



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS

PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Epaltes mexicana* Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA

PRESENTA:

Q.F.B. TAMARA DE LOS ÁNGELES JUÁREZ VELÁZQUEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. OSWALDO IGNACIO HERNÁNDEZ ABREU

DR. JOSÉ ARNOLD GONZÁLEZ GARRIDO

CUNDUACÁN, TABASCO, AGOSTO, 2024

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Cunduacán, el día 01 del mes Julio del año 2024, el que suscribe Tamara de los Ángeles Juárez Velázquez alumna(o) del Programa de Maestría en Ciencias en Química Aplicada con número de matrícula 222A27007, adscrito a la División Académica de Ciencias Básicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor(a) (es) de la Tesis presentada para la obtención del grado, titulada: PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Epaltes mexicana* Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, dirigida por el Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu y el Dr. José Arnold González Garrido.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 01 de Julio 2024.



Q.F.B. Tamara de los Ángeles Juárez Velázquez



UJAT
UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

19 de junio de 2024

**Q.F.B. TAMARA DE LOS ÁNGELES JUÁREZ VELÁZQUEZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN QUÍMICA APLICADA
PRESENTE**

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **“PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Epaltes mexicana* Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**, en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Química Aplicada.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE


**DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA**



C.c.p.- Archivo

DIR'DRA.HPV/JP'DRA.EAM/jkal

Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6702,6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 01 de Julio de 2024.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTOR(A) y/o AUTORES(RAS) en la producción, creación y/o realización de la obra denominada: PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Epaltes mexicana* Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES

EGRESADA




Q.F.B. Tamara de los Ángeles Juárez Velázquez

DIRECTORES



Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu



Dr. José Arnold González Garrido

TESTIGOS



Q.F.B. Estephania López Oliva



Ing. Arabelly Anai Jiménez Rodríguez



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

*Era como si se me abriera un mundo nuevo, el mundo de la ciencia,
que por fin se me permitía conocer con toda libertad.*

-Marie Curie



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de maestría otorgada durante la realización de este proyecto de tesis.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por el acceso a los equipos y las instalaciones utilizados en la realización de esta investigación.

A los directores de este proyecto de investigación, al Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu y al Dr. José Arnold González Garrido, ambos de la División Académica de Ciencias Básicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su asesoría y orientación a través de sus conocimientos teóricos y experimentales en el transcurso de esta investigación, sin su apoyo, comprensión y empatía este proyecto no hubiera sido posible.

Al Dr. Carlos Javier López Victorio, al Dr. Abraham Gómez Rivera y al Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, miembros del comité tutorial de este proyecto, por su asesoría en el transcurso de este proyecto.

Y finalmente, a los miembros del comité revisor. Al Dr. Carlos Javier López Victorio, al Dr. Abraham Gómez Rivera, al Dr. Miguel Ángel Vilchis Reyes, al Dr. José Arnold González Garrido y al Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, por sus correcciones y aportaciones valiosas que fueron esenciales en la redacción del documento final de este proyecto de investigación.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por darme la sabiduría, la fortaleza para continuar y permitirme obtener un logro más en la vida.

Al Dr. José Arnold, por los aprendizajes otorgados, su orientación académica, sus aportes en mi trayectoria y por impulsarme a crecer profesionalmente. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Oswaldo, por sus consejos, su paciencia y en especial por su valiosa asesoría, gracias por fomentar en mí ese sentido de ser mejor investigadora. Sin su esfuerzo y dedicación por la ciencia este trabajo no hubiera sido posible. Muchas gracias por la confianza, es un privilegio contar con su guía y amistad.

A mis padres, Cleotilde y José Santos, por el amor y la motivación que me inculcaron desde que era pequeña y que hasta el día de hoy siguen rindiendo frutos, este logro es para ustedes. Los amo. Siempre en mi corazón.

A mami Naty, por su amor, guía y apoyo en todo momento, y por siempre estar para mí, gracias por impulsarme a ser mejor en todos los ámbitos y poder cumplir mis metas a pesar de los obstáculos. No hay palabras que expresen mi gratitud y amor.

A mi familia, por su comprensión, consejos y amor que me brindan cada día, gracias infinitamente Guille, Pedro y Aarón, muchas gracias por darme su apoyo en todo y estar siempre pendiente de mí. Los amo con todo mi corazón.

A mis amigos del laboratorio, Luz y Romario, gracias por su amistad. Arabelly y Estephania, gracias chicas por estar para mí, por las risas que no podían faltar cada día y sin duda por el verdadero trabajo en equipo en nuestra formación. Las quiero.

A Chester y Dodi, mis grandes amigos que también me acompañaron en este transcurso, en especial en las tardes de estudio. Mi Dodi siempre te llevaré en mi corazón.

Y finalmente, a cada una de las personas que aportaron sus conocimientos teóricos y experimentales en esta investigación, y a mis amistades que estuvieron motivándome y apoyándome en este transcurso, la lista es larga, muchas gracias.

Con mucho cariño ¡Gracias a todos!



I. ÍNDICE DE CONTENIDO.

	Página
I. ÍNDICE.	i
II. LISTA DE FIGURAS.	iv
III. LISTA DE TABLAS.	vi
IV. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.	vii
1. RESUMEN.	1
2. ABSTRACT.	2
3. INTRODUCCIÓN.	3
4. MARCO TEÓRICO.	4
4.1 Cáncer.	4
4.1.1 Estadísticas del cáncer.	4
4.1.2 Características del cáncer.	5
4.1.3 Factores que propician el cáncer.	6
4.1.4 Tratamientos.	7
4.2 Estrés oxidativo.	8
4.2.1 Radicales libres.	9
4.2.2 Principales especies reactivas de oxígeno.	10
4.2.2.1 Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).	10
4.2.2.2 Radical Hidroxilo ($\cdot OH$).	11
4.2.3 Enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo.	12
4.3 Relación de ROS y cáncer.	12
4.4 Antioxidantes.	13
4.4.1 Características de los antioxidantes.	14
4.4.2 Fuente de antioxidantes.	14
4.5 Métodos para la determinación de la actividad antioxidante.	16
4.5.1 Ensayo DPPH.	17
4.5.2 Ensayo ABTS.	18



	Página	
4.6	Importancia de las especies vegetales en el tratamiento de las enfermedades.	19
4.7	<i>Epaltes mexicana</i> Less.	20
4.7.1	Antecedentes fitoquímicos de <i>Epaltes mexicana</i> .	21
4.8	Métodos para la identificación de metabolitos secundarios con actividades biológicas.	25
4.8.1	Espectrometría de masas.	26
4.8.2	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.	27
4.8.2.1	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo.	27
5.	JUSTIFICACIÓN.	29
6.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	30
7.	HIPÓTESIS.	31
8.	OBJETIVO GENERAL.	32
9.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	33
10.	METODOLOGÍA.	34
10.1	Recolección e identificación de la especie vegetal <i>Epaltes mexicana</i> .	35
10.2	Obtención de los extractos vegetales.	35
10.3	Separación e identificación mediante cromatografía en columna.	36
10.4	Determinación del perfil metabólico a través de LC/MS-QTOF.	36
10.5	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de <i>Epaltes mexicana</i> .	38
10.5.1	Ensayo de actividad de eliminación de radicales libres por DPPH.	38
10.5.2	Capacidad antioxidante determinada por el catión radical ABTS.	39
10.6	Análisis de datos.	40
10.7	Consideraciones éticas.	40
11.	RESULTADOS.	41
11.1	Recolección e identificación de la especie vegetal <i>E. mexicana</i> .	41
11.2	Obtención del EME _m , EHE _m , EDE _m y de la F6 del EHE _m .	41
11.3	Determinación del perfil metabólico a través de LC/MS-QTOF.	42



	Página
11.4 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de <i>Epaltes mexicana</i> por DPPH y ABTS.	49
11.4.1 Ensayo DPPH.	49
11.4.2 Ensayo ABTS.	50
12. DISCUSIÓN.	52
13. CONCLUSIÓN.	56
14. PERSPECTIVAS.	57
15. BIBLIOGRAFÍA.	58
16. ANEXOS.	64



II. ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Estadísticas de defunciones registradas 2021. Base de datos. SNIEG. Información de Interés Nacional y estimación de población elaborada por el INEGI con base en el Marco de Muestreo de Viviendas.	4
Figura 2. Características del cáncer.	6
Figura 3. Fármacos para el tratamiento del cáncer ubicados según el sitio de acción en el ciclo celular.	8
Figura 4. Implicación de los radicales libres (ROS) en el desarrollo del cáncer, un desequilibrio entre especies moleculares oxidantes y antioxidante puede generar un estado de estrés oxidativo causando daños en proteínas, lípidos y ADN.	13
Figura 5. Ejemplos de carotenoides.	15
Figura 6. Clasificación de métodos para evaluar las propiedades antioxidantes integradas.	17
Figura 7. Mecanismo de eliminación de DPPH por un antioxidante (AH).	18
Figura 8. Principio químico del método ABTS.	19
Figura 9. Especie vegetal <i>Epaltes mexicana</i> utilizada en la presente investigación.	21
Figura 10. Sesquiterpenos de la especie <i>Epaltes mexicana</i> .	22
Figura 11. Sesquiterpenos con actividad antibacteriana de la especie <i>Epaltes mexicana</i> .	23
Figura 12. Gráficas de las curvas concentración-respuesta del efecto citotóxico de la reunión de fracciones No. 6 del extracto hexánico de <i>Epaltes mexicana</i> (EHEm) sobre la viabilidad celular.	25
Figura 13. Diagrama de la metodología realizada en esta investigación.	34
Figura 14. Sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con cuadrupolo tiempo de vuelo y la ionización por electrospray.	38



Figura 15.	Monitoreo por cromatografía en capa fina para la agrupación de la F6.	42
Figura 16.	Cromatograma de pico base (BPC) de los metabolitos obtenidos a través de LC/MS QTOF en modo positivo de la colección de fracciones No. 6 del extracto hexánico de <i>Epaltes mexicana</i> .	42
Figura 17.	Metabolitos identificados por LC/MS-QTOF comparados con comparados la base de datos METLIN.	43
Figura 18.	Espectro de masas de la giberelina A15 obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	45
Figura 19.	Espectro de masas de la farfugina A obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	45
Figura 20.	Espectro de masas de la deshidromiodesmona obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	46
Figura 21.	Espectro de masas de la eremopetasitenina A1 obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	46
Figura 22.	Espectro de masas de la hidroxisonobilina obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	47
Figura 23.	Espectro de masas de la anhidrocinceilanina obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	48
Figura 24.	Espectro de masas de la nigakilactona H obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	48
Figura 25.	Espectro de masas de la taxodiona obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.	49
Figura 26.	Gráfica de la actividad antioxidante por el método DPPH de los extractos de <i>Em</i> y de F6 <i>EHEm</i> , comparado con ácido ascórbico.	50
Figura 27.	Gráfica de la actividad actividad antioxidante por el método ABTS de los extractos de <i>Em</i> y de F6 del <i>EHEm</i> , comparado con trolox.	51



III. ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo.	10
Tabla 2. Parámetros evaluados de las curvas concentración-respuesta del efecto citotóxico de la fracción 6 del EHEm sobre la viabilidad celular.	24
Tabla 3. Disolventes utilizados para la obtención de la colección de fracciones No. 6 del EHEm.	36
Tabla 4. Rendimiento total de los extractos orgánicos de <i>Em</i> .	41
Tabla 5. Compuestos identificados por LC/MS-QTOF en el extracto hexánico de <i>Epaltes mexicana</i> .	44
Tabla 6. Efecto antioxidante de los compuestos a través del método DPPH.	50
Tabla 7. Efecto antioxidante de los compuestos a través del método ABTS.	51



IV. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	Células B del linfoma 2
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAET	Capacidad antioxidante equivalente a trolox
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Electroforesis capilar
cFLIP	Proteína inhibidora similar a FLICE (enzima convertidora de IL-1 β)
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DE	Desviación estándar
DU-145	Línea celular de cáncer de próstata
EDE _m	Extracto diclorometánico de <i>Epaltes mexicana</i>
EHE _m	Extracto hexánico de <i>Epaltes mexicana</i>
E _{max}	Efecto máximo
EME _m	Extracto metanólico de <i>Epaltes mexicana</i>
<i>E. mexicana</i>	<i>Epaltes mexicana</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESI	Electropulverización
FRAP	Poder reductor antioxidante del ion férrico
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IKK- β	Inhibidor de la subunidad beta de la quinasa kappa-B del factor nuclear
K562	Células derivadas de leucemia mielógena humana



LC	Cromatografía líquida
MCF-10A	Línea celular epitelial mamaria humana
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama hormono-independiente
MFE	Extracción de características moleculares
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz-9
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
<i>m/m</i>	Masa/masa
<i>m/z</i>	Masa/carga
N.D.	No determinado
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PG	Galato de propilo
Q	Cuadrupolo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.p.m	Revoluciones por minuto
SiHa	Cáncer cervicouterino
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TBHQ	Terbutilhidroquinona
CAET	Capacidad antioxidante de equivalencia trolox
TLR	Receptores tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOF	Tiempo de vuelo
TWIST-1	Proteína 1 relacionada con la torsión
UV	Ultravioleta

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO
HEXÁNICO DE *Epaltes mexicana* Y
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE**

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

1. RESUMEN



1. RESUMEN.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial causando una de cada seis muertes y en México durante el año 2021 un 8 % (90,123) de las defunciones fue por tumores malignos. El objetivo de esta tesis fue determinar el perfil metabólico de la fracción 6 (F6) del extracto hexánico de *Epaltes mexicana* (EHEm) que tiene efecto citotóxico para conocer los metabolitos responsables de la actividad y evaluar el efecto antioxidante para explorar la posible relación con la actividad citotóxica.

Mediante procesos cromatográficos se obtuvo la F6 del EHEm y se analizó mediante LC/MS-QTOF, se utilizó como fase móvil: A) ácido fórmico al 0.1% en agua y B) ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, 1 mg de la fracción 6 se disolvió en 1 mL de acetonitrilo y se diluyó 1:100 para iniciar la elución. Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó el ensayo DPPH y ABTS.

Se logró identificar mediante la anotación de iones, fragmentación MS/MS y comparación con bases de datos ocho metabolitos de naturaleza terpénica clasificados como sesquiterpenos (farfugina A y deshidromiodesmona), diterpenos (giberelina A15, eremopetasetenina A1, hidroxisonobilina, anhidrocinzeilanina y taxodiona) y un triterpeno (nigakilactona H). El único extracto que tuvo efecto antioxidante por ambos métodos fue el EHEm, $CI_{50} = 6.12$ Eq. A.A. y $CI_{50} = 0.228$ CAET, en DPPH y ABTS, respectivamente.

Se sugiere continuar con los estudios de aislamiento de los metabolitos como fuente prometedora de fármacos anticancerígenos, asimismo el EHEm es una fuente de moléculas de gran potencial antioxidante.

Palabras claves: Antioxidante, *Epaltes mexicana*, LC/MS-QTOF, terpenos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2. ABSTRACT



2. ABSTRACT.

Cancer is the second leading cause of death worldwide since one in every six deaths is due to cancer. In Mexico in the year 2021, 8% (90,123) of deaths were due to malignant tumors. The objective was to determine the metabolic profile of the F6 of *EHEm* that has a cytotoxic effect to know the metabolites responsible for the activity and to evaluate the antioxidant effect to explore the possible relationship with the cytotoxic activity.

Through chromatographic processes, the fraction was obtained and analyzed by LC/MS-QTOF, the following were used as mobile phase: A) 0.1% formic acid in water and B) 0.1% formic acid in acetonitrile, 1 mg of fraction 6 was dissolved in 1 mL of acetonitrile and diluted 1:100 to start elution. To evaluate the antioxidant activity, the DPPH and ABTS assay were used.

Eight terpene metabolites classified as sesquiterpenes were identified through ion annotation, MS/MS fragmentation and comparison with databases: Farfugin A and dehydromiodesmone; diterpenes: Gibberellin A15, eremopetasetenin A1, hydroxyisonobilin, anhydrocynzeilanin and taxodione; and triterpene: Nigakilactone H. In the determination of antioxidant activity, the only extract that had an effect by both methods was *EMEm*, $IC_{50} = 6.12$ Eq. AA and $IC_{50} = 0.228$ CAET, in DPPH and ABTS, respectively.

It is suggested to continue with studies on the isolation of metabolites as a promising source of anticancer drugs, and *EMEm* is also a source of molecules with great antioxidant potential.

Keywords: Antioxidant, *Epaltes mexicana*, LC/MS-QTOF, terpenes.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
Mexico.

3. INTRODUCCIÓN



3. INTRODUCCIÓN.

En México, se ha registrado una cantidad mayor a 4,000 especies medicinales con diferentes usos por lo que se considera que el conocimiento herbolario se transmite generación tras generación y su aplicación persiste tanto en comunidades indígenas como en zonas urbanas (Velázquez-Vázquez *et al.*, 2019). Se estima que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para la atención primaria de salud incluyendo el uso de plantas medicinales, las cuales han sido uno de los recursos más valorados por el ser humano a través del tiempo (Maldonado *et al.*, 2020).

En la medicina tradicional de Tabasco es utilizada *Epaltes mexicana* (*E. mexicana*) para el tratamiento de diversos padecimientos como gripe, asma, dolor muscular y problemas dermatológicos (Heinrich, 2003; Magaña-Alejandro *et al.*, 2010). Se han aislado ocho sesquiterpenos con actividad antibacteriana (Heinrich, 2003; Wu *et al.*, 2006); también recientemente se identificó actividad citotóxica en una fracción del extracto hexánico de *E. mexicana* (EHEm) en modelos celulares de cáncer, no hay evidencia científica que exponga los componentes responsables de esta actividad terapéutica (Juárez-Velázquez, 2022).

Debido a lo anterior, en la presente investigación se realizó un perfil metabólico a partir de la anotación de iones de la F6 del EHEm por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad citotóxica. Además se ha mencionado que algunos de los metabolitos de las especies medicinales tienen la capacidad de modular las vías de señalización celular que interfieren en los mecanismos de defensa para preservar a las células no tumorigénicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y llevan a la apoptosis a las células tumorigénicas (Prakash *et al.*, 2021); así que también se determinó la evaluación de la capacidad antioxidante del EHEm con las técnicas DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) para determinar la capacidad antioxidante del extracto y analizar la posible relación con el efecto citotóxico de los metabolitos presentes en la fracción con actividad citotóxica.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. MARCO TEÓRICO



4. MARCO TEÓRICO.

4.1 Cáncer.

La palabra cáncer engloba a conjunto de enfermedades que puede afectar diversas partes del cuerpo, estas afecciones comparten en común un desorden en el ciclo celular generando un crecimiento acelerado y como consecuencia acumulaciones de células (tumores) que tienen la capacidad de alterar las funciones de los órganos o tejidos en donde se desarrollan y también extenderse a otras partes del cuerpo. Debido al total de incidencia y las muertes por el cáncer se considera un problema de salud pública (Catherine-Sánchez, 2013; OMS, 2021).

4.1.1 Estadísticas del cáncer.

En el año 2020 se produjeron 10 millones de muertes por cáncer a nivel mundial y se considera la segunda causa de muerte, pues una de cada seis muertes se debe al cáncer (Crosby *et al.*, 2022). En 2021, se registraron 1,122,249 defunciones en México, de las cuales 8 % (90,123) fue por tumores malignos. Los estados que presentaron tasas de muerte más altas fueron Ciudad de México, Colima, Veracruz, Sonora, Chihuahua y Morelos, oscilando entre 7.8 a 9.3 defunciones por cada 10 mil habitantes (Figura 1), (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2023).





Los tipos de cáncer que se detectan frecuentemente en México son el cáncer de mama y el cervicouterino en las mujeres, también son los tipos de cáncer que ocupan las primeras causas de muerte por tumores malignos (Sánchez-Mercader *et al.*, 2021).

4.1.2 Características del cáncer.

Las características del cáncer surgen como un conjunto de capacidades funcionales obtenidas por células debido al cambio de estar en un estado de normalidad a estados de crecimiento neoplásico que permiten la formación de tumores malignos. Los diferentes tipos de cáncer se desarrollan debido a una gran variedad de factores que incluyen múltiples pasos lo que genera una diversidad de patogénesis maligna que incluye múltiples tipos de tumores y una abundancia de subtipos que abarcan varios daños (Hanahan, 2022).

Hanahan (2022) ha indicado que pueden ser ocho características las distintivas del cáncer (Figura 2, izquierda) se incluyen 1) las capacidades para sustentar la señalización proliferativa; 2) evadir los supresores del crecimiento; 3) evadir la muerte celular; 4) autorizar la inmortalidad replicativa; 5) estimular/permitir la vascularización; 6) iniciar la invasión y la metástasis; 7) reprogramar el metabolismo celular; y 8) eludir la destrucción inmune. Sin embargo, derivado de nuevos estudios se proponen otras características emergentes (Figura 2, derecha) que comprenden desbloquear la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes.

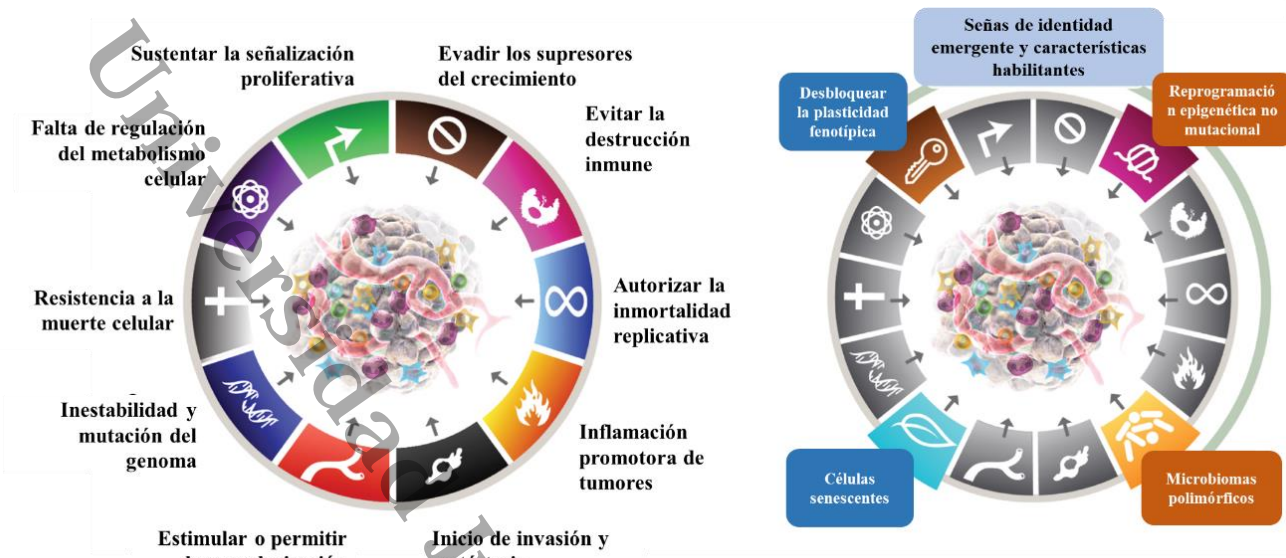


Figura 2. Características del cáncer. En la izquierda, se muestran las ocho capacidades distintivas y dos características habilitadoras. En la derecha se muestran las características emergentes propuestas adicionales y características habilitantes (modificado de Hanahan, 2022).

4.1.3 Factores que propician el cáncer.

De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha reportado que la carga de las enfermedades no transmisibles (ENT) aumentan gradualmente en diversos países, estas incluyen cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades respiratorias crónicas (OMS, 2023). Los números de mortalidad por las ENT representan aproximadamente dos tercios del total de la mortalidad anual principalmente en los países en vías de desarrollo, se considera que es por el tipo de vida poco saludable en la mayoría de la población como una dieta con altos consumos de grasas y calorías que provoca un desequilibrio; adicionalmente, la poca actividad física que realizan, el desarrollo de una ENT principalmente se ha relacionado con el estrés oxidativo (Romulo, 2020).

Los comportamientos para la aparición del cáncer no sólo dependen del genotipo del huésped, sino que también se ven intervenidos por otro tipo de factores como ingesta excesiva de calorías/nutrientes, infección o tabaquismo que inducen la tumorigénesis e incrementan el riesgo de la aparición del cáncer. La capacidad poco efectiva de las células inmunitarias para detectar y eliminar células cancerosas recién formadas es un punto clave en el crecimiento y la propagación de tumores. En gran parte de los diferentes tipos de



cáncer no se conoce las células originales con mutaciones de potencial transformador, pero hay pruebas que indican que el cáncer puede originarse por (Yin *et al.*, 2021):

- a) Mutaciones de células madre.
- b) Transformación de células progenitoras.
- c) Adquisición e hibridación de los ADN del huésped por parte de las bacterias.
- d) Reposo embrionario.
- e) Detención de la maduración.
- f) Desdiferenciación de células maduras.

Es conocido que las mutaciones genéticas tienen un papel importante en la carcinogénesis, se ha indicado que se requiere más de una mutación crítica y se estimó que el número necesario de mutaciones es de tres a siete para superar la reparación del ADN, evadir la apoptosis y adquirir funciones excesivas como la proliferación continua. No obstante, el conocimiento de los patrones de adquisición de mutaciones genéticas en células normales es limitado. Mediante un estudio de secuenciación del genoma completo se descubrió que las personas normales pueden portar mutaciones conductoras en las primeras décadas de vida pero la carga incrementa con la edad. Existen semejanzas entre las células madre y las células cancerosas en la expresión genética y las características biológicas, aunque la transformación de células madre en células cancerosas todavía necesita algunas mutaciones, después de que las células madre han pasado por el proceso de mutagénesis se convierten en el origen o transmisor de cáncer (Yin *et al.*, 2021).

4.1.4 Tratamientos.

Los tratamientos para tratar el cáncer eran limitados e incluían la cirugía, radioterapia y quimioterapia como tratamientos solos o en combinación. Actualmente se implementan estrategias combinatorias que abarcan múltiples terapias dirigidas o quimioterapias tradicionales, como los taxanos y los compuestos de platino que tienen un efecto positivo o sinérgico. Se han empleado nuevos enfoques como medicamentos, moléculas biológicas y terapias inmunomediadas dentro del tratamiento; sin embargo, la quimioterapia se considera la modalidad más eficaz y ampliamente empleada. Los tratamientos hormonales también se usan ampliamente para el cáncer y se consideran citostáticos porque restringen



el crecimiento del tumor al limitar los factores de crecimiento hormonal que actúan en la dirección del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPGA), el bloqueo de los receptores hormonales y la limitación de la síntesis de esteroides suprarrenales (Debela *et al.*, 2021).

Los tipos de tratamiento del cáncer se pueden dividir en convencionales (tradicionales) y avanzados o modernos. Los primeros abarcan la resección quirúrgica de los tumores seguida de radioterapia con rayos X y/o quimioterapia siendo la cirugía más efectiva en una etapa inicial dado que la radioterapia puede dañar células, órganos y tejidos sanos; por otra parte, la quimioterapia ha disminuido la mortalidad y morbilidad, pero los agentes dañan a las células sanas en especial a las que por naturaleza crecen y se dividen rápidamente, en la Figura 3 se muestran algunos fármacos utilizados en el tratamiento para el cáncer. Las terapias contra el cáncer que se consideran avanzadas e innovadoras incluyen terapia con células madre, células madre pluripotentes, células madre adultas, células madre cancerosas, terapia farmacológica dirigida, agentes objetivo (como anticuerpos monoclonales, inhibidores de moléculas pequeñas, ablación térmica), antioxidantes naturales y terapia de genes (Debela *et al.*, 2021).

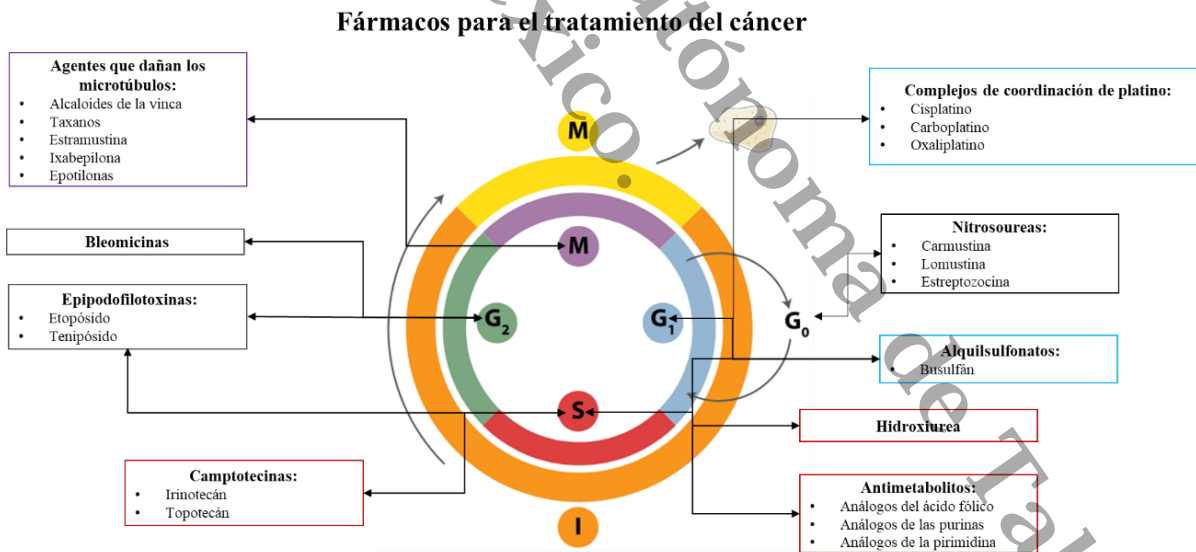


Figura 3. Fármacos para el tratamiento del cáncer ubicados según el sitio de acción en el ciclo celular. Figura propia.

4.2 Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se ha definido como el desequilibrio entre la producción de oxidantes y



las defensas antioxidantes, lo que puede generar diversas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y Alzheimer. El nivel en que el estrés oxidativo contribuye en el desarrollo de las enfermedades es variable, dado que la eficacia de incrementar la defensa antioxidante puede ser limitada para algunas enfermedades. Algunas investigaciones han demostrado que los antioxidantes como el ácido ascórbico y los tocoferoles, protegen contra el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Forman & Zhang, 2021; Parcheta *et al.*, 2021).

4.2.1 Radicales libres.

Las especies reactivas son entidades o fragmentos moleculares considerados subproductos de procesos celulares, que tienen la capacidad de existir de forma independiente y dentro de sus principales características resaltan que contienen uno o más electrones desapareados en un orbital atómico externo o en un orbital molecular, son de vida corta y altamente reactivos lo que hace que presenten reacciones en cadena. Algunos radicales libres son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que participan en numerosos procesos en el organismo, por ejemplo, maduración celular, protección inmune, citotoxicidad contra patógenos. No obstante, pueden causar daños en proteínas, lípidos e incluso modificar el ADN (Martemucci *et al.*, 2022; Parcheta *et al.*, 2021).

Los radicales libres poseen una carga eléctrica negativa que es contrarrestada por la carga nuclear positiva de los positrones resultando una partícula neutra; de lo contrario, tenemos radicales aniónicos o catiónicos. En el organismo estas especies suelen ser neutralizadas por los antioxidantes disminuyendo los efectos dañinos, como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa que se encargan de restaurar el daño oxidativo (Martemucci *et al.*, 2022; Parcheta *et al.*, 2021).

El electrón desapareado de un radical libre se indica mediante un punto en el átomo o grupo predominantemente, por ejemplo $\cdot\text{H}$ (radical de hidrógeno), $\cdot\text{OH}$ (radical hidroxilo) y $\cdot\text{CH}_3$ (radical metilo). En los radicales de oxígeno, el electrón desapareado se encuentra principalmente en un átomo de oxígeno, por ejemplo, superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno pueden ser compuestos



radicales o no radicales, estas últimas suelen desencadenar fácilmente reacciones de radicales libres en los organismos vivos, aun siendo no radicales se consideran dentro de la denominación de ROS, los radicales tienen diferente reactividad; por ejemplo, la reactividad de ROS en orden decreciente es: $\cdot\text{OH} > \text{O}_2^{\cdot-} > \text{H}_2\text{O}_2$, así que esta reactividad se relaciona con el potencial para lesionar las moléculas biológicas (Martemucci *et al.*, 2022).

4.2.2 Principales especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno engloba tres especies químicas de la vía Fenton/Haber-Weiss (radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 y radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$), productos de la reducción parcial del oxígeno. La reducción de cuatro electrones del oxígeno molecular lleva a la producción de agua sin la propagación de ROS, en cambio la reducción de un electrón provoca la producción del radical superóxido, peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo. Los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{OH}$ tienen electrones desapareados en orbitales externos así que se consideran radicales libres, mientras que otros compuestos como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que no tiene electrones desapareados son no radicales (Tabla 1), (Martemucci *et al.*, 2022).

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo (Martemucci *et al.*, 2022).

Especies reactivas de oxígeno (ROS)					
Radicales			No radicales		
Nombre	Símbolo	Vida media	Nombre	Símbolo	Vida media
Superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$	10^{-6} s	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Estable
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-10} s	Ozono	O_3	s
Hidroperóxido	HO_2^{\cdot}	s	Oxígeno singlete	$\text{O}_2 (^1\Delta_g)$	10^{-6} s
Peroxilo	ROO^{\cdot}	17 s	Ácido hipocloroso	HOCl	Estable (min.)
Alcoxilo	RO^{\cdot}	10^{-6} s	Peroxinitrito	ONOO^-	10^{-3} s
Hidroperóxido orgánico	ROOH	Estable			

s. segundos; min. minutos.

4.2.2.1 Radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

En el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) se encuentra reducido el oxígeno molecular que es formado al recibir un electrón en un orbital antienlazante π^* . Con sólo un electrón desapareado, el superóxido es menos radical que el O_2 , la incorporación de otro electrón al $\text{O}_2^{\cdot-}$ genera el ion peróxido (O_2^-), que es un no radical dado que no tiene electrones desapareados sin



embargo tiene un enlace oxígeno-oxígeno más débil. Al añadir dos electrones más al O_2^{2-} elimina completamente el enlace, generando dos O_2^- (iones de óxido). El producto de reducción de dos electrones del O_2 da como resultado H_2O_2 y la reducción de cuatro electrones genera agua. Esto se efectúa generalmente la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el desarrollo de la fosforilación oxidativa, que da como producto trifosfato de adenosina (ATP). El anión superóxido se genera por actividad enzimática o no enzimática, por transferencia directa de electrones a una molécula de oxígeno o por medios fotoquímicos; en los sistemas biológicos, $O_2^{\cdot-}$ es el primordial iniciador de especies reactivas como $\cdot OH$, 1O_2 , $HOCl$, $ONOO\cdot$, $CO_3^{\cdot-}$ y $GSSG^{\cdot-}$ (disulfuro de glutatión). Las enzimas que originan superóxido comprenden oxigenasas que dependen del citocromo P450 y xantina oxidasa dependiente de lipoxigenasa, ciclooxigenasa y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Martemucci *et al.*, 2022).

Dos radicales superóxidos pueden reaccionar y producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede reducirse a agua o reducirse parcialmente al radical hidroxilo extremadamente reactivo ($\cdot OH$). La dismutación del radical superóxido puede efectuarse por dos formas, espontánea o catalizada por enzimas como superóxido dismutasa. La producción de $\cdot OH$ es posible por la descomposición de H_2O_2 , catalizada mediante iones de metales de transición en el estado de valencia inferior, como Fe^{2+} o Cu^+ o por la reacción de H_2O_2 con un radical superóxido, además los metales de transición oxidados de la reacción de Fenton pueden reducirse nuevamente a través de $O_2^{\cdot-}$, debido a que es altamente reactivo tiene la capacidad de lesionar moléculas de proteínas, lípidos o ADN (Martemucci *et al.*, 2022).

4.2.2.2 Radical Hidroxilo ($\cdot OH$).

El radical más reactivo químicamente que se genera *in vivo* es el radical hidroxilo $\cdot OH$, se produce a través de la reacción de Fenton donde el hierro libre (Fe^{2+}) reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por la reacción de Haber-Weiss del radical superóxido con hierro férrico (Fe^{3+}) produciendo Fe^{2+} . La reacción no se limita al hierro, ya que involucra otros metales (Cu^{2+} , Ti^{4+} y Co^{3+}) en algunas ocasiones, se calcula que una célula genera aproximadamente 50 radicales hidroxilos por segundo debido a que tienen el mayor potencial de reducción de un electrón, por estos motivos se consideran las especies libres



más dañinas por tener la capacidad de lesionar a gran variedad de moléculas a pocos nanómetros después que se generan. Se considera que el $\cdot\text{OH}$ es responsable del 60-70 % del daño tisular ocasionado por la radiación ionizante (Martemucci *et al.*, 2022).

4.2.3 Enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo.

Se han identificado dos mecanismos del estrés oxidativo que originan algunas enfermedades, el primero se centra en la liberación de especies reactivas en el desarrollo del estrés oxidativo, como $\cdot\text{OH}$, ONOO^- y HOCl , dado que producen la oxidación de macromoléculas de ácidos nucleicos, lípidos de membrana, enzimas y proteínas estructurales, lo que lleva a un mal funcionamiento y la muerte; el segundo se basa en una señalización redox anormal, los oxidantes como H_2O_2 generados por la células mediante una estimulación fisiológica actúan como segundos mensajeros, sin embargo, en el estrés oxidativos una producción no fisiológica de este oxidante ocasiona un fallo en la señalización redox (Forman & Zhang, 2021).

Los dos mecanismos pueden intervenir en la aparición de una enfermedad, un ejemplo es la diabetes, en la que se aglomeran productos de la glicación avanzada y una activación de las vías de señalización anormal del estrés oxidativo. Asimismo, una producción mayor de H_2O_2 y liberación de hierro proveniente de las proteínas en el estrés oxidativo debido a $\text{O}_2\cdot^-$ y ONOO^- ocasiona un incremento considerable de productos de la lipoperoxidación, además de una señalización anormal. Por otra parte, los tipos de contribuciones a las patologías generadas por el estrés oxidativo se dividen en dos grupos, el primero es donde se considera al estrés como la fuente primordial del desarrollo de la enfermedad como la toxicidad debido a la radiación; el segundo es donde se considera al estrés oxidativo como una causa secundaria de la aparición de la enfermedad (Forman & Zhang, 2021).

4.3 Relación de ROS y cáncer.

Las especies reactivas de oxígeno son consideradas subproductos del oxígeno en el metabolismo celular, se han relacionado con el cáncer debido a que se han encontrado en células tumorales altos niveles de ROS y daños en proteínas, lípidos y ADN, generando inestabilidad genética y carcinogénesis que pueden ser oncogénicos (Figura 4). Las ROS en



el cáncer pueden ejercer un papel de moléculas de señalización, favoreciendo el crecimiento irregular de las células, metástasis, evasión de la apoptosis y angiogénesis (Moloney & Cotter, 2018).

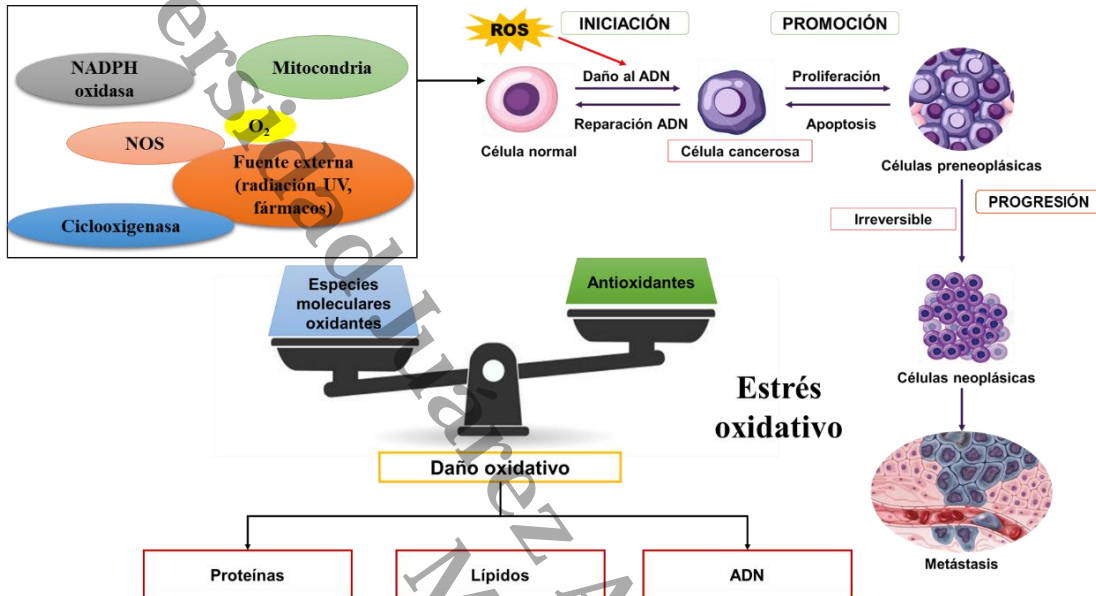


Figura 4. Implicación de los radicales libres (ROS) en el desarrollo del cáncer, un desequilibrio entre especies moleculares oxidantes y antioxidante puede generar un estado de estrés oxidativo causando daños en proteínas, lípidos y ADN. Figura propia.

Los antioxidantes sirven como defensa para evitar la acumulación en grandes cantidades de ROS generando un equilibrio de oxidación-reducción, en las células tumorales los antioxidantes eliminan excesos de ROS pero mantienen cantidades de ROS protumorales, ocasionando que se genere y desarrolle la resistencia a la apoptosis, esta producción de ROS también pueden afectar la resistencia a algunos medicamentos, dado que existe en el cáncer una falta de estabilidad genómica y daño en el ADN (Moloney & Cotter, 2018).

4.4 Antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias que, cuando están presentes en concentraciones adecuadas inhiben, retrasan, controlan o previenen el daño oxidativo que llevan al desencadenamiento de enfermedades degenerativas en el organismo. Los antioxidantes inhiben los radicales libres compitiendo en la reacción de oxidación de lípidos generando productos estables que no seguirán participando en la oxidación en reacción de cadena. Los denominados



antioxidantes secundarios se encargan de prevenir o retardar la oxidación al erradicar los promotores de la oxidación, entre ellos se encuentran los iones metálicos, el oxígeno singlete y las enzimas prooxidativas (Romulo, 2020; Shahidi & Zhong, 2015).

El efecto de los antioxidantes puede estar determinado por diversos factores como las características estructurales, concentración, temperatura, tipo de sustrato de oxidación y estado físico del sistema, ubicación de acción, así como la presencia de prooxidantes y sinergistas. Todos estos puntos deben considerarse al evaluar la eficacia y seleccionar un antioxidante adecuado para una aplicación específica (Shahidi & Zhong, 2015).

4.4.1 Características de los antioxidantes.

Un efecto de un antioxidante está determinado por diversas variables como características estructurales, por ejemplo, la estructura química establece la reactividad intrínseca de los antioxidantes con los radicales libres, la termodinámica de la reacción y el nivel en que reacciona el antioxidante, otras características son la concentración, tipo de sustrato de oxidación y estado físico del sistema, así como la presencia de prooxidantes y sinergistas (Shahidi & Zhong, 2015).

4.4.2 Fuente de antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden encontrar de forma natural en plantas, animales y microorganismos, otra opción es su síntesis a través de medios químicos. Principalmente las plantas superiores y sus constituyentes son una abundante fuente de antioxidantes naturales, ejemplos son los tocoferoles y polifenoles; que están presentes en diversos recursos como hierbas, frutas, verduras, cereales, semillas, vino tinto, té y aceites. Las fuentes de antioxidantes que provienen del mar son algas, peces, mariscos y algunas bacterias marinas. También en subproductos de las industrias alimentaria y agrícola se ha encontrado potencial antioxidante como en las cáscaras y pieles de nueces y cereales, cáscaras y semillas de cítricos, harina de canola y extractos de vísceras de pescado (Parcheta *et al.*, 2021; Shahidi & Zhong, 2015).

Los antioxidantes naturales pueden ser separados de otros constituyentes de su origen para obtener los compuestos aislados que son utilizados en la industria nutracéutica o



farmacéutica. Además, se pueden utilizar directamente de su material de origen, como extractos de plantas dado que albergan un cóctel de compuestos antioxidantes con efectos sinérgicos para inhibir la oxidación. Por otra parte, los antioxidantes sintéticos conocidos como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), el galato de propilo (PG) y la terbutilhidroquinona (TBHQ), han sido empleados en la industria alimentaria para prevenir la rancidez de los productos debido a que son de bajo costo y sabor suave. Aunque su uso ha disminuido porque ahora tienen demanda los productos de etiqueta limpia, es decir, que los ingredientes deben ser totalmente naturales, por lo que requiere la búsqueda de antioxidantes eficaces de fuentes naturales (Shahidi & Zhong, 2015).

Los carotenoides son isoprenoides lipófilos (C₄₀) y son los segundos pigmentos naturales con mayor abundancia, varían de incoloros a amarillos y de naranja a rojo esto le da la pigmentación a las frutas y verduras, además están presentes en organismos fotosintéticos y en bacterias autótrofas. Los animales y los humanos no sintetizan carotenoides, sin embargo, están en la sangre y los tejidos como precursores del retinol (vitamina A), se localizan en el interior de las membranas celulares como moléculas altamente lipófilas, por otra parte los hidrocarburos estrictos, como el licopeno o el β-caroteno (Figura 5) se localizan en el interior de la bicapa lipídica, las moléculas con una configuración más polar que poseen átomos de oxígeno unidos están orientadas aproximadamente perpendiculares a la superficie de la membrana con sus partes hidrófilas hacia un ambiente acuoso. Por otra parte, se ha reportado que la ingesta de carotenoides ocasiona una disminución del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular (Mendonça, 2022).

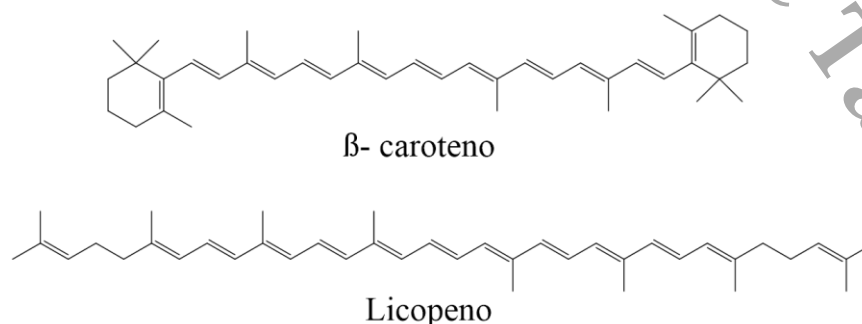


Figura 5. Ejemplos de carotenoides. Figura propia.



4.5 Métodos para la determinación de la actividad antioxidante.

Debido a que la capacidad antioxidante no se puede medir directamente, los métodos de evaluación ayudan a conocer los efectos de los antioxidantes para conocer el grado de oxidación. Hoy en día existen diversos ensayos para determinar la actividad antioxidante de un compuesto, basándose en su modo de acción de inhibición a través de pruebas *in vitro*, como la actividad eliminadora de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), la capacidad de evitar radicales hidroxilo (HORAC), capacidad antioxidante de equivalencia trolox (CAET), parámetro antioxidante que atrapa radicales totales (TRAP), capacidad antioxidante reductor de ion cúprico (CUPRAC), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), absorbancia capacidad de radicales de oxígeno (ORAC) y poder reductor antioxidante del ion férrico (FRAP), (Ivanova *et al.*, 2020; Mendonça, 2022).

Los mecanismos de acción biológica de los antioxidantes, químicamente se reducen a tres mecanismos principales (Ivanova *et al.*, 2020):

- A. Reacciones de transferencia de electrones del antioxidante al sustrato (mecanismo ET).
- B. Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno de un antioxidante a un sustrato que en medios acuosos pueden considerarse como transferencia de protones acompañada de transferencia de electrones (mecanismo HAT).
- C. Reacciones de transferencia de uno o más pares de electrones con formación de un enlace covalente mediante el mecanismo donador-aceptor (mecanismo quelante).

El mecanismo ET no se produce en el organismo en su forma pura, porque el entorno de protones está presente en el organismo vivo. Así que se considera mejor el mecanismo quelante (Figura 6) como una combinación de mecanismo mixto entre ET y HAT.

Por tanto, los métodos existentes se pueden clasificar según el esquema que se muestra en la Figura 6, de acuerdo con los tres tipos principales de reacciones.

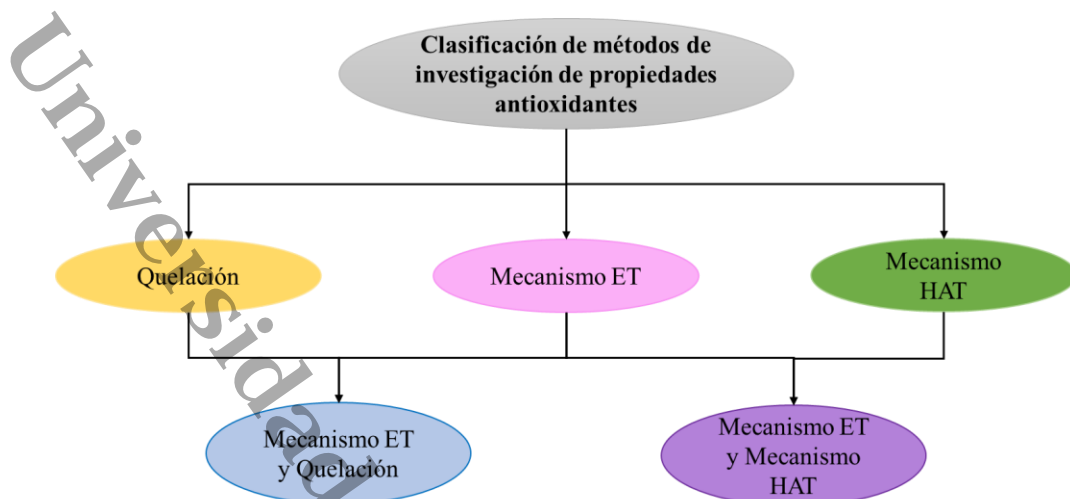


Figura 6. Clasificación de métodos para evaluar las propiedades antioxidantes integradas (modificado de Ivanova *et al.*, 2020).

4.5.1 Ensayo DPPH.

DPPH es una de las técnicas de determinación antioxidante más común de acuerdo con lo revisado en la base de datos PubMed donde hasta febrero de 2024 se reportan más de 18,000 estudios donde se implementa la técnica DPPH. Este método es una combinación del mecanismo ET y el HAT, se basa en la eliminación del DPPH por un antioxidante, en su forma radical el DPPH tiene una banda de absorción activa en λ_{\max} 515-517 nm y tiene un color púrpura, sin embargo, cuando el DPPH acepta el donante de hidrógeno hay un cambio de coloración a amarillo pálido (Figura 7). Las propiedades de los disolventes y el pH influyen en la actividad eliminadora, los disolventes próticos con enlaces fuertes de hidrógeno, como mezclas con metanol, etanol y agua que son disolventes aptos para el análisis de antioxidantes hidrófilos e hidrófobos. Se considera que es un ensayo simple, rápido, comparable y reproducible, aunque también se debe tener en cuenta que los solventes den un falso positivo en las determinaciones (Romulo, 2020).

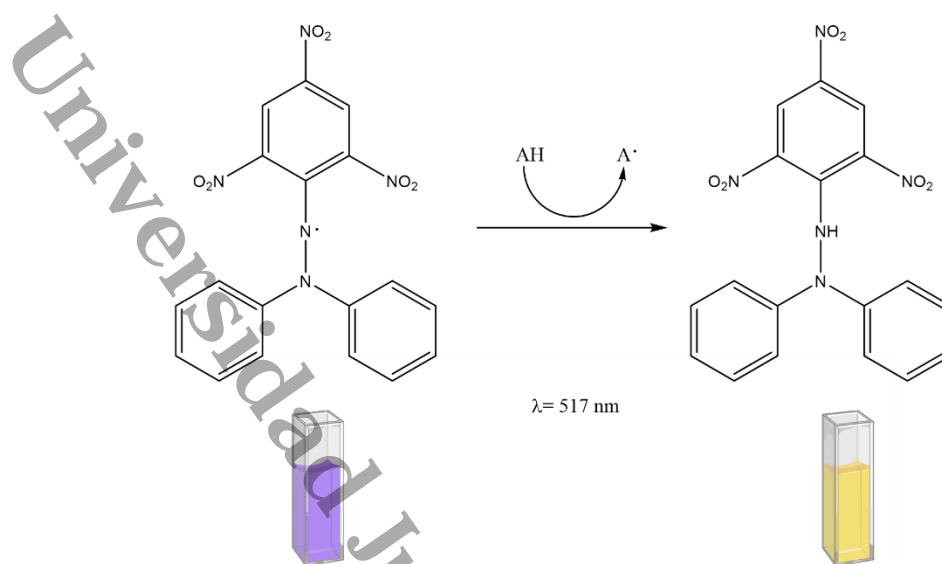


Figura 7. Mecanismo de eliminación de DPPH por un antioxidante (AH). Figura propia.

4.5.2 Ensayo ABTS.

El método ABTS se clasifica dentro de los mecanismos ET y monitorea la desaparición del catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ cuando distintas moléculas lo atrapan al reaccionar. Además, distintas bandas de absorbancia hacen que sea más amplia la cantidad de compuestos que se pueden estudiar (414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico) gracias a una menor interferencia, a diferencia del DPPH que presenta su máximo de absorbancia únicamente a 515 nm (Grande-Tovar *et al.*, 2020).

Esta técnica se basa en la eliminación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ estable (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) adecuado para el marcaje de la enzima peroxidasa (HRP), produce un color azul verdoso tras la oxidación y se realiza la comparación con Trolox, la pérdida de color se mide a λ_{max} 734 nm (Figura 8). Comúnmente el Trolox se emplea como estándar del cálculo de antioxidantes y el resultado de las muestras de los antioxidantes se representa como equivalentes de Trolox. Este método es reproducible, aplica para una amplia gama de muestras, diferentes pH y muestras de diversas polaridades (Romulo, 2020).

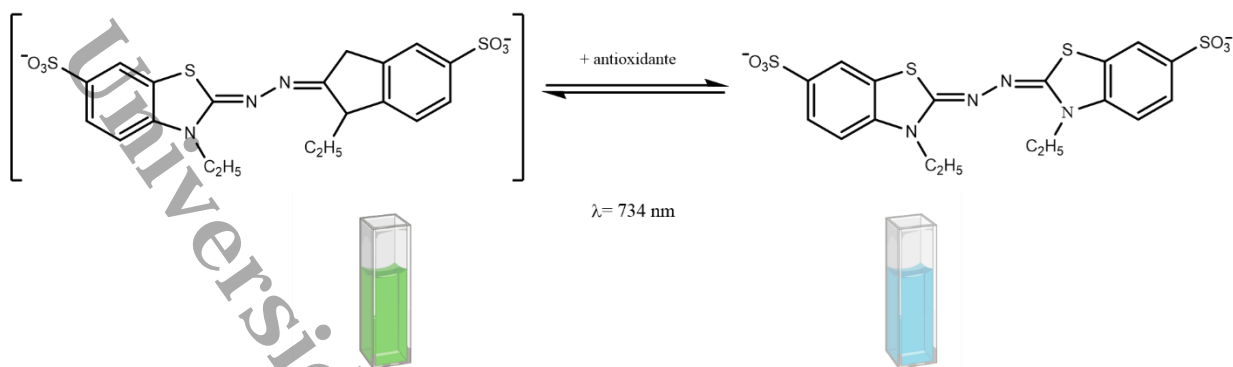


Figura 8. Principio químico del método ABTS. Figura propia.

4.6 Importancia de las especies vegetales en el tratamiento de las enfermedades.

Uno de los recursos más aprovechado por los hombres a lo largo de la historia han sido las plantas, su conocimiento en gran manera se deriva de los ancestros, el nombre con el que las identifican se debe a las personas que la utilizaban, la ubicación geográfica o la lengua que hablan los pobladores donde se ubique la planta (Maldonado *et al.*, 2020).

De acuerdo con la OMS la medicina tradicional es el conjunto de conocimientos, enfoques, creencias y prácticas que se encuentran fundamentadas por el conocimiento empírico de diversas culturas (se utilizan plantas, animales, minerales, terapias espirituales) con el objeto de procurar la salud, diagnosticar y/o prevenir algunas enfermedades en los seres humanos (OMS, 2013). La medicina tradicional es una alternativa en América Latina debido a la carencia de recursos en los sistemas de salud, el 80 % de la población en el mundo utiliza la medicina tradicional en la atención primaria de la salud. Debido a esto, la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), han trabajado por incluir la medicina tradicional a los servicios de salud (León-Montoya *et al.*, 2022; Maldonado *et al.*, 2020).

Es importante destacar que los compuestos químicos albergados en las especies medicinales no se encuentran distribuidos de manera homogénea en las partes de la planta y la cantidad de compuestos puede ser diferente debido a una variedad de factores como la época de recolección, hábitat o la forma de preparación (Maldonado *et al.*, 2020).

Se contemplan al menos 35,000 especies vegetales con potencial en la medicina tradicional, el retorno del uso de las especies se debe a que son pocos efectos secundarios que producen



en comparación con algunos medicamentos que provienen de síntesis química. En México, se ha registrado una cantidad mayor a 4,000 especies medicinales con diferentes usos, el conocimiento herbolario se ha compartido en cada generación y debido a esto, algunos usos siguen siendo aplicados hoy en día en pueblos indígenas y en lugares urbanos (Velázquez-Vázquez *et al.*, 2019).

4.7 *Epaltes mexicana* Less.

La especie vegetal *Epaltes mexicana* Less. es originaria de América Central (Figura 9) pertenece a la familia Asteraceae y es la única especie del género *Epaltes* que se encuentra en México. Se localiza en los estados de Campeche, Puebla, Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Tabasco (Redonda-Martínez, 2020). Comúnmente a esta especie se le conoce con el nombre de hierba de sapo o gurusapo, se emplea en la medicina tradicional para tratar algunos padecimientos como gripe, asma, calentamiento de cabeza, dolor muscular, infección de la garganta, mordedura de víbora, ofiadura y tos; se utilizan las hojas, raíces y ramas en té o infusión (Álvarez-Quiroz *et al.*, 2017; Magaña-Alejandro *et al.*, 2010). Otro uso de *E. mexicana* que han reportado los zapotecas del Istmo es en problemas dermatológicos (Heinrich, 2003).

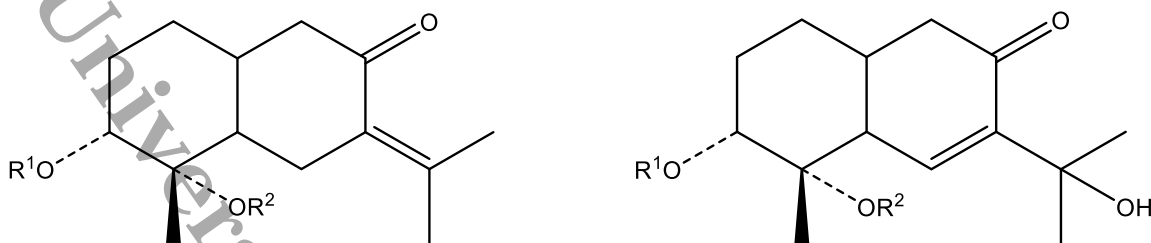
La especie *E. mexicana* se encuentra en la naturaleza en forma de arbusto color verde con hojas obovadas, bordes dentados y tallos estriados, presenta unas agrupaciones que se parecen a una flor en la parte superior, estas son redondas de color verde lima, aunque luego toman un color café (Gómez-Álvarez, 2012; Juárez-Velázquez, 2022). La temporada en que la especie florece es en los meses de marzo a noviembre, comúnmente crece en manglares, vegetación de dunas costeras, selvas altas perennifolias, halófila, hidrófila y secundaria, las características de la tierra donde crece es que sea arenosa o arcillosa y tenga un pH básico (Redonda-Martínez, 2020).



Figura 9. Especie vegetal *Epaltes mexicana* utilizada en la presente investigación. Figura propia.

4.7.1 Antecedentes fitoquímicos de *Epaltes mexicana*.

Respecto a los antecedentes fitoquímicos de *E. mexicana* se han encontrado sesquiterpenos y particularmente se han aislado ocho sesquiterpenos que tienen actividad bacteriana, el trabajo reportado por Maldonado-Jiménez (1989), indica que se obtuvieron partes aéreas secas molidas de *E. mexicana* (682 g) recolectadas en Chiapas, México y se extrajeron con *n*-hexano (5 L), acetona (5 L) y metanol (3 L), proporcionando 35.4 g, 14.2 g y 9.5 g de rendimiento, respectivamente. El extracto hexánico se fraccionó en una columna de gel de sílice eluida con un gradiente de hexano con acetato de etilo, se descartaron las fracciones menos polares y las restantes se combinaron con el extracto de acetona y metanol, después de otros procedimientos como filtración y purificación con cromatografía en columna (CC) con una elución de acetato de etilo: *n*-hexano, 2:3, se analizó por RMN y se identificaron siete sesquiterpenos (Figura 10).



1 $R^1 = 2',3'$ -epoxi -2'-metilbutirilo, $R^2 = H$

2 $R^1 =$ Tigloilo, $R^2 = H$

3 $R^1 = 2',3'$ -epoxi -2'-metilbutirilo, $R^2 = Ac$

4 $R^1 = 2',3'$ -dihidroxi -2'-metilbutirilo, $R^2 = H$

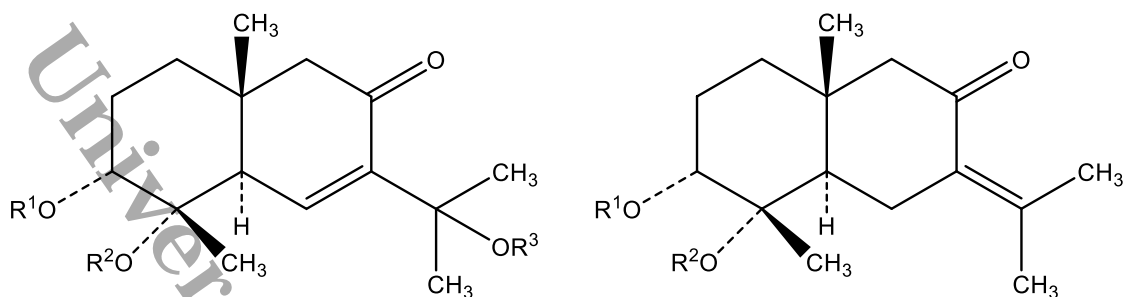
5 $R^1 = 2',3'$ -epoxi -2'-metilbutirilo, $R^2 = Ac$

6 $R^1 = 2',3'$ -epoxi -2'-metilbutirilo, $R^2 = H$

7 $R^1 =$ Angeloil $R^2 = H$

Figura 10. Sesquiterpenos de la especie *E. mexicana* (tomado de Maldonado-Jiménez, 1989).

Por otra parte, Kato *et al.* (1996) reportó que esta especie crece en el sur de México y sus hojas se utilizan en la medicina tradicional para infecciones fúngicas y bacterianas además de ser usada para tratar la fiebre, de las partes aéreas de *E. mexicana* (300 g) mediante cromatografía al vacío (VLC) y cromatografía en capa fina (CCF) se hizo un fraccionamiento guiado por bioactividad donde se encontró que una fracción de *n*-hexano mostró actividad antibacteriana. Para la purificación final se utilizó HPLC (hexano: AcOEt, 65: 35) y la identificación se hizo por RMN donde se encontraron ocho sesquiterpenos (Figura 11), mostraron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*.



1 $R^1 = \text{epoxyang}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{OH}$

2 $R^1 = \text{epoxyang}$, $R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{OH}$

5 $R^1 = \text{ang}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{OH}$

6 $R^1 = \text{ang}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$

7 $R^1 = \text{epoxyang}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$

8 $R^1 = \text{epoxyang}$, $R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{H}$

3 $R^1 = \text{epoxyang}$, $R^2 = \text{H}$

4 $R^1 = \text{epoxyang}$, $R^2 = \text{Ac}$

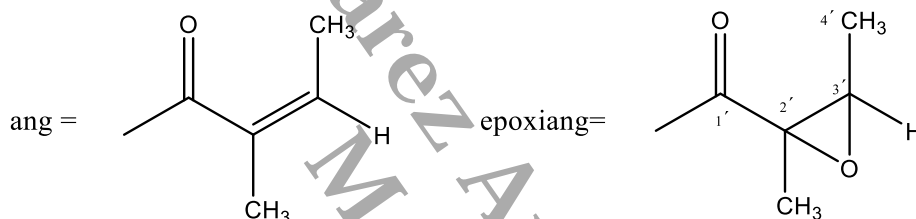


Figura 11. Sesquiterpenos con actividad antibacteriana de la especie *E. mexicana* (tomado de Kato *et al.*, 1996).

Así mismo, como antecedente de este trabajo se evaluaron tres extractos orgánicos de diferente polaridad de *E. mexicana* a través de un estudio biodirigido, extracto hexánico de *E. mexicana* (EHEm), extracto diclorometánico de *E. mexicana* (EDEm) y extracto metanólico de *E. mexicana* (EMEm), para conocer el efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), (Juárez-Velázquez, 2022).

El EHEm presentó efecto citotóxico en el modelo de estudio, por lo que se continuo con la separación de sus componentes a través de CC y en CCF y se reunieron en 19 fracciones, que fueron evaluadas en el mismo modelo de estudio y la fracción del EHEm que presentó actividad citotóxica fue la fracción 6. Debido a esto, se evaluó en otros modelos celulares (Tabla 2), (Juárez-Velázquez, 2022).



Tabla 2. Parámetros evaluados de las curvas concentración-respuesta del efecto citotóxico de la fracción 6 del EHEm sobre la viabilidad celular.

Línea celular	CI ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (%)
MCF-7	6.31	74.69 ± 6.19
MDA-MB-231	124.21	79.28 ± 12.12
SiHa	124.34	82.96 ± 6.02
DU-145	ND	39.41 ± 6.34
MCF-10A	ND	25.51 ± 5.035

MCF-7: cáncer de mama; MDA-MB-231: cáncer de mama; SiHa: cáncer cervicouterino; DU-145: cáncer de próstata; y MCF-10A: glándula mamaria no tumorigénica.

En la Figura 12 se pueden observar las gráficas del efecto de la F6 del EHEm en la inhibición del porcentaje en la viabilidad celular de los modelos celulares, estos mostraron ser dependiente de la concentración y en la Tabla 2 se muestran las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) y los efectos máximos (E_{max}) obtenidos del efecto de la F6 en los modelos celulares, teniendo una mayor potencia en MCF-7 y mayor eficacia en SiHa, interesantemente en las células no tumorigénicas de MCF-10A no tuvo una disminución significativa en la viabilidad celular (Juárez-Velázquez, 2022).

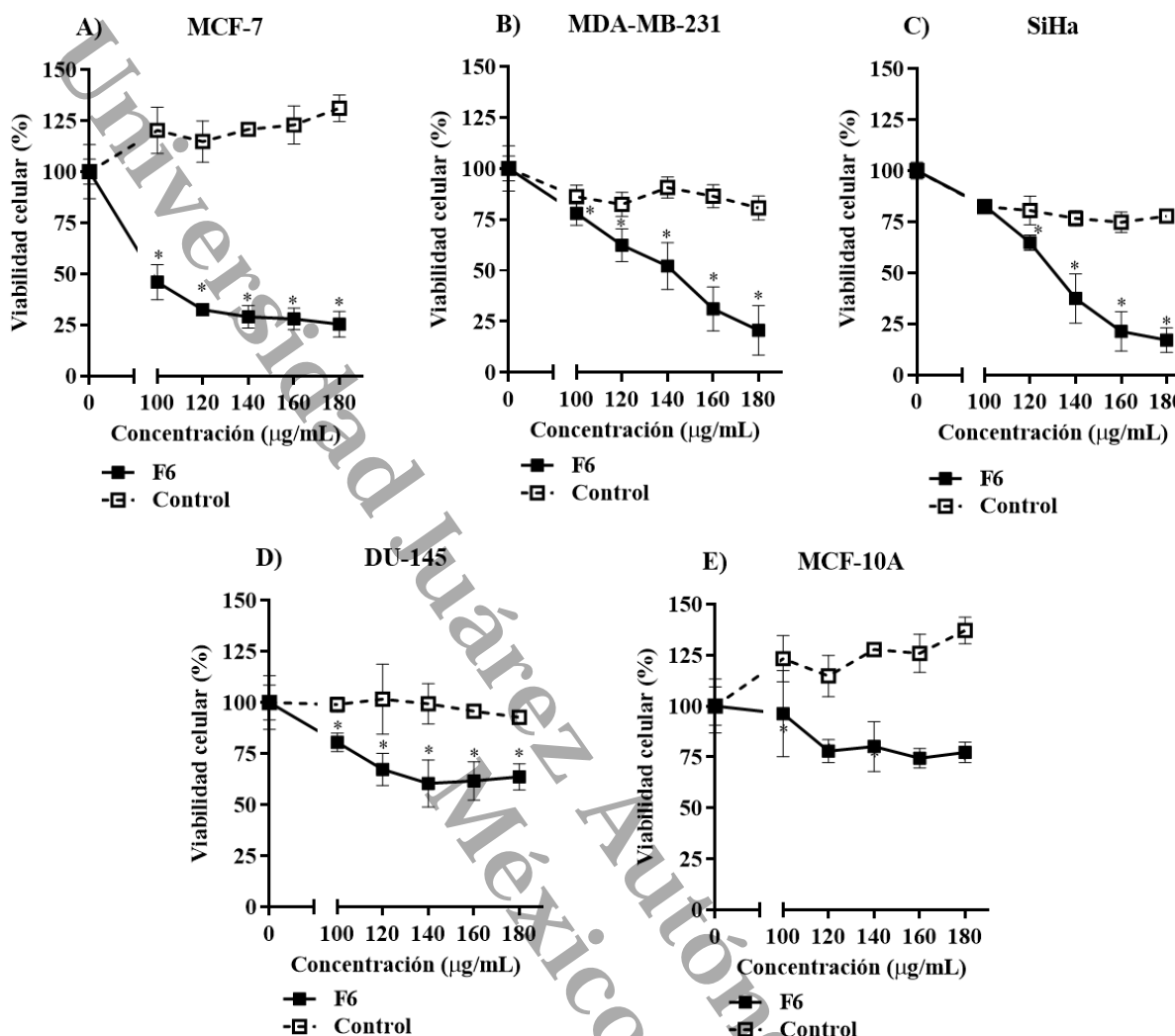


Figura 12. Gráficas de las curvas concentración-respuesta del efecto citotóxico de la reunión de fracciones No. 6 del extracto hexánico de *Epaltes mexicana* sobre la viabilidad celular, los resultados son expresados como el promedio \pm DE de 6 experimentos. A) modelo celular MCF-7, pertenece a células de cáncer de mamá. B) modelo celular MDA-MB-231, corresponde a células de cáncer de mamá. C) modelo celular SiHa, proveniente de cáncer cervicouterino contiene el virus del papiloma humano subtipo16. D) modelo celular DU-145, derivada de cáncer de próstata. E) modelo celular MCF-10A, originaria del epitelio mamario no tumoral. Se utilizó como control dimetilsulfóxido (DMSO), (Juárez-Velázquez, 2022).

4.8 Métodos para la identificación de metabolitos secundarios con actividades biológicas.

La metabolómica es la rama de las ciencias ómicas que se encarga del estudio, identificación y cuantificación de los metabolitos tanto endógenos y exógenos, por ejemplo en células, biofluidos o tejidos en un tiempo y condiciones determinadas; se ha utilizado



para conocer el estado bioquímico, debido a que es de utilidad en el estudio y diagnóstico de enfermedades, así como en el descubrimiento de productos naturales. El término metaboloma engloba a todos los metabolitos secundarios, lípidos, aminoácidos, azúcares, hormonas, ácidos grasos, carbohidratos (Collado-Martín, 2017; Zhang *et al.*, 2012).

La metabolómica en el estudio de las plantas medicinales ha permitido detectar e identificar metabolitos con propiedades farmacológicas debido a que facilita el aislamiento a través de la correlación de la constitución de los diversos análisis de plantas reportados por los procesos de fraccionamiento y purificación que se han determinado en los bioensayos. Las plataformas de análisis más comunes en los estudios metabolómicos son la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN), (Hernández-Bolio, 2017).

4.8.1 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica selectiva que detecta y determina la cantidad de un componente en una mezcla, identifica las partículas ionizadas mediante la relación masa/carga (m/z); los equipos de MS hacen uso de campos magnéticos solos o en combinación con los eléctricos para modificar la posición de las partículas ionizadas y obtener un espectro de la relación m/z . La MS se combina con cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) para los análisis metabolómicos ya que se complementan generando una alta definición del sistema cromatográfico y alta sensibilidad en los detectores MS, miles de metabolitos de las muestras biológicas se separan primero entre sí en un inicio a través del cromatógrafo en función de sus diferentes propiedades sin perder la sensibilidad (Collado-Martín, 2017; Zeki *et al.*, 2020).

Por otra parte, los analizadores de masas se clasifican de acuerdo con su mecanismo de separación por ejemplo cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), orbitrap, trampa de iones, resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FTICR); en los estudios metabolómicos los primeros dos métodos son los más comunes. Los espectrómetros de cuadrupolo utilizan campos eléctricos oscilantes para estabilizar o desestabilizar los iones que atraviesan un campo cuadrupolar de radiofrecuencia diseñado por cuadro placas lineales, por lo que los iones pasan en un tiempo preciso y con un valor de m/z determinado, los analizadores se pueden conectar para formar un tándem de espectrómetros



de masas (MS/MS). En este sentido, un perfil metabolómico por espectrometría de masas implica la unión de MS con técnicas como la LC o GC, ambas técnicas analizan grandes cantidades de metabolitos con mayor sensibilidad en comparación con la RMN (Collado-Martín, 2017; Zeki *et al.*, 2020).

4.8.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

La MS y la cromatografía han evolucionado a lo largo de los últimos años, así que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la MS se combinan para proporcionar un análisis más específico caracterizando los metabolitos endógenos o exógenos desconocidos en muestras biológicas complejas, con esta combinación no es necesario derivatizar los compuestos previo al análisis. Las separaciones por HPLC son aptas para el análisis de compuestos polares, no polares lábiles y no volátiles, la técnica LC-MS utiliza un enfoque de ionización suave debido a esto la MS es más robusta, proporcionan valores m/z , tiempos de retención y una estimación de la abundancia relativa de las especies identificadas, es una técnica reproducible y de alta resolución. Las interacciones de los metabolitos y el sistema cromatográfico se basan en las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos, el tipo de fase estacionaria, por lo que las interacciones determinan el orden de elución en el sistema cromatográfico (Zeki *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2012).

La separación de la muestra se logra con una columna adecuada determinada por la longitud, el diámetro interior, la fase móvil y la velocidad lineal, además la fase estacionaria adecuada brinda una separación más eficaz; y con un tiempo de retención apropiado para la muestra definido por el diámetro interior de la columna, el espesor de la película y la temperatura. En el área de la metabolómica la longitud de la columna generalmente debe ser de 100 a 150 mm y el tamaño de partícula de 1.5 a 3 μm , aunque también hoy en día se emplean columnas de diámetro interior de 1 a 4.6 mm y longitud de 3 a 7 cm en la LC-MS, se emplean comúnmente columnas C18 y C8 (Zeki *et al.*, 2020).

4.8.2.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo.

El sistema se compone por la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con



cuadrupolo tiempo de vuelo (LC/MS-QTOF), el espectrómetro está conformado por tres partes principales: fuente de iones, analizador de masas y detector. Comúnmente se emplean fuentes de iones como ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), entre otras. Se emplean análisis en modos de ionización positivo (+) y negativo (-) bajo un rango de escaneo para maximizar la cobertura del metaboloma dado que las propiedades químicas de los metabolitos son de naturaleza diversa. Se prefiere en los estudios de metabolómica el acoplamiento LC-MS con ESI debido a la capacidad de ionización suave produce una gran cantidad de iones a través del intercambio de carga en solución y generalmente crea iones moleculares intactos que facilitan a la identificación inicial. El uso de capacidades de ionización dual (por ejemplo, ESI y APCI) se aplican actualmente dado que presentan una mayor cobertura del metaboloma (Zeki *et al.*, 2020).

Por otra parte, los detectores TOF se emplean en los análisis metabolómicos basados en LC-MS debido a su precio asequible, alta resolución y detección rápida de analitos; sin embargo, los analizadores de masas Q no son adecuados para estudios de metabolómica no específicos debido a su baja resolución, pero la combinación de Q con MS de alta resolución como TOF u orbitrap brinda anotaciones precisas de metabolitos en el análisis LC-MS, donde se obtiene alta resolución de la masa molecular y los patrones de fragmentación de los metabolitos en los espectros MS/MS. Estos dos datos ortogonales disminuyen las anotaciones falsas en los estudios de metabolómica LC-MS, debido a que existe una tasa de error de falsos positivos en las definiciones basadas en la masa ya que una variedad de isótopos tienen la misma masa pero diferente estructura química por eso se realiza la comparación de espectros MS/MS. Para definir e interpretar las masas obtenidas en los análisis se utilizan bases de datos públicas para la anotación de metabolitos como HMDB, METLIN, MetaCyc y NIST (Zeki *et al.*, 2020).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. JUSTIFICACIÓN



5. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer es una enfermedad que se considera un problema de salud pública siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial y en el año 2020 ocasionó 10 millones de muertes (Crosby *et al.*, 2022). En el 2021, en México se registraron 90,123 defunciones debido a los tumores malignos (INEGI, 2023); aunque existen diversos tipos de fármacos contra el cáncer aún sigue ocupando las primeras tasas de diagnóstico y de mortalidad, específicamente el cáncer de mama, cervicouterino y próstata (INSP, 2020; Sánchez-Mercader *et al.*, 2021).

Las especies vegetales son utilizadas para tratar diversos efectos terapéuticos debido a los metabolitos que poseen (Pedraza-Alva *et al.*, 2019); se ha señalado que la actividad citotóxica de las plantas medicinales está relacionada con su composición química (Canga *et al.*, 2022). Particularmente la especie *Epaltes mexicana* ha demostrado tener sesquiterpenos con actividad antibacteriana (Heinrich, 2003; Wu *et al.*, 2006) y recientemente actividad citotóxica selectiva en la fracción 6 del extracto hexánico de *E. mexicana* en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino (Juárez-Velázquez, 2022). Por este motivo, se realizó la determinación cualitativa de los compuestos en dicha fracción, con el objetivo de identificar las moléculas o compuestos responsables de la actividad citotóxica, el perfil metabólico se realizó a partir de la anotación de iones por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. No obstante, cabe señalar que existe poca evidencia científica fitoquímica de la especie vegetal *E. mexicana*.

Por otro lado, se ha reportado que metabolitos de la familia Asteraceae presentan actividad antioxidante y modulan las vías de señalización celular que afectan los mecanismos de defensa celular preservando células no tumorogénicas de las ROS y conduciendo a la muerte celular a las células cancerosas (Prakash *et al.*, 2021; Yimer *et al.*, 2021), por lo que en este trabajo de investigación también se realizó la evaluación antioxidante mediante los ensayos DPPH y ABTS de la fracción 6 para determinar si existe una relación entre la actividad citotóxica y antioxidante.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN



6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿El contenido metabólico de la fracción 6 del extracto hexánico de *Epaltes mexicana* estará relacionado con el efecto citotóxico previamente reportado y con una posible actividad antioxidante?

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

7. HIPÓTESIS



7. HIPÓTESIS.

La determinación del perfil metabólico de la fracción 6 del extracto hexánico de *Epaltes mexicana* mediante LC/MS-QTOF permitirá conocer los metabolitos secundarios responsables de la actividad citotóxica; por otra parte, la evaluación por DPPH y ABTS de los extractos orgánicos y de la fracción 6 del EHEm proporcionará información sobre la actividad antioxidante de la especie y su posible relación citotóxica.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
Mexico.

8. OBJETIVO GENERAL



8. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto antioxidante de extractos orgánicos de la especie vegetal *Epaltes mexicana* y determinar el perfil metabólico de la fracción citotóxica del extracto hexánico.

9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 9.1 Recolectar e identificar la especie vegetal *Epaltes mexicana*.
- 9.2 Obtener el extracto hexánico, diclorometánico y metanólico de *Epaltes mexicana* mediante la técnica de maceración.
- 9.3 Realizar la separación de los componentes del EHEm mediante cromatografía en columna y agruparlos de acuerdo con la técnica de cromatografía en capa fina para la obtención de fracción 6.
- 9.4 Determinar el perfil metabólico de la fracción 6 del extracto hexánico de *Epaltes mexicana* a través de LC/MS.
- 9.5 Evaluar la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de *Epaltes mexicana* y de la fracción 6 de EHEm a través de las pruebas DPPH y ABTS.
- 9.6 Identificar la relación de los metabolitos citotóxicos de la fracción 6 con un efecto antioxidante.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

10. METODOLOGÍA



10. METODOLOGÍA.

Se efectuó la metodología que se presenta en la figura 13.

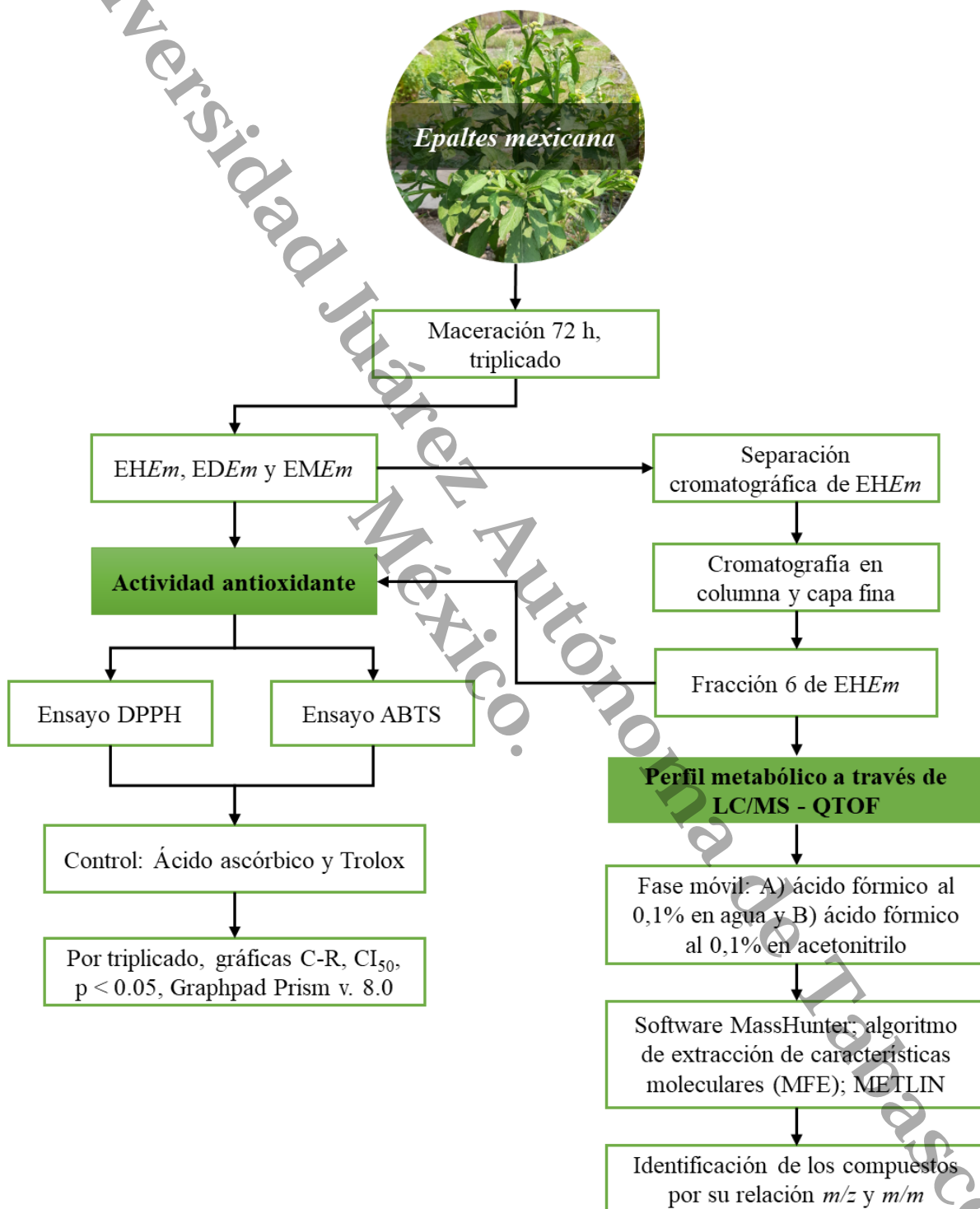


Figura 13. Diagrama de la metodología realizada en esta investigación.



De acuerdo con una metodología realizada por Juárez-Velázquez (2022), se realizó la obtención de las fracciones activas del extracto hexánico de *Epaltes mexicana*.

10.1 Recolección e identificación de la especie vegetal *Epaltes mexicana*.

Se recolectó la especie *E. mexicana* en el municipio Cárdenas, Tabasco con coordenadas 18°19'14" N, 93°31'43" O, se identificó en la División Académica de Ciencias Biológicas por la Dra. Nelly Jiménez Pérez y quedó registrada con el número de váucher 36,574. Después de la recolección, se realizó la remoción de los contaminantes externos como polvo, microorganismos y otras partículas para la limpieza correcta de la especie. Se desecó *E. mexicana* bajo la sombra durante 2 semanas, se fragmentó toda la especie de forma general en una licuadora marca American® modelo 7972 de 350 watts de potencia, posteriormente, se pesó en una balanza analítica marca Ohaus® Pioneer PA214 y finalmente se puso en contacto con los disolventes (Juárez-Velázquez, 2022).

10.2 Obtención de los extractos vegetales.

Se realizó la extracción de los componentes de *E. mexicana* mediante la técnica de maceración con disolventes de polaridad ascendente. Primero, se colocó la especie vegetal con el disolvente *n*-hexano (C₆H₁₄) hasta saturar el material vegetal durante 72 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el material vegetal se separó por filtración y el disolvente se eliminó al vacío utilizando un rotavapor marca DLAB a 60°C y 90 revoluciones por minuto (r.p.m.), la maceración se realizó por triplicado para obtener el extracto hexánico de *E. mexicana* (EH_{Em}). Posteriormente, el material vegetal utilizado anteriormente se maceró con diclorometano (CH₂Cl₂) y finalmente con metanol (CH₃OH) bajo las mismas condiciones mencionadas para *n*-hexano. De esta manera, también se obtuvo el extracto diclorometánico de *E. mexicana* (ED_{Em}) y el extracto metanólico de *E. mexicana* (EM_{Em}), para obtener el rendimiento en porcentaje se utilizó la siguiente fórmula (Juárez-Velázquez, 2022):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de los extractos obtenidos}}{\text{Masa del material vegetal seco}} \times 100$$



10.3 Separación e identificación mediante cromatografía en columna.

Se separó el EHEm por cromatografía en columna (CC), pues tuvo efecto citotóxico según lo reportado en Juárez-Velázquez (2022). Para la fase estacionaria de la columna cromatográfica (22 x 300 mm) se utilizó alúmina (90 g; grado cromatografía, 40-300 μ m, Thermo Scientific Chemicals) y para la fase móvil se empleó un método de gradiente de *n*-hexano y diclorometano. Se colocó 300 mg del EHEm en la superficie del adsorbente, se abrió la llave de la columna para que eluyera la muestra hasta que se absorbió. Después se llenó la parte superior de la columna con el eluyente y se abrió la llave de la columna estableciendo un flujo continuo con recolecciones de 10 mL, los solventes utilizados se indican en la Tabla 3, cada recolección se monitorea por CCF para la agrupación correcta de las fracciones (Juárez-Velázquez, 2022).

Tabla 3. Disolventes utilizados para la obtención de la colección de fracciones No. 6 del EHEm

Número asignado	Recolección (10 mL)	Eluyentes
1	1 - 32	Hexano 100 %
2	33 - 36	Hexano – Diclorometano 4:6
3	37 – 39	Hexano – Diclorometano 4:6
4	40	Hexano – Diclorometano 4:6
5	41 - 43	Hexano – Diclorometano 4:6
6	44 – 48	Hexano – Diclorometano 4:6

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas CCF Silica gel 60 F₂₅₄ marca Merck KGaA®. Primero, se colocaron las recolecciones de EHEm a un cm del borde inferior de la placa, por cada una se colocaron cinco recolecciones para el monitoreo de su composición, después se llevó la placa a una cámara cerrada con *n*-hexano y diclorometano (2:8) como fase móvil, esta no estuvo en contacto con las muestras. Cuando el disolvente estuvo a un cm del borde superior de la placa se sacó de la cámara y se dejó secar el disolvente, se observó bajo la luz UV, las recolecciones que presentaron las mismas características se agruparon (Juárez-Velázquez, 2022).

9.4 Determinación del perfil metabólico a través de LC/MS-QTOF.

Para efectuar la corrida cromatográfica se utilizó el sistema de cromatografía líquida con un sistema LC (1290 Infinity II, Agilent Technologies), equipado con una bomba cuaternaria y.



acoplado a un espectrómetro de masas de ionización por ESI, con Q-TOF de la serie Agilent 6545 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos), (Figura 14) en modo de ionización positiva, este equipo se localiza en el Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAT), de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Primero, se colocó 1 mg de la fracción activa de EHEm en 1 mL de acetonitrilo (MeCN) y se agitó en un vortex marca DLAB por 1 min, seguidamente la muestra se pasó a través de un filtro de nailon de 0.45 μm y se diluyó 1:100 con MeCN para realizar la elución se utilizaron MeCN y agua como diluyentes, en conjunto con ácido acético en modo positivo. La separación cromatográfica se realizó en una columna bioZen™ XB-C18 (100 \times 2.1 mm \times 1.7 μm), se emplearon dos fases móviles con las siguientes concentraciones (A) ácido fórmico al 0.1 %/H₂O v/v y (B) ácido fórmico al 0.1 %/ MeCN v/v, se realizó la elución en un método de gradiente (50:50 v/v, 0-5 min; 25:75 v/v, 5-15 min; 0:100 v/v y 15-25 min). La inyección de la muestra fue de 5 μL , con un caudal de 0.2 mL/min, en la elución se empleó en el modo masas, se utilizó masas de referencia de purina protonada (121.050873 m/z), hexakis protonada (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi) y fosfazina (HP-921; 922.009798 m/z). Para lavar la fase estacionaria, como blanco y para la identificación de los compuestos ajenos a la muestra se utilizó MeCN a través de una solución calibrante (Rodríguez-Morales *et al.*, 2021).

Se realizó experimentos de MS/MS dirigido para anotar el perfil metabólico y para reconocer los patrones de fragmentación a través del modo de adquisición MS² dirigida y una energía de colisión fija de 20 eV. Los datos cromatográficos se analizaron en el software MassHunter (versión B.07.00). Los compuestos se obtuvieron mediante el algoritmo de extracción de características moleculares (MFE) y la identificación de los compuestos fue a través de la base de datos de metabolitos METLIN (<https://metlin.scripps.edu/>) y con el software de generación de fórmulas moleculares (Agilent Technologies), el programa METLIN identificó los compuestos por su relación m/z (Rodríguez-Morales *et al.*, 2021).

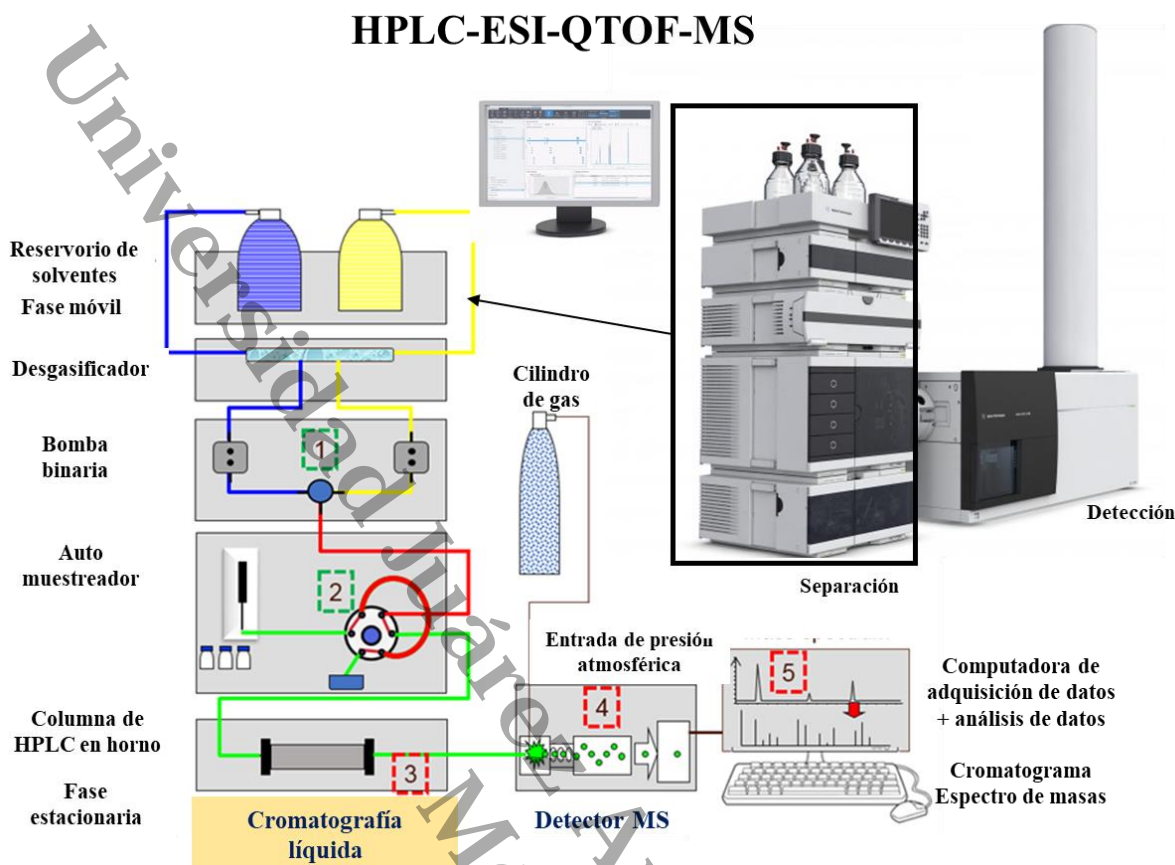


Figura 14. Sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con cuadrupolo tiempo de vuelo, la ionización se realiza por electrospray. La muestra se introduce en el equipo de cromatografía para su separación en fase reversa, posteriormente a través de una interfaz pasan los compuestos seleccionados al equipo QTOF para ser detectados (modificada de Química Analítica, 2021).

10.5 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de *Epaltes mexicana*.

10.5.1 Ensayo de actividad de eliminación de radicales libres por DPPH.

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos a través de la prueba DPPH, debido a que se ha descrito que esta prueba se utiliza frecuentemente para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de plantas; este método se basa en la reducción de un radical DPPH de color púrpura a un DPPH de color amarillo por lo que se efectuó lo siguiente (Munteanu & Apetrei, 2021).

Brevemente, se prepararon 10 mL de reactivo DPPH a una concentración 99 μM , del EHEm, EDEm y EHEm a concentraciones de 10 000 $\mu\text{g/mL}$. Para realizar la evaluación



antioxidante se utilizaron tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, donde se añadieron los extractos en diferentes concentraciones (0 a 1,000 $\mu\text{g/mL}$) seguido de cien microlitros de DPPH metanólico a todos los tubos cónicos, se incubaron durante 30 min a 25 °C y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en un espectrómetro UV/Visible de escaneo UV Thermo Scientific GENESYS 10, se utilizó el ácido ascórbico como control positivo para expresar los resultados como Eq de ácido ascórbico. El porcentaje inhibitor de DPPH se calculó mediante la fórmula que se muestra a continuación (Tundis *et al.*, 2012):

$$\text{Inhibición por DPPH (\%)} = \frac{DO_0 - DO_m}{DO_0} \times 100$$

Donde:

DO_0 = Densidad óptica del blanco.

DO_m = Densidad óptica de la muestra.

El valor de CI_{50} representa la relación de inhibición del 50 % de la actividad de DPPH.

$$\text{Eq. A. A.} = \frac{\% \text{ A. A. extracto} - CI_{50} \text{ Ac. ascórbico}}{\% \text{ A. A. Ac. ascórbico}}$$

10.5.2 Capacidad antioxidante determinada por el catión radical ABTS.

El ensayo ABTS se basó en el método de Re *et al.* (1999) con ligeras modificaciones. El catión radical ABTS ($ABTS^+$) se produjo haciendo reaccionar una solución de ABTS 7 mM con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2.45 mM en una relación 2:1. Se dejó reposar la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso. Después de este tiempo, la solución formada de $ABTS^+$ se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.05 a 734 nm. Se evaluaron los extractos orgánicos de 0 a 125 $\mu\text{g/mL}$, después de ponerse en contacto con el $ABTS^+$ se esperó 6 min para realizar la lectura a 734 nm en un lector de placas multiskan FC, modelo 5111900, Thermo Scientific (Tundis *et al.*, 2012).

Se preparó una curva estándar midiendo la reducción de la absorbancia de la solución



ABTS⁺ en diferentes concentraciones de trolox y se llevaron a cabo mediciones de blancos apropiadas, los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente a trolox. Para calcular el porcentaje de inhibición y la CAET se usaron las fórmulas que se muestran a continuación (Janković *et al.*, 2023):

$$\text{Inhibición por ABTS (\%)} = \frac{DO_0 - DO_m}{DO_0} \times 100$$

$$CAET = \frac{CI_{50} \text{ trolox}}{CI_{50} \text{ extracto}}$$

10.6 Análisis de datos.

Los experimentos del ensayo DPPH y ABTS⁺ se realizaron por triplicado y todos los resultados se presentaron como media \pm desviación estándar (DE). Se obtuvo el efecto máximo (E_{\max}) de los datos obtenidos y el CI_{50} se calculó mediante una curva de regresión lineal con el uso del software Graphpad Prism versión 8.0 para Windows. La curva concentración-respuesta se obtuvo trazando el porcentaje de inhibición frente a las concentraciones en el mismo programa, para el análisis se utilizó una prueba ANOVA seguida de Dunnett, se consideró diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (More *et al.*, 2021; Tundis *et al.*, 2012).

10.7 Consideraciones éticas.

Para la preservación y uso de la especie vegetal se implementó la NOM-126-ECOL-2000 y la NOM-059-ECOL-1994. Para el manejo de los solventes químicos utilizados en esta metodología se consideró la NOM-054-SEMARNAT-1993 y el PROY-NOM-005-STPS-2017.

Este proyecto está aprobado por la comisión institucional de ética en investigación, subcomisión de medicina y ciencias de la salud con el número de folio UJAT-CIEI-2023-178.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

11. RESULTADOS



11. RESULTADOS.

11.1 Recolección e identificación de la especie vegetal *E. mexicana*.

Se empleó la especie vegetal *E. mexicana*, dado que es una especie candidata para estudiar las propiedades farmacológicas y se localiza en el estado de Tabasco, principalmente la F6 del EHEm ha demostrado tener actividad citotóxica selectiva en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y cervicouterino (SiHa). Se confirmó el género y la especie de la muestra como *E. mexicana* y quedó registrada con número de vóucher 36,574 en el herbario de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco con ubicación en Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0.5 S/N, entronque a Bosques de Saloya, Villahermosa, Tabasco. Después de la identificación, se realizaron las pruebas experimentales indicadas en la metodología para la obtención de los extractos orgánicos, obtención del perfil metabólico y determinación de la actividad antioxidante.

11.2 Obtención del EME_m, EHE_m, EDE_m y de la F6 del EHE_m.

A partir de 73 g de la especie vegetal limpia, seca y fragmentada se obtuvo por el método de maceración un mayor rendimiento del EME_m, seguido del EHE_m y EDE_m (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento total de los extractos orgánicos de *Em*.

Extractos	Rendimiento (%)
EHE _m	2.87
EDE _m	1.64
EME _m	4.38

Después de la obtención del EHE_m se procedió a la separación de sus componentes para la obtención de la F6 mediante procesos cromatográficos, según lo indicado en el apartado 10.3 de la metodología descrita. Las recolecciones se agruparon en esta investigación de acuerdo al monitoreo por CCF, como se observa en la figura 15 se realizó la agrupación de la recolección número 44 a 48 y se obtuvieron 10 mg de F6, esta agrupación fue muy similar a la que se había realizado previamente en el trabajo de licenciatura (Juárez-Velázquez, 2022).

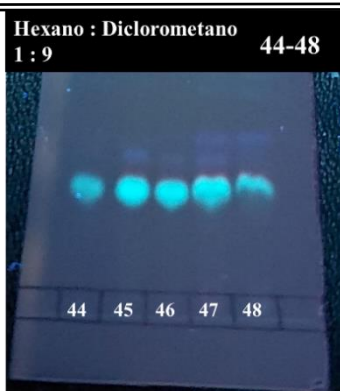


Figura 15. Monitoreo por cromatografía en capa fina para la agrupación de la F6.

11.3 Determinación del perfil metabólico a través de LC/MS-QTOF.

Se realizó la anotación de iones de los metabolitos presentes en la F6 de EHEm en modo positivo a través software del equipo LC/MS-QTOF, se obtuvo un cromatograma de pico base donde se observa la abundancia de iones a través del tiempo (Figura 16) se identificaron ocho m/z en ocho tiempos de retención diferentes de 1.949 min a 3.315 min, que se obtuvieron con el MFE comparados en la base de datos METLIN (Tabla 5), del análisis se obtuvieron los tiempos de retención, fórmula química, fragmentos MS/MS y tipo de ion. Se encontraron: **1)** giberelina A15, **2)** farfugina A, **3)** deshidromiodesmona, **4)** eremopetasetenina A1, **5)** hidroxiiisonobilina, **6)** anhidrocinceilanina, **7)** nigakilactona H y **8)** taxodiona (Figura 17).

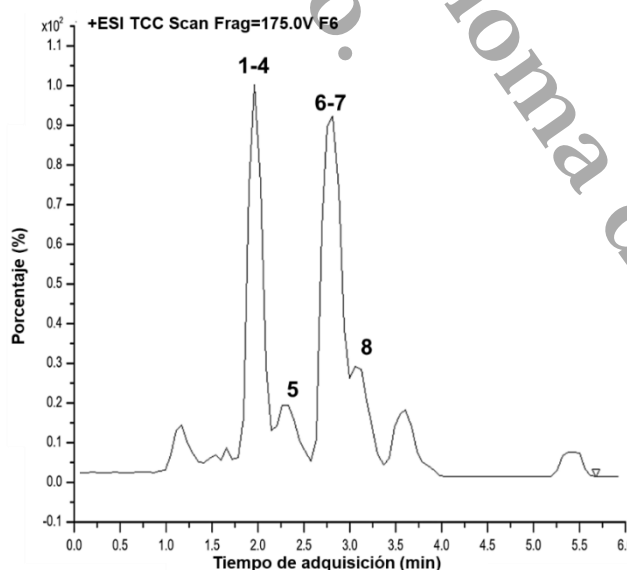


Figura 16. Cromatograma de pico base (BPC) de los metabolitos obtenidos a través de LC/MS-QTOF en modo positivo de la F6.

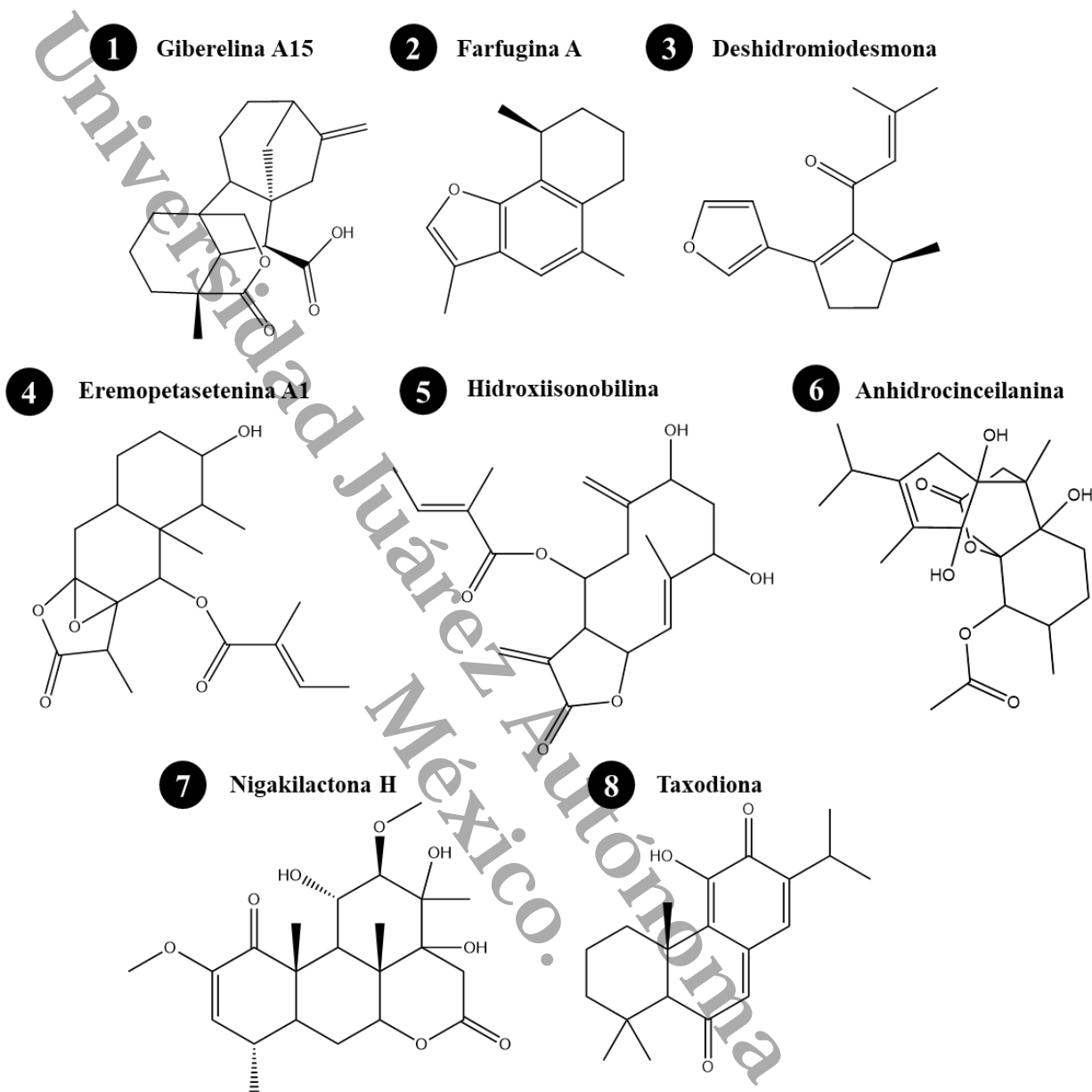


Figura 17. Metabolitos identificados por LC/MS-QTOF comparados con la base de datos METLIN, sesquiterpenos: Farfugina A y deshidromiodesmona; diterpenos: Giberelina A15, eremopetasetenina A1, hidroxiisonobilina, anhidrocinceilanina y taxodiona; y triterpenos: Nigakilactona H.



Tabla 5. Compuestos identificados por LC/MS-QTOF en la F6 del extracto hexánico de *Epaltes mexicana*.

#	T.R. (min)	Identificación	Formula molecular	Tipo de ion	<i>m/z</i> experimental	Masa	Fragmentos MS/MS
1	1.949	Giberelina A15	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	(M+H) ⁺	331.1905	330.1833	303.1954 233.1534
2	1.955	Farfugina A	C ₁₅ H ₁₈ O	(M+H) ⁺	215.1432	214.1359	200.1197 135.0802
3	1.956	Deshidromiodesmona	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	(M+H) ⁺	231.1381	230.1310	215.1434 173.0963
4	2.192	Eremopetasetenina A1	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	(M+H) ⁺	365.1961	364.1888	349.2009 249.1487
5	2.492	Hidroxiisonobilina	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	(M+H) ⁺	363.1806	362.1734	179.0665
6	2.764	Anhidrocinzeilanina	C ₂₂ H ₃₂ O ₇	(M+Na) ⁺	431.2044	408.2152	349.2006
7	3.001	Nigakilactona H	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	(M+Na) ⁺	447.1991	424.2100	431.2044 407.2069
8	3.115	Taxodiona	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	(M + H) ⁺	315.1956	314.1884	231.1379

T.R. Tiempo de retención.

En las siguientes figuras (18 a 25) se observan las anotaciones de iones de los espectros de masas de los metabolitos de la fracción 6 del extracto hexánico de *E.mexicana*.

En la figura 18 se muestra el espectro de masas de giberelina A15 (**1**), identificada en un tiempo de retención de 1.949 min, con una *m/z* del ion molecular [M+H]⁺ de 331.1905 y los fragmentos correspondientes a la [M-CO]⁺ de 303.1954 y [M-C₅H₆O₂]⁺ de 233.1534.



1 Giberelina A15

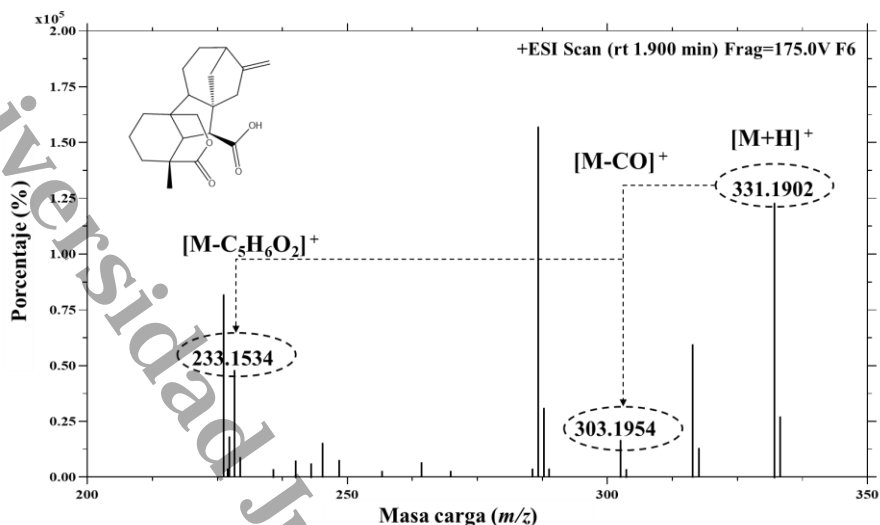


Figura 18. Espectro de masas de la giberelina A15 obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

En la figura 19 se observa el espectro de masas de farfugina A (**2**) en un tiempo de retención 1.955 min, con m/z del ion molecular $[M+H]^+$ de 215.1432 y los fragmentos correspondientes a la $[M-CH_3]^+$ de 200.1197 y $[M-C_6H_8]^+$ de 135.0802.

2 Farfugina A

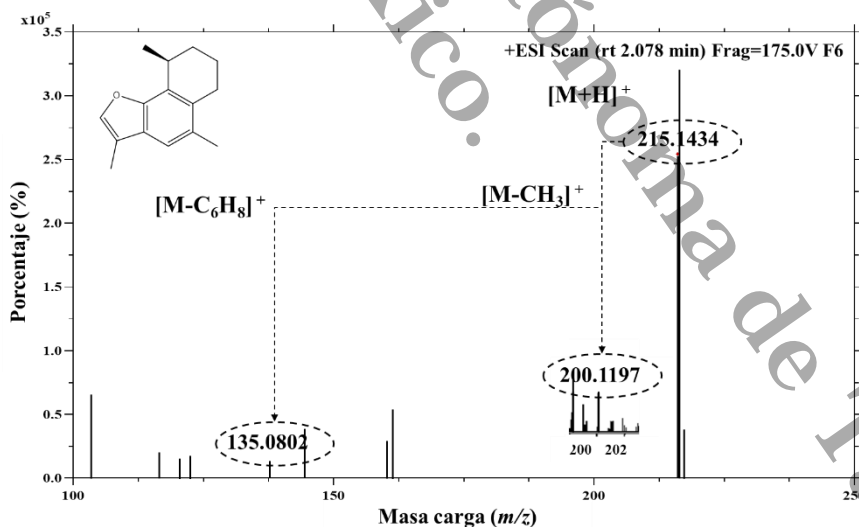


Figura 19. Espectro de masas de la farfugina A obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

En la figura 20 se presenta el espectro de masas de deshidromiodesmona (**3**) a los 1.956 min, con m/z del ion molecular $[M+H]^+$ de 231.1381 y los fragmentos correspondientes a la



$[M-O]^+$ de 215.1434, $[M-C_2H_2O]^+$ de 189.1278 y $[M-C_3H_6O]^+$ de 173.0963.

3 Deshidromiodesmona

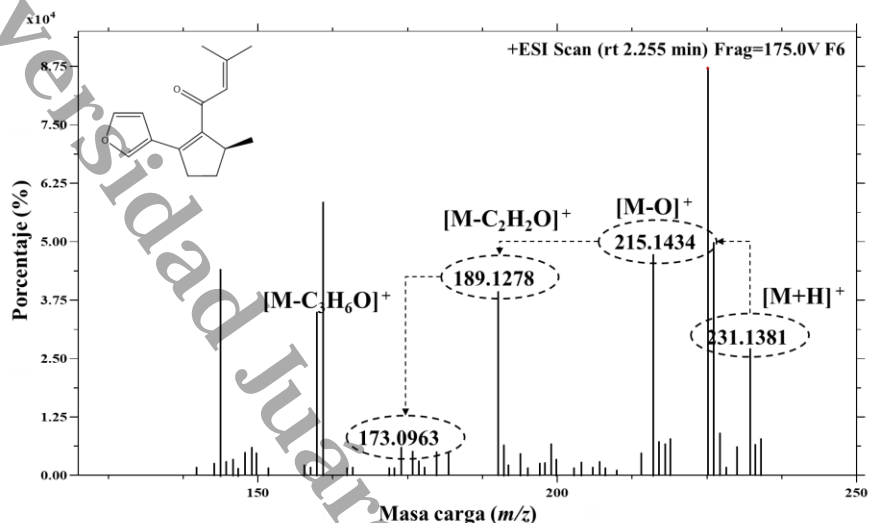


Figura 20. Espectro de masas de la deshidromiodesmona obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

En el tiempo de retención 2.192 min se encontró el ion molecular de eremopetasitenina A1 (4) en la figura 21 se observa su espectro de masas, con m/z $[M+H]^+$ de 365.1961 y los fragmentos correspondientes a la $[M-O]^+$ de 349.2009 y $[M-C_5H_8O_2]^+$ de 265.1427.

4 Eremopetasitenina A1

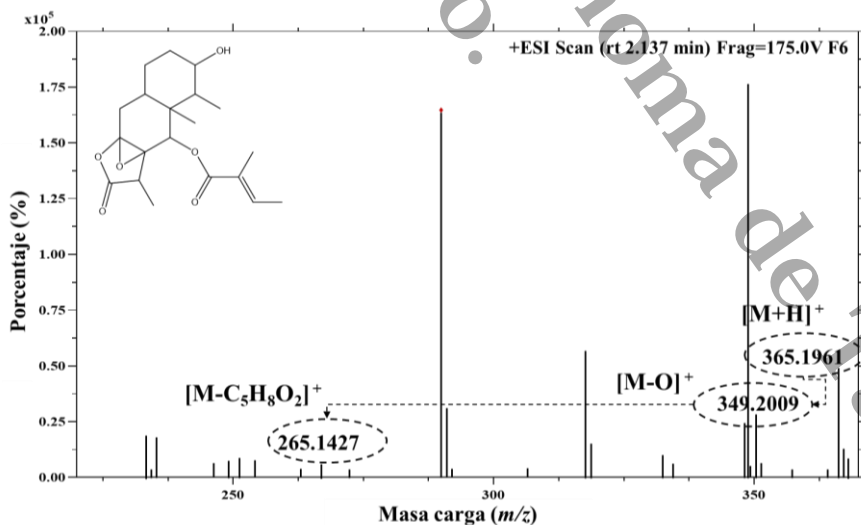


Figura 21. Espectro de masas de la eremopetasitenina A1 obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

En el segundo pico (figura 16) se encuentran los iones moleculares de hidroxiisonobilina



(5) y anhidrocinceilanina (6). En un tiempo de 2.492 min en la figura 22 se observa el espectro de masas de hidroxiiisonobilina (5) con m/z de $[M+H]^+$ de 363.1806 y los fragmentos correspondientes a la $[M-O]^+$ de 347.1858 y $[M-C_{10}H_{16}O_3]^+$ de 179.0665.

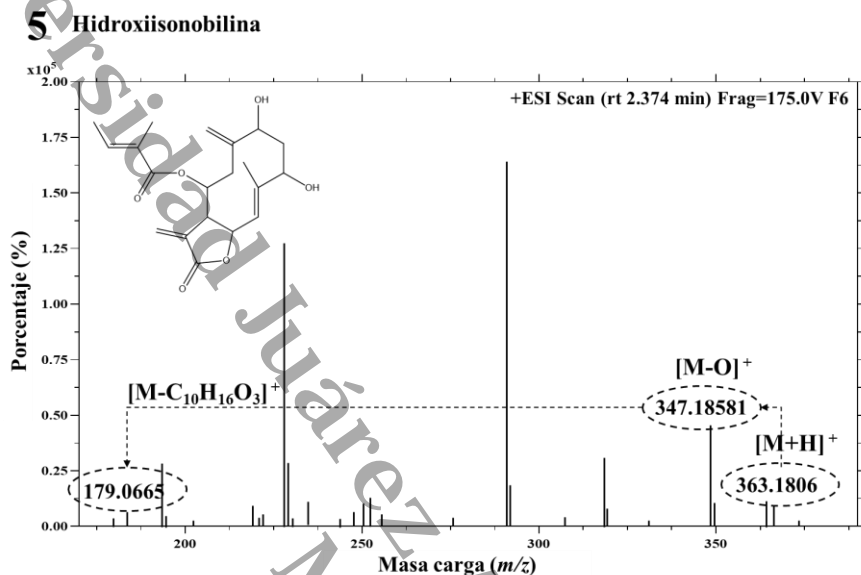


Figura 22. Espectro de masas de la hidroxiiisonobilina obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

En un tiempo de 2.764 min se identificó la anhidrocinceilanina (6), se observa en la figura 23 su espectro de masas con una m/z $[M+Na]^+$ de 431.2044 y el fragmento correspondiente a la $[M-C_2H_3NaO_2]^+$ de 349.2006.



6 Anhidrocincellanina

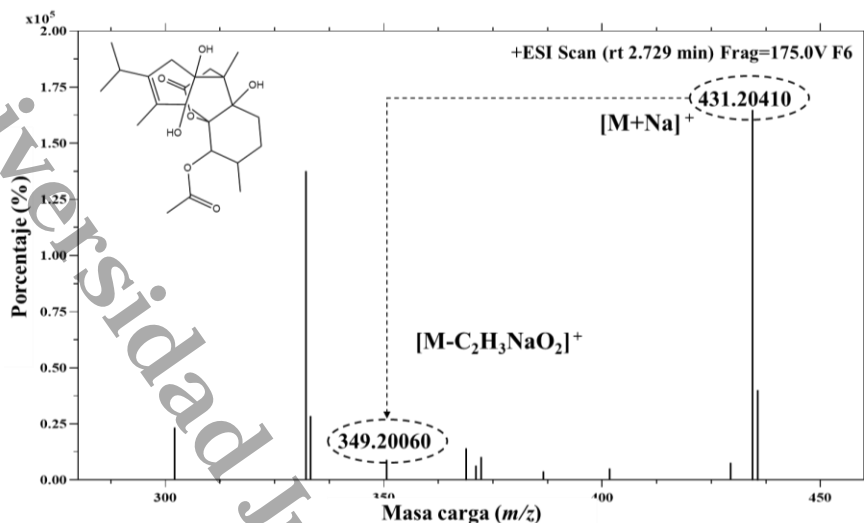


Figura 23. Espectro de masas de la anhidrocincellanina obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

Seguidamente se observa en la figura 24 el espectro de masas de nigakilactona H (7) en un tiempo de retención de 3.001 min, con una m/z $[M+Na]^+$ de 447.1991 y los fragmentos correspondientes a la $[M-O]^+$ 431.2044 y $[M-HNaO]^+$ de 407.2069.

7 Nigakilactona H

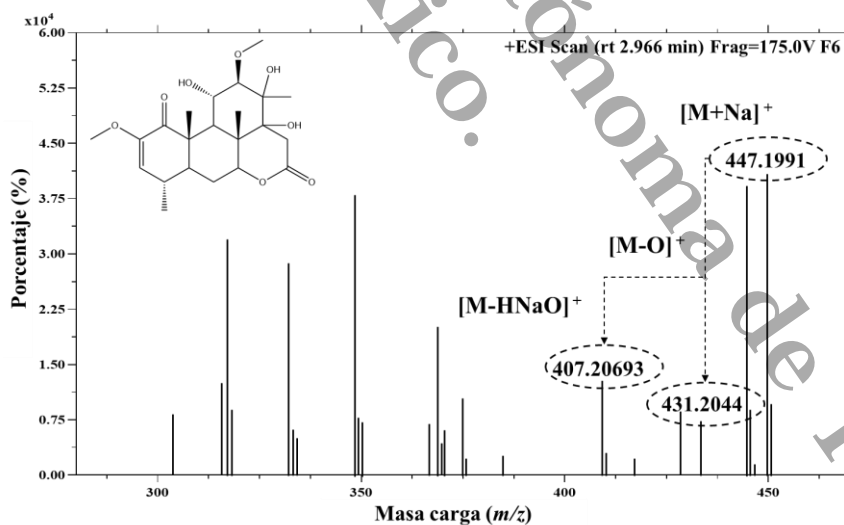


Figura 24. Espectro de masas de la nigakilactona H obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

Finalmente se identificó taxodiona (8) en un tiempo de 3.115 min, en la figura 25 se observa el espectro de masas con m/z de $[M+H]^+$ de 315.1956 y su fragmento



correspondiente a la $[M-C_5H_8O]^+$ de 231.137.

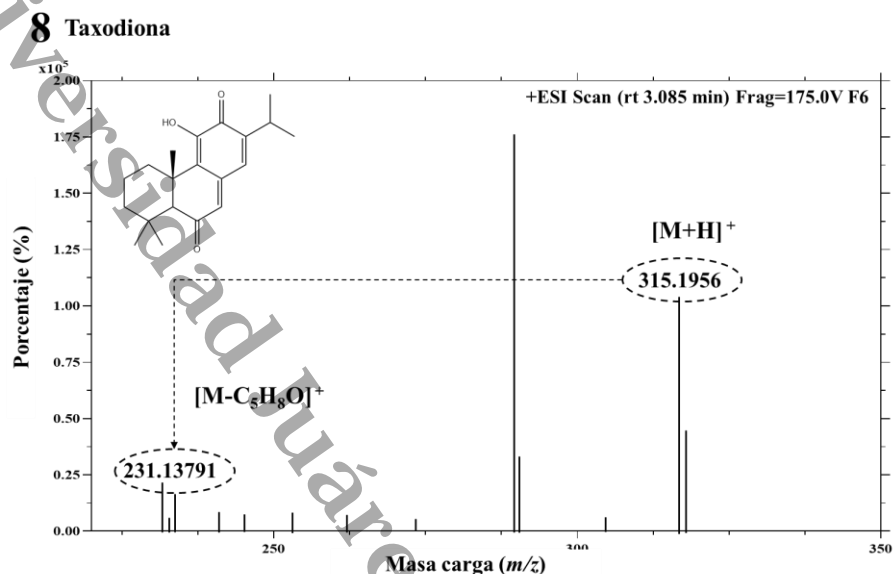


Figura 25. Espectro de masas de la taxodiona obtenido por MS/MS a través del sistema ESI-QTOF/MS en modo positivo.

11.4 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de *Epaltes mexicana*

11.4.1 Ensayo DPPH.

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de la especie *E. mexicana* y de la F6 de EHEm, en la Figura 26 se muestra la actividad antioxidante del EME_m con una $CI_{50} = 80.47 \mu\text{g/mL}$ y un $E_{\text{max}} = 87.96 \pm 0.81 \%$. El efecto máximo fue muy similar al ácido ascórbico que tuvo un $E_{\text{max}} = 91.10 \pm 0.45 \%$, estos valores del control coinciden con trabajos previos (Kumar *et al.*, 2021; Rozimamat, *et al.*, 2019). Se realizó el cálculo de los equivalentes de ácido ascórbico siendo de 6.12 para el EME_m; sin embargo, el EHE_m, EDE_m y F6 de EHE_m no mostraron actividad antioxidante significativa (Tabla 6). Aunque se evaluó hasta 1,000 $\mu\text{g/mL}$ solo se graficó hasta en 125 $\mu\text{g/mL}$ debido a que después de esta cantidad el aumento del porcentaje de actividad antioxidante no fue significativo.

Por otra parte, dado a que en la primera concentración evaluada (15.6 $\mu\text{g/mL}$) el ácido ascórbico presentó un alto % de actividad antioxidante, se realizó posteriormente una curva



concentración-respuesta para la obtención de la CI_{50} (Anexo 1).

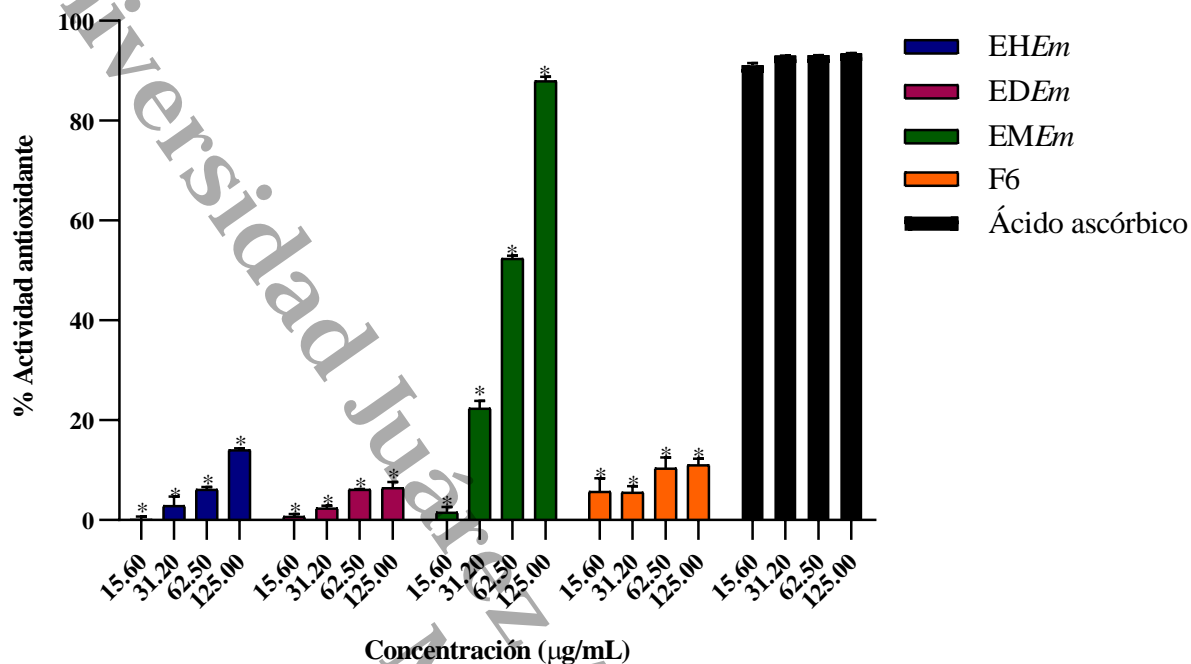


Figura 26. Gráfica de la actividad antioxidante por el método DPPH de los extractos de *Em* y de la F6 EHEm, comparado con ácido ascórbico. N= 3, * $p \leq 0.05$.

Tabla 6. Efecto antioxidante de los compuestos a través del método DPPH.

Compuesto	CI_{50} (µg/mL)	A.A. (%)	Eq. de A.A.
EHEm	ND	$14.07 \pm 0.27^*$	ND
EDEm	ND	$6.46 \pm 1.12^*$	ND
EMEm	80.47	$87.96 \pm 0.81^*$	6.12
F6	ND	$11.01 \pm 1.27^*$	ND

Control: Ácido ascórbico, $CI_{50} = 6.93 \mu\text{g/mL}$; A.A.= $91.10 \pm 0.45 \%$.

ND. No Determinado.

*Diferencias estadísticamente significativa respecto al control.

Eq. de A.A. Equivalentes de ácido ascórbico.

11.4.2 Ensayo ABTS.

Después se realizó por el método ABTS de acuerdo con lo indicado en la metodología, utilizando como control el reactivo trolox, los extractos orgánicos se evaluaron de 15.6 a 125 µg /mL (Figura 27 y Tabla 7). El EMEm presentó una $CI_{50} = 13.484 \mu\text{g/mL}$ y un $E_{\text{max}} =$



93.60 ± 1.17 %, mientras que el trolox tuvo una CI₅₀= 3.075 µg/mL y un E_{max}= 95.22 ± 1.54 %, a partir de esta concentración se calculó la capacidad antioxidante equivalente a trolox (CAET) donde se obtuvo un valor de 0.228 para el EME_m, no se mostró actividad antioxidante significativa del EHE_m, EDE_m y F6 de EHE_m.

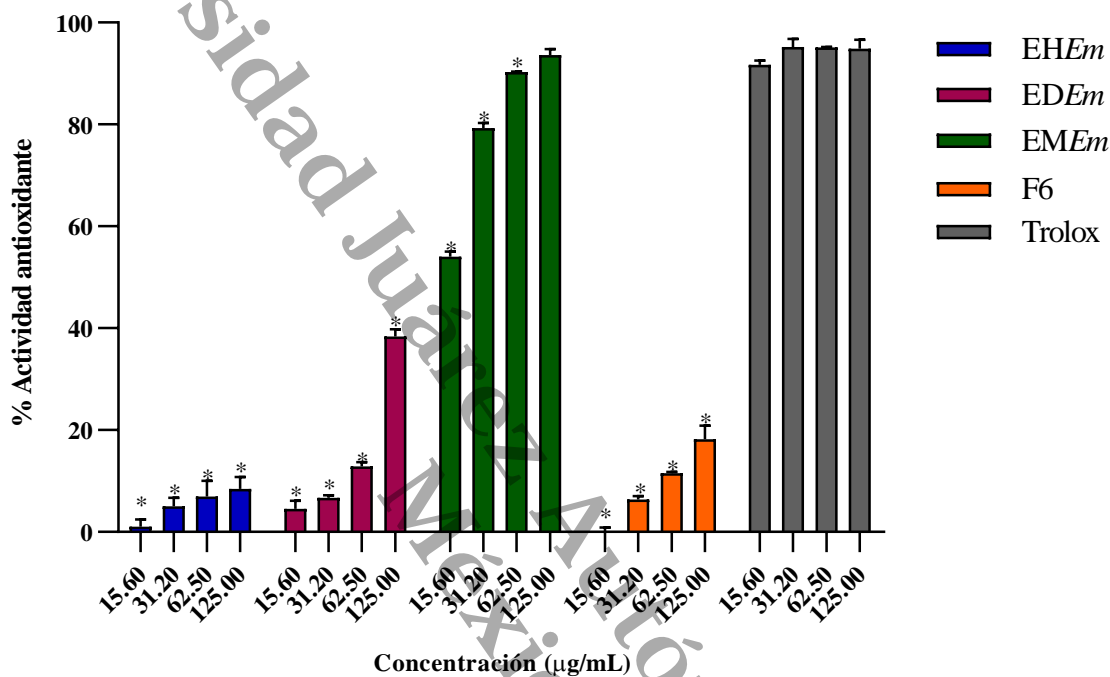


Figura 27. Gráfica de la actividad antioxidante por el método ABTS de los extractos de *Em* y de la F6 del EHE_m, comparado con Trolox. N= 3, *p ≤ 0.05.

Tabla 7. Efecto antioxidante de los compuestos a través del método ABTS.

Compuesto	CI ₅₀ (µg/mL)	A.A. (%)	CAET
EHE _m	ND	8.45 ± 2.32*	ND
EDE _m	ND	38.39 ± 1.36*	ND
EME _m	13.484	93.60 ± 1.17	0.228
F6	ND	18.21 ± 2.68*	ND

Control: Trolox, CI₅₀= 3.075 µg/mL; A.A.= 95.22 ± 1.54%.

ND. No Determinado.

*Diferencias estadísticamente significativa respecto al control.

CAET. Capacidad antioxidante equivalente a trolox.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

12. DISCUSIÓN



12. DISCUSIÓN.

Los resultados de la presente investigación son continuación de estudios previamente realizados en nuestro laboratorio. Se utilizó *E. mexicana* una especie vegetal que es endémica del estado de Tabasco, para efectuar los objetivos del presente trabajo, dado que es una especie candidata para estudiar las propiedades farmacológicas y existen pocos reportes en la literatura que respalden sus propiedades. Además, se reportó actividad citotóxica selectiva en una fracción del EHEm, por lo que resulta de interés conocer los metabolitos que le confieren dicha propiedad (Juárez-Velázquez, 2022).

Como antecedente de la actividad citotóxica (Juárez-Velázquez, 2022) se eligió una determinación cualitativa de los compuestos de la F6, cabe mencionar que fue reportada como la fracción activa, por lo que se analizó por LC/MS-QTOF teniendo en cuenta que es utilizada en el análisis de especies vegetales y en vista de que es una técnica que tiene un amplio rango de detección, utiliza un enfoque de ionización suave, proporciona valores m/z , tiempos de retención y una estimación de la abundancia relativa de las especies identificadas, además de que es una técnica reproducible y de alta resolución en comparación con otras técnicas como RMN (Zeki *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2012).

Los metabolitos identificados (Figura 17) derivan de la ruta de los terpenos que son la clase más grande de metabolitos distribuidos en la naturaleza (El-Baba *et al.*, 2021). Se ha reportado en otros grupos de investigación que la farfugina A ha sido evaluada en modelos de cáncer de mama y pulmón (MCF-7 y A-549), donde se ha registrado una CI_{50} de 13.6 $\mu\text{g/mL}$ y 10.9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Wang *et al.*, 2007), comparada con la CI_{50} de la F6 en la línea MCF-7 (6.31 $\mu\text{g/mL}$), el conjunto de metabolitos de esta fracción presenta una mayor potencia que la farfugina A, esto se puede deber a un posible sinergismo entre dos o más metabolitos de la F6; de la dehidromiodesmona se ha indicado que produce necrosis periportal en el hígado de los terneros (células periportales), mediante una biopsia hepática se encontró que habían células vacuoladas, una intensa expresión de células Kupffer y además no había glucógeno teñible en el hígado (Ford & Rivera, 1978); la hidroxisonobilina ha sido reportada con un efecto en la disminución del consumo de glucosa y de la formación de ácido láctico, así como la inhibición de las enzimas



fosfofructoquinasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa (Baer *et al.*, 1983); y de la taxodiona hay reportes que le atribuyen propiedades antibacterianas, citotóxicas y antitumorales, específicamente indicaron citotoxicidad significativa en la línea A-549 proveniente de carcinoma pulmonar (Kuzma *et al.*, 2015) y se ha encontrado que induce significativamente la apoptosis en células K562 derivadas de leucemia mielógena humana y reduce las actividades de los complejos III y V de la cadena respiratoria mitocondrial, que parecían inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Uchihara *et al.*, 2018).

Hasta la fecha no se ha reportado en la literatura si los otros metabolitos anotados tienen antecedentes citotóxicos en los tipos de cáncer estudiados en la presente investigación, sin embargo, investigaciones anteriores proclaman que los terpenoides tienen efectos antitumorales para las diferentes etapas del cáncer y son diversos, entre los que se encuentran la inhibición de la inflamación, los antiproliferativos, actividades apoptóticas, antiangiogénicas y antimetastásicas (El-Baba *et al.*, 2021; Tesfaye *et al.*, 2020). Los terpenoides afectan los mecanismos epigenéticos y de muerte celular al atacar el factor nuclear κB (NF- κB), el transductor de señal de Janus quinasas y las proteínas de transcripción activadas (JAK-STAT), la proteína activadora-1 (AP-1), las metaloproteinasas (MMP), ADN topoisomerasa I y II, bloqueando el retículo endoplásmico (ER) bomba de calcio ATPasa, que inhibe el proteosoma, activa p53 y modula los surcos menores del ADN. Sin embargo, el principal mecanismo de muerte celular inducida por terpenoides se ha indicado que es la apoptosis y la autofagia (El-Baba *et al.*, 2021).

Como se describe en la Figura 17 los ocho metabolitos anotados se clasifican en sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos; acerca de los sesquiterpenos en otras investigaciones han destacado por presentar actividad citotóxica, inhibiendo el crecimiento celular mediante la inducción de apoptosis y la supresión de la proliferación, induciendo la degradación de IKK- β (inhibidor de la subunidad beta de la quinasa kappa-B del factor nuclear) y, en consecuencia, la inhibición de la señalización de NF- κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) seguidamente de la regulación negativa de los genes (COX-2, MMP-9, TWIST-1 y Bcl-2) que son regulados por NF- κB (Feng *et al.*, 2021; Roozbehani *et al.*, 2021); también se ha demostrado que los



diterpenos tienen función quimiopreventiva, dado que inducen enzimas desintoxicantes de fase 2 y proteínas antioxidantes, en consecuencia, previene eventos mutagénicos tempranos, la característica proapoptótica contribuye a sus efectos antitumorales al regular negativamente las proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, disminuyendo la liberación de citocromo c y activando las enzimas caspasas, asimismo se ha mencionado que los diterpenos son inhibidores de la angiogénesis, es decir, de la formación de vasos sanguíneos nuevos una característica fundamental en el desarrollo del cáncer (Eldesouki *et al.*, 2022). Por último, los triterpenos se ha mencionado que inhiben la proliferación celular, inducen la progresión de la muerte de las células tumorales al atacar múltiples objetivos específicos del cáncer mediante angiogénesis, el proteasoma, Bcl-2, NF- κ B, STAT3, TNF y TLR (Gill *et al.*, 2016).

En conjunto, existen reportes de otros grupos de investigación donde confirman que los terpenos presentan actividad citotóxica en diferentes objetivos celulares. Por otra parte, existen investigaciones donde relacionan esta actividad con una propiedad antioxidante (Prakash *et al.*, 2021), sin embargo, en esta investigación no se encontró la relación entre actividad antioxidante y la citotóxica de la mezcla de metabolitos de la F6 con los métodos de determinación antioxidante utilizados hasta el momento (DPPH y ABTS).

Cabe resaltar que como se muestra en las figuras 26 y 27 el EME_m sí presentó un efecto antioxidante por los dos métodos evaluados, ambos ensayos están basados en reacciones de transferencia de electrones del antioxidante al sustrato, aunque son diferentes en su estabilidad el DPPH es un solo reactivo empleado y ABTS se forma mediante el radical catión ABTS^{•+} se crea por reacción entre el ABTS con el persulfato de potasio, además de que varían los tiempos de medición, este último es menos propenso a sufrir interferencias ocasionadas por muestras coloreadas debido a la mayor longitud de onda utilizada (Rumpf *et al.*, 2023).

Por el método ABTS el EME_m tuvo una mayor potencia que en el ensayo DPPH, en figura 27 se observa que a partir de los 62.5 μ g/mL el extracto ya había superado el 80 % de la actividad antioxidante, no así en DPPH que en ese punto de evaluación su actividad fue menor a 60 %; en la prueba por ABTS el EDE_m mostró un leve incremento en el % de la



actividad. Por otra parte, se encontró reportado que el extracto de acetato de etilo de *Epaltes divaricata*, especie que pertenece a la misma familia (Asteraceae) y género de *E. mexicana* mostró una actividad significativa dependiente de la concentración por DPPH, con una CI_{50} de $560 \pm 2,02 \mu\text{g/mL}$ (Glorybai *et al.*, 2015), comparado con la CI_{50} de EME m es más potente el EME m que el extracto de *Epaltes divaricata*.

Se ha reportado que la actividad antioxidante de las especies vegetales está vinculada ampliamente con el contenido de compuestos fenólicos, ya que son los principales responsables de esta actividad (Su *et al.*, 2024). Por lo que el consumo de antioxidantes es importante debido a que neutralizan radicales libres y reducen el riesgo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

13. CONCLUSIÓN



13. CONCLUSIÓN.

Los resultados de esta investigación indican los primeros estudios sobre el análisis de metabolitos por LC/MS-QTOF y de la determinación de la actividad antioxidante de *E. mexicana*.

Se anotaron un total de ocho metabolitos de naturaleza terpénica de la F6, de los cuales la farfugina A y taxodiona se han destacado debido a que tienen antecedentes relacionados con actividades citotóxicas y antitumorales.

En los ensayos exploratorios de la determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS el EME_m ha mostrado tener actividad antioxidante en ambas técnicas.

El contenido metabólico de la F6 no mostró relación entre la actividad citotóxica y la antioxidante mediante los ensayos DPPH y ABTS.

Se consideran los ocho metabolitos para la continuación de sus estudios, como fuente prometedora de fármacos anticancerígenos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

14. PERSPECTIVAS



14. PERSPECTIVAS.

- 14.1 En el futuro, se deben considerar los ocho metabolitos para la continuación de estudios debido a su efecto prometedor.
- 14.2 Ampliar la información de la F6 frente al tiempo de exposición de las células de cáncer de mama y cervicouterino para describir si presentan el efecto citotóxico en un menor tiempo y con concentraciones más bajas.
- 14.3 Establecer el mecanismo de acción de este conjunto de metabolitos en las células cancerosas.
- 14.4 Determinar la(s) molécula(s) bioactiva(s) causante(s) de la citotoxicidad en los extractos orgánicos estudiados.
- 14.5 Aislar la(s) molécula encarga da(s) del efecto citotóxico para proceder con el desarrollo de fármacos efectivos para el tratamiento del cáncer
- 14.6 Analizar las moléculas de F6 en modelos citotóxicos *in silico* e *in vivo*.
- 14.7 Evaluar el EME_m a través de otros métodos de determinación antioxidante.
- 14.8 Realizar la caracterización de los componentes de EME_m, con el fin de conocer las moléculas bioactivas con potencial uso en la defensa de las especies reactivas.
- 14.9 Determinar el efecto antioxidante de EME_m en modelos *in vivo*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

15. BIBLIOGRAFÍA



15. BIBLIOGRAFÍA.

1. Álvarez-Quiroz, V., Caso-Barrera, L., Aliphath-Fernández, M., & Galmiche-Tejeda, A. (2017). Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(4), 428–454.
2. Baer, W., Chmiel, J., Gnojowski, J., & Klimek, D. (1983). The effect of sesquiterpene lactones, eupatoriopicrin and hydroxyisonobilin, on the glycolytic metabolism of human lymphocytes. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*, 21(1), 41–46.
3. Canga, I., Vita, P., Oliveira, A. I., Castro, M. Á., & Pinho, C. (2022). *In vitro* cytotoxic activity of african plants: A review. *Molecules*, 27(15), 4989.
4. Catherine-Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562.
5. Crosby, D., Bhatia, S., Brindle, K. M., Coussens, L. M., Dive, C., Emberton, M., Esener, S., Fitzgerald, R. C., Gambhir, S. S., Kuhn, P., Rebbeck, T. R., & Balasubramanian, S. (2022). Early detection of cancer. *Science*, 375(6586), eaay9040.
6. Collado-Martín, R (2017). Perfil metabolómico plasmático en pacientes con cáncer de mama. Tesis de doctorado, Universidad de Granada.
7. Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 20503121211034366.
8. El-Baba, C., Baassiri, A., Kiriako, G., Dia, B., Fadlallah, S., Moodad, S., & Darwiche, N. (2021). Terpenoids' anti-cancer effects: focus on autophagy. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 26(9-10), 491–511.
9. Eldesouki, S., Qadri, R., Abu Helwa, R., Barqawi, H., Bustanji, Y., Abu-Gharbieh, E., & El-Huneidi, W. (2022). Recent updates on the functional impact of kahweol and cafestol on cancer. *Molecules*, 27(21), 7332.
10. Feng, Y., Xia, J., Xu, X., Zhao, T., Tan, Z., Wang, Q., Wang, J., Meng, J., Sanderson, C., Lu, Z., & Yang, Y. (2021). Sesquiterpene lactone bigelovin induces apoptosis of colon cancer cells through inducing IKK- β degradation and suppressing nuclear factor



- kappa B activation. *Anti-cancer drugs*, 32(6), 664–673.
11. Ford, E. J. & Rivera, R. (1978). The modification of the dehydromyodesmone-induced hepatic lesion in cattle by microsomal drug metabolizing enzymes. *Journal of Comparative Pathology*, 88(3), 365–80.
 12. Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(9), 689–709.
 13. Gill, B. S., Kumar, S., & Navgeet (2016). Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Molecular biology reports*, 43(9), 881–896.
 14. Glorybai, L., Kannan K, B., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., & Agastian, P. (2015). Some biological activities of *Epaltes divaricata* L. - an in vitro study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 18.
 15. Grande-Tovar, C., Araujo-Pabón, L., Flórez-López, E., & Aranaga-Arias, C. (2020). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Informador Técnico*, 85(1), 64–82.
 16. Gómez-Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista fitotecnica mexicana*, 35(1), 43–49.
 17. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46.
 18. Heinrich, M. (2003). Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures?. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(2), 141–154.
 19. Hernández-Bolio, G. I. (2017). Análisis del perfil metabolómico e identificación de productos antihelmínticos de *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth. (*Tzalam*). Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
 20. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf. INEGI (2023). Comunicado de prensa núm. 77/23. Consultado el 29 de enero de 2024.
 21. <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>. INSP (2020). Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas. Consultado el 03 de octubre de 2022.
 22. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf.



- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Consultado el 04 de febrero de 2024.
23. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. OMS (2023). Enfermedades no transmisibles. Consultado el 012 de abril de 2024.
24. Ivanova, A., Gerasimova, E., & Gazizullina, E. (2020). Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms. *Molecules*, 25(18), 4251.
25. Janković, N., Tadić, J., Milović, E., Marković, Z., Jeremić, S., Petronijević, J., Joksimović, N., Borović, T. T., & Abbas Bukhari, S. N. (2023). Investigation of the radical scavenging potential of vanillin-based pyrido-diprimidines: experimental and *in silico* approach. *RSC Advances*, 13(22), 15236–15242.
26. Juárez-Velázquez, T. Á. (2022). Efecto citotóxico de la especie vegetal *Epaltes mexicana* utilizada en medicina tradicional de Tabasco. Tesis de licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
27. Kato, T., Frei, B., Heinrich, M., & Sticher, O. (1996). Sesquiterpenes with antibacterial activity from *Epaltes mexicana*. *Planta medica*, 62(1), 66–67.
28. Kuźma, Ł., Wysokińska, H., Sikora, J., Olszewska, P., Mikiciuk-Olasik, E., & Szymański, P. (2016). Taxodione and extracts from *Salvia austriaca* roots as human cholinesterase inhibitors. *Phytotherapy research: PTR*, 30(2), 234–242.
29. León-Montoya, G. B. Saavedra-Chinchayán, M. E. & Valenzuela-Ramos, M. R. (2022). Prácticas de medicina tradicional en trabajadores administrativos nativos andinos en el sur del Perú. *Atención Primaria*, 54(8), 102355.
30. Magaña-Alejandro, M. A., Gama-Campillo, L. M., & Mariaca-Méndez, R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*. 29, 213–262.
31. Maldonado, C., Paniagua-Zambrana, N., Bussmann, R. W., Zenteno-Ruiz, F. S., & Fuentes, A. F. (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*, 55(1), 1–5.
32. Maldonado-Jimenez, E. (1989). Eudesmane derivatives from *Epaltes mexicana*. *Phytochemistry*, 28(7), 1973–1974.



33. Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48–78.
34. Mendonça, J. D. S., Guimarães, R. C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. P., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K. C., Hiane, P. A., de Pádua-Melo, E. S., Vilela, M. L. B., & Nascimento, V. A. D. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*, 27(11), 3563.
35. Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 80, 50–64.
36. More, G. K. Meddows-Taylor, S. & Prinsloo, G. (2021). Metabolomic profiling of antioxidant compounds in five *Vachellia* species. *Molecules*, 26 (20), 6214.
37. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3380.
38. Prakash, S., Radha, Kumar, M., Kumari, N., Thakur, M., Rathour, S., Pundir, A., Sharma, A. K., Bangar, S. P., Dhumal, S., Singh, S., Thiyagarajan, A., Sharma, A., Sharma, M., Changan, S., Sasi, M., Senapathy, M., Pradhan, P. C., Garg, N. K., Ilakiya, T., & Mekhemar, M. (2021). Plant-based antioxidant extracts and compounds in the management of oral Cancer. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1358.
39. Parcheta, M., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Akimowicz, M., Choińska, R., & Lewandowski, W. (2021). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties, 14(8), 1984.
40. Pedraza-Alva, G., Ramírez-Serrano, C. E., Pedraza, F., Flores-Vallejo, R. D. C., Villarreal, M. L., & Pérez-Martínez, L. (2019). From traditional remedies to cutting-edge medicine: Using ancient mesoamerican knowledge to address complex disorders relevant to psychoneuroimmunology. *Brain, behavior, and immunity*, 79, 3–5.
41. Química Analítica (2021). *Teórica n°11 Cromatografía Líquida de alta resolución* [Vídeo]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=re0muds5zYk>
42. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9-10), 1231–1237.



43. Redonda-Martínez, R. (2020). La subtribu Plucheinae (Inuleae, Asteraceae) en México: taxonomía, diversidad y distribución. *Acta Botánica Mexicana*, 127, 1-9.
44. Rodríguez-Morales, S., Ocampo-Medina, B., Romero-Ceronio, N., Alvarado-Sánchez, C., Vilchis-Reyes, M. Á., Roa de la Fuente, L. F., Ortiz-Andrade, R., & Hernández-Abreu, O. (2021). Metabolic profiling of vasorelaxant extract from *Malvaviscus arboreus* by LC/QTOF-MS. *Chemistry & biodiversity*, 18(4), e2000820.
45. Romulo, A. (2020). The Principle of Some In vitro Antioxidant Activity Methods: Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 426, 012177.
46. Roozbehani, M., Abdolmohammadi, M. H., Hamzeloo-Moghadam, M., Irani, S., & Fallahian, F. (2021). Gaillardin, a potent sesquiterpene lactone induces apoptosis via down-regulation of NF- κ B in gastric cancer cells, AGS and MKN45. *Journal of ethnopharmacology*, 281, 114529.
47. Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International journal of biological macromolecules*, 233, 123470.
48. Sánchez-Mercader, A., Cámara-Salazar, A., Traconis-Díaz, V., & Sánchez-Buenfil, G. (2021). Análisis de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México y el estado de Yucatán. *Ginecología y obstetricia de México*, 89(9), 671-677.
49. Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781.
50. Su, Z., Yao, B., Liu, G., & Fang, J. (2024). Polyphenols as potential preventers of osteoporosis: A comprehensive review on antioxidant and anti-inflammatory effects, molecular mechanisms, and signal pathways in bone metabolism. *The Journal of nutritional biochemistry*, 123, 109488.
51. Tesfaye, S., Asres, K., Lulekal, E., Alebachew, Y., Tewelde, E., Kumarihamy, M., & Muhammad, I. (2020). Ethiopian medicinal plants traditionally used for the treatment of cancer, part 2: A review on cytotoxic, antiproliferative, and antitumor phytochemicals, and future perspective. *Molecules*, 25(17), 4032.
52. Tundis, R., Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Solimene, U., & Menichini, F. (2012). Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio stibianus* Lacaita



- (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Natural product research*, 26(5), 393–404.
53. Uchihara, Y., Tago, K., Taguchi, H., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Tamura, H., & Funakoshi-Tago, M. (2018). Taxodione induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells through ROS generation. *Biochemical pharmacology*, 154, 357–372.
54. Velázquez-Vázquez, G., Pérez-Armendáriz, B., Ortega-Martinez, L. D., & Nelly-Juarez, Z. (2019). Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(3), 265–276.
55. Wang, Q., Mu, Q., Shibano, M., Morris-Natschke, S. L., Lee, K. H., & Chen, D. F. (2007). Eremophilane sesquiterpenes from *Ligularia macrophylla*. *Journal of natural products*, 70(8), 1259–1262.
56. Wu, Q. X., Shi, Y. P., & Jia, Z. J. (2006). Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural product reports*, 23(5), 699–734.
57. Yimer, T., Emiru, Y. K., Kifle, Z. D., Ewunetei, A., Adugna, M., & Birru, E. M. (2021). Pharmacological evaluation of antipyretic and antioxidant activities of 80% methanol root extract and derived solvent fraction of *Echinops kebericho* M. (Asteraceae) in mice model. *BioMed research international*, 2021, 6670984.
58. Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental biology and medicine*, 246(16), 1791–1801.
59. Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., & Nemutlu, E. (2020). Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 190, 113509.
60. Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137 (2), 293–300.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
Mexico.

16. ANEXOS



16. ANEXOS.

Anexo 1. Gráficas concentración-respuesta del porcentaje de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS de los controles utilizados en esta investigación.

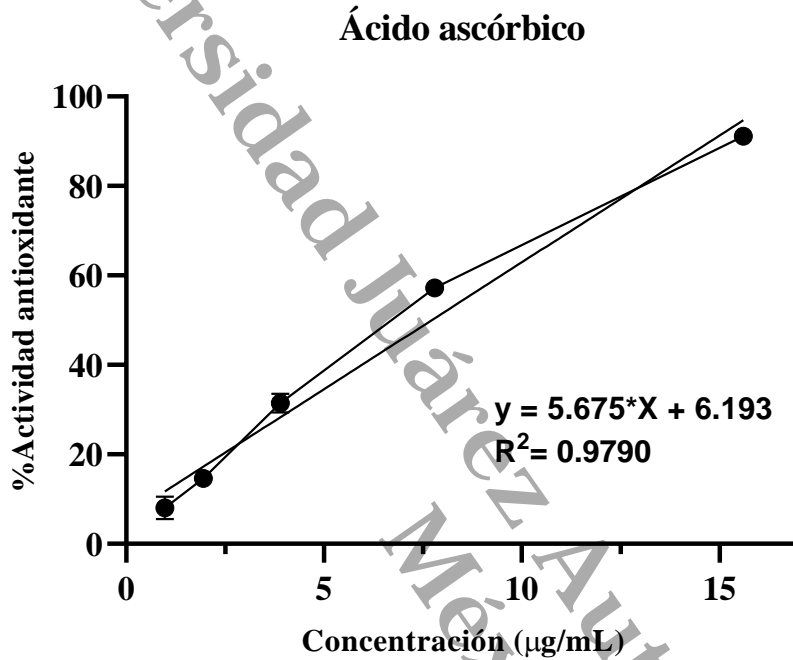


Figura 1. Gráfica de la curva de concentración-respuesta de la actividad antioxidante del ácido ascórbico sobre el DPPH. (Fuente: Autor).

$$E_{\max} = 91.0981 \%$$

$$50\% E_{\max} = 45.5490 = y$$

$$CI_{50} = x = ?$$

$$y = mx + b \therefore x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{45.459 - 6.193}{5.675}$$

$$x = 6.935 \mu\text{g/mL} = CI_{50}$$

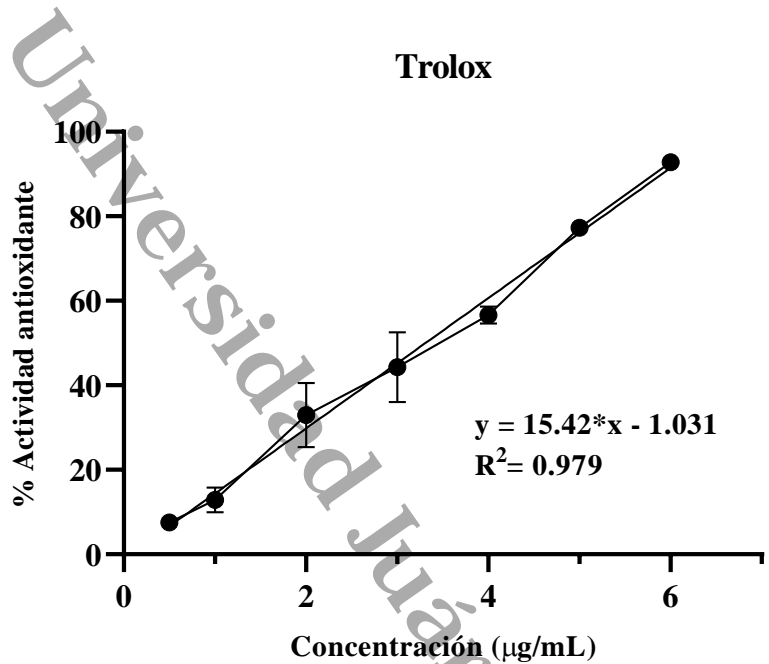


Figura 2. Gráfica de la curva de concentración-respuesta de la actividad antioxidante del trolox sobre el ABTS. (Fuente: Autor).

$$E_{\max} = 92.769 \%$$

$$50\% E_{\max} = 46.384 = y$$

$$CI_{50} = x = ?$$

$$y = mx + b \quad \therefore x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{46.384 - (-1.031)}{15.42}$$

$$x = 3.075 \mu\text{g/mL} = CI_{50}$$



Anexo 2. Resumen de la presentación modalidad cartel en la 18ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, organizada por Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales.

Rev. Mex. Inv. Prod. Nat. 2023, 1 (Supl. Especial)

Actividad antioxidante y citotóxica de la especie vegetal *Epaltes mexicana*

Tamara de los Angeles Juárez-Velázquez,^{1*} José Arnold González-Garrido,¹ Adelma Escobar-Ramírez,¹ Nelly Jiménez-Pérez,² José Rubén García-Sánchez,³ Oswaldo Hernández-Abreu¹

¹ Carretera Cunduacán-Jalpa km 1, Col. La Esmeralda, Cunduacán, Tabasco. ² Carretera Villahermosa-Cárdenas km. 0.5 S/N, entronque a Bosques de Saloya, Villahermosa, Tabasco. ³ Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas, Ciudad de México, CDMX. *Correo: 222A27007@alumno.ujat.mx

Palabras clave: *Epaltes mexicana*, cáncer, citotóxico, antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Para la atención primaria de la salud un 80% de la población en el mundo hace uso de la medicina tradicional, principalmente por la presencia de moléculas antioxidantes.¹ El estrés oxidativo es un proceso fisiológico en el organismo en donde los niveles de oxidantes (ROS y RNS), están en desequilibrio con antioxidantes, siendo los primeros los más abundantes, se ha relacionado el aumento de ROS con la presencia de cáncer.²

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie vegetal se recolectó en Cárdenas, Tabasco y se identificó en el herbario de la DACBIol con número de vócher 36574. Se maceró el material vegetal seco y molido en disolventes C₆H₁₄, CH₂Cl₂ y CH₃OH, durante 72h por triplicado. Para la determinación de la actividad antioxidante se empleó el método DPPH, se evaluaron los extractos vegetales en concentraciones de 15.6 – 750 µg/mL y se reportó como % actividad antioxidante.³ Mediante un ensayo biodirigido se evaluó el efecto citotóxico en las líneas cancerosas MCF-7 (mama), MDA-MB-231 (mama), SiHa (cervicouterino), DU-145 (próstata) y en una no tumorigénica MCF-10A (mama), determinando la viabilidad celular por el método MTT.⁴ El extracto hexánico (EHEm) mostró mayor actividad, fue separado mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Al₂O₃ y fase móvil gradiente de disolventes; las fracciones obtenidas se monitorearon por capa fina y se les determinó su efecto citotóxico en las mismas líneas celulares. Los resultados se presentan como la media ± DE. En ambas actividades se estableció diferencia estadística significativa con un valor p ≤ 0.05 respecto al control mediante una prueba t-Student de dos colas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el efecto antioxidante del EHEm (Cl₅₀= 80.47 µg/mL) comparado con su control, EHEm y EDEm no mostraron actividad antioxidante. Los extractos diclorometánico y metanólico no mostraron actividad citotóxica. En cambio, la fracción 6 del EHEm mostró efecto citotóxico dependiente de la concentración en las

líneas SiHa, MDA-MB-231, y MCF-7 (ver Tabla 1). Previamente en este mismo extracto se ha reportado actividad antibacteriana, siendo el único reporte.⁵ Interesantemente, no presentó efecto citotóxico en la línea no tumoral MCF10A y la línea de cáncer DU-145.

Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos de Em, comparado con ácido ascórbico. N= 3, p ≤ 0.05.*

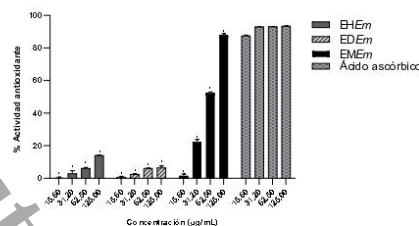


Tabla 1. Efecto de la fracción 6 del EHEm

Línea celular	Cl ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (%)
MCF-7	6.31	74.69 ± 6.19
MDA-MB-231	124.21	79.28 ± 12.12
SiHa	124.34	82.96 ± 6.02
DU-145	ND	39.41 ± 6.34
MCF-10A	ND	25.51 ± 5.035

ND. No Determinado.

CONCLUSIONES

El EHEm mostró actividad antioxidante por el método DPPH, pero no actividad citotóxica. La fracción 6 del EHEm mostró un efecto citotóxico selectivo sobre líneas de cáncer de mama y cervicouterino.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por otorgar la beca para estudio de posgrado de la M.C. en Química Aplicada en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

REFERENCIAS

- Maldonado, C.; Paniagua, N.; Bussmann, R. W.; Zenteno, F. S.; Fuentes, A. F. *Ecología en Bolivia* 2020, 55, 1-5.
- Hernández, E.Y.; Eugenio, D.; Ramírez, K.J.; Pedraza, J. *ACS Omega* 2023, 8, 8936-8959.
- Munteanu, I. G.; Apetrei, C. *International Journal of molecular sciences* 2021, 22, 3380.
- Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018, 2018, 469-471.
- Kato, T.; Frel, B.; Heinrich, M.; Sticher, O. *Planta medica* 1996, 62, 66-67.



Anexo 3. Resumen de la presentación modalidad cartel en cartel en el 4° Congreso Nacional Estudiantil en Biología, Educación Ambiental y Agricultura, organizada por la Universidad de Chapingo.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE LA ESPECIE VEGETAL *Epaltes mexicana*

Tamara de los Angeles Juárez-Velázquez,^{1*} José Arnold González-Garrido,¹ Adelma Escobar-Ramírez,¹ Nelly Jiménez-Pérez,² José Rubén García-Sánchez,³ Oswaldo Hernández-Abreu¹

¹División Académica de Ciencias Básicas, UJAT. ²División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT. ³Escuela Superior de Medicina, IPN. *Correo: 222A27007@alumno.ujat.mx

INTRODUCCIÓN

Para la atención primaria de la salud un 80 % de la población hace uso de la medicina tradicional, principalmente por la presencia de moléculas antioxidantes.¹ El estrés oxidativo es un proceso fisiológico en donde los niveles de oxidantes están en desequilibrio con antioxidantes, siendo los primeros los más abundantes.

JUSTIFICACIÓN

Aunque existen diversos tipos de fármacos para el cáncer, sigue ocupando las primeras tasas de diagnóstico y de mortalidad, además se ha relacionado el aumento de ROS con la presencia de cáncer, por otra parte, se ha reportado que algunos metabolitos de otras especies de la familia Asteraceae presentan efecto antioxidante, es por ello que debido a la falta de fármacos efectivos para el cáncer se evaluará *Epaltes mexicana*.

OBJETIVOS

Determinar el efecto antioxidante a través de la técnica DPPH y el efecto citotóxico con MTT, de los extractos orgánicos de *Epaltes mexicana*.

MÉTODOS

La especie vegetal se recolectó en Cárdenas, Tabasco y se identificó en el herbario de la DACBiol con número de vócher 36574. Se maceró el material vegetal seco y molido en disolventes C₆H₁₄, CH₂Cl₂ y CH₃OH, durante 72h por triplicado. Para la determinación de la actividad antioxidante se empleó el método DPPH, se evaluaron los extractos vegetales en concentraciones de 15.6 – 750 µg/mL y se reportó como % actividad antioxidante.³ Mediante un ensayo biodirigido se evaluó el efecto citotóxico en las líneas cancerosas MCF-7 (mama), MDA-MB-231 (mama), SiHa (cervicouterino), DU-145 (próstata) y en una no tumorigénica MCF-10A (mama), determinando la viabilidad celular por el método MTT.⁴ El extracto hexánico (EHEm) mostró mayor actividad, fue separado mediante cromatografía

en columna utilizando como fase estacionaria Al₂O₃ y fase móvil gradiente de disolventes; las fracciones obtenidas se monitorearon por capa fina y se les determinó su efecto citotóxico en las mismas líneas celulares. Los resultados se presentan como la media ± DE. En ambas actividades se estableció diferencia estadística significativa con un valor p ≤ 0.05 respecto al control mediante una prueba t-Student de dos colas.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el efecto antioxidante del EHEm (CI₅₀= 80.47 µg/mL) comparado con su control, EHEm y EDEm no mostraron actividad antioxidante. Los extractos diclorometánico y metanólico no mostraron actividad citotóxica. En cambio, la fracción 6 del EHEm mostró efecto citotóxico dependiente de la concentración en las líneas SiHa, MDA-MB-231, y MCF-7 (ver Tabla 1). Previamente en este mismo extracto se ha reportado actividad antibacteriana, siendo el único reporte.⁵ Interesantemente, no presentó efecto citotóxico en la línea no tumoral MCF10A y la línea de cáncer DU-145.

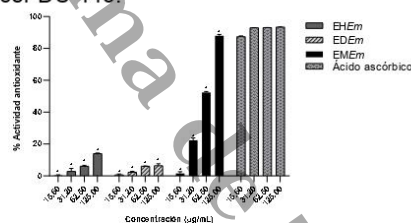


Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos de *Em*, comparado con ácido ascórbico. N= 3, p ≤ 0.05.*

Tabla 1. Efecto de la fracción 6 del EHEm

Línea celular	CI ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (%)
MCF-7	6.31	74.69 ± 6.19
MDA-MB-231	124.21	79.28 ± 12.12
SiHa	124.34	82.96 ± 6.02
DU-145	ND	39.41 ± 6.34
MCF-10A	ND	25.51 ± 5.035

ND. No Determinado



Anexo 4. Resumen de la presentación modalidad cartel en el 1er. Simposio Mexicano de Farmacognosia, organizada por la Red Mexicana de Investigación Preclínica y Desarrollo Farmacéutico.



Ciencia & Tecnología



Resumen de trabajo libre

Determinación de terpenos citotóxicos de la especie vegetal *Epaltes mexicana* mediante LC-qToF-MS

Tamara de los Angeles Juárez Velázquez^{1*}, José Arnold González Garrido¹, Ivonne María Olivares Corichi², José Rubén García Sánchez², Oswaldo Hernández Abreu¹

¹ División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa Km 1, Col. La Esperanza, C.P. 86690, Cunduacán, Tabasco, México.

² Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas, C.P. 11340, Ciudad de México, México.

* Autor de correspondencia: 222A27007@alumno.ujat.mx

Resumen

Introducción. En una fracción cromatográfica del extracto hexánico de *Epaltes mexicana* se ha encontrado efecto citotóxico selectivo en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino. **Objetivo.** Determinar el contenido metabólico de la fracción 6 de *Epaltes mexicana* por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. **Material y métodos.** Se utilizó un sistema de cromatografía líquida (LC 1290 Infinity II, Agilent Technologies) con bomba cuaternaria acoplada a un espectrómetro de masas con ionización electrospray y detector cuadrupolo de tiempo de la serie Agilent 6545; una columna bioZen™ XB-C18; y disolventes grado HPLC. Se empleó como fase móvil: A) ácido fórmico al 0,1% en agua y B) ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo, en un método de gradiente. 1 miligramo de la fracción 6 se disolvió en 1 mililitro de acetonitrilo y se diluyó 1:100 para iniciar la elución. La fragmentación se determinó por anotación de iones y se comparó con la base de datos METLIN. **Resultados y conclusiones.** Se identificaron ocho metabolitos de naturaleza terpénica en un tiempo de retención menor a cinco minutos: (1) giberelina A15, (2) farfugina A, (3) deshidromidesmona, (4) eremopetasetenina A1, (5) hidroxisonobilina, (6) anhidrocinczeilanina, (7) nigakilactona H y (8) taxodiona. El tipo de ion molecular para los metabolitos fue (M+H)⁺, a excepción de anhidrocinczeilanina y nigakilactona H que fue (M+Na)⁺. La farfugina A presentó la mayor abundancia de iones. La especie vegetal *Epaltes mexicana* contiene terpenos con actividad citotóxica selectiva sobre líneas de cáncer, lo cual las hace moléculas de interés para continuar con sus estudios preclínicos.

Cita: Juárez Velázquez *et al.*. Determinación de terpenos citotóxicos de la especie vegetal *Epaltes mexicana* mediante LC-qToF-MS. *Ciencia y Tecnología ITESCAM Calkiní* 2024;3(S1):17.

Recibido: 20 de abril de 2024

Aceptado: 29 de abril de 2024

Publicado: 30 de mayo de 2024

Copyright: Los datos proporcionados son propiedad de la revista *Ciencia y Tecnología ITESCAM Calkiní*.

Ciencia y Tecnología ITESCAM-Calkiní 2024;3(S1):17



Anexo 5. Resumen de la presentación modalidad cartel en la 19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, organizada por Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales.

Determinación de terpenos citotóxicos de la especie vegetal *Epaltes mexicana* mediante LC-QTOF-MS

Tamara de los Angeles Juárez-Velázquez,^{1*} José Arnold González-Garrido¹ Ivonne María Olivares-Corichi² José Rubén García-Sánchez² Oswaldo Hernández-Abreu¹

¹Carretera Cunduacán-Jalpa km 1, Col. La Esmeralda, Cunduacán, Tabasco. ²Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas, Ciudad de México, CDMX. *Correo: 222A27007@alumno.ujat.mx

Palabras clave: *Epaltes mexicana*, citotoxicidad, LC-QTOF-MS, terpenos.

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios de las plantas son fuentes potenciales para prevenir y/o curar enfermedades. Una fracción cromatográfica del extracto hexánico de la especie *Epaltes mexicana* (EH_{Em}) ha demostrado tener efecto citotóxico selectivo en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y cervicouterino (SiHa), con CI₅₀= 6.31 µg/mL, 124.21 µg/mL y 124.34 µg/mL, respectivamente.¹ El objetivo de este estudio fue determinar el contenido metabólico de la fracción activa de *E. mexicana* por LC-QTOF-MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la identificación de los compuestos activos se utilizó un sistema de cromatografía líquida (LC 1290 Infinity II, Agilent Technologies) con bomba cuaternaria acoplada a un espectrómetro de masas con ionización por ESI y detector de Q-TOF de la serie Agilent 6545 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se desarrolló un método utilizando una columna bioZen™ XB-C18 (100 x 2,1 mm x 1,7 µm); se emplearon: A) ácido fórmico al 0,1% en agua y B) ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo, como fase móvil. El gradiente de elución se estableció de la siguiente manera: 0 min, 50 % A); 5 min, 75% A); 15 min, 0% A). 1 mg de la F6 se disolvió en 1 ml de acetonitrilo y se pasó por un filtro de nailon de 0.45 µm. Posteriormente, se diluyó 1:100 para iniciar la elución.² El análisis de fragmentación (MS/MS) se determinó por anotación de iones a través del algoritmo de extracción de características moleculares (MFE) y se comparó con la base de datos METLIN.²

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron ocho metabolitos de naturaleza terpénica en un tiempo de retención menor a cinco minutos: (1) giberelina A15, (2) farfugina A, (3) deshidromiodesmona, (4) eremopetasetenina A1, (5) hidroxiisonobilina, (6) anhidrocinezanina, (7) nigakilactona H y (8) taxodiona (Tabla 1). El tipo de ion molecular para los metabolitos fue (M+H)⁺ a excepción de la anhidrocinezanina y nigakilactona H que fue (M+Na)⁺.

Tabla 1. Compuestos identificados de la F6 EH_{Em} por LC-QTOF-MS

t _R (min)	Identificación	Tipo de ion	m/z
1.949	Giberelina A15	(M+H) ⁺	331.19
1.955	Farfugina A	(M+H) ⁺	215.14
1.956	Deshidromiodesmona	(M+H) ⁺	231.13
2.192	Eremopetasetenina A1	(M+H) ⁺	365.19
2.492	Hidroxiisonobilina	(M+H) ⁺	363.18
2.764	Anhidrocinezanina	(M+Na) ⁺	431.20
3.001	Nigakilactona H	(M+Na) ⁺	447.19
3.115	Taxodiona	(M+H) ⁺	315.19

t_R. Tiempo de retención

Se encontró que farfugina A presenta una mayor abundancia de iones con respecto a los otros metabolitos presentes en la F6, además en otro estudio se ha reportado que la farfugina A en la línea MCF-7 tiene una CI₅₀= 13.6 µg/mL y en la línea de cáncer de pulmón A-549 una CI₅₀= 10.9 µg/mL,³ sin embargo, la CI₅₀ en MCF-7 del conjunto de metabolitos de la F6 es menor, lo que sugiere un posible sinergismo entre los metabolitos presentes.

CONCLUSIONES

La especie vegetal *E. mexicana* contiene terpenos con actividad citotóxica selectiva sobre líneas de cáncer, lo cual los hace moléculas de interés para continuar con sus estudios preclínicos.

AGRADECIMIENTOS

A CONACHyT por otorgar la beca 826932 para estudio de posgrado de la M.C. en Química Aplicada en la UJAT.

REFERENCIAS

- Juárez Velázquez, T. A. (2022). *Efecto citotóxico de la especie vegetal Epaltes mexicana utilizada en medicina tradicional de Tabasco* [Tesis de licenciatura]. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Rodríguez-Morales, S., Ocampo-Medina, B., Romero-Ceronio, N., Alvarado-Sánchez, C., Vilchis-Reyes, M. A., Roa de la Fuente, L. F., Ortiz-Andrade, R., & Hernández-Abreu, O. (2021). Metabolic Profiling of Vasorelaxant Extract from *Malva viscosa* arboreus by LC/QTOF-MS. *Chemistry & Biodiversity*, 18(4), e2000820. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000820>
- Wang, Q., Mu, Q., Shibano, M., Morris-Natschke, S. L., Lee, K. H., & Chen, D. F. (2007). Eremophilane sesquiterpenes from *Ligularia macrophylla*. *Journal of Natural Products*, 70(8), 1259-1262. <https://doi.org/10.1021/jnp070113x>



Anexo 6. Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional.

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>Epaltes mexicana</i> Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.
Autora de la Tesis:	Q.F.B. Tamara de los Ángeles Juárez Velázquez
ORCID:	https://orcid.org/0000-0002-1881-821X
Resumen de la Tesis:	<p>El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial causando una de cada seis muertes y en México durante el año 2021 un 8 % (90,123) de las defunciones fue por tumores malignos. El objetivo de esta tesis fue determinar el perfil metabólico de la fracción 6 (F6) del extracto hexánico de <i>Epaltes mexicana</i> (EHEm) que tiene efecto citotóxico para conocer los metabolitos responsables de la actividad y evaluar el efecto antioxidante para explorar la posible relación con la actividad citotóxica.</p> <p>Mediante procesos cromatográficos se obtuvo la F6 del EHEm y se analizó mediante LC/MS-QTOF, se utilizó como fase móvil: A) ácido fórmico al 0.1% en agua y B) ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, 1 mg de la fracción 6 se disolvió en 1 mL de acetonitrilo y se diluyó 1:100 para iniciar la elución. Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó el ensayo DPPH y ABTS.</p> <p>Se logró identificar mediante la anotación de iones, fragmentación MS/MS y comparación con bases de datos ocho metabolitos de naturaleza terpénica clasificados como sesquiterpenos (farfugina A y deshidromiodesmona), diterpenos (giberelina A15, eremopetasetenina A1, hidroxiisonobilina, anhidrocinczeilanina y taxodiona) y un triterpeno (nigakilactona H). El único extracto que tuvo efecto antioxidante por ambos métodos fue el EHEm, $CI_{50} = 6.12$ Eq. A.A. y $CI_{50} = 0.228$ CAET, en DPPH y ABTS, respectivamente.</p> <p>Se sugiere continuar con los estudios de aislamiento de los metabolitos como fuente prometedora de fármacos anticancerígenos, asimismo EHEm es una fuente de moléculas de gran potencial antioxidante.</p>
Palabras claves de la Tesis:	Antioxidante, <i>Epaltes mexicana</i> , LC/MS-QTOF, terpenos.
Referencias citadas:	1. Álvarez-Quiroz, V., Caso-Barrera, L., Aliphat-Fernández, M., & Galmiche-Tejeda, A. (2017). Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. <i>Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas</i> , 16(4), 428–454.



Referencias citadas:	<ol style="list-style-type: none"> 2. Baer, W., Chmiel, J., Gnojowski, J., & Klimek, D. (1983). The effect of sesquiterpene lactones, eupatoriopicrin and hydroxyisonobilin, on the glycolytic metabolism of human lymphocytes. <i>International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology</i>, 21(1), 41–46. 3. Canga, I., Vita, P., Oliveira, A. I., Castro, M. Á., & Pinho, C. (2022). <i>In vitro</i> cytotoxic activity of african plants: A review. <i>Molecules</i>, 27(15), 4989. 4. Catherine-Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. <i>Revista Médica Clínica Las Condes</i>, 24(4), 553–562. 5. Crosby, D., Bhatia, S., Brindle, K. M., Coussens, L. M., Dive, C., Emberton, M., Esener, S., Fitzgerald, R. C., Gambhir, S. S., Kuhn, P., Rebbeck, T. R., & Balasubramanian, S. (2022). Early detection of cancer. <i>Science</i>, 375(6586), eaay9040. 6. Collado-Martín, R (2017). Perfil metabólico plasmático en pacientes con cáncer de mama. Tesis de doctorado, Universidad de Granada. 7. Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. <i>SAGE open medicine</i>, 9, 20503121211034366. 8. El-Baba, C., Baassiri, A., Kiriako, G., Dia, B., Fadlallah, S., Moodad, S., & Darwiche, N. (2021). Terpenoids' anti-cancer effects: focus on autophagy. <i>Apoptosis: an international journal on programmed cell death</i>, 26(9-10), 491–511. 9. Eldesouki, S., Qadri, R., Abu Helwa, R., Bargawi, H., Bustanji, Y., Abu-Gharbieh, E., & El-Huneidi, W. (2022). Recent updates on the functional impact of kahweol and cafestol on cancer. <i>Molecules</i>, 27(21), 7332. 10. Feng, Y., Xia, J., Xu, X., Zhao, T., Tan, Z., Wang, Q., Wang, J., Meng, J., Sanderson, C., Lu, Z., & Yang, Y. (2021). Sesquiterpene lactone bigelovin induces apoptosis of colon cancer cells through inducing IKK-β degradation and suppressing nuclear factor kappa B activation. <i>Anti-cancer drugs</i>, 32(6), 664–673. 11. Ford, E. J. & Rivera, R. (1978). The modification of the dehydromyodesmone-induced hepatic lesion in cattle by microsomal drug metabolizing enzymes. <i>Journal of Comparative Pathology</i>, 88(3), 365–80. 12. Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. <i>Nature reviews. Drug discovery</i>, 20(9), 689–709. 13. Gill, B. S., Kumar, S., & Navgeet (2016). Triterpenes in cancer: significance and
----------------------	---



their influence. *Molecular biology reports*, 43(9), 881–896.

14. Glorybai, L., Kannan K, B., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., & Agastian, P. (2015). Some biological activities of *Epaltes divaricata* L. - an in vitro study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 18.

15. Grande-Tovar, C., Araujo-Pabón, L., Flórez-López, E., & Aranaga-Arias, C. (2020). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Informador Técnico*, 85(1), 64–82.

16. Gómez-Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 43–49.

17. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46.

18. Heinrich, M. (2003). Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures?. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(2), 141–154.

19. Hernández-Bolio, G. I. (2017). Análisis del perfil metabólico e identificación de productos antihelmínticos de *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth. (*Tzalam*). Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

20. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf. INEGI (2023). Comunicado de prensa núm. 77/23. Consultado el 29 de enero de 2024.

21. <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>. INSP (2020). Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas. Consultado el 03 de octubre de 2022.

22. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf. Organización Mundial de la Salud [OMS] (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Consultado el 04 de febrero de 2024.

23. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. OMS (2023). Enfermedades no transmisibles. Consultado el 012 de abril de 2024.

24. Ivanova, A., Gerasimova, E., & Gazizullina, E. (2020). Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms. *Molecules*, 25(18), 4251.

25. Janković, N., Tadić, J., Milović, E., Marković, Z., Jeremić, S., Petronijević, J., Joksimović, N., Borović, T. T., & Abbas Bukhari, S. N. (2023). Investigation of the radical scavenging potential of vanillin-based pyrido-dipyrimidines: experimental and *in silico* approach. *RSC Advances*, 13(22), 15236–15242.

26. Juárez-Velázquez, T. Á. (2022). Efecto citotóxico de la especie vegetal *Epaltes*



mexicana utilizada en medicina tradicional de Tabasco. Tesis de licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

27. Kato, T., Frei, B., Heinrich, M., & Sticher, O. (1996). Sesquiterpenes with antibacterial activity from *Epaltes mexicana*. *Planta medica*, 62(1), 66–67.
28. Kuźma, Ł., Wysokińska, H., Sikora, J., Olszewska, P., Mikiciuk-Olasik, E., & Szymański, P. (2016). Taxodione and extracts from *Salvia austriaca* roots as human cholinesterase inhibitors. *Phytotherapy research: PTR*, 30(2), 234–242.
29. León-Montoya, G. B. Saavedra-Chinchayán, M. E. & Valenzuela-Ramos, M. R. (2022). Prácticas de medicina tradicional en trabajadores administrativos nativos andinos en el sur del Perú. *Atención Primaria*, 54(8), 102355.
30. Magaña-Alejandro, M. A., Gama-Campillo, L. M., & Mariaca-Méndez, R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*. 29, 213–262.
31. Maldonado, C., Paniagua-Zambrana, N., Bussmann, R. W., Zenteno-Ruiz, F. S., & Fuentes, A. F. (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*, 55(1), 1–5.
32. Maldonado-Jimenez, E. (1989). Eudesmane derivatives from *Epaltes mexicana*. *Phytochemistry*, 28(7), 1973–1974.
33. Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D’andrea, L., Napolitano, P., & D’Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48–78.
34. Mendonça, J. D. S., Guimarães, R. C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. P., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K. C., Hirane, P. A., de Pádua-Melo, E. S., Vilela, M. L. B., & Nascimento, V. A. D. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*, 27(11), 3563.
35. Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 80, 50–64.
36. More, G. K. Meddows-Taylor, S. & Prinsloo, G. (2021). Metabolomic profiling of antioxidant compounds in five *Vachellia* species. *Molecules*, 26 (20), 6214.
37. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3380.
38. Prakash, S., Radha, Kumar, M., Kumari, N., Thakur, M., Rathour, S., Pundir, A., Sharma, A. K., Bangar, S. P., Dhumal, S., Singh, S., Thiyagarajan, A., Sharma, A., Sharma, M., Changan, S., Sasi, M., Senapathy, M., Pradhan, P. C., Garg, N. K.,



Ilakiya, T., & Mekhemar, M. (2021). Plant-based antioxidant extracts and compounds in the management of oral Cancer. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1358.

39. Parcheta, M., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Akimowicz, M., Choińska, R., & Lewandowski, W. (2021). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties, 14(8), 1984.

40. Pedraza-Alva, G., Ramírez-Serrano, C. E., Pedraza, F., Flores-Vallejo, R. D. C., Villarreal, M. L., & Pérez-Martínez, L. (2019). From traditional remedies to cutting-edge medicine: Using ancient mesoamerican knowledge to address complex disorders relevant to psychoneuroimmunology. *Brain, behavior, and immunity*, 79, 3–5.

41. Química Analítica (2021). *Teórica nº11 Cromatografía Líquida de alta resolución* [Vídeo]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=re0muds5zYk>

42. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9-10), 1231–1237.

43. Redonda-Martínez, R. (2020). La subtribu Plucheinae (Inuleae, Asteraceae) en México: taxonomía, diversidad y distribución. *Acta Botánica Mexicana*, 127, 1-9.

44. Rodríguez-Morales, S., Ocampo-Medina, B., Romero-Ceronio, N., Alvarado-Sánchez, C., Vilchis-Reyes, M. A., Roa de la Fuente, L. F., Ortiz-Andrade, R., & Hernández-Abreu, O. (2021). Metabolic profiling of vasorelaxant extract from *Malvaviscus arboreus* by LC/QTOF-MS. *Chemistry & biodiversity*, 18(4), e2000820.

45. Romulo, A. (2020). The Principle of Some In vitro Antioxidant Activity Methods: Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 426, 012177.

46. Roozbehani, M., Abdolmohammadi, M. H., Hamzeloo-Moghadam, M., Irani, S., & Fallahian, F. (2021). Gaillardin, a potent sesquiterpene lactone induces apoptosis via down-regulation of NF- κ B in gastric cancer cells, AGS, and MKN45. *Journal of ethnopharmacology*, 281, 114529.

47. Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International journal of biological macromolecules*, 233, 123470.

48. Sánchez-Mercader, A., Cámara-Salazar, A., Traconis-Díaz, V., & Sánchez-Buenfil, G. (2021). Análisis de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México y el estado de Yucatán. *Ginecología y obstetricia de México*, 89(9), 671-677.

49. Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of*



Functional Foods, 18, 757–781.

50. Su, Z., Yao, B., Liu, G., & Fang, J. (2024). Polyphenols as potential preventers of osteoporosis: A comprehensive review on antioxidant and anti-inflammatory effects, molecular mechanisms, and signal pathways in bone metabolism. *The Journal of nutritional biochemistry*, 123, 109488.

51. Tesfaye, S., Asres, K., Lulekal, E., Alebachew, Y., Tewelde, E., Kumarihamy, M., & Muhammad, I. (2020). Ethiopian medicinal plants traditionally used for the treatment of cancer, part 2: A review on cytotoxic, antiproliferative, and antitumor phytochemicals, and future perspective. *Molecules*, 25(17), 4032.

52. Tundis, R., Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Solimene, U., & Menichini, F. (2012). Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Natural product research*, 26(5), 393–404.

53. Uchihara, Y., Tago, K., Taguchi, H., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Tamura, H., & Funakoshi-Tago, M. (2018). Taxodione induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells through ROS generation. *Biochemical pharmacology*, 154, 357–372.

54. Velázquez-Vázquez, G., Pérez-Armendáriz, B., Ortega-Martinez, L. D., & Nelly-Juarez, Z. (2019). Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(3), 265–276.

55. Wang, Q., Mu, Q., Shibano, M., Morris-Natschke, S. L., Lee, K. H., & Chen, D. F. (2007). Eremophilane sesquiterpenes from *Digularia macrophylla*. *Journal of natural products*, 70(8), 1259–1262.

56. Wu, Q. X., Shi, Y. P., & Jia, Z. J. (2006). Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural product reports*, 23(5), 699–734.

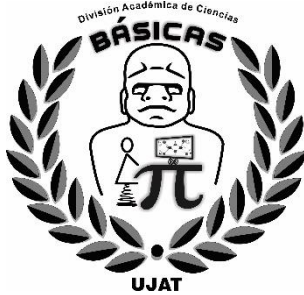
57. Yimer, T., Emiru, Y. K., Kifle, Z. D., Ewunetei, A., Adugna, M., & Birru, E. M. (2021). Pharmacological evaluation of antipyretic and antioxidant activities of 80% methanol root extract and derived solvent fraction of *Echinops kebericho* M. (Asteraceae) in mice model. *BioMed research international*, 2021, 6670984.

58. Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental biology and medicine*, 246(16), 1791–1801.

59. Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., & Nemutlu, E. (2020). Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 190, 113509.

60. Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137 (2), 293–300.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.



“Donde hacer ciencia, es Básico”