolizables son los dos tipos principales de taninos, que se encuentran principalmente en las cortezas, hojas, frutos, cáscaras de frutos, semillas, brotes y tallos. Es posible extraer los taninos de estas fuentes con agua o con agua con otros solventes, es decir, metanol, etanol, acetona, hidróxido de sodio y líquidos iónicos.[16] Los taninos son capaces de quelar el hierro (importante para el metabolismo bacteriano), inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, alteran la membrana celular e inhiben las vías biosintéticas de los ácidos grasos. Ha sido informado que los taninos actúan como inhibidores del quorum sensing y de esta manera pueden inhibir la expresión de factores de virulencia e interferir con la formación de biopelículas. Además, es considerada una alternativa potencial a los antibióticos convencionales. [15]

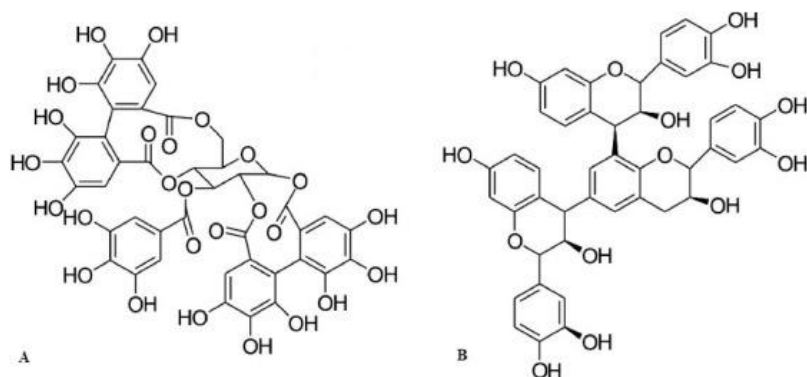


Figura 4. Estructura de los taninos (A) hidrolizables y (B) condensados

### Saponinas

Las saponinas como los ginsenósidos, ácido glicirricico,  $\beta$ -escina,  $\alpha$ -hederina, hederacósido C y ácido primúlico 1 pueden mejorar la susceptibilidad de importantes cepas bacterianas multirresistentes como enterococos resistentes a la vancomicina o MRSA. La cucurbitacina B, perteneciente a los triterpenos tiene efecto antibacteriano contra *S. aureus*, con CMI de 0,12 y 0,44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , además tiene actividad sinérgica con tetraciclina y oxacilina. Ha sido demostrado que las saponinas triterpénicas parecen desempeñar un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas de la piel. [15]

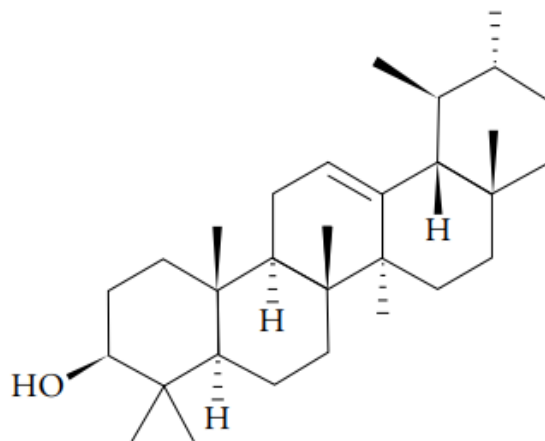


Figura 5. Estructura de las saponinas que se encuentran en la *Chenopodium quinoa* ( $\beta$ -amirina)



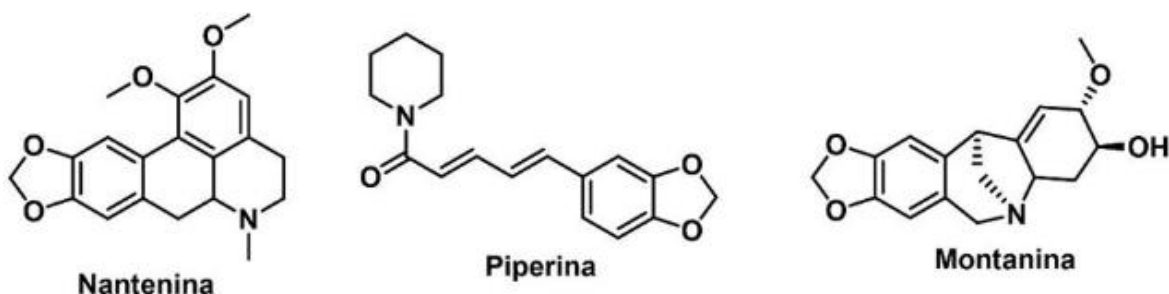


Figura 7. Ejemplo de Alcaloides

## ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales cuentan con una fuente importante de compuestos biológicamente activos. Numerosos metabolitos secundarios que crean tienen propiedades antifúngicas. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc. [20] Las plantas ofrecen excelentes perspectivas para el desarrollo de nuevos productos terapéuticos, algunos de los cuales pueden tener propiedades fungicidas, contra la contaminación, nutraceuticos para la prevención de la micotoxicosis. Estos fungicidas de origen vegetal pueden tener efectos tóxicos bajos o nulos.[21]

La capacidad para utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, nitrógeno y energía es una adaptación muy desarrollada de los hongos, dificultando su control. Es por esto que pueden causar enfermedades muy importantes en humanos. *Candida albicans* es un miembro de la flora oral y gastrointestinal en individuos sanos, pero produce infecciones muy frecuentes en pacientes inmunocomprometidos. En condiciones de inmunosupresión severa, hospitalización prolongada, terapias con antibióticos y/o prótesis, *Saccharomyces cerevisiae* es un colonizador común de mucosas produciendo infecciones tanto superficiales como viscerales invasivas. *Aspergillus niger* produce infecciones cutáneas en pacientes inmunosuprimidos, mientras que *Penicillium notatum* es agente causal de infecciones y alergia en el hombre.[20]

Los compuestos fenólicos aislados de fuentes naturales han sido reportados con actividad antifúngica. Es observado que los sitios y el número de grupos hidroxilos en el grupo fenólico están íntimamente relacionados con la toxicidad hacia los microorganismos, es decir, a mayor número de grupos hidroxilos, mayor la toxicidad. Los mecanismos responsables de esta acción incluyen la inhibición enzimática por oxidación de compuestos, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilos o a través de otras interacciones no específicas con proteínas.[22]

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo y la adición de un grupo hidroxilo en el carbono número 3 lo hace un flavonol. Algunos ejemplos de este grupo

de compuestos son: la amentoflavona, extraída de *Selaginella tamariscina* la cual tiene actividad antifúngica (IC<sub>50</sub>= 18.3 mg/ mL) contra cepas patógenas de hongos y un bajo efecto hemolítico en eritrocitos humanos, *Inula viscosa* es comúnmente utilizada en la medicina tradicional por sus efectos terapéuticos. Compuestos como flavonoides, azulenos, sesquiterpenos y aceites esenciales de esta planta tuvieron actividad antifúngica significativa contra especies de dermatofitos a concentraciones de 10 mg/mL. La actividad antifúngica es mayor en los compuestos cuya molécula está completamente metilada, como es el caso de la tangeretina de los cítricos, y disminuye dramáticamente cuando se remueve el grupo metilo de la posición 5.[22] Las Xantonas son un grupo restringido de polifenoles de plantas, biosintéticamente relacionados con los flavonoides. Son moléculas planares de seis carbonos en sistemas de anillos conjugados de la cadena principal y varios grupos químicos unidos a ella. La cadena principal de las Xantonas consiste en dos anillos de benceno unidos a través de un grupo carbonilo y un oxígeno que no permite la libre rotación entre los enlaces C-C. La cadena principal, la posición y tipo de los grupos químicos que posee, define las propiedades específicas de estas moléculas. Poseen actividad biológica variada, incluyendo la actividad antifúngica, ej., la Caledonixantona aislada de la corteza de *Calophyllum caledonicum*. [22]

Los alcaloides son un grupo de compuestos nitrogenados heterocíclicos el primero del que se tiene uso con fines medicinales es la morfina aislada del opio *Papaver somniferum*. Otro es la Walterione A, alcaloide tipo quinolinona obtenido de las hojas de *Melochia odorata*, tiene actividad antifúngica contra un amplio espectro de hongos patógenos. Los mecanismos de acción de los alcaloides parecen ser primordialmente modificaciones del ADN-ARN (mutaciones), alquilación, efecto negativo en la ADN o ARN polimerasa, también en inhibición de la traducción proteica, fue observado que afectan las membranas dando efectos negativos en los transportadores de iones y por efecto en la estabilidad de la membrana y cuentan con la inhibición enzimática de hidrolasas y adenilato ciclasa. [22] Las saponinas son metabolitos secundarios que son producidos en un amplio rango de especies de plantas que se encuentran almacenadas en las células vegetales como precursores inactivos listos para ser transformados en antibióticos activos vía enzimática en respuesta a patógenos. Son compuestos glicosilados ampliamente distribuidos en el reino vegetal y pueden ser divididos en tres grandes grupos: triterpenoides, esteroideos y alcaloides esteroideos glicosilados. Su mecanismo de acción es sobre la membrana afectando la integridad de las células fúngicas.[22]

La helenalina es el principal principio activo del *Árnica*. Es una lactona hidrofóbica que es obtenida a partir de flores de *A. montana* y de *A. chamissonis*, aunque se encuentra en otras Asteraceae y en otras plantas. Es un compuesto poco soluble en agua y con baja biodisponibilidad, por lo que estudios de tecnología farmacéutica son realizados con el fin de maximizar su eficacia. Es comprobado que posee actividad anticancerígena y antiinflamatoria. También, la helenalina y compuestos relacionados han mostrado actividad antibacteriana en bacterias Gram positivas y Gram negativas, antifúngica y antiparasitaria.

El efecto antiinflamatorio de helenalina es superior al de la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas, existiendo clara relación estructura-actividad. Este compuesto lleva el resto  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona que es esencial y además un anillo de ciclopentenona.[23]

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar las propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas de metabolitos secundarios de *Árnica Montana* obtenidos por extracción diferencial.

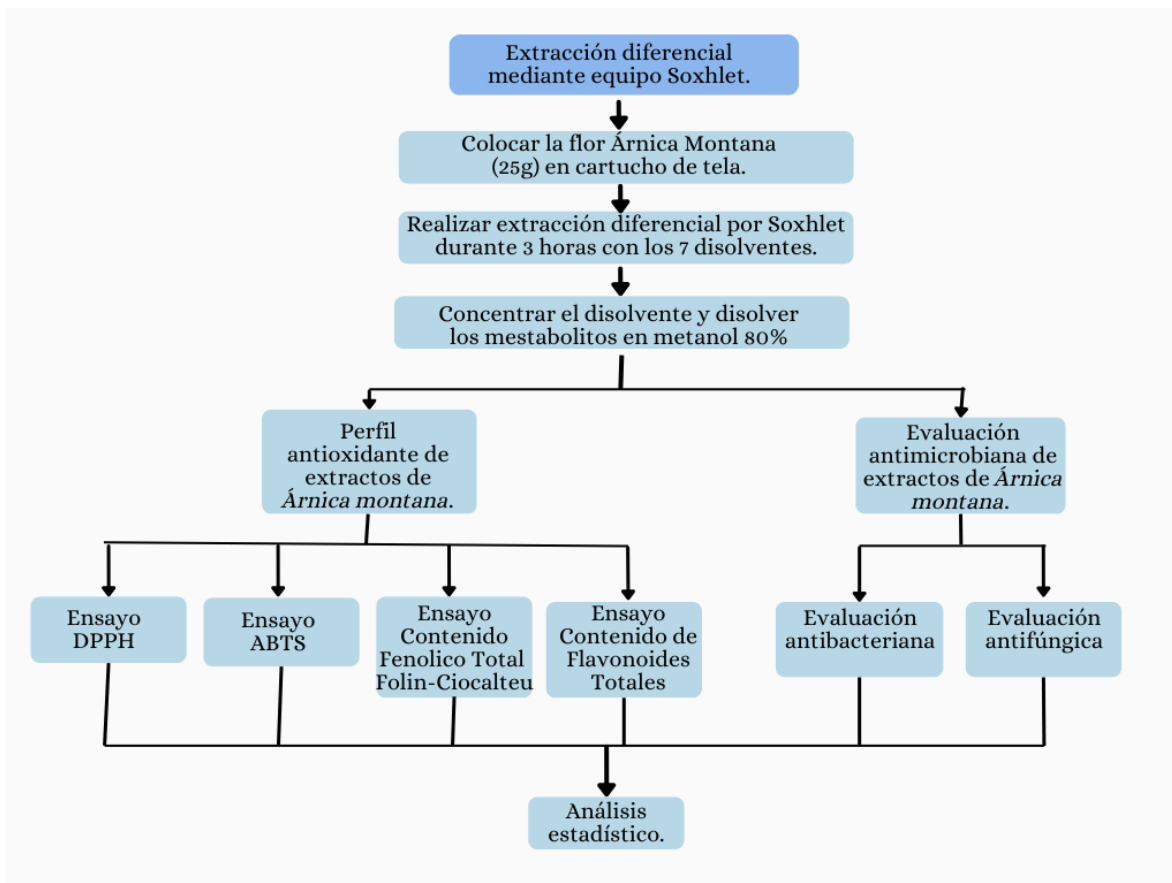
### Objetivos particulares

- Extraer diferencialmente los metabolitos secundarios de *Árnica mexicana* mediante equipo Soxhlet.
- Determinar el perfil antioxidante de extractos de *Árnica montana*.
- Determinar la capacidad antibacteriana de los extractos de *Árnica montana*.
- Determinar la capacidad antifúngica de los extractos de *Árnica montana*.

## METODOLOGÍA

### Diagrama de la metodología usada

En la figura de abajo se resume la metodología usada en cada una de las etapas del proyecto.



### Extracción diferencial mediante equipo Soxhlet

Se utilizó material vegetal seco de flor de *Arnica Montana*, contenido 500 g, Lote: F02-50521, hecho en México. B-Nature. La Herradura. Pachuca, Hgo.C.P.42082. En un cartucho de tela blanca se colocaron 25 g de flor seca de *Arnica montana* y se colocó en la cámara de extracción o cámara Soxhlet. Se le realizaron extracciones diferenciales por Soxhlet al cartucho pasando 7 disolventes de diferente polaridad, desde el menos polar hasta el más polar. Los disolventes utilizados en orden ascendente a su polaridad fueron los siguientes: hexano, acetato de etilo, dicloro metano, acetona, etanol, metanol, agua. Cada extracción tuvo una duración de aproximadamente 3 horas.

Al obtener los extractos, se procedió a realizar una destilación a presión reducida para eliminar el disolvente de cada uno en el equipo rotavapor, con excepción del extracto de agua, ya que en ese caso solamente se concentró. Se procedió a secar cada uno de los matraces para evaporar restos de agua retenidos en los extractos. Posteriormente, los matraces se

pesaron con el propósito de obtener una diferencia de pesos con respecto a los matraces vacíos previamente pesados. Los compuestos extraídos se retiraron y se disolvieron en metanol al 80% en una concentración de 0.1 mg/ml.

## Ensayo DPPH

El ensayo consistió en evaluar la captación de radicales libres de la flor *Árnica montana* mediante el ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y medir la actividad antioxidante de la planta. Se preparó 1 ml a dilución de 1:50 (solución madre/metanol 80%) para cada una de las respectivas soluciones madre de los 7 extractos. Esto debido a que la concentración de los extractos es demasiado alta para ser detectada en el lector de microplacas Accuris SmartReader MR-9600.

En una placa ELISA se colocó en cada pozo 25µl de cada muestra y adicionalmente una muestra blanco correspondiente al disolvente que se utilizó para los extractos (metanol al 80%) y un control positivo (25µl de ácido gálico 0.04 mg/mL). Posteriormente, a los posos con las muestras se les añadió 200µl de una solución de DPPH. Se incubó durante 40 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia con el lector de microplacas Accuris MR-9600 con un filtro de 492 nm. Se registraron los resultados de cada muestra y posteriormente se calculó el % de inhibición con la formula siguiente:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left( \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs extracto}}{\text{Abs blanco}} \right) \times 100$$

## Ensayo ABTS

Se preparo 1 ml con una dilución de 1:50 (solución madre/metanol 80%) para cada una de las respectivas soluciones madre de los 7 extractos, debido a que la concentración de los extractos es muy alta para ser detectada en el lector de microplacas Accuris SmartReader MR-9600. En una placa ELISA se colocó en cada pozo 20µl de cada muestra y adicionalmente una muestra blanco correspondiente al disolvente que se utilizó para los extractos (metanol al 80%) y un control positivo (20µl de ácido ascórbico 0.06 g/mL). Posteriormente, a los pozos con las muestras se les añadió 280µl del reactivo ABTS. Se incubó durante 30 minutos y se midió la absorbancia con el lector de microplacas Accuris MR-9600 con un filtro de 750nm. Se realizaron 3 repeticiones por triplicado.

Se registro los resultados de cada muestra y posteriormente se calcula el porcentaje de inhibición mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left( \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs extracto}}{\text{Abs blanco}} \right) \times 100$$

### Ensayo Contenido Fenolico Total Folin-Ciocalteu

Se preparo 1 ml con una dilución de 1:50 (solución madre/metanol 80%) para cada una de las respectivas soluciones madre de los 7 extractos. Dado que la concentración de los extractos es muy alta para ser detectada en el espectrofotómetro de UV-VIS VE-5600uv para medir la absorbancia a 760nm. En celdas de plástico se agregaron 150 µl de cada muestra, incluyendo celdas para el blanco (disolvente empleado en las muestras metanol 80%) y el control (estándar de ácido gálico 0.1 mg/ml). A cada celda se le agregaron, 2.25mL de agua destilada, 150 µl del reactivo de Folin homogeneizando y esperando de 1 a 8 minutos, para posteriormente adicionar 450µl de carbonato de sodio al 20%.

Se incubó durante 2 horas en oscuridad y posteriormente se utilizó el espectrofotómetro de UV-VIS VE-5600uv para medir la absorbancia a 760nm.

El contenido fenólico se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg EGA}}{\text{Kg Planta}} = \left( \frac{A + b}{m} \right) * \left( \frac{1}{\text{Concentración del extracto}} \right) * \left( \frac{\text{g extracto}}{\text{g planta}} \right) * 1000$$

### Ensayo Contenido de Flavonoides Totales

Se preparo 1 ml de dilución (solución madre/metanol 80%) para cada una de las respectivas soluciones madre de los 7 extractos, con las siguientes diluciones: para hexano 1:5, acetato de etilo 1:20, dicloro metano 1:5, acetona 1:50, etanol 1:50, metanol 1:50, agua 1:10. En tubos de ensayo se colocaron 4 ml de agua destilada y 1 ml de la muestra, además de tubos de ensayo para el blanco (metanol 80%) y un control (quercetina 0.1 mg/mL) pasando por vortex para homogenizar. A cada tubo se le agrego 300µl de nitrito de sodio 1M, y se homogenizó, una vez terminado el ultimo tubo se esperó 5 minutos. Se continuó adicionando a cada tubo 300µl de tricloruro de aluminio al 10% 1M, se homogenizó en vortex, una vez terminado el ultimo tubo se esperó 5 minutos. Se continuó adicionando a cada tubo 2 mL de hidróxido de sodio 1M, se homogenizó en vortex. Se aforó cada tubo a 10 ml, adicionándole 2.4 mL de agua destilada y se esperó 40 minutos de incubación en oscuridad. Posteriormente se depositó 3 ml de la reacción en una celda y se repitió el procedimiento con cada tubo. Se utilizó el espectrofotómetro de UV-VIS VE-5600uv para medir la absorbancia a 510 nm. El contenido de flavonoides totales se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{mg\ QE}{Kg\ Planta} = \left(\frac{A + b}{m}\right) * \left(\frac{1}{Concentración\ del\ extracto}\right) * \left(\frac{g\ extracto}{g\ planta}\right) * 1000$$

## Evaluación de la actividad antibacteriana de metabolitos secundarios

### Preparación y esterilización de los medios de cultivo

#### *Medio de cultivo Lb líquido.*

Para preparar los medios de cultivo Lb líquido para el sembrado de las 4 bacterias se utilizaron 12 ml en total de medio líquido, 3 ml por cada bacteria. En la formulación del medio indica que se requieren 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura, 10g/L de peptona de caseína y en este caso se utilizaron 0.12 g de NaCl, 0.06 g de extracto de levadura y 0.12 g de peptona de caseína, depositados en un tubo Falcón de 50 ml para su posterior esterilización en una autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente, se esperó a que se enfriara el medio y en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar se vertieron 3 ml de medio Lb líquido en 4 tubos Falcón de 15 ml y se inocularon las cepas de las 4 bacterias en cada uno de ellos. Se incubaron a 37 °C en una incubadora con agitación por 24 horas a 180 rpm, la cual sirve para favorecer el crecimiento de las bacterias en el medio líquido. El crecimiento bacteriano se pudo visualizar mediante la turbidez de los tubos Falcón.

#### *Medio de cultivo Lb sólido.*

La preparación de placas con el medio LB sólido se usaron 25 ml por cada placa de Petri y de acuerdo con la formulación se necesitaron 35 g de medio de cultivo solido Lb/litro de solución. Se usaron 12 placas, 3 para cada una de las bacterias y se requirió 10.5g de medio de cultivo sólido Lb para 300 ml de agua destilada depositados en un matraz Erlenmeyer de 500 ml para su posterior esterilización en una autoclave a 121 °C por 15 min. Se utilizaron círculos de papel filtros estériles con un diámetro de 6 mm para utilizarlos como sensidiscos para los extractos.

#### *Siembra y colocación de los extractos de Árnica Montana.*

Una vez preparados los medios de cultivo, tanto los líquidos con las bacterias inoculadas y las placas de Petri con el medio sólido, se continuo con la siembra de las bacterias. Se inocularon 150 µl de la cepa que se encuentran con crecimiento bacteriano de los tubos Falcón en las placas de Lb sólido, se realizó la siembra mediante el método de estriado masivo, se utilizó el mismo procedimiento para todas las cepas que se estuvieron trabajando. Terminado el estriado masivo de todas las placas, se colocaron 8 círculos de papel filtro

estériles con ayuda de unas pinzas estériles que previamente se esterilizaron en autoclave, posteriormente entre cada uso nos apoyamos con lámparas de alcohol para esterilizar la punta de la pinza al rojo vivo en la colocación de los círculos de papel filtro, formando un círculo alrededor de la placa Petri. Se impregnaron los círculos de papel filtro estériles con 8 µl de cada solución madre de los extractos, además de 8 µl para el blanco (metanol 80%), como control para cada placa de Petri se utilizaron fármacos de referencia (Discos BD BBL™ Sensi-Disc™ Imipenem 10 µg, Netilmicina 10 µg, Trimetoprima/Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg, Trimetoprima 5 µg) que se colocó en el centro de cada placa Petri. Al tener todos los sensidiscos con el extracto a probar en las placas, éstas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para asegurarse un óptimo crecimiento bacteriano. Pasado este tiempo se obtuvieron los resultados del crecimiento, midiendo los halos de inhibición con la ayuda de un calibrador vernier digital Steren HER-411 sobre un fondo negro.

### Evaluación antifúngica de metabolitos secundarios

Preparación y esterilización de los medios de cultivo.

#### *Medio de cultivo Lb líquido.*

En los medios de cultivo de Lb líquido para el crecimiento de las 3 cepas de hongos se utilizaron 9 ml en total, 3 ml por cada hongo. En la formulación del medio indica que se requieren 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura, 10g/L de peptona de caseína y en este caso se utilizaron solamente 0.09 g de NaCl, 0.045 g de extracto de levadura y 0.09 g de peptona de caseína, depositados en tubo Falcón de 50 ml para su posterior esterilización en una autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente, se esperó a que se enfriara el medio y en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, se vertieron 3 ml del medio Lb líquido en 3 tubos Falcón de 15 ml y se inocularon las cepas de los 3 hongos. Se incubaron en una incubadora de agitación por 24 horas a 37 °C y 180 rpm. El crecimiento se pudo apreciar mediante la turbidez de los tubos Falcón.

#### *Preparación de medio agar dextrosa y papa.*

Para la preparación de placas Petri con el medio agar dextrosa y papa se necesitaron aproximadamente 25 ml de agar por cada placa y de acuerdo con la formulación se necesitaron 39 g de agar para un litro de solución. Para nuestras pruebas se necesitaron 9 placas Petri, 3 para cada uno de los 3 hongos y se requirieron 8.775g de agar dextrosa y papa para 225 ml de agua destilada depositados en un matraz Erlenmeyer de 500 ml para su posterior esterilización en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se utilizaron círculos de papel filtro estériles con un diámetro de 6 mm para utilizarlos a manera de sensidiscos para nuestros extractos.

### *Siembra y colocación de los extractos de Árnica Montana.*

Una vez contando con los medios de cultivo, tanto los líquidos con los hongos inoculados y nuestras placas Petri con el medio sólidos, se continuó con la siembra de las cepas de hongos en las placas Petri. Se depositaron 200 µl de la cepa que se encuentran en el tubo Falcón en las placas de agar dextrosa y papa y se procedió a sembrar mediante el método estriado masivo con la misma punta de la micropipeta, así para los 3 hongos. Terminado el estriado masivo de todas las placas, se colocaron 8 círculos de papel filtro estériles con ayuda de unas pinzas estériles que previamente se esterilizaron en autoclave, posteriormente entre cada uso nos apoyamos con lámparas de alcohol para esterilizar la punta de la pinza al rojo vivo en la colocación de los círculos de papel filtro, formando un círculo alrededor de la placa Petri. Se impregnaron los círculos de papel filtro estériles con 10 µl de cada solución madre de los extractos, además de 10 µl para el blanco (metanol 80%), como control para cada placa de Petri se utilizaron fármacos de referencia (Itraconazol y Anfotericina b) que se colocó en el centro de cada placa Petri. Al tener todos los sensidiscos con los extractos a probar en las placas, éstas se incubaron a 28 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se leyeron los resultados del crecimiento de los halos de inhibición con la ayuda de un calibrador vernier digital Steren HER-411 sobre un fondo negro.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **Extracción diferencial por Soxhlet.**

El uso tradicional de *Árnica Montana* es muy diverso, sin embargo, muchas veces el uso de este es incorrecto o no se observa el efecto terapéutico esperado, esto puede deberse principalmente a la incorrecta técnica de extracción de los metabolitos secundarios, para lo cual se realizó extracción diferencial con disolventes en orden ascendente a la polaridad para separar estos metabolitos. En el proceso de extracción por Soxhlet, los metabolitos son transportados por el disolvente según su afinidad. Por ello, es fundamental utilizar varios disolventes con propiedades distintas para maximizar la extracción de compuestos. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la extracción diferencial en equipos Soxhlet, en el que se registraron la diferencia de los matraces vacíos y los matraces con los metabolitos obtenidos, mostrando diferencias significativas en el peso del extracto recuperado.

Tabla 1. Pesos obtenidos de extractos de *Árnica Montana* con respecto al disolvente utilizado por extracción diferencial en Soxhlet

| <b><i>Árnica Montana</i></b> |          |                           |   |      |
|------------------------------|----------|---------------------------|---|------|
| <b>Disolvente</b>            | <b>N</b> | <b>peso extracto ± SD</b> |   |      |
| <b>Hexano</b>                | 9        | 0.49                      | ± | 0.04 |
| <b>AcOEt</b>                 | 9        | 0.32                      | ± | 0.04 |
| <b>DCM</b>                   | 9        | 0.19                      | ± | 0.06 |
| <b>Acetona</b>               | 9        | 0.38                      | ± | 0.14 |
| <b>Etanol</b>                | 9        | 0.91                      | ± | 0.25 |
| <b>Metanol</b>               | 9        | 1.18                      | ± | 0.17 |
| <b>Agua</b>                  | 9        | 0.03                      | ± | 0.01 |

Con disolventes más polares, como etanol y metanol, resultó mayor cantidad de extracto, con valores de 0.91 g y 1.18 g con respecto a la media respectivamente. Esto sugiere que los metabolitos extraídos tienen mayor afinidad con disolventes de mayor polaridad. Por el contrario, con disolventes menos polares, como hexano y diclorometano, hubo menor cantidad de extracto recuperado, 0.49 g y 0.19 g, lo que indica que arrastraron compuestos menos polares. Este análisis sugiere la importancia de seleccionar el disolvente adecuado para lograr extracción eficiente de los metabolitos secundarios. Reforzando la idea de que una técnica de extracción inapropiada, especialmente si no se considera la polaridad de los disolventes, podría llevar a subóptima recuperación de los compuestos activos responsables de los efectos terapéuticos asociados al uso tradicional de *Árnica montana*.

### Ensayo por DPPH

El reactivo DPPH es una molécula de radical libre estable que se emplea para evaluar la capacidad antioxidante. Tiene la característica de aceptar un átomo de hidrógeno de moléculas antioxidantes, como los metabolitos secundarios que se encuentran en los extractos de las plantas analizadas.

Se evaluó la normalidad de la población con el fin de seleccionar la prueba estadística adecuada. Se determinó la normalidad mediante la prueba de normalidad de Anderson-Darling, la cual arrojó una  $p < 0.005$  indicando que los datos no pertenecen a una distribución normal como se muestra en la Figura 8. [24] Las gráficas muestran distribución no normal, por lo que se continuó el análisis con prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann Whitney.

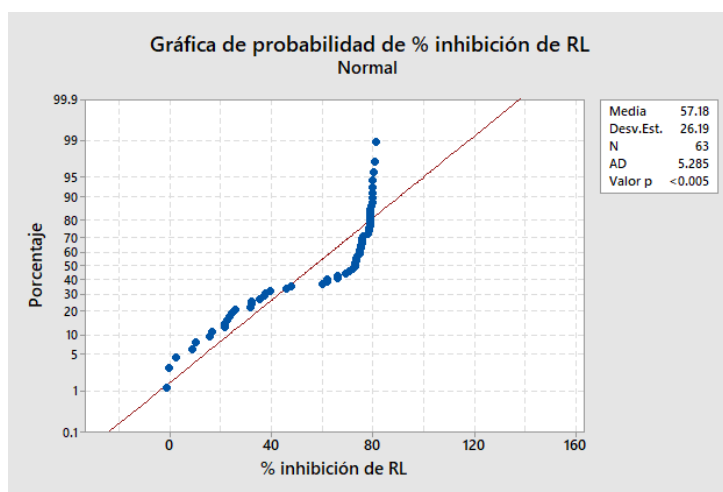


Figura 8. Gráficas de normalidad del porcentaje de inhibición.

La actividad antioxidante DPPH para los extractos de *Árnica montana* en diversos disolventes tuvieron diferencias significativas en la actividad antioxidante según el disolvente utilizado. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para comparar los porcentajes de inhibición entre los disolventes. Los resultados evidencian diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre ellos como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney del porcentaje de % inhibición de RL vs. Solventes

| Disolvente | N  | Mediana | Clasificación de medias | Valor Z | Agrupación |   |   |
|------------|----|---------|-------------------------|---------|------------|---|---|
| Acetona    | 9  | 79.6085 | 49.9                    | 3.17    | A          |   |   |
| Metanol    | 9  | 78.9318 | 46.7                    | 2.60    | A          |   |   |
| Etanol     | 9  | 77.7933 | 43.7                    | 2.07    | A          |   |   |
| AcOEt      | 9  | 74.8777 | 38.9                    | 1.23    | A          |   |   |
| Agua       | 9  | 60.0834 | 22.2                    | -1.73   |            | B |   |
| Hexano     | 9  | 31.9832 | 15.7                    | -2.89   |            | B |   |
| DCM        | 9  | 15.7821 | 6.8                     | -4.46   |            |   | C |
| General    | 63 |         | 32.0                    |         |            |   |   |

Según las medianas y el valor Z, los disolventes se agrupan en tres categorías principales basadas en su eficacia antioxidante:

Grupo A (alta actividad): En el cual se encuentran los extractos de Acetona, Metanol, Etanol y AcOET (Acetato de etilo) con medianas de inhibición de aproximadamente 70%. Con acetona tiene el valor Z más alto (3.17) indicando que presenta la mayor inhibición relativa vs los demás solventes. En estas comparaciones, no se encontraron diferencias significativas, lo que indica que la acetona tuvo capacidad inhibidora similar a la de AcOEt, etanol, y metanol.

Grupo B (actividad media): agua y hexano, como se puede observar en la Figura 9, parece que el agua tiene mayor capacidad de inhibición que hexano (según las medianas), el valor  $p = 0.093$  indica que esta diferencia no es estadísticamente significativa al nivel de significancia estadística del 5%.

Grupo C (baja actividad): DCM (diclorometano) tiene valor Z bajo (-4.46), lo que indica que presenta inhibición significativamente menor. En todas las comparaciones, los valores probabilidad son menores a 0.05, lo que indica que DCM tiene capacidad de inhibición significativamente diferente (inferior según los datos de la prueba de Kruskal-Wallis) en comparación con todos los demás solventes. Esto sugiere que DCM es menos eficaz en la inhibición de radicales libres (DPPH) en comparación con los otros solventes evaluados.

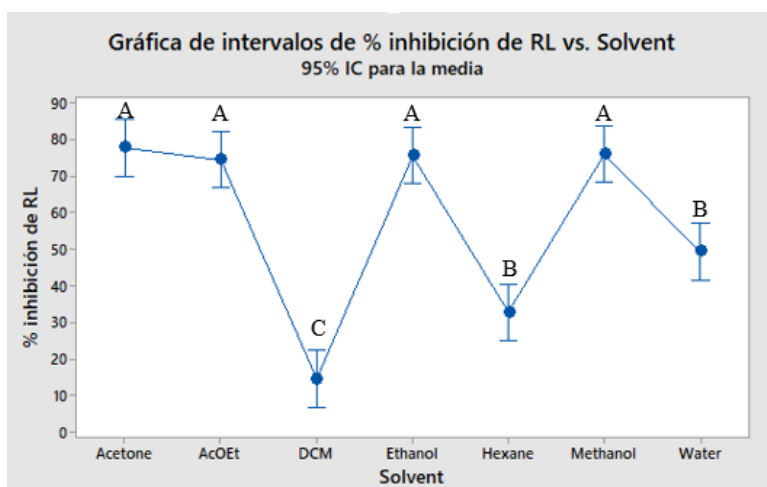


Figura 9. Porcentaje de inhibición de DPPH con respecto al disolvente.

Estos resultados sugieren que los disolventes polares (como Acetona y AcOET) promueven mayor actividad antioxidante vs los menos polares como el hexano.

## Ensayo ABTS

Se realizó la prueba de capacidad antioxidante basada en la capacidad de los antioxidantes para eliminar el radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) para los 7 extractos de *Arnica montana* en sus disolventes de diferente polaridad (hexano, acetona, diclorometano, acetona, etanol, metanol y agua). Para el análisis de los resultados se determinó la normalidad de la población, para posteriormente determinar la prueba estadística apropiada. Se determinó la normalidad mediante la prueba de normalidad de Anderson-Darling, la cual arrojó una  $p < 0.005$  indicando que los datos no pertenecen a una distribución normal como se muestra en la Figura 10. Las gráficas muestran distribución no normal por lo que se continúa el análisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann Whitney.

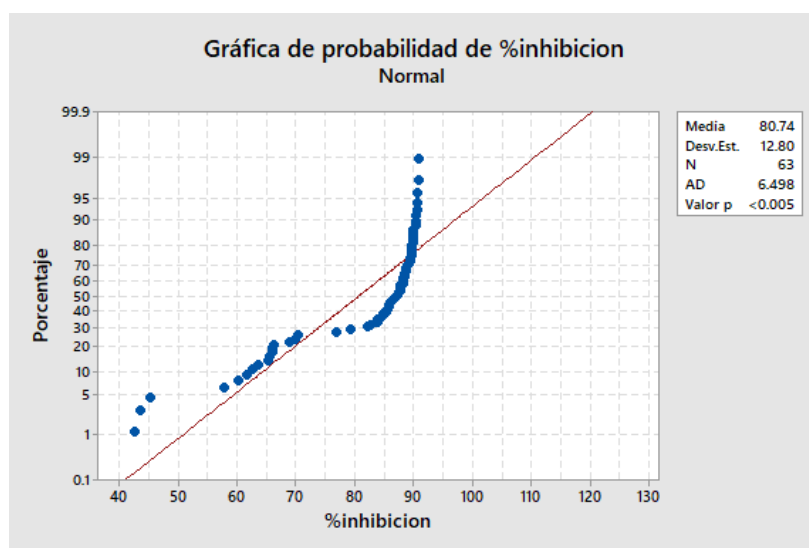


Figura 10. Gráficas de normalidad del porcentaje de inhibición de la prueba ABTS

La distribución de los datos indica que la prueba de normalidad de Anderson-Darling arrojó un valor de  $p < 0.005$  como se muestra en la Figura 10, indica que los datos no tienen distribución normal. Esto llevó a utilizar pruebas estadísticas no paramétricas.

El análisis de los resultados de la prueba ABTS para los extractos de *Arnica montana* en diversos disolventes, muestra que existen diferencias significativas en la actividad antioxidante según el disolvente utilizado.

Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los porcentajes de inhibición entre los disolventes. Los resultados evidencian diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre ellos.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del radical ABTS vs. Solventes. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney

| Disolvente | N  | Mediana | Clasificación de medias | Valor Z | Agrupación |   |   |
|------------|----|---------|-------------------------|---------|------------|---|---|
| Acetona    | 9  | 89.5582 | 46.6                    | 2.57    | A          |   |   |
| AcOET      | 9  | 89.4257 | 48.0                    | 2.83    | A          |   |   |
| Etanol     | 9  | 88.8376 | 44.0                    | 2.12    | A          |   |   |
| Metanol    | 9  | 88.6908 | 42.8                    | 1.91    | A          |   |   |
| Hexano     | 9  | 84.5941 | 23.7                    | -1.47   |            | B |   |
| DCM        | 9  | 65.9594 | 10.4                    | -3.81   |            |   | C |
| Agua       | 9  | 63.4458 | 8.6                     | -4.14   |            |   | C |
| General    | 63 |         | 32.0                    |         |            |   |   |

Según las medianas y el valor Z, los disolventes se agrupan en tres categorías principales basadas en su eficacia antioxidante:

Grupo A (alta actividad): En el cual se encuentran los extractos de acetona, AcOET (acetato de etilo), etanol y metanol con medianas de inhibición cercanas a 89%.

Grupo B (actividad media): hexano, con la mediana de 84.59% y con valores p menores a 0.05, lo que indica que tienen una capacidad de inhibición significativamente diferente en comparación con todos los demás solventes.

Grupo C (baja actividad): Los extractos diclorometano (DCM) y agua, con medianas de inhibición significativamente menores y en todas las comparaciones, los valores p son menores a 0.05, lo que indica que tienen una capacidad de inhibición significativamente diferente en comparación con todos los demás solventes. Al comparar (DCM) y agua se obtuvo un p valor de 0.480 indicando que esta diferencia no es estadísticamente significativa al nivel de significancia del 5%.

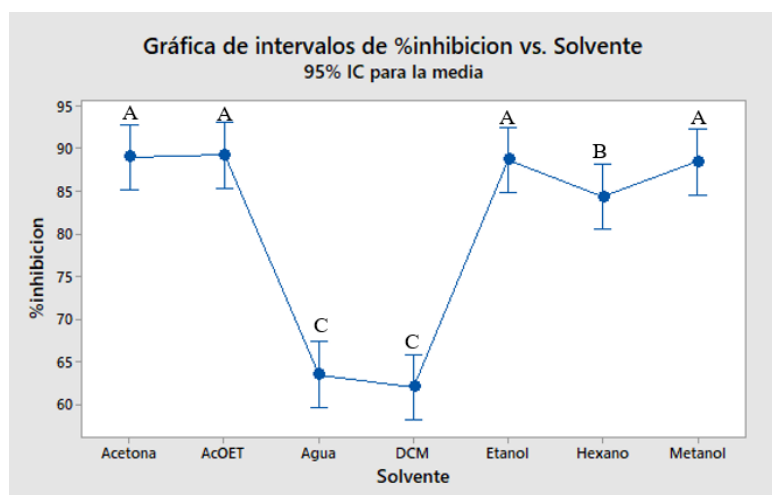


Figura 11. Gráfica del porcentaje de inhibición de la prueba ABTS

### Resultados del ensayo contenido fenólico total Folin-Ciocalteu

Se realizó el análisis de la determinación del contenido fenólico total para los 7 extractos de *Árnica montana* en sus disolventes de diferente polaridad (hexano, acetona, diclorometano, acetona, etanol, metanol y agua).

Para el análisis de los resultados se determinó la normalidad de la población, para posteriormente determinar que prueba estadística se realizaría. Se determinó la normalidad mediante la prueba de normalidad de Anderson-Darling, la cual arrojó una  $p < 0.005$  indicando que los datos no pertenecen a una distribución normal como se muestra en la Figura 12. Las gráficas muestran distribución no normal por lo que se continúa el análisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann Whitney.

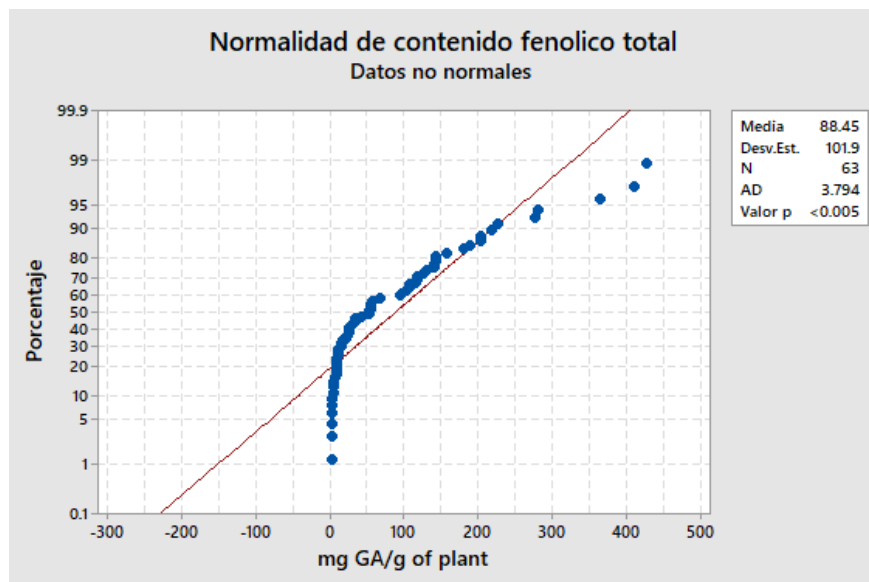


Figura 12. Gráficas de normalidad del Contenido de compuestos fenólicos totales

La prueba para contenido fenólico total de los extractos de *Arnica montana* en diversos disolventes muestra que existen diferencias significativas en la actividad antioxidante según el disolvente utilizado.

Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para comparar los resultados obtenidos de los extractos. Los resultados evidencian diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre ellos como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Contenido fenólico total vs. disolventes. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

| Disolvente | N  | Mediana | Clasificación de medias | Valor Z | Agrupación |   |   |   |
|------------|----|---------|-------------------------|---------|------------|---|---|---|
| Agua       | 9  | 274.696 | 55.1                    | 4.09    | A          |   |   |   |
| Etanol     | 9  | 138.802 | 47.6                    | 2.75    |            | B |   |   |
| Metanol    | 9  | 95.628  | 43.4                    | 2.02    |            | B |   |   |
| Acetona    | 9  | 54.631  | 33.0                    | 0.18    |            | B |   |   |
| AcOEt      | 9  | 24.110  | 23.6                    | -1.49   |            |   | C |   |
| Hexano     | 9  | 9.475   | 16.0                    | -2.83   |            |   |   | D |
| DCM        | 9  | 2.085   | 5.3                     | -4.71   |            |   |   | E |
| General    | 63 |         | 32.0                    |         |            |   |   |   |

Grupo A (mayor contenido fenólico total): el agua presentó el contenido fenólico más alto, con mediana de 274.696 mg GA/g, indicando que los compuestos fenólicos son más solubles en este disolvente polar.

Grupo B (contenido fenólico moderado): en este grupo encontramos etanol, metanol y acetona, con medianas de 138.802, 95.628 y 54.631 mg GA/g, respectivamente, mostrando una buena capacidad para extraer compuestos fenólicos, aunque menos que el agua.

Grupo C, D, E (bajo contenido fenólico): acetato de etilo (AcOEt) mostró un contenido fenólico reducido (24.110 mg GA/g). Si bien es menos polar, aún tiene cierta capacidad para extraer compuestos fenólicos, hexano tuvo un valor bajo (9.475 mg GA/g), indicando que este disolvente apolar no es eficaz para extraer compuestos fenólicos. Diclorometano (DCM) mostró el contenido fenólico más bajo con 2.085 mg GA/g, lo que confirma su limitada capacidad para extraer compuestos fenólicos.

Los resultados sugieren que los compuestos fenólicos de *Arnica montana* son más solubles en disolventes polares, con agua siendo el más eficaz. Disolventes apolares como hexano y diclorometano tienen capacidad mínima para extraer estos compuestos como se puede ver en la Figura 13.

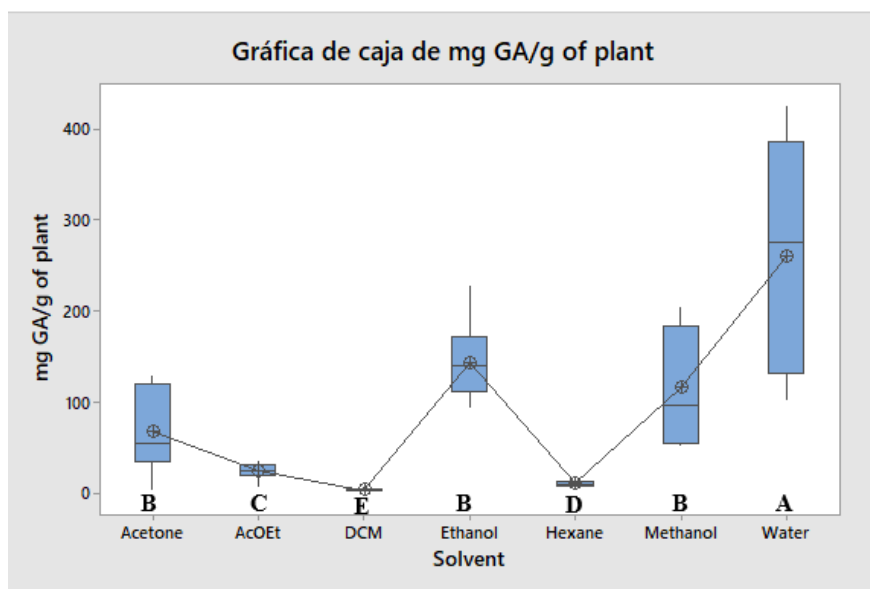


Figura 13. Contenido fenólico total mg GA/g de panta con respecto a los disolventes

Los disolventes polares como agua, metanol, etanol y acetona extraen más compuestos fenólicos y muestran mayor actividad antioxidante en DPPH y ABTS. Metanol y etanol aparecen en los tres métodos con valores relativamente altos, lo que indica que extraen

compuestos fenólicos con buena actividad antioxidante. Hexano y diclorometano (DCM) tienen bajos valores en estas pruebas, lo que sugiere que estos disolventes no extraen bien los compuestos fenólicos ni otros antioxidantes efectivos.

## Resultados del ensayo de contenido de flavonoides totales

Se realizó el análisis de la determinación del contenido de flavonoides totales para los 7 extractos de *Arnica montana* en sus disolventes de diferente polaridad (hexano, acetona, diclorometano, acetona, etanol, metanol y agua). Para el análisis de los resultados se determinó la normalidad de la población, para posteriormente determinar que prueba estadística se realizaría. Se determinó la normalidad mediante la prueba de normalidad de Anderson-Darling, la cual arrojó una  $p < 0.005$  indicando que los datos no pertenecen a una distribución normal como se muestra en la Figura 14, que muestran una distribución no normal.

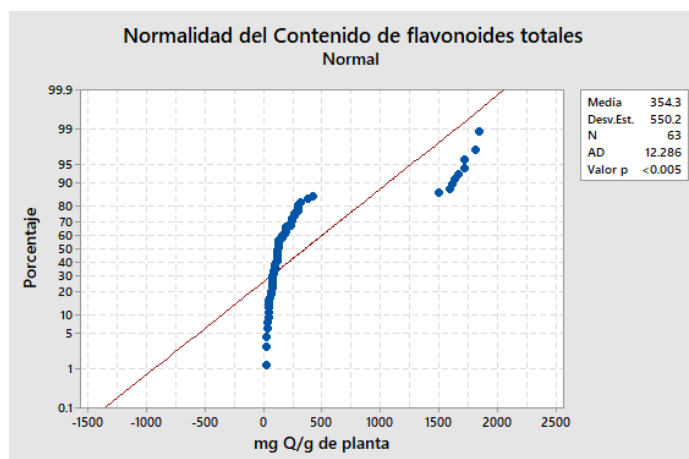


Figura 14. Gráficas de normalidad del contenido de flavonoides totales

Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para comparar los resultados entre los distintos disolventes. Los resultados evidencian diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre ellos como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney del contenido de flavonoides totales mg Q/kg de planta con respecto a los disolventes.

| Disolvente | N  | Mediana | Clasificación de medias | Valor Z | Agrupación |   |   |   |
|------------|----|---------|-------------------------|---------|------------|---|---|---|
| Agua       | 9  | 1664.07 | 59.0                    | 4.77    | A          |   |   |   |
| Metanol    | 9  | 290.48  | 49.6                    | 3.10    |            | B |   |   |
| Etanol     | 9  | 186.11  | 40.8                    | 1.55    |            |   | C |   |
| Acetona    | 9  | 114.10  | 26.6                    | -0.96   |            |   |   | D |
| Hexano     | 9  | 96.79   | 23.9                    | -1.43   |            |   |   | D |
| DCM        | 9  | 69.65   | 18.4                    | -2.40   |            |   |   | D |
| AcOEt      | 9  | 34.41   | 5.8                     | -4.64   |            |   |   | E |
| General    | 63 |         | 32.0                    |         |            |   |   |   |

Grupo A (mayor contenido de flavonoides): Agua presentó el contenido más alto de flavonoides totales, con una mediana de 1664.07 mg Q/g, destacándose como el disolvente más efectivo para extraer estos compuestos.

Grupo B (contenido moderado): Metanol tuvo una mediana de 290.48 mg Q/g, mostrándose como el segundo disolvente más eficiente, aunque significativamente menor en comparación con el agua.

Grupo C (contenido intermedio-bajo): Etanol, con una mediana de 186.11 mg Q/g, mostró una capacidad moderada para extraer flavonoides.

Grupo D (bajo contenido de flavonoides): Acetona, hexano y diclorometano (DCM) presentaron medianas de 114.10 mg Q/g, 96.79 mg Q/g y 69.65 mg Q/g, respectivamente. Estos disolventes fueron menos efectivos para extraer flavonoides en comparación con los grupos anteriores.

Grupo E (Menor contenido de flavonoides): Acetato de etilo (AcOEt) mostró el contenido de flavonoides más bajo, con una mediana de 34.41 mg Q/g.

El agua es el disolvente óptimo para maximizar la extracción de flavonoides totales, seguido por metanol y etanol, que también presentan buena capacidad extractiva. Disolventes menos polares como acetona, hexano, DCM y AcOEt tienen una capacidad significativamente menor para extraer flavonoides, lo que limita su efectividad para este fin, como se puede ver en la Figura 15. Si bien no todos los fenoles extraídos son flavonoides, estos muestran una proporción importante. Otros fenoles presentes pueden ser taninos o ácidos fenólicos.

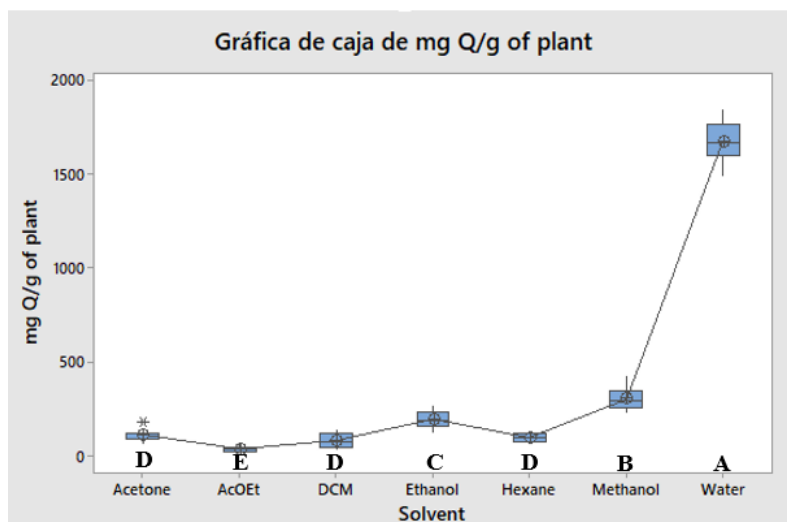


Figura 15. Contenido de flavonoides totales mg Q/g de panta con respecto a los disolventes.

## Resultados del ensayo de evaluación antibacteriana

Se realizó la evaluación antibacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, dos Gram positivas y dos Gram negativas para los 7 extractos de *Árnica montana* en sus disolventes de diferente polaridad (hexano, acetona, diclorometano, acetona, etanol, metanol y agua) con el objetivo de determinar cuáles de estos 7 extractos de *Árnica Montana* presentan propiedades para inhibir el crecimiento microbiano.

A continuación, se presentan los resultados para cada una de estas bacterias.

### *Staphylococcus aureus*

Para *Staphylococcus aureus* se utilizó el método estadístico de Tukey con un nivel de confianza del 95%, lo cual permite identificar diferencias significativas entre las medias de inhibición de cada disolvente. Tabla 6

Tabla 6. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* por extractos de *Arnica montana*.

| <b>Disolventes</b> | <b>N</b> | <b>Media</b> | <b>Agrupación</b> |   |   |
|--------------------|----------|--------------|-------------------|---|---|
| <b>Hexano</b>      | 3        | 1.589        | A                 |   |   |
| <b>DCM</b>         | 3        | 1.5333       | A                 |   |   |
| <b>AcOEt</b>       | 3        | 1.211        | A                 | B |   |
| <b>Acetona</b>     | 3        | 0.544        | A                 | B | C |
| <b>Metanol</b>     | 3        | 0.4444       | A                 | B | C |
| <b>Etanol</b>      | 3        | 0.3222       | B                 |   | C |
| <b>Agua</b>        | 3        | 0.000000     | C                 |   |   |

En el caso de *Staphylococcus aureus*, los disolventes se agruparon en tres niveles de efectividad:

Grupo A: En este grupo se encuentra hexano y diclorometano, que mostraron los mayores valores promedio de inhibición (1.589 y 1.5333, respectivamente), indicando un efecto inhibitorio relativamente alto. La tabla sugiere que solo los disolventes hexano y diclorometano tienen diferencias significativas respecto a otros disolventes menos efectivos.

Grupo A y B: Los resultados muestran que el extracto acetato de etilo, acetona y metanol, que comparten letras con otros grupos, indicando una efectividad intermedia. Estos solventes tienen un efecto inhibitorio que, aunque es menor que el de hexano y diclorometano, aún es significativo.

Grupo B y C: Incluye etanol y agua, con actividad inhibitoria (media de 0) indicando que el agua no mostró actividad inhibitoria. Este grupo tiene la menor capacidad de inhibición.

Esta agrupación nos permite concluir que los disolventes apolares son más adecuados para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Figura 16

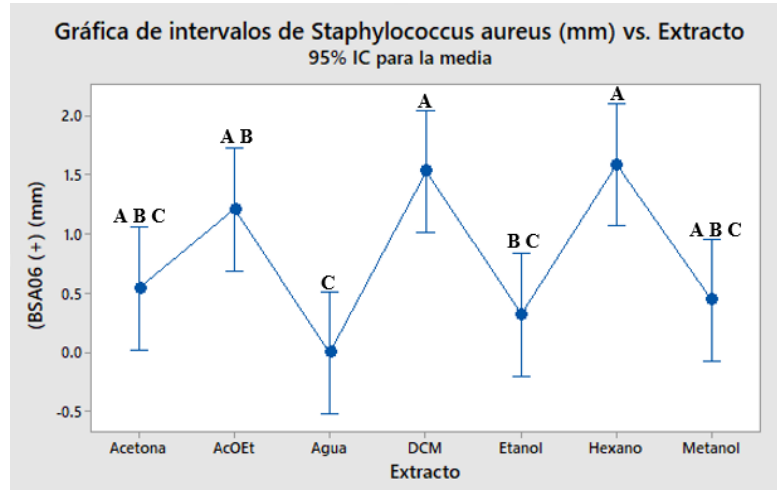


Figura 16. Inhibición de halos (mm) en *Staphylococcus aureus* por extractos de *Árnica Montana* a concentración 0.1 mg/ml

### *Enterococcus faecalis*

Para *Enterococcus faecalis* se utilizó el método estadístico de Tukey con un nivel de confianza del 95%, lo cual permite identificar diferencias significativas entre las medias de inhibición de cada disolvente.

Tabla 7. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* por extractos de *Árnica montana*.

| Disolventes | N | Media    | Agrupación |
|-------------|---|----------|------------|
| AcOEt       | 3 | 1.4222   | A          |
| DCM         | 3 | 1.211    | A B        |
| Hexano      | 3 | 1.111    | A B        |
| Acetona     | 3 | 0.5444   | B C        |
| Etanol      | 3 | 0.2111   | C          |
| Metanol     | 3 | 0.1222   | C          |
| Agua        | 3 | 0.000000 | C          |

Para *Enterococcus faecalis*, los disolventes se agruparon en tres niveles de efectividad:

Grupo A: Incluye el acetato de etilo, que obtuvo la media de inhibición más alta (1.4222 mm), lo que sugiere que este disolvente es el más efectivo en inhibir *Enterococcus faecalis*.

Grupo A y B: El diclorometano y hexano están en esta agrupación, compartiendo parcialmente letras con otros grupos. Esto indica que tienen una efectividad significativa, aunque ligeramente menor que el acetato de etilo.

Grupo B y C: Incluye la acetona, que se ubica en un nivel intermedio de efectividad.

Grupo C: Este grupo lo conforman etanol, metanol y agua, que tienen los valores de inhibición más bajos. Específicamente, el agua muestra un valor de 0 mm, indicando que no inhibe el crecimiento de la bacteria.

Esta agrupación nos permite concluir que *Enterococcus faecalis*, una bacteria Gram positiva, responde mejor a los extractos de *Árnica montana* en solventes de polaridad intermedia a baja, lo cual sugiere que los componentes bioactivos responsables de la inhibición son más solubles en estos tipos de solventes. Figura 17

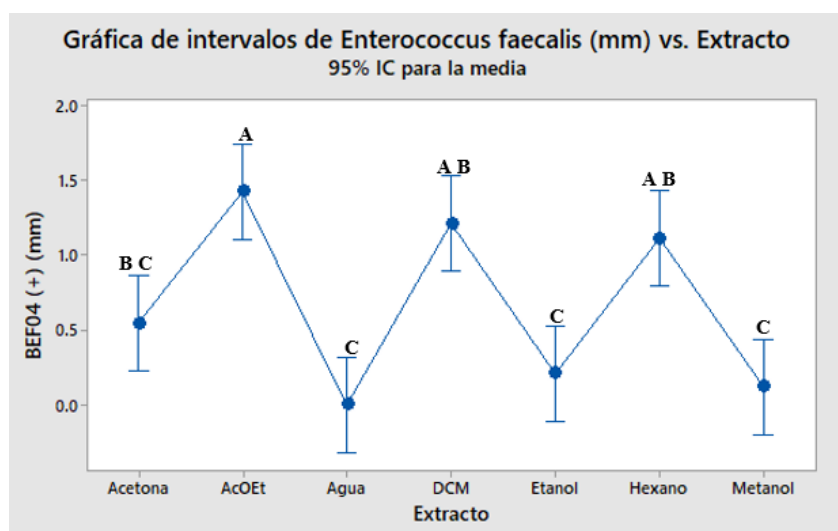


Figura 17. Inhibición de halos (mm) en *Enterococcus faecalis* por extractos de *Árnica Montana* a concentración 0.1 mg/mL

### *Escherichia coli*

Para *Escherichia coli* también se utilizó el método estadístico de Tukey con un nivel de confianza del 95%, para identificar diferencias significativas entre las medias de inhibición de cada disolvente.

## Tabla 8

Tabla 8. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de *Escherichia coli* por extractos de *Árnica montana*

| <b>Disolventes</b> | <b>N</b> | <b>Media</b> | <b>Agrupación</b> |   |   |
|--------------------|----------|--------------|-------------------|---|---|
| <b>DCM</b>         | 3        | 0.700        | A                 |   |   |
| <b>Hexano</b>      | 3        | 0.5444       | A                 | B |   |
| <b>AcOEt</b>       | 3        | 0.511        | A                 | B | C |
| <b>Etanol</b>      | 3        | 0.4222       | A                 | B | C |
| <b>Acetona</b>     | 3        | 0.3333       | A                 | B | C |
| <b>Metanol</b>     | 3        | 0.0889       |                   | B | C |
| <b>Agua</b>        | 3        | 0.000000     |                   |   | C |

Para *Escherichia coli*, los disolventes se agruparon en tres niveles de efectividad:

Grupo A: El diclorometano obtuvo la media más alta de inhibición (0.700 mm), colocándose como el disolvente más efectivo para inhibir *E. coli*.

Grupo A y B: Aquí encontramos el hexano, acetato de etilo, etanol y acetona. Al compartir letras con otros grupos, estos disolventes muestran una efectividad intermedia, aunque estadísticamente no tan distinta de la efectividad del diclorometano.

Grupo B y C: Metanol y agua presentan los valores más bajos de inhibición, con el agua mostrando una inhibición de 0 mm, lo que indica que no tiene efecto inhibitorio sobre *E. coli*.

Para *E. coli*, el diclorometano resulta ser el disolvente más efectivo, mientras que los solventes más polares como el metanol y el agua presentan poca o ninguna capacidad de inhibición Figura 18. Esto sugiere que los compuestos activos de *Árnica montana* que afectan a *E. coli* son más solubles en disolventes de polaridad intermedia a baja. Además, estos resultados indican que la susceptibilidad de *E. coli*, una bacteria Gram negativa, es menor en comparación con otras bacterias en presencia de los mismos disolventes.

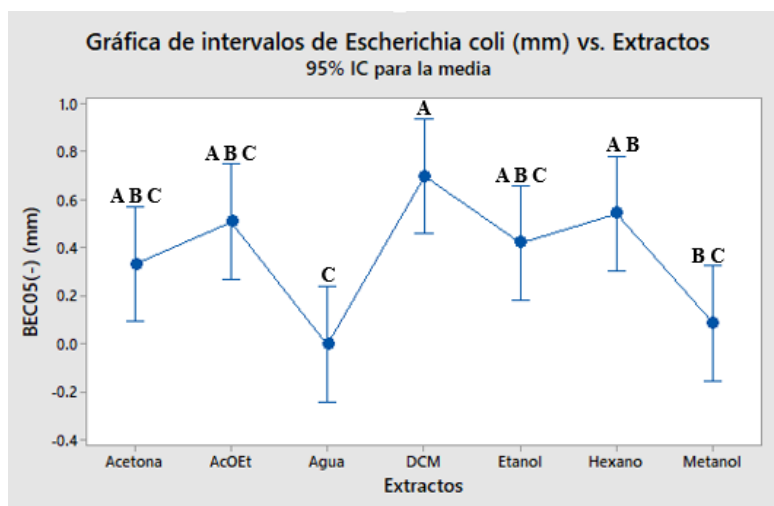


Figura 18. Gráfica de Inhibición de halos (mm) en *Escherichia coli* por extractos de *Árnica montana* a concentración 0.1 mg/mL

### *Pseudomona aeruginosa*

Para *Pseudomona aeruginosa* también se utilizó el método estadístico de Tukey con un nivel de confianza del 95%, para identificar diferencias significativas entre las medias de inhibición de cada disolvente, pero, a diferencia de otras bacterias, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los solventes. Esto significa que los valores de inhibición obtenidos no presentan una variación lo suficientemente marcada como para establecer grupos distintos de efectividad. Tabla 9.

Tabla 9. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de *Pseudomona aeruginosa* por extractos de *Árnica montana*.

| Disolvente | N | Media    | Agrupación |
|------------|---|----------|------------|
| AcOEt      | 3 | 0.811    | A          |
| DCM        | 3 | 0.722    | A          |
| Hexano     | 3 | 0.489    | A          |
| Metanol    | 3 | 0.2222   | A          |
| Etanol     | 3 | 0.0778   | A          |
| Acetona    | 3 | 0.0444   | A          |
| Agua       | 3 | 0.000000 | A          |

Todos los disolventes, incluyendo acetato de etilo, diclorometano, hexano, metanol, etanol y acetona, comparten la misma letra en la agrupación ("A"), indicándonos que no existen diferencias significativas entre ellos en términos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*.

Aunque hay pequeñas variaciones en las medias de inhibición (con el acetato de etilo siendo el más alto con 0.811 mm y el agua mostrando 0 mm), estas diferencias no son estadísticamente relevantes.

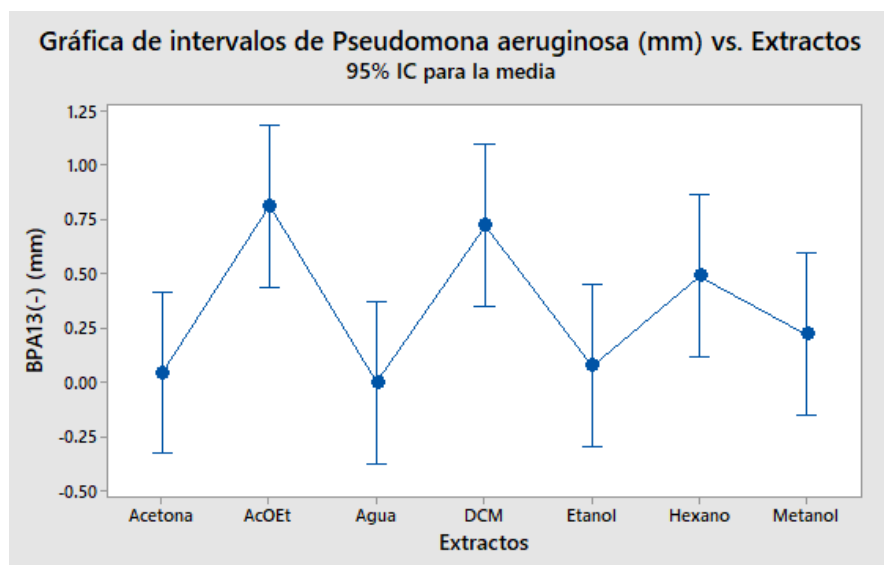


Figura 19. Gráfica de Inhibición de halos (mm) en *Pseudomona aeruginosa* por extractos de *Árnica montana* a concentración 0.1 mg/mL

Tabla 10. Inhibición de halo (mm) en bacterias por extractos de *Árnica Montana* a concentración 0.1 mg/mL

| Halos de inhibición <i>Árnica Montana</i> (mm) |                              |          |                              |          |                         |          |                              |          |
|--|------------------------------|----------|------------------------------|----------|-------------------------|----------|------------------------------|----------|
| Bacterias                                      | <i>Staphylococcus aureus</i> |          | <i>Enterococcus faecalis</i> |          | <i>Escherichia coli</i> |          | <i>Pseudomona aeruginosa</i> |          |
|  | Media                        | Des.ves. | Media                        | Des.ves. | Media                   | Des.ves. | Media                        | Des.ves. |
| Hexano   | <b>1.59</b>                  | 0.87     | <b>1.11</b>                  | 0.54     | <b>0.54</b>             | 0.15     | <b>0.49</b>                  | 0.44     |
| AcOEt  | <b>1.21</b>                  | 0.98     | <b>1.42</b>                  | 0.24     | <b>0.51</b>             | 0.58     | <b>0.81</b>                  | 0.83     |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>                | <b>1.53</b>                  | 0.46     | <b>1.21</b>                  | 0.58     | <b>0.70</b>             | 0.61     | <b>0.72</b>                  | 0.32     |
| Acetona  | <b>0.54</b>                  | 0.42     | <b>0.54</b>                  | 0.54     | <b>0.33</b>             | 0.37     | <b>0.04</b>                  | 0.09     |
| Etanol   | <b>0.32</b>                  | 0.14     | <b>0.21</b>                  | 0.18     | <b>0.42</b>             | 0.12     | <b>0.08</b>                  | 0.08     |
| Metanol  | <b>0.44</b>                  | 0.26     | <b>0.12</b>                  | 0.13     | <b>0.09</b>             | 0.11     | <b>0.22</b>                  | 0.21     |
| Agua   | <b>0.00</b>                  | 0.00     | <b>0.00</b>                  | 0.00     | <b>0.00</b>             | 0.00     | <b>0.00</b>                  | 0.00     |

La Tabla 10 presenta los halos de inhibición (medidos en mm) para cada disolvente en las cuatro bacterias estudiadas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cada celda muestra la media y desviación estándar del halo de inhibición, para comparar la efectividad de los disolventes en cada bacteria.

Hexano: Presenta halos de inhibición más altos en *Staphylococcus aureus* (1.59 mm) y *Enterococcus faecalis* (1.11 mm), pero menor efecto en *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Acetato de Etilo (AcOEt): Tiene una efectividad alta contra *Enterococcus faecalis* (1.42 mm) siendo también efectivo en *Staphylococcus aureus* (1.21 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (0.81 mm).

Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): Es efectivo en las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *E. coli*, con un halo máximo de 1.53 mm en *Staphylococcus aureus*.

Acetona, Etanol y Metanol: Muestran halos menores en general, con la acetona presentando algunos efectos limitados en *E. coli* (0.33 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (0.04 mm).

Agua: No muestra ningún halo de inhibición (0 mm) en todas las bacterias, indicando que no posee efectos antibacterianos.

Los resultados de esta tabla sugieren que los disolventes menos polares como el hexano, acetato de etilo y diclorometano son generalmente más efectivos para inhibir bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*). Los disolventes de polaridad intermedia muestran una efectividad limitada en las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). El agua, sin actividad inhibitoria, refuerza que los compuestos activos de *Árnica montana* requieren disolventes de baja a moderada polaridad para mostrar efectos antibacterianos.

### Actividad antifúngica

Se realizó la evaluación antifúngica de tres hongos (*Geotrichum spp*, *Trichoderma spp* y *Candida albicans*), para los 7 extractos de *Árnica montana* en sus disolventes de diferente polaridad (Hexano, Acetona, Diclorometano, Acetona, Etanol, Metanol y Agua) con el objetivo de determinar cuáles de estos 7 extractos de *Árnica Montana* presentan propiedades para inhibir el crecimiento fúngico.

A continuación, se presentan los resultados para cada uno de estos hongos.

#### *Geotrichum spp.*

En el análisis antifúngico para *Geotrichum spp.* se utilizó el método de Tukey al 95% de confianza para agrupar los disolventes según su efectividad inhibitoria en función de los halos de inhibición.

Tabla 11

Tabla 11. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antifúngica de *Geotrichum spp.* por extractos de *Árnica montana*.

| <b>Disolvente</b> | <b>N</b> | <b>Media</b> | <b>Agrupación</b> |   |
|-------------------|----------|--------------|-------------------|---|
| <b>Hexano</b>     | 3        | 1.156        | A                 |   |
| <b>AcOEt</b>      | 3        | 0.767        | A                 | B |
| <b>DCM</b>        | 3        | 0.100        | A                 | B |
| <b>Metanol</b>    | 3        | 0.000000     | B                 |   |
| <b>Etanol</b>     | 3        | 0.000000     | B                 |   |
| <b>Agua</b>       | 3        | 0.000000     | B                 |   |
| <b>Acetona</b>    | 3        | 0.000000     | B                 |   |

Grupo A: El hexano tiene la media más alta de inhibición (1.156 mm), lo cual lo posiciona como el disolvente más efectivo contra *Geotrichum spp.*

Grupo A y B: Incluye acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano (DCM), que también muestran actividad inhibidora, aunque menor que el hexano.

Grupo B: El resto de los disolventes (metanol, etanol, agua y acetona) tienen medias de 0 mm, lo que indica que no mostraron actividad inhibitoria contra *Geotrichum spp.*

El análisis muestra que *Geotrichum spp.* es susceptible principalmente a extractos de *Árnica montana* disueltos en hexano, seguido de acetato de etilo y diclorometano. Los disolventes polares como el metanol, etanol, agua y acetona no lograron inhibir su crecimiento, lo cual sugiere que los compuestos activos antifúngicos de *Árnica montana* son más solubles en disolventes de baja polaridad. Esto indica que los componentes responsables de la actividad antifúngica contra *Geotrichum spp.* están mejor extraídos en disolventes apolares. Figura 20

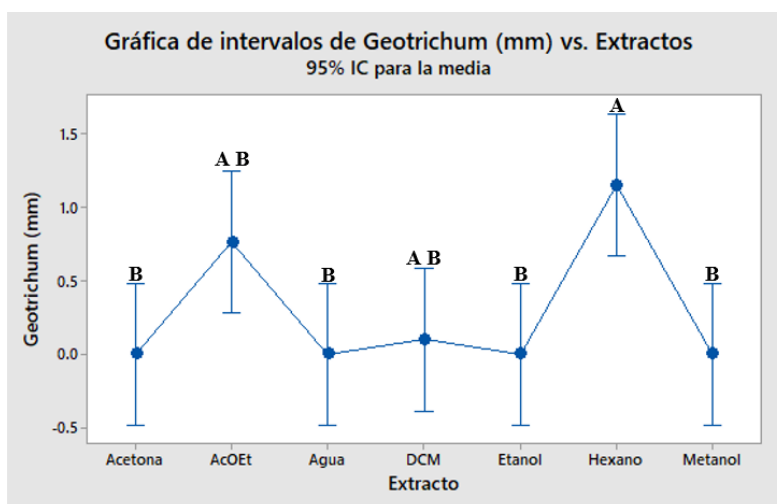


Figura 20. Inhibición de halos (mm) en *Geotrichum spp.* por extractos de *Árnica montana* a concentración 0.1 mg/mL

### *Trichoderma spp.*

En el análisis antifúngico para *Trichoderma spp.* se utilizó el método de Tukey al 95% de confianza para agrupar los disolventes según su efectividad inhibitoria en función de los halos de inhibición

Tabla 12. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antimicrobiana de *Trichoderma spp.* por extractos de *Árnica montana*

| Disolventes | N | Media    | Agrupación |
|-------------|---|----------|------------|
| Hexano      | 3 | 1.311    | A          |
| AcOEt       | 3 | 0.556    | A B        |
| DCM         | 3 | 0.1333   | B          |
| Metanol     | 3 | 0.0889   | B          |
| Etanol      | 3 | 0.0333   | B          |
| Agua        | 3 | 0.000000 | B          |
| Acetona     | 3 | 0.000000 | B          |

Grupo A: El hexano es el disolvente con la media de inhibición más alta (1.311 mm), indicando que es el más efectivo en inhibir *Trichoderma spp.*

Grupo A y B: Incluye acetato de etilo (AcOEt) con una media de 0.556 mm. Comparte letras con hexano, lo que sugiere que su efecto es significativo pero menor en comparación con hexano.

Grupo B: Este grupo incluye los disolventes diclorometano (DCM), metanol, etanol, agua y acetona, todos con medias bajas y sin diferencias significativas entre sí. Estos disolventes presentan una capacidad de inhibición limitada o nula, con valores entre 0 y 0.1333 mm.

Los resultados sugieren que *Trichoderma spp.* es susceptible al hexano y, en menor medida, al acetato de etilo. Los disolventes de polaridad más alta, como metanol, etanol, agua y acetona, mostraron efectos limitados o nulos, indicando que los compuestos antifúngicos de *Árnica montana* son más efectivos en disolventes apolares. Este patrón sugiere que los componentes activos contra *Trichoderma spp.* son de naturaleza lipofílica, lo cual es relevante para optimizar futuros estudios de extracción y aplicación de estos compuestos antifúngicos. Figura 21

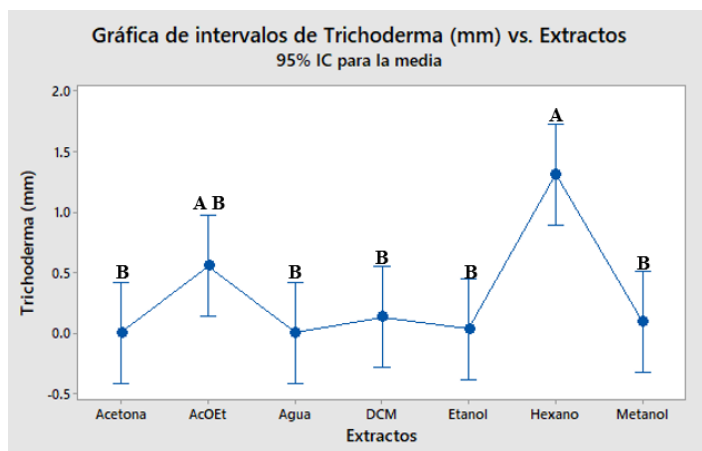


Figura 21. Inhibición de halos (mm) en *Trichoderma spp.* por extractos de *Árnica Montana* a concentración 0.1 mg/mL

### *Candida albicans*

En el análisis antifúngico de *Candida albicans*, se utilizó el método de Tukey con un 95% de confianza para agrupar los disolventes según su efectividad en la inhibición del hongo. Tabla 13

Tabla 13. Agrupaciones utilizando el método de Tukey con una confianza de 95% para la evaluación antifúngica de *Candida albicans* por extractos de *Árnica montana*.

| <b>Disolvente</b> | <b>N</b> | <b>Media</b> | <b>Agrupación</b> |
|-------------------|----------|--------------|-------------------|
| <b>AcOEt</b>      | 3        | 0.8556       | A                 |
| <b>Hexano</b>     | 3        | 0.844        | A                 |
| <b>DCM</b>        | 3        | 0.6222       | A                 |
| <b>Acetona</b>    | 3        | 0.1889       | B                 |
| <b>Etanol</b>     | 3        | 0.0667       | B                 |
| <b>Metanol</b>    | 3        | 0.0556       | B                 |
| <b>Agua</b>       | 3        | 0.0111       | B                 |

Grupo A: Incluye acetato de etilo (AcOEt), hexano y diclorometano (DCM), con medias de inhibición de 0.8556 mm, 0.844 mm y 0.6222 mm, respectivamente. Esto indica que estos tres disolventes son los más efectivos para inhibir *Candida albicans* y no presentan diferencias significativas entre sí en términos de su capacidad inhibidora.

Grupo B: Este grupo incluye los disolventes acetona, etanol, metanol y agua, que tienen medias de inhibición más bajas, con agua mostrando la menor inhibición (0.0111 mm). Estos disolventes muestran una efectividad significativamente menor que los del grupo A.

Los resultados indican que los disolventes de menor polaridad, como acetato de etilo, hexano y diclorometano, son más efectivos para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*. En cambio, los disolventes polares (como etanol, metanol y agua) tienen poco o ningún efecto inhibitorio. Esto sugiere que los componentes bioactivos de *Árnica montana* que son eficaces contra *Candida albicans* son más solubles en disolventes apolares, lo cual es coherente con la solubilidad de compuestos lipofílicos. Figura 22

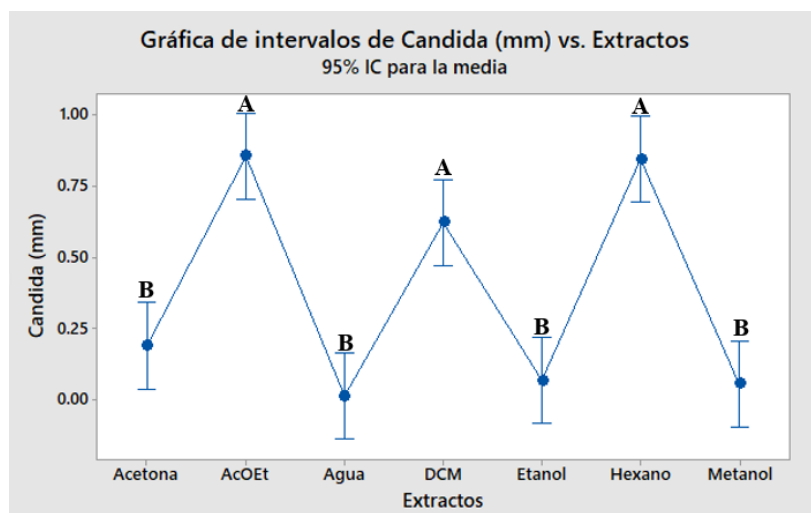


Figura 22. Inhibición de halos (mm) en *Candida albicans* por extractos de *Árnica montana* a concentración 0.1 mg/mL

Tabla 14. Inhibición de halo (mm) en Hongos por extractos de *Árnica Montana* a concentración 0.1 mg/mL

| Medición de halos de inhibición de <i>Árnica Montana</i> . |                              |            |                              |            |                             |            |
|--|------------------------------|------------|------------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| Hongos   | <i>Candida albicans</i> (mm) |            | <i>Trichoderma spp.</i> (mm) |            | <i>Geotrichum spp.</i> (mm) |            |
| Disolvente   | promedio                     | Des.ves    | promedio                     | Des.ves    | promedio                    | Des.ves    |
| Hexano   | 0.84444444                   | 0.40034707 | 1.31111111                   | 0.90061707 | 1.15555556                  | 1.11367759 |
| AcOEt  | 0.85555556                   | 0.34681087 | 0.55555556                   | 0.51988247 | 0.76666667                  | 0.81240384 |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>                            | 0.62222222                   | 0.21081851 | 0.13333333                   | 0.21794495 | 0.1                         | 0.3        |
| Acetona  | 0.18888889                   | 0.28480012 | 0                            | 0          | 0                           | 0          |
| Etanol   | 0.06666667                   | 0.08660254 | 0.03333333                   | 0.1        | 0                           | 0          |
| Metanol  | 0.05555556                   | 0.11303883 | 0.08888889                   | 0.18333333 | 0                           | 0          |
| Agua   | 0.01111111                   | 0.03333333 | 0                            | 0          | 0                           | 0          |

Hexano: Presentó valores de inhibición altos en los tres hongos, especialmente en *Trichoderma spp.* (1.31 mm) y *Geotrichum spp.* (1.16 mm). Su eficacia es notable, mostrando una inhibición bastante consistente en los hongos evaluados.

Acetato de Etilo (AcOEt): También muestra actividad significativa, con una inhibición destacada en *Candida albicans* (0.86 mm) y *Geotrichum spp.* (0.77 mm), aunque es menos eficaz que hexano.

Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): Tiene un efecto moderado en los tres hongos, siendo más efectivo en *Candida albicans* (0.62 mm), pero con inhibiciones bajas en *Trichoderma spp.* (0.13 mm) y *Geotrichum spp.* (0.10 mm).

Acetona, Etanol, Metanol y Agua: Estos disolventes muestran halos de inhibición muy bajos o nulos en todos los hongos, siendo el agua el que consistentemente no presenta actividad inhibitoria.

La Tabla 14 indica que los hongos *Candida albicans*, *Trichoderma spp.* y *Geotrichum spp.* son más susceptibles a los extractos de *Árnica montana* en disolventes de baja polaridad, como hexano y acetato de etilo, con hexano siendo particularmente efectivo en *Trichoderma spp.* y *Geotrichum spp.* En contraste, los disolventes de polaridad más alta (etanol, metanol y agua) presentan una baja o nula actividad antifúngica.

## CONCLUSION

La extracción diferencial de los metabolitos secundarios de *Árnica montana* por Soxhlet indica que los disolventes polares como etanol y metanol son los más efectivos para obtener la mayor cantidad de compuestos. Esto debido a la mayor afinidad de los metabolitos presentes en la *Árnica montana* con disolventes de polaridad elevada, logrando cantidades de 0.91 y 1.18 g respectivamente. Por el contrario, con disolventes menos polares, como hexano y diclorometano, hubo menor cantidad de extracto (0.49 g y 0.19 g), lo que sugiere que estos solventes no extraen de manera efectiva.

La prueba de DPPH mostraron que los extractos con acetona, metanol, etanol y AcOEt tuvieron mayor actividad antioxidante (79-80%). En contraste, el agua presentó actividad moderada (60.08%), ya que, al tratarse de extracciones consecutivas, disminuye la cantidad de compuestos antioxidantes en el agua. Extractos con hexano hubo menor eficacia (31.98%) y DCM registró la actividad más baja (15.78%), indicando que la extracción de compuestos antioxidantes es más eficiente en disolventes polares, debido a que la mayoría de los compuestos antioxidantes contienen en su estructura grupos hidroxilo, confirmando cierta polaridad a la molécula, facilitando su extracción con esta clase de disolvente.

En la prueba de capacidad antioxidante por ABTS, los resultados mostraron que, con acetona, AcOEt, etanol y metanol hubo mayor actividad antioxidante (88-89%). Los extractos con hexano tuvieron actividad moderada (84.59%) indicando la posible presencia de antioxidantes lipofílicos en el extracto inicial. Los extractos con agua y DCM mostraron actividad significativamente menor (63.44% y 65.95%, respectivamente), esto podría deberse a que los metabolitos más activos ya habían sido extraídos en etapas anteriores con disolventes de polaridad intermedia. Estos resultados indican la importancia de la secuencia de extracción en la obtención de compuestos antioxidantes y confirman que la polaridad del disolvente influye directamente en la eficacia de la extracción de antioxidantes en *Árnica montana*.

En cuanto a la prueba de contenido fenólico total (Folin-Ciocalteu), la extracción de los compuestos fenólicos se facilita en disolventes polares, debido a la polaridad que le confieren los grupos hidroxilo en su estructura. El extracto de *Árnica montana* en agua presentó el mayor contenido fenólico total (274.696 mg GA/g), seguido por los disolventes polares etanol, metanol y acetona. En la prueba de contenido de flavonoides totales también son más solubles en disolventes polares, ya que el agua destacó como el mejor disolvente (1664.07 mg Q/g), seguido por metanol (290.48 mg Q/g) y etanol (186.11 mg Q/g) y los disolventes menos polares, como acetona, hexano y DCM, tuvieron una capacidad significativamente menor, siendo AcOEt el menos efectivo, mostrando correlación positiva entre el contenido fenólico total y el contenido de flavonoides, ya que los disolventes más eficaces para extraer fenoles también lo son para los flavonoides.

Los resultados antibacterianos muestran que los extractos en hexano y diclorometano fueron más efectivos contra bacterias Gram positivas, mientras que las bacterias Gram negativas fueron menos sensibles a los extractos. Los hongos fueron particularmente sensibles a los extractos en hexano y acetato de etilo. El hexano mostró la mayor efectividad contra *Trichoderma spp.* y *Geotrichum spp.* mientras que los extractos con acetato de etilo fueron efectivos contra *Candida albicans*. Estos resultados sugieren que el hexano es el disolvente óptimo para extraer compuestos bioactivos de *Árnica montana* con actividad antimicrobiana de amplio espectro, particularmente eficaces contra microorganismos Gram positivos y hongos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] T.J. Schmidt, *Arnica montana* L.: Doesn't Origin Matter?, *Plants (Basel)* 12 (2023) 3532. <https://doi.org/10.3390/plants12203532>.
- [2] J. Röhrl, M.-R. Piqué-Borràs, M. Jaklin, M. Werner, O. Werz, H. Josef, H. Hölz, A. Ammendola, G. Künstle, Anti-Inflammatory Activities of *Arnica montana* Planta Tota versus Flower Extracts: Analytical, In Vitro and In Vivo Mouse Paw Oedema Model Studies, *Plants (Basel)* 12 (2023) 1348. <https://doi.org/10.3390/plants12061348>.
- [3] D. Sugier, P. Sugier, J. Jakubowicz-Gil, U. Gawlik-Dziki, A. Zając, B. Król, S. Chmiel, M. Kończak, M. Pięt, R. Paduch, Nitrogen Fertilization and Solvents as Factors Modifying the Antioxidant and Anticancer Potential of *Arnica montana* L. Flower Head Extracts, *Plants (Basel)* 12 (2022) 142. <https://doi.org/10.3390/plants12010142>.
- [4] S. Duthen, A. Gadéa, P. Trempat, N. Boujedaini, N. Fabre, Comparison of the Phytochemical Variation of Non-Volatile Metabolites within Mother Tinctures of *Arnica montana* Prepared from Fresh and Dried Whole Plant Using UHPLC-HRMS Fingerprinting and Chemometric Analysis, *Molecules* 27 (2022) 2737. <https://doi.org/10.3390/molecules27092737>.
- [5] D. Sugier, K. Olesińska, P. Sugier, M. Wójcik, Chemical Composition of Essential Oil from Flower Heads of *Arnica Chamissonis* Less. under a Nitrogen Impact, *Molecules* 24 (2019) 4454. <https://doi.org/10.3390/molecules24244454>.
- [6] O. Craciunescu, D. Constantin, A. Gaspar, L. Toma, E. Utoiu, L. Moldovan, Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts, *Chem Cent J* 6 (2012) 97. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-97>.
- [7] S.M. Robledo, J. Murillo, N. Arbeláez, A. Montoya, V. Ospina, F.M. Jürgens, I.D. Vélez, T.J. Schmidt, Therapeutic Efficacy of *Arnica* in Hamsters with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* and *L. tropica*, *Pharmaceuticals (Basel)* 15 (2022) 776. <https://doi.org/10.3390/ph15070776>.
- [8] D. Sugier, P. Sugier, J. Jakubowicz-Gil, K. Winiarczyk, R. Kowalski, Essential Oil from *Arnica Montana* L. Achenes: Chemical Characteristics and Anticancer Activity, *Molecules* 24 (2019) 4158. <https://doi.org/10.3390/molecules24224158>.
- [9] G. Ziyatdinova, A. Kalmykova, Electrochemical Characterization of the Antioxidant Properties of Medicinal Plants and Products: A Review, *Molecules* 28 (2023) 2308. <https://doi.org/10.3390/molecules28052308>.
- [10] S.C. Lourenço, M. Moldão-Martins, V.D. Alves, Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications, *Molecules* 24 (2019) 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.
- [11] D.-P. Xu, Y. Li, X. Meng, T. Zhou, Y. Zhou, J. Zheng, J.-J. Zhang, H.-B. Li, Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources, *Int J Mol Sci* 18 (2017) 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>.
- [12] S. Škrovánková, L. Mišurcová, L. Machů, Chapter Three - Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants, in: J. Henry (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, 2012: pp. 75–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00003-4>.
- [13] M. Aćimović, M. Zorić, V.D. Zheljaskov, L. Pezo, I. Čabarkapa, J. Stanković Jeremić, M. Cvetković, Chemical Characterization and Antibacterial Activity of

- Essential Oil of Medicinal Plants from Eastern Serbia, *Molecules* 25 (2020) 5482. <https://doi.org/10.3390/molecules25225482>.
- [14] F. Haile, M.T. G/Medhin, Z.D. Kifle, T.A. Dejenie, N. Berhane, Synergetic antibacterial activity of *Vernonia auriculifera* Hiern and *Buddleja polystachya* Fresen on selected human pathogenic bacteria, *Metabol Open* 16 (2022) 100210. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2022.100210>.
- [15] S. Bittner Fialová, K. Rendeková, P. Mučaji, M. Nagy, L. Slobodníková, Antibacterial Activity of Medicinal Plants and Their Constituents in the Context of Skin and Wound Infections, Considering European Legislation and Folk Medicine—A Review, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 10746. <https://doi.org/10.3390/ijms221910746>.
- [16] A.K. Das, Md.N. Islam, Md.O. Faruk, Md. Ashaduzzaman, R. Dungani, Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities, *South African Journal of Botany* 135 (2020) 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>.
- [17] Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens, *Complementary Therapies in Clinical Practice* 18 (2012) 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>.
- [18] Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities, *International Journal of Antimicrobial Agents* 44 (2014) 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>.
- [19] C.A.L.R. Morales Santiago González Periañez, Margarita Virginia Saavedra Vélez, Fernando Rafael Ramos, Las plantas medicinales como fuente de nuevas moléculas para el tratamiento de la enfermedad sagrada, *Avance y Perspectiva* (2023). <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/las-plantas-medicinales-como-fuente-de-nuevas-moleculas-para-el-tratamiento-de-la-enfermedad-sagrada/> (accessed February 17, 2025).
- [20] R. Davicino, M.A. Mattar, Y.A. Casali, S.G. Correa, E.M. Pettenati, B. Micalizzi, Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, *Revista Peruana de Biología* 14 (2007) 247–252.
- [21] P.M. Dikhoba, N.I. Mongalo, E.E. Elgorashi, T.J. Makhafola, Antifungal and antimycotoxigenic activity of selected South African medicinal plants species, *Heliyon* 5 (2019) e02668. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02668>.
- [22] R. Davicino, M.A. Mattar, Y.A. Casali, S.G. Correa, E.M. Pettenati, B. Micalizzi, Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, *Revista Peruana de Biología* 14 (2007) 247–252.
- [23] Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, D.G. García-Hernández, C. Rivas-Morales, C. Leos-Rivas, Actividad antifúngica, in: *Investigación en plantas de importancia médica*, 1st ed., OmniaScience, 2016: pp. 101–128. <https://doi.org/10.3926/oms.314>.
- [24] M.E. Carretero, T. Ortega, Flores de *Arnica montana*: interés terapéutico, (n.d.).
- [25] C.E.F. Tapia, K.L.F. Cevallos, PRUEBAS PARA COMPROBAR LA NORMALIDAD DE DATOS EN PROCESOS PRODUCTIVOS: ANDERSON-DARLING, RYAN-JOINER, SHAPIRO-WILK Y KOLMOGÓROV-SMIRNOV, *Societas. Revista de Ciencias Sociales y Humanísticas* 23 (n.d.) 83–106.