



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



**DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO
DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Eryngium
foetidum* MEDIANTE LC/MS y GC/MS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA
APLICADA**

PRESENTA

ROMARIO VÁZQUEZ CANCINO

DIRECTOR

DR. OSWALDO IGNACIO HERNÁNDEZ ABREU

Cunduacán, Tab.

Agosto 2022



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

26 de julio de 2022

**LIC. ROMARIO VÁZQUEZ CANCINO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA
P R E S E N T E.**

Por medio de la presente y de la manera más atenta, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Eryngium foetidum* MEDIANTE LC/MS y GC/MS"** en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Química Aplicada.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**DR. GERARDO DELGADILLO PIÑÓN
DIRECTOR**



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p.- Archivo.

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

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE
Eryngium foetidum MEDIANTE LC/MS y GC/MS.**



CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada "DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Eryngium foetidum* MEDIANTE LC/MS y GC/MS", de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Cunduacán, Tabasco a los 29 días del mes de julio de 2022.

Autoriza

Romario Vázquez Cancino

202A27004



“En la ciencia el reconocimiento se concede al hombre que convence al mundo, no a aquel a quien se le ocurre la idea”

William Osler



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la maestría y su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el uso de sus instalaciones, equipos y laboratorios durante formación académica y desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu por la dirección del proyecto de investigación desarrollado durante la Maestría,

A la M.C. María de los Ángeles Guadarrama Olivera y la Dra. Nelly del C Jiménez Pérez, de la División Académica de Ciencias Biológicas por su colaboración en la identificación de la especie vegetal a estudiar.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Química Orgánica y Química Farmacéutica del Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por la colaboración técnica en la obtención de los extractos orgánicos de este trabajo experimental.

Al Dr. Cuauhtémoc Alvarado Sánchez, a la Dra. María Teresa Flores Dorantes y al Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, miembros del comité tutorial evaluador del proyecto, por su asesoría, orientación y guía en este proyecto.

Al resto de los miembros del jurado de corrección de tesis y examen de grado, Al Dr. Miguel Ángel Reyes Vilchis, Dr. Abraham Gómez Rivera, Dr. Cuauhtémoc Alvarado Sánchez, Dra. María Teresa Flores Dorantes y al Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, agradezco su tiempo y dedicación para corregir y orientarme con sus conocimientos en el manuscrito final de este proyecto de investigación y así mismo fungir como miembros del jurado evaluador.



DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme culminar este proyecto, gracias por darme la fuerza y el coraje para hacer esta meta realidad, por estar conmigo en cada momento de mi vida. Por cada regalo de gracia que me has dado. Por darme salud y bendición para alcanzar mis metas como persona y como profesional.

A mi amigo y tutor de tesis Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu por su amistad, instrucción, guía, asesoría y colaboración durante el desarrollo de este proyecto de maestría, agradezco su dedicación y valiosos aportes durante mi trayectoria académica, siempre ayudándome e impulsándome a mejorar como estudiante, profesionista e investigador.

A mis padres, como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el apoyo y el amor brindado y porque hoy veo llegar a su fin una de mis metas en la vida, les agradezco la orientación que siempre me han otorgado, y el aliento para lograr esta hermosa realidad, para ellos todo mi amor, respeto y admiración.

A mis familiares, mis hermanos, mis abuelos y tíos, les agradezco enormemente ya que siempre me brindaron y me brindan su apoyo incondicional en todas las áreas de mi vida y aun en lo profesional.

A mis amigos, mis compañeros de vida y aventuras, en especial a Thelma García y Norma Jiménez mis bellas, hermosas y queridas princes, por su motivación, orientación, consejos y amistad incondicional, porque entre risas, llantos y corajes siempre demostraron estar para mí cuando más los necesite.

Todo mi amor y cariño para ustedes, los amo.

INDICE

INDICE.....	ii
II. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	iv
III. LISTA DE FIGURAS.....	vi
IV. LISTA DE TABLAS.....	viii
V. LISTA DE GRÁFICAS.....	ix
1. ABSTRACT.....	3
2. RESUMEN.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	7
4. ANTECEDENTES.....	10
4.1 Plantas medicinales.....	10
4.1. Impacto del uso de las plantas medicinales en la actualidad.....	10
4.1.2 Uso de plantas medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades.....	11
4.2 Ciencias que estudian a las plantas medicinales.....	11
4.2.1 Ciencias ómicas.....	12
4.2.2 Genómica.....	13
4.2.3 Epigenómica.....	14
4.2.4 Transcriptómica.....	14
4.2.5 Proteómica.....	15
4.2.6 Metabolómica.....	15
4.2.7 Aplicaciones actuales de las ciencias ómicas.....	16
4.2.8 Enfoques metabolómicos.....	17
4.3 Técnicas analíticas empleadas en los estudios metabolómicos.....	18
4.3.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).....	20
4.3.2 Aplicaciones de LC/MS.....	21
4.3.3 Introducción a la instrumentación de LC/MS aplicada en análisis metabolómico de plantas.....	22
4.4 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS).....	23
4.4.1 Características de GC/MS.....	23
4.5 Generalidades de <i>Eryngium foetidum</i>	26
4.5.1 Usos tradicionales de <i>Eryngium foetidum</i>	26
	ii
DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>Eryngium foetidum</i> MEDIANTE LC/MS y GC/MS.	



4.5.2 Antecedentes de la selección e identificación de la especie vegetal.....	27
4.5.3 Antecedentes fitoquímicos de <i>Eryngium Foetidum</i>	28
4.5.4 Antecedentes biológicos de <i>Eryngium foetidum</i>	28
5. JUSTIFICACIÓN	34
6. HIPÓTESIS.....	36
7. OBJETIVO GENERAL	38
8. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	40
9. METODOLOGÍA.....	42
9.1.1 Preparación de la muestra mediante LC/MS.	44
9.1.2 Condiciones del análisis cromatográfico de LC/MS.....	44
9.1.3 Análisis y adquisición de datos de LC/MS.....	45
9.2 Determinación del perfil metabólico mediante la técnica GC/MS.....	46
9.2.1 Preparación de la muestra en GC/MS.	46
9.2.3 Análisis y adquisición de datos de GC/MS.....	47
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
11. CONCLUSIONES.....	63
12. PERSPECTIVAS.....	65
13. BIBLIOGRAFÍA.....	67



II. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.

ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajeros
CICTAT	Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco
CL ₅₀	Concentración Letal Media
COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
Q-TOF	Cuádrupolo de Tiempo de Vuelo
LC/MS	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DACB	División Académica de Ciencias Básicas
<i>Ef</i>	<i>Eryngium foetidum</i>
EHEf	Extracto hexánico de <i>Eryngium foetidum</i>
EM	Esclerosis Múltiple
eV	Electrovoltios
MFE	Extracción de Características Moleculares
He	Helio
hpf	Horas pos fecundación
C ₆ H ₁₄	Hexano
ESI	Ionización de Electrospray
<i>m/z</i>	Masa/Carga
MPP	Medicina Personalizada de Precisión
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN	Resonancia Magnética Nuclear



TDAH
UJAT

Terapia contra el déficit de atención con hiperactividad
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



III. LISTA DE FIGURAS.

		Página
Figura 1.	Ciencias ómicas y su relación entre ellas. Tomado de Benítez, <i>et al.</i> , 2019.	13
Figura 2.	Principales aplicaciones de las ciencias ómicas en las áreas de mayor impacto de la medicina con relación a la MPP. Tomado de Benítez, <i>et al.</i> , 2019.	17
Figura 3.	Esquema simplificado de un análisis metabolómico dirigido y no dirigido. Tomado de Canuto <i>et al.</i> , 2018.	18
Figura 4.	Técnicas analíticas para abordar la metabolómica en dependencia de la clase de compuestos a estudiar. Tomado de Benítez, <i>et al.</i> , 2019.	19
Figura 5.	Esquema general del análisis metabolómico mediante la técnica de LC/MS. Tomado Zubiri-Gaitán, 2018.	21
Figura 6.	Componentes generales de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tomado de Wheeler, <i>et al.</i> , 2006.	25
Figura 7.	Planta de <i>Eryngium foetidum</i> tomado de López-Rivera, 2020.	26
Figura 8.	Microfotografía sobre el desarrollo embrionario del EHEf probados a la máxima concentración: A) embrión de 2 hpf en vehículo control negativo, B) embrión coagulado, C) pos-larva sin malformación de 72 hpf en control negativo, D) malformación de cabeza a las 72 hpf, E) malformación de edema en saco vitelino a las 72 hpf, F) malformación de región caudal a las 72 hpf.	30
Figura 9.	Esquema general de la metodología por LC/MS.	42
Figura 10.	Esquema general de la metodología por GC/MS.	43



Figura 11.	Cromatograma general de los metabolitos y compuestos tóxicos identificados en el extracto hexánico de la especie vegetal <i>Eryngium foetidum</i> en modo positivo.	50
Figura 12.	Estructuras químicas de los metabolitos y compuestos tóxicos anotados en el extracto hexánico de <i>Eryngium foetidum</i> modo positivo.	54
Figura 13.	Cromatograma general de los metabolitos y compuestos tóxicos identificados en el extracto hexánico de la especie vegetal <i>Eryngium foetidum</i> en modo negativo.	55
Figura 14.	Estructuras químicas de los metabolitos y compuestos tóxicos anotados en el extracto hexánico de <i>Eryngium foetidum</i> modo negativo.	57
Figura 15.	Cromatograma general de los metabolitos identificados en NIST del extracto de hexano de la especie vegetal <i>Eryngium foetidum</i> mediante GC/MS.	58
Figura 16.	Estructuras químicas de los metabolitos anotados en el extracto hexánico de <i>Eryngium foetidum</i> mediante GC/MS.	61



IV. LISTA DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. % de supervivencia del extracto hexánico de la especie vegetal <i>Eryngium foetidum</i> (EHEf).	31
Tabla 2. Moléculas identificadas mediante LC/MS en modo positivo	51
Tabla 3. Moléculas identificadas mediante LC/MS en modo negativo.	56
Tabla 4. Compuestos anotados por GC/MS del extracto hexánico de <i>Eryngium foetidum</i> mediante el método Splitless.	59



V. LISTA DE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1. Gráfica de supervivencia de los embriones evaluados en el modelo del pez cebra expuestos al extracto hexánico de <i>Eryngium foetidum</i> (EHEf). Control negativo con agua de garrafón (----), Concentración 0.0033 µg/mL (-◇-), concentración 0.033 µg/mL (-Δ-), concentración 0.33 µg/mL (●●●), concentración 3.3 µg/mL (-□-), concentración 33 µg/mL (-◎-).	32
Gráfica 2. Determinación del efecto toxicológico del extracto hexánico de la especie vegetal <i>Eryngium foetidum</i> observando la mortalidad en concentraciones logarítmicas, usando los embriones del pez cebra. Tomado de Vazquez-Cancino, 2020.	33

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

ABSTRACT

DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *Eryngium foetidum* MEDIANTE LC/MS y GC/MS.



1. ABSTRACT

Since ancient times, herbal medicine has been used as the first strategy to cure ailments and diseases, however, there is limited information about the toxicity of natural products, as well as the metabolic profile responsible of biological activities. Currently, the World Health Organization (WHO) has informed that a large percentage of the world's population employs the use of numerous plants as folk medicine for their health care.

The aim of this work focuses on the metabolomic study of the n-hexane extract of *Eryngium foetidum* (HEEf), used as food and medicine in Tabasco State. Previous studies report that the HEEf showed toxic activity on the zebrafish (*Danio rerio*) model.

We carried out the method standardization for to analyze the metabolic profile of the HEEf, using two analytical techniques: Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS) with electrospray ionization-quadrupole time of flight (ESI-QTOF) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) with electron impact. As results by LC/MS, the chromatograms were obtained. From this, the retention times, molecular formula, ion type, experimental and theoretical m/z and the fragmentation by ion annotation of 17 secondary metabolites such as flavonoids, terpenes and fatty acids and 7 toxic compounds from environmental pollution such as additives, flavorings and pesticides, were determined. On the other hand, in GC/MS using a *splitless* method, 13 secondary metabolites with low melting were found.

In conclusion, it was possible to recognize secondary metabolites that could be responsible for the pharmacological activities attributed to *Eryngium foetidum* and pollution compounds, probably responsible for the toxic activity on zebrafish (*Danio rerio*). In addition, it was demonstrated that the consumption of plant species must be documented with biological studies and metabolomic activities to ensure safety in humans.



RESUMEN



2. RESUMEN

Desde tiempos ancestrales se ha utilizado la herbolaria como primera estrategia para curar los padecimientos y enfermedades, sin embargo, existe poca información sobre la toxicidad de productos naturales, así como la identificación del contenido metabólico que le confiere las actividades biológicas. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que un gran porcentaje de la población mundial emplea el uso de diversas plantas como medicina tradicional para su salud.

Por su potencial tóxico en el modelo del pez cebra (*Danio rerio*) y su amplio uso como alimento y en la medicina tradicional del estado de Tabasco, el objetivo del presente trabajo se enfoca en el estudio metabólico del extracto hexánico de *Eryngium foetidum* (EHEf). Se llevó a cabo la estandarización de métodos para la determinación del perfil metabólico del EHEf, utilizando dos técnicas analíticas: cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) por ionización de electrospray (ESI) con detector de cuadrupolo de tiempo de vuelo (QTOF) en modo de ionización positiva y negativa y cromatografía de gases mediante espectrometría de masas (GC/MS) por impacto electrónico. Como resultados por LC/MS se obtuvieron los cromatogramas, donde se determinaron los tiempos de retención, fórmula molecular, tipo de ion, m/z experimental y teórica, y la fragmentación por anotación de iones de diecisiete metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos y ácidos grasos y siete compuestos tóxicos provenientes de la contaminación ambiental como aditivos, aromatizantes y pesticidas. Por otra parte, en GC/MS utilizando un método de *splitless* se encontraron trece metabolitos secundarios de bajo punto de fusión. Como conclusión, se lograron identificar metabolitos secundarios que podrían ser los responsables de las actividades farmacológicas atribuidas a la especie vegetal y compuestos contaminantes presentes en ella que, probablemente responsables de la actividad tóxica previamente demostrada sobre *Danio rerio*. Más aún, se demuestra que el consumo de especies vegetales debe de ser fundamentado con estudios metabólicos, de la actividad biológica y de las vías metabólicas de degradación que garanticen la seguridad en el ser humano.



INTRODUCCIÓN



3. INTRODUCCIÓN

En México el uso de las plantas medicinales ha sido de suma importancia a través de la historia (Gómez-Alvares, 2012). Más allá de generar un beneficio a la salud, en ocasiones suelen ser contraproducentes, pues muchas de las plantas medicinales utilizadas carecen de estudios científicos que comprueben sus posibles efectos terapéuticos y en menor proporción el efecto tóxico sobre los seres vivos (García de Alba, *et al.*, 2012; Manzanero-Medina, *et al.*, 2009). En los últimos años se ha considerado a la metabolómica como una de las ciencias ómicas emergentes que tienen como fin descifrar el perfil metabólico en sistemas complejos en conjunto de la combinación de ciertas técnicas analíticas y análisis de datos multivariados como LC/MS y GC/MS (Frigolet y Gutiérrez-Aguilar, 2017; Rocha-Viggiano, *et al.*, 2018).

Por otra parte, *Eryngium foetidum* (culantro cimarrón) es una especie vegetal ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para diversas patologías como fiebre, quemaduras, complicaciones de infertilidad, diarrea, escalofríos, vómitos, hipertensión, entre otras (López-Rivera, 2019). El efecto terapéutico dependerá de la parte de la planta, método de preparación, estación del año en que se haga la colecta, lugar de colecta y de la estación del año en la que se haga la recolección (Sánchez y González, 2002). Sin embargo, se carece de información científica que respalde sus posibles efectos tóxicos y farmacológicos. Es por ello que la presente investigación busca determinar el perfil metabólico a partir de la anotación de iones del extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, estableciendo así las condiciones de análisis más aptas para llevar a cabo la determinación del perfil metabólico, así como identificar moléculas y compuestos con un potencial terapéutico y tóxico presentes en la planta (Saftić, *et al.*, 2019).



ANTECEDENTES



4. ANTECEDENTES

4.1 Plantas medicinales.

La poca información científica que existe sobre los diferentes tipos de plantas medicinales, sus diversas aplicaciones terapéuticas como sustituto de los medicamentos y sobre todo los posibles efectos tóxicos que éstos pueden llegar a tener sobre la salud de la población que los consume ha generado un gran interés en los científicos por estudiar e identificar diversas plantas que se emplean como medicina tradicional en la población (García, *et al.*, 2015).

Hoy en día, existe poca evidencia científica sobre los efectos terapéuticos de la mayoría de las plantas medicinales de uso común e incluso ancestral, y sobre todo de los posibles efectos tóxicos. Esto ha generado un área investigación y de oportunidad para los científicos. (Kats y Baltz, 2016).

Actualmente en diversos países y sobre todo en comunidades, su población utiliza frecuentemente diversos tipos de remedios naturales empleando el uso de plantas, pues consideran que por ser de origen natural no representa un daño a la salud (Gray, *et al.*, 2006). Sin embargo, a medida que ha ido creciendo de forma indiscriminada el uso de plantas como medicina alternativa en la atención primaria para tratar diversas patologías, también crece el número de incidencias y casos sobre diversas reacciones adversas y casos de intoxicación (Ramawat, 2004).

4.1. Impacto del uso de las plantas medicinales en la actualidad.

En la actualidad hay un gran interés en el uso de las plantas medicinales y este uso deriva principalmente del conocimiento empírico que las personas han obtenido a través de los años. Este conocimiento ha tenido gran relevancia, pues se ha logrado tratar y curar padecimientos (Martínez Ávila y Gómez López, 2013)



Y es que, dentro de su composición las plantas contienen una gran diversidad de moléculas químicas que expresan una o diversas actividades biológicas (DeCorte, 2016). Estas moléculas también son conocidas como metabolitos secundarios y se hayan distribuidos en toda la planta como, por ejemplo: las hojas, raíces, tallos, frutos, etc. Son productos del metabolismo secundario de la especie vegetal, lugar de donde proviene su nombre. El identificar los metabolitos de una planta es de suma importancia, pues de esta forma se puede encontrar al responsable de la acción biológica. De esta manera, se puede también hacer una selección más certera de las especies a estudiar, así como asignarles un espectro más amplio de posibles aplicaciones (Davey, 2017; González, *et al.*, 2004; Ruíz y Mejía, 2020).

4.1.2 Uso de plantas medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades.

El uso de las plantas medicinales para curar y tratar diversas enfermedades, es una práctica ancestral y es también una alternativa a la medicina moderna. Desafortunadamente, aunque se conozcan de manera empírica las propiedades biológicas de una planta, normalmente no se conoce la composición exacta de sus metabolitos, lo que puede ocasionar daños a la salud, sobre todo si se le usa indiscriminadamente (Fiehn, 2002).

La OMS ha mostrado la relevancia de las plantas medicinales en el tratamiento de varias enfermedades y a nivel económico hoy en día. Demostrando que es mucho más económico utilizar una planta que un medicamento (Patti, *et al.*, 2013; Sepúlveda, *et al.*, 2003).

4.2 Ciencias que estudian a las plantas medicinales.

Son dos las ciencias que se dedican al estudio de las plantas medicinales: la fitoquímica y la farmacognosia. La fitoquímica permite identificar los componentes activos de las plantas, mientras que la farmacognosia se ocupa de estudiar los compuestos con actividad biológica provenientes de las plantas. Por otro lado, la farmacología, es una ciencia complementaria de las dos anteriores, que estudia el



efecto que los metabolitos secundarios de las plantas ocasionan en el organismo. (Kuklinski, 2000; González, *et al.*, 2004; Waizel, 2006).

Los avances científicos han crecido a pasos gigantesco en los últimos años, generando un gran impacto en la investigación. La investigación médica también se ha visto favorecida por este hecho, ya que se ha permitido el desarrollo de las ciencias "ómicas", por ejemplo, la metabolómica. Estas ciencias, en conjunto con las técnicas analíticas, permiten identificar y obtener datos más precisos de un gran número de moléculas implicadas en el funcionamiento de un organismo y complementadas con otras técnicas analíticas que permiten obtener datos de forma más precisa y veraz (Frigolet y Gutiérrez-Aguilar, 2017; Watson y Preedy, 2008).

4.2.1 Ciencias ómicas.

De manera general, a las ciencias ómicas se les conoce como: el conjunto de tecnologías que permiten el conocimiento de los sistemas biológicos complejos a nivel molecular. Este conocimiento permite obtener una perspectiva holística del individuo a través del funcionamiento de sus células y la influencia que tiene el ambiente sobre el organismo, es decir, las relaciones e interacciones entre los componentes internos y los elementos externos con los que un organismo interactúa (Rocha-Viggiano, *et al.*, 2018).

En el campo de la salud las ciencias ómicas permiten, no solo caracterizar los comportamientos de las células, tejidos y órganos a nivel molecular, profundizando en la comprensión integral tanto de las enfermedades como de los estados de salud, sino que, además, a través de estrategias basadas en su uso, ayudan en el diagnóstico temprano y no invasivo de las enfermedades, en la elección del mejor tratamiento y en el planteamiento de nuevas estrategias de intervención preventiva; En este sentido, a lo largo del tiempo se han establecido diferentes ciencias pertenecientes al tipo "ómicas", como lo son: genómica, la transcriptómica, la epigenómica, la proteómica y la metabolómica. Sin embargo, cada una de ellas ha ido creciendo a medida que se ha ido adquiriendo mayor información y datos. Pues todas estas ciencias tienen



grandes aportaciones en el conocimiento general de los temas biológicos, además que significan un gran aporte en el desarrollo y búsqueda de aplicaciones biotecnológicas en el descubrimiento de nuevos fármacos (Figura 1; Benitez, *et al.*, 2019).

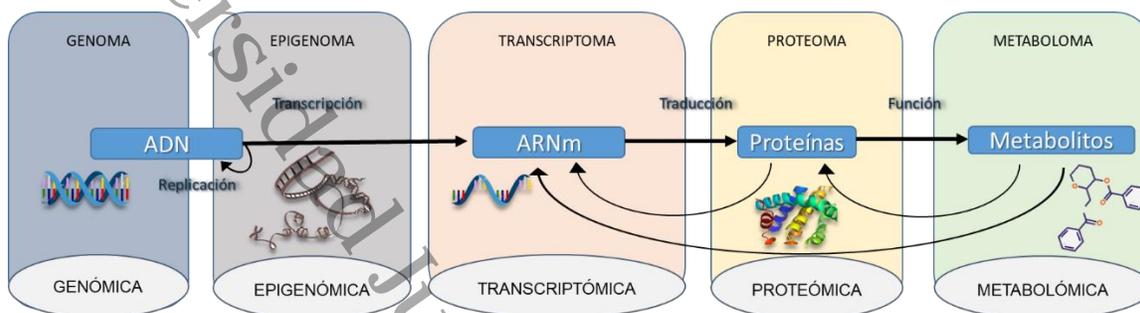


Figura 1. Ciencias ómicas y su relación entre ellas. Tomado de benítez, *et al.*, 2019.

4.2.2 Genómica.

La genómica es la ciencia que se basa en el estudio del genoma, es decir en el estudio del conjunto de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) que hay en un organismo y esta ciencia deriva del campo de la genética que intenta conocer el contenido, función y evolución molecular del ADN (López, 2012). Además esta ciencia se caracteriza por contener dos ramas que se conocen como genómica estructural que se basa principalmente en la caracterización e identificación de las diferentes secuencias que conforman a la molécula del ADN, que permiten la obtención de los diferentes mapas genéticos de los organismos y la genómica funcional, es una disciplina enfocada principalmente en la recolección sistemática de información sobre las funciones de los genes, así como de las secuencias funcionales del ADN que no codifican para proteínas con el fin de conocer mejor el funcionamiento del genoma en su conjunto a través de los diferentes patrones de expresión; se puede decir que complementa una parte entre ese conocimiento de la identificación de secuencias y de la función primordial de los genes. (Pierce, 2009).



Ambas ramas conciben ir más allá de una simple descripción de un gen, pues permiten identificar las variaciones presentes en el genoma, expresado en distintos niveles que van desde la expresión de ARNs mensajeros hasta la producción de metabolitos que componen un sistema biológico (Horton y Lucassen, 2019).

4.2.3 Epigenómica.

Es la ciencia que se basa en el estudio general de los cambios reversibles del ADN y ARN o de las proteínas que se encuentran asociadas a este y que tienen como función actuar como elementos funcionales de regulación en la expresión genética de una célula sin verse alterada su secuencia de ADN (García-Vallejo, 2011).

De igual forma esta ciencia se aplica al estudio de las complejas modificaciones que se producen en la cromatina, tanto en su modificación química como en los cambios topológicos condicionados por efectos internos y ambientales. Siendo una conexión entre el ambiente y la expresión de los diferentes genes de un organismo (Wilson, *et al.*, 2020).

4.2.4 Transcriptómica.

Se basa principalmente en el estudio del conjunto en la expresión génica de un organismo o de células específicas que se encuentran bajo circunstancias concretas, es decir es el estudio del conjunto de ARN donde abarca todas las moléculas de ARNm mensajeros y ARNs no codificantes. Y estas son muy variables debido a los diferentes genes que se expresan en un momento dado, siendo así, una ciencia que ofrece mucha información de gran interés, pero variables a través del tiempo, debido a que indica que genes se expresan en una célula, tejido u organismo en específico (Joseph, 2017; Giacomello, 2021).

A través de la transcriptómica y la secuenciación de nueva generación, hoy en día se puede alcanzar y tener un nivel de detalle sin precedentes en la comprensión de los fenotipos celulares (Chambers, *et al.*, 2019).



4.2.5 Proteómica.

La proteómica es la ciencia que estudia a gran escala todo el conjunto de proteínas, que van desde su estructura hasta su función, expresadas en una célula, tejido u órgano bajo ciertas condiciones y localización específica. Las proteínas por otra parte, son vitales para los organismos vivos, ya que son uno de los principales componentes de las diversas rutas metabólicas de las células (Aslam, *et al.*, 2017).

Las proteínas sufren cambios estructurales posteriores a su síntesis conocidos como modificaciones postraduccionales. Esto afecta tanto en la estructura como la función de una proteína. Mientras el genoma es prácticamente invariable, el proteoma no sólo se relaciona de una célula en otra célula, sino que también se modifica acorde a las interacciones bioquímicas con el genoma y el ambiente (Monti, *et al.*, 2019). Finalmente, esta es una ciencia relativamente reciente, pues para su identificación ha sido necesaria la consolidación de otras técnicas que permitan la detección de estas moléculas mediante técnicas como lo son la espectrometría de masas aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes o proteínas en las bases de datos (Kelly, 2020; Williams, *et al.*, 2020).

4.2.6 Metabolómica.

La metabolómica se define como una de las ciencias ómicas emergente en biología que tiene como principal objetivo el descifrar el perfil metabólico en sistemas complejos a través de técnicas analíticas y análisis de datos multivariados los cuales permiten un análisis de alto rendimiento de moléculas pequeñas (metabolitos) en biofluidos y tejidos que dan perfiles metabólicos como producto final, ofreciendo un enfoque holístico en la exploración de los detalles moleculares de múltiples factores en todo un organismo biológico y el conjunto de metabolitos expresados en una muestra biológica se denomina metaboloma. El desarrollo de tecnologías capaces de extraer y analizar estos datos moleculares ha revolucionado la aplicación de la metabolómica en el análisis de organismos y procesos biológicos relevantes (Zhang, *et al.*, 2012). La



comparación de estos perfiles de diferentes fenotipos se puede utilizar para identificar cambios metabólicos específicos que conducen a la comprensión de las vías bioquímicas, combinaciones complejas de biomarcadores, efectos tóxicos y progresión de la enfermedad (Park, *et al.*, 2016).

La metabolómica nos permite analizar el perfil metabólico de una muestra, de forma cuantitativa y cualitativa. Se pueden encontrar metabolitos específicos relacionados con el desarrollo de una enfermedad o con la respuesta a un tratamiento nutricional o farmacológico (Griffiths, *et al.*, 2008; Lindon, *et al.*, 2007).

4.2.7 Aplicaciones actuales de las ciencias ómicas.

Las ciencias ómicas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la medicina personalizada de precisión (MPP) que contribuye a mejorar la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento, de forma individualizada para cada paciente (Benítez, *et al.*, 2019).

A partir del conocimiento derivado de la integración de las diversas ciencias ómicas y tras la aplicación generalizada de las tecnologías especializadas, será posible explicar mejor los fenotipos tanto fisiológicos como patológicos en cada individuo. De esta manera, en el futuro será posible contar con información que refleje la complejidad biológica de los sistemas vivos, ayudando a la comprensión de los mismos y proporcionando una visión holística, así como generalizando el enfoque específico sobre cada patología que ayude a la búsqueda e identificación de nuevas moléculas para el tratamiento farmacológico (Figura 2; Benítez, *et al.*, 2019; Rocha-Viggiano, *et al.*, 2018).

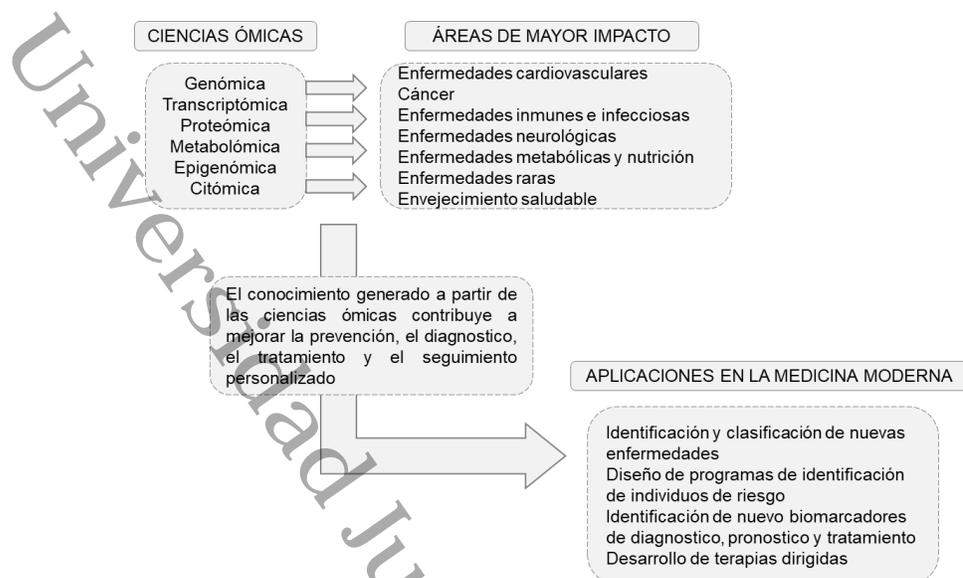


Figura 1. Principales aplicaciones de las ciencias ómicas en las áreas de mayor impacto de la medicina con relación a la MPP. Tomado de Benítez, et al., 2019.

4.2.8 Enfoques metabolómicos.

El estudio metabolómico se puede enfocar en dos líneas principales que van desde un enfoque dirigido o no dirigido. El enfoque metabolómico biodirigido, tiene como principal función detectar y cuantificar de forma precisa, un metabolito, o un conjunto de ellos, que tienen relación con una enfermedad y que han sido previamente identificados y reportados (Zubiri-Gaitán, 2018). De igual forma es un tipo de estudio empleado para verificar algún mecanismo molecular, en particular para demostrar una hipótesis de causa de una enfermedad o algún blanco molecular de un medicamento (Rocha-Viggiano, *et al.*, 2018).

Por otra parte, en el enfoque no dirigido se enfoca en identificar las señales de todos los metabolitos presentes en el metaboloma de manera general y se obtiene un perfil que logre caracterizar el tipo de muestra analizado, permitiendo la cuantificación, aunque de manera menos precisa y útil en la comparación entre individuos o grupos (Zubiri-Gaitán, 2018). Hoy en día, este tipo de estudio, se ha enfocado sobre todo en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico temprano de enfermedades, a partir



del perfil de metabolitos que caracterizan una enfermedad en comparación con los individuos sanos. (Figura 3; Rocha-Viggiano, *et al.*, 2018).

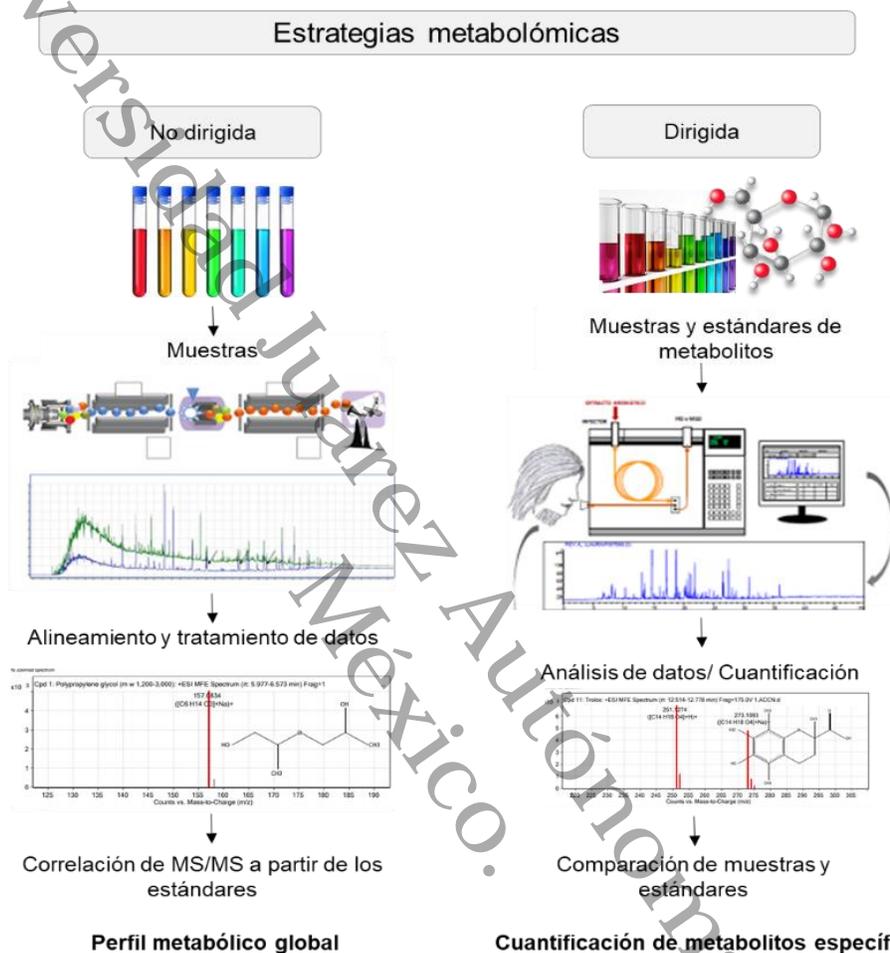


Figura 2. Esquema simplificado de un análisis metabolómico dirigido y no dirigido.

Tomado de Canuto *et al.*, 2018.

4.3 Técnicas analíticas empleadas en los estudios metabolómicos.

Uno de los grandes desafíos de estos análisis se debe a la gran diversidad química que presentan los metabolitos que componen el metaboloma. Por este motivo, esta disciplina necesita el uso de varias técnicas (Figura 4; Krastanov, 2010). En los últimos años, se han implementado varias técnicas analíticas instrumentales, que, mediante el desarrollo de métodos innovadores, permiten obtener el metaboloma general de una



muestra y dentro de dichas técnicas destacan: Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Cromatografía Líquida acoplado a Espectrometría de Masas y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (Fuhrer y Zamboni, 2015; Putri, *et al.*, 2013).

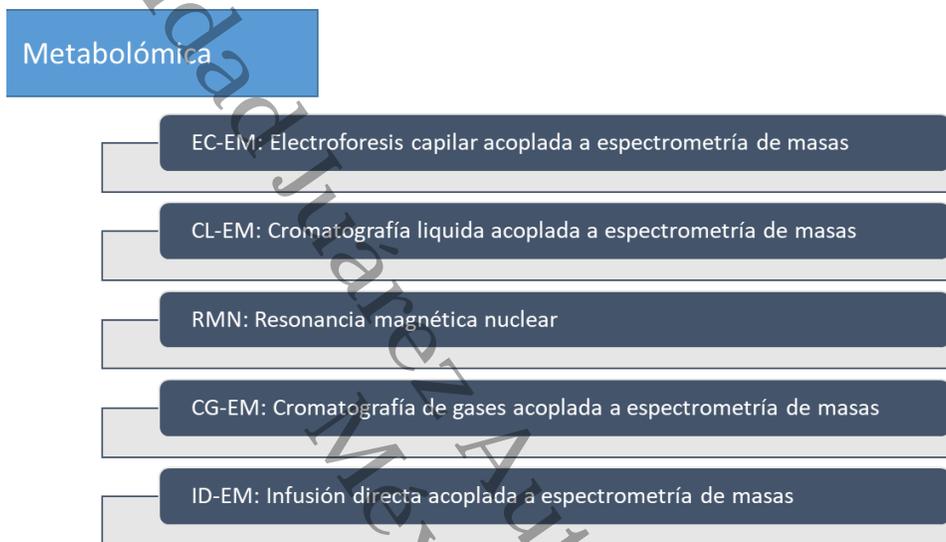


Figura 3. Técnicas analíticas para abordar la metabolómica en dependencia de la clase de compuestos a estudiar. Tomado de Benítez, *et al.*, 2019.

Entre las técnicas analíticas más utilizadas en los estudios de metabolómica se consideran las técnicas de separación y de detección. Las técnicas más utilizadas son LC/MS Y GC/MS (Naz, *et al.*, 2014). Tras la separación y el análisis por el espectrómetro de masas, cada metabolito tendrá una relación m/z y un tiempo de retención característico, que se corresponde al tiempo transcurrido desde que la inyección de la muestra en el sistema de separación hasta que es detectado en el espectrómetro. Esta información adicional es de gran utilidad para ayudar a la identificación de los metabolitos (Gil de la Fuente, *et al.*, 2018).



4.3.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

La cromatografía líquida es una técnica de gran versatilidad que permite detectar una gran cantidad de metabolitos, de amplio rango de peso molecular. La fase móvil utilizada en esta técnica es un líquido y la fase estacionaria es un sólido poroso conocido como columna cromatográfica (Gariglia, *et al.*, 2010). Este tipo de tecnología, que permite aumentar la eficacia de la técnica. Tiene la particularidad de que las partículas que recubren el interior de la columna cromatografía tienen un tamaño muy pequeño, de 3-10 μm aproximadamente (Romero, *et al.*, 2007). Este tamaño de partículas requiere altas presiones del sistema para una separación óptima. Se diferencian dos tipos de cromatografía líquida según las fases utilizadas: fase normal y fase reversa (Pang, *et al.*, 2016; Sana, *et al.*, 2008).

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la detección de iones que se separan en función de su relación masa/carga (m/z), al aplicar un campo electromagnético (Artati, *et al.*, 2012). Los elementos que conforman un espectrómetro de masas son: un inyector de muestra, una fuente de ionización, un analizador de masas, un detector y un sistema de análisis de datos (Figura 5). El análisis comienza con la inyección de la muestra en el equipo. Esta muestra pasa por la fuente de ionización que generará los iones que serán luego separados en el analizador, en función de su relación m/z . La fuente de ionización les da carga a las moléculas y las fragmenta, siguiendo un patrón de ionización característico para cada metabolito, que se utiliza posteriormente en la identificación (Dunn, *et al.*, 2013).

Por último, el detector es el mecanismo que capta las moléculas cargadas y devuelve los resultados en un espectrograma de masas. En estos espectros el eje "x" representa la relación m/z y el eje "y" la abundancia relativa de los metabolitos detectados (Martín-Gómez y Ballesteros-González, 2010). La identificación de los compuestos se logra mediante la asociación de las masas obtenidas con masas conocidas e identificadas y mediante el patrón de ionización característico (Dunn, *et al.*, 2013).

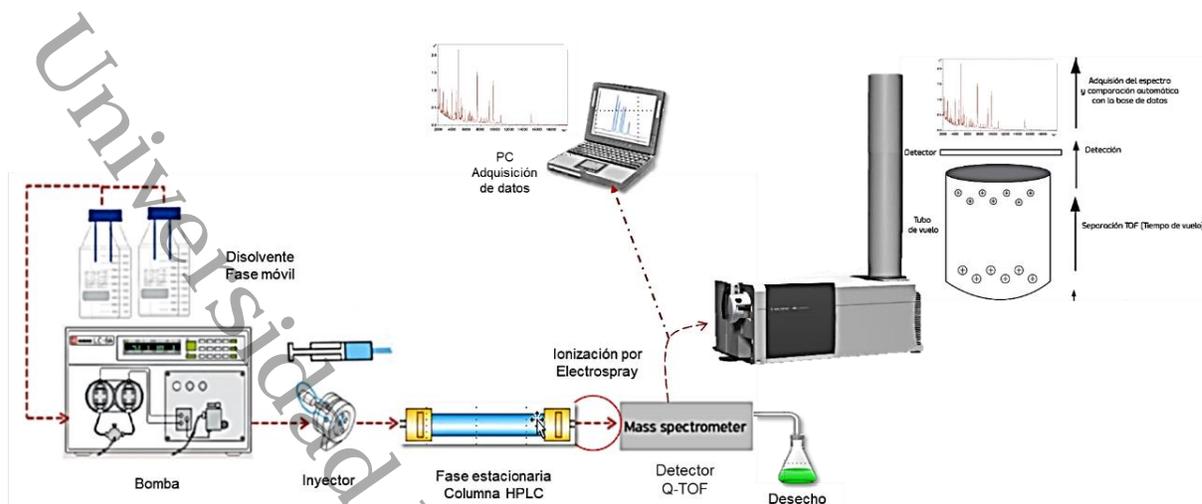


Figura 4. Esquema general del análisis metabolómico mediante la técnica de LC/MS. Tomado Zubiri-Gaitán, 2018.

4.3.2 Aplicaciones de LC/MS.

Las principales aplicaciones de la LC/MS, se encuentran en los campos de la investigación farmacéutica y la biología molecular. La primera se centra en el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios con actividad biológica, en tanto que la segunda se basa en estudios de estructura de las proteínas. Por otro lado, debido a que en los alimentos se pueden encontrar un gran número de sustancias tóxicas tales como plaguicidas, medicamentos veterinarios y acrilamidas a muy bajas concentraciones, es importante su análisis medioambiental. La situación es similar en la medicina forense, pues se pueden encontrar residuos orgánicos y nitrocelulosa en la escena del crimen (Mayolo-Deloysa, *et al.*, 2012).

Mediante la metabolómica se logra analizar diversos biomarcadores potenciales de forma simultánea. Debido a la complejidad de las muestras, el investigador necesita una extraordinaria resolución, precisión y sensibilidad de masa, así como un sofisticado software de análisis de datos que complementa al equipo. Por su gran sensibilidad y rendimiento óptimo en el rango m/z , el LC/MS Q-TOF aunado a un software adecuado, es el equipo perfecto para llevar a cabo un análisis metabolómico (Martín-Gómez y Ballesteros-González, 2010).



4.3.3 Introducción a la instrumentación de LC/MS aplicada en análisis metabolómico de plantas.

En la literatura, ha sido demostrado de manera amplia, el gran impacto que ha tenido el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC/MS), en la determinación de los diversos perfiles metabólicos de las plantas. Demostrando así, que es una herramienta que permite tener una eficacia en la investigación biomédica, especialmente en el caso del análisis de muestras biológicas naturales complejas provenientes de plantas que carecen de estudios científicos que avalen su alto potencial, tanto benéfico como tóxico en el ser humano (Gariglia, *et al.*, 2010).

Estudios reportados señalan que mediante el uso de LC/MS se determinaron diversos metabolitos secundarios presentes en las especies vegetales: *Eugenia stipitata*, *Sageretia elegans*, *Byrsonima arthropoda*, *Spondias mombiny* y *Rubus rosaefolius*; Se identificaron un total de 18 compuestos en el extracto de *Eugenia stipitata*, en comparación con 31 compuestos en *Sageretia elegans*, 22 en *Byrsonima arthropoda*, 19 en *Rubus rosaefolius* y 6 en *Spondias mombiny*. Dentro de este grupo, se encontraron metabolitos identificados como ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, antocianinas y elagitaninos, varios de los cuales fueron identificados por primera vez en estas especies y se demostró que estas especies poseen una actividad antiinflamatoria (Soares, *et al.*, 2019).

Existen, además, estudios de LC/MS de *Bacopa monieri*, una planta medicinal utilizada ampliamente como potenciador de la memoria. La caracterización de los constituyentes químicos de la planta, mostró como componentes principales las saponinas jujubogenina y pseudojujubogenina, como sus glucósidos. También se pudieron identificar: el tipo de azúcar contenida en la aglicona, flavonóides y alcalóides (Nuengchamnong, *et al.*, 2016).

Por otra parte, se reportó de que en el género *Rumex*, una especie vegetal utilizada como alimento o para el tratamiento de diferentes enfermedades (estreñimiento, diarrea, hinchazón, trastornos renales), se identificaron y caracterizaron 60 nuevos



compuestos utilizando LC/MS en modo negativo. Los compuestos encontrados poseían fuerte actividad antioxidante y fueron clasificados en 12 familias, por ejemplo: flavonoles, flavanoles, flavonas, ácidos hidroxibenzóicos y taninos condensados. El 3-O-glucurónido de quercetina y el galato de (-)-epicatequina fueron los compuestos fenólicos más abundantes en hojas y tallos respectivamente (Abidi, *et al.*, 2019).

4.4 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS).

La técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica altamente sensible y reproducible, por lo que se ha utilizado con éxito en la identificación y cuantificación de los componentes de aceites esenciales de las plantas medicinales (Abolghasemi y Piryaei, 2020). Se considera así, una de las principales plataformas analíticas utilizadas en el campo de la metabolómica. Con la llegada de las columnas capilares y la computación mejorada que permite velocidades de adquisición de datos más rápidas, la GC/MS se ha convertido en una tecnología robusta para la separación y cuantificación eficiente de unos pocos cientos de metabolitos de un solo extracto de muestra (De Souza, 2013).

En general, las muestras a analizar por esta técnica se volatilizan antes de su separación mediante el uso de una columna llamada capilar y con ayuda de una fase estacionaria apta para el análisis de los compuestos de interés a analizar (De Souza, 2013). Los compuestos separados se eluden mediante un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización por impacto de electrones, provocando así una marca espectral de masas cuantificable (Abolghasemi y Piryaei, 2020).

4.4.1 Características de GC/MS.

La cromatografía de gases se realiza hoy en día, en gran parte con columnas capilares, es una técnica que depende de la velocidad de movimiento de un compuesto (en fase gaseosa) a través de la columna, impulsado por la fase móvil (gas portador). Esta técnica se realiza a altas temperaturas, por lo que los compuestos a analizar deben cumplir dos requisitos previos que son: la volatilidad y la estabilidad térmica. Una vez



que salen de la columna, los compuestos pasan al equipo de masas, sitio donde son convertidos en iones y separados por campos eléctricos o magnéticos, antes de pasar al detector (Wheeler, *et al.*, 2006). Debido a que la técnica involucra electrones e iones, que reaccionarían o serían dispersados por el aire, un MS opera bajo vacío. La fuente de iones se calienta para garantizar que las moléculas estén en fase gaseosa. Las moléculas se fragmentarán en la MS según el proceso de ionización y la fuerza de los enlaces químicos dentro de la molécula. El patrón de fragmentación de los iones generados, es básicamente la huella digital de una molécula. En un espectro de Masas los fragmentos se separan de acuerdo a su relación masa/carga (m/z), por lo que se puede observar el porcentaje y la masa de cada uno. Los datos obtenidos de la fragmentación de cada compuesto, se pueden comparar con los de una biblioteca de espectros de compuestos conocidos, lo que puede permitir su identificación (Abolghasemi y Piryaei, 2020). El espectro representa el número de fragmentos. Los movimientos que llegan al detector y los tamaños de los fragmentos se registran como una relación masa a carga (m/z). El espectro se puede comparar con los de una biblioteca de espectros de compuestos conocidos. Además, el espectro puede derivar una fórmula empírica y de la naturaleza de la fragmentación, se puede ensamblar la estructura completa a partir de las subestructuras moleculares, similar a un rompecabezas. Para el análisis cuantitativo, las intensidades de las señales asociadas con las moléculas y fragmentos ionizados pueden correlacionarse con la cantidad del analito. Dependiendo de la resolución de la MS, el ion se puede determinar como un número entero con una resolución de MS baja o como una masa exacta con varios decimales con una resolución de MS alta (Papadimitropoulos, *et al.*, 2018).

4.4.2 Componentes principales de la técnica de GC/MS.

Un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas tiene 7 componentes primordiales, que se describirán a continuación: 1) un inyector para introducir la muestra al equipo de cromatografía, 2) una columna con gas acarreador para separar los compuestos, en caso de que provengan de una mezcla. 3) Un controlador de flujo de la muestra gaseosa del cromatógrafo de gases hacia el equipo



de masas, 4) un analizador de masas para permitir la separación de los iones, 5) un detector para registrar la abundancia de los iones presentes en la muestra, 6) un amplificador para intensificar la señal a límites medibles y 7) una computadora con el software adecuado para el análisis de los datos (Figura 6; Abolghasemi y Piryaei., 2020; Wheeler, *et al.*, 2006).

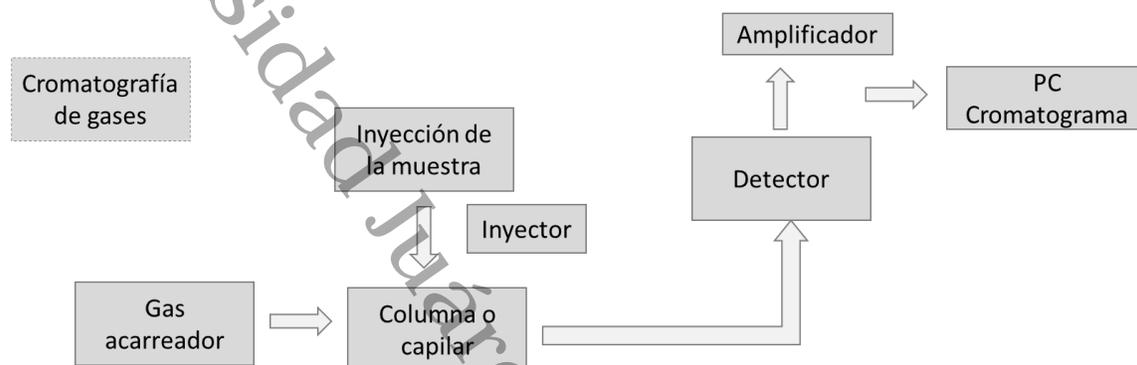


Figura 5. Componentes generales de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tomado de Wheeler, *et al.*, 2006.

4.4.3 Introducción a la instrumentación de GC/MS aplicada al análisis metabolómico de plantas.

En los últimos años, se han logrado avances considerables en el desarrollo de tecnologías analíticas, para medir e interpretar perfiles de metabolitos complejos. Sin embargo, dado el amplio rango dinámico y químico de los metabolitos de bajo peso molecular en mezclas biológicas, no es posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola plataforma analítica (Want y Masson, 2011; Abolghasemi y Piryaei, 2020).

Desde su introducción en las ciencias ómicas, la metabolómica ha mostrado una gran eficacia en el análisis de los componentes de las plantas. Debido a esto, el interés por técnicas analíticas que complementen la identificación de los compuestos de una muestra se ha incrementado. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), es una técnica altamente sensible aplicable al análisis de



compuestos orgánicos volátiles (COV), así como a compuestos semipolares presentes en las plantas como metabolitos secundarios (p.ej. los aceites esenciales), por lo que es ampliamente utilizada en metabolómica. Sin embargo, la técnica se ve limitada por el tiempo excesivamente largo que se necesita para preparar una muestra (Allwood y Goodacre, 2010).

4.5 Generalidades de *Eryngium foetidum*.

Eryngium foetidum es una hierba tropical, bienal y de olor penetrante que crece mejor en condiciones húmedas en bancos abiertos o en pastizales (Paul, *et al.*, 2011). Las hojas oblanceoladas tienen márgenes dentados, una espina amarillenta, tienen una longitud de 8 a 20 cm y crecen en un patrón de roseta basal. Las inflorescencias blanquecinas nacen en brotes largos (30–50 cm) como un césped apical conspicuo. La fruta es globosa a ovoide y está cubierta con protuberancias redondeadas de 1–2 mm de largo (Figura 7). A pesar del uso generalizado de esta hierba como alimento y como agente etnomedicinal, solo recientemente ha habido una proliferación de investigaciones fitoquímicas en la planta (Paul, *et al.*, 2011).



Figura 6. Planta de *Eryngium foetidum* tomado de López-Rivera, 2020.

4.5.1 Usos tradicionales de *Eryngium foetidum*.

Esta planta se ha utilizado de forma tradicional con fines medicinales, para el tratamiento de diversos padecimientos. Cada parte de la planta se usa para un padecimiento diferente, por ejemplo: quemaduras, otitis, fiebre, hipertensión,



estreñimiento, asma, dolor de estómago, infertilidad, mordeduras de serpiente, diarrea, malaria y antihelmíntico. Los antiguos mexicanos la usaron principalmente para calmar los dolores, p.ej.; el dolor de estómago. (Paul, *et al*, 2011).

4.5.2 Antecedentes de la selección e identificación de la especie vegetal.

Previamente, en el grupo de investigación del laboratorio de Química orgánica y Química farmacéutica y Productos Naturales del Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAT) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se obtuvo el extracto hexánico de las partes aéreas de la planta *Eryngium foetidum*, para ello se seleccionaron ejemplares en condiciones óptimas; recolectando así ejemplares de hojas, tallos, raíces, flores, fruto u otras estructuras reproductivas desarrolladas de la especie vegetal (Ocampo-Medina, 2019 y López-Rivera, 2020).

La colecta se realizó por triplicado, incluyendo su inflorescencia para su posterior disección. De acuerdo al orden de colecta, se le asignó un número de identificación con número de voucher 35776 en la colección de plantas vasculares del herbario de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. La especie vegetal fue recolectada en la localidad de La Ranchería La Piedra primera sección Cunduacán, Tabasco (18°05'10.5" N, 93°15'29.6" W; Ocampo-Medina, 2019 y López-Rivera, 2020).

Se llevó a cabo la limpieza de las especies vegetales para la eliminación de contaminantes externos como el polvo y otras partículas ajenas a la planta; la separación, a partir de los tallos hojas e inflorescencia; la desecación a temperatura ambiente durante 3 semanas a la sombra y la fragmentación en una licuadora marca American® de dos velocidades, para posteriormente ponerlas en contacto con disolventes (Vazquez-Cancino, 2020).

Concluida la molienda, se pesó el material vegetal por separado en una balanza analítica de marca Ohaus®, y se realizó la maceración con hexano (C₆H₁₄) durante 72 h. Posteriormente, se filtró cada macerado y concentró en el rotavapor marca



Yamato®, modelo BM400, a 40° C a 180 revoluciones por minuto (r.p.m.). Esto se realizó de manera consecutiva por triplicado con el mismo disolvente, para obtener el extracto final (Vazquez-Cancino, 2020).

4.5.3 Antecedentes fitoquímicos de *Eryngium Foetidum*.

Las hojas de *Eryngium foetidum* contienen un 90 % de agua, pero tienen alta concentración de caroteno, calcio, hierro, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina C, vitamina A y proteínas. El aceite esencial de la hoja es rico en aldehídos alifáticos, la mayor parte son α , β -insaturados. El compuesto principal es *E*-2-dodecenal (60 %), además 2,3,6-trimetilbenzaldehído (10 %), dodecanal (7 %) y *E*-2-tridecenal (5 %) han sido identificados (Jaramillo, *et al.*, 2011; Rodríguez y Castro, 2014). Se ha descrito que el aceite esencial de las hojas frescas de *Eryngium foetidum*, obtenido mediante destilación por arrastre de vapor de agua, contiene: 1-metiletilbenceno, 1-metil-2-(1-metiletil)benceno, 2,4,6-trimetilfenol, dodecanal, 2-dodecanal, 2,4,5-trimetilbenzaldehído, ácido 2,4,5-trimetilbenzónico, octadecano y los ácidos mirístico y linoléico. Pruebas biológicas *in vitro*, mostraron que el aceite posee propiedades antibacterianas. (Kinghorn, *et al.*, 2011; Rodríguez y Castro, 2014).

4.5.4 Antecedentes biológicos de *Eryngium foetidum*.

Estudios etnofarmacológicos afirman que la planta es utilizada emenagogo, aperitivo, antiescorbútico, antirreumático, antiséptico, antiemético, carminativo, para el dolor de cabeza, gripe, hemorragias, dolor de estómago, convulsiones, diarrea, tos y espasmos. Las hojas de *Eryngium foetidum* han sido utilizadas para el tratamiento de la diabetes, hipertensión arterial, convulsiones, gripe, asma, infecciones vaginales, diarrea y malaria, las raíces son utilizadas en las infecciones por parásitos, en cuanto a su semilla es considerado afrodisíaco y emenagogo (Paul, *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que la planta entera puede causar infertilidad en mujeres, sin embargo, ayuda a controlar los cólicos menstruales, auxilia en caso de mordedura de



serpiente, es utilizada como antiparasitario, para inducir aborto y antiinflamatorio (Dawila, *et al.*, 2013). Los extractos metanólicos y de acetato de etilo de *Eryngium foetidum* son considerados poseen actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Kouitcheu, *et al.*, 2016; López-Rivera, 2019; Rodríguez y Castro, 2014).

El uso empírico (autoprescripción, falta de conocimiento de la planta) e indiscriminado (abuso de la dosis) de *Eryngium foetidum*, han conducido algunas veces a la intoxicación de las personas que lo toman. (García de Alba, *et al.*, 2012 y Sánchez-Flores, 2013).

En estudios previos realizados en el laboratorio de Química orgánica y Química farmacéutica y Productos Naturales del Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAT), se determinó la concentración letal media (CL₅₀) del extracto hexánico de *Eryngium foetidum* evaluado mediante el modelo del pez cebra (*Danio rerio*). Durante la estandarización del modelo, se pudieron observar los diferentes estadios de las fases embrionarias del pez, se adquirió la capacidad para descartar embriones por coagulación y se pudieron observar especímenes de larva post-eclosión, después de un periodo superior a 72 hpf. Como resultado, cuando se probó el EHEf, se encontró que éste produjo diversos daños teratogénicos durante el desarrollo del embrión, como malformación de la cabeza, del saco vitelino y de la región caudal (Figura 8).

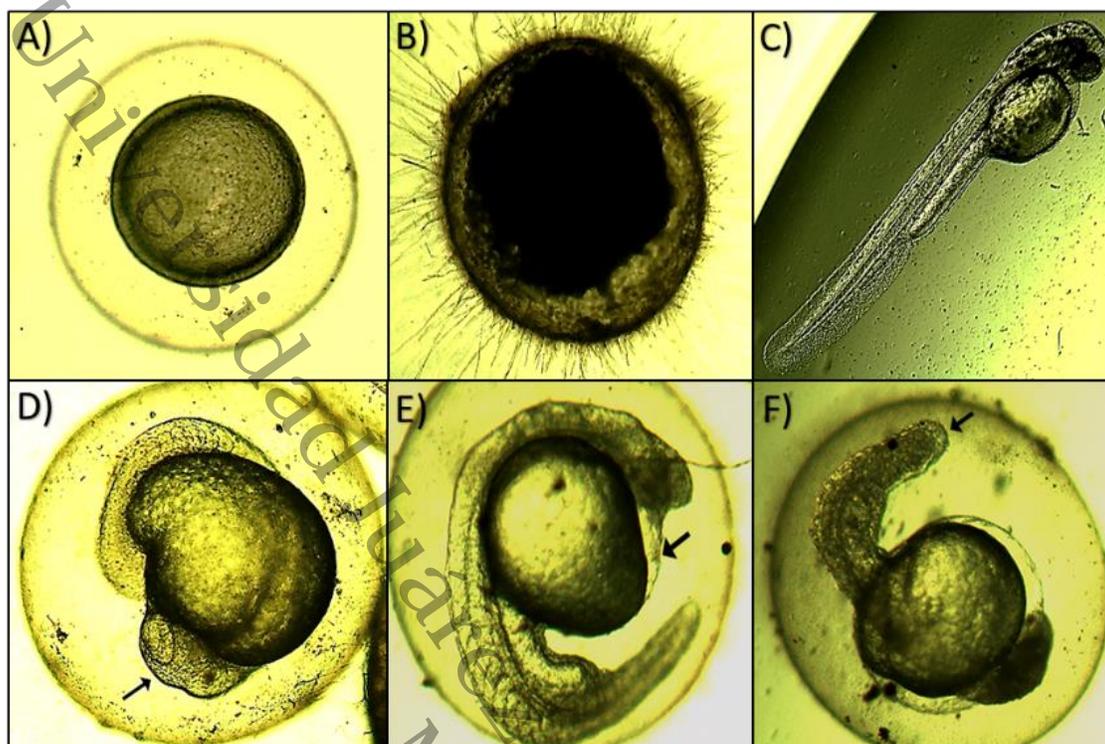


Figura 7. Microfotografía sobre el desarrollo embrionario del EHEf probados a la máxima concentración: A) embrión de 2 hpf en vehículo control negativo, B) embrión coagulado, C) pos-larva sin malformación de 72 hpf en control negativo, D) malformación de cabeza a las 72 hpf, E) malformación de edema en saco vitelino a las 72 hpf, F) malformación de región caudal a las 72 hpf.

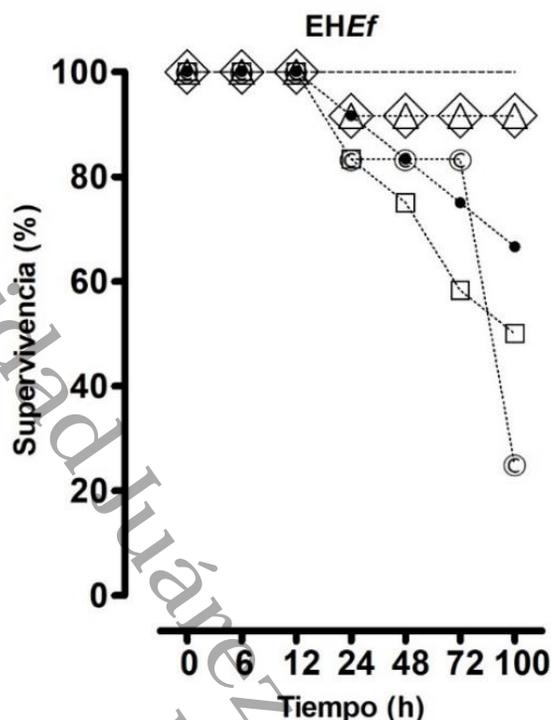
El porcentaje de supervivencia de los embriones respecto del EHEf de la especie vegetal, se determinó gráficamente, encontrándose que la supervivencia era dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al EHEf. Las concentraciones evaluadas fueron de: 0.0033, 0.033, 0.33, 0.3 y 33 $\mu\text{g/mL}$.



Tabla 1. % de supervivencia del extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* (EHEf).

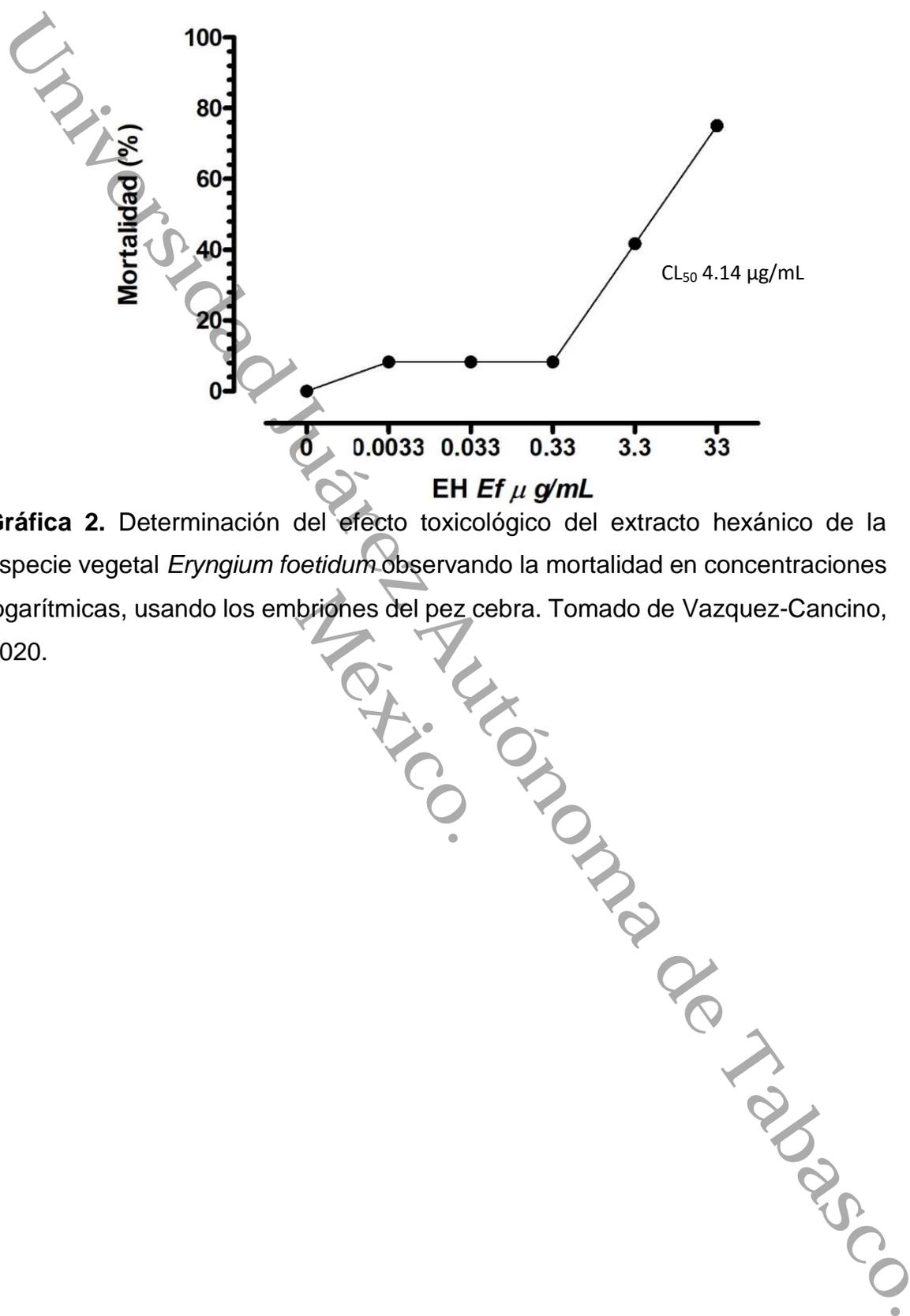
% Supervivencia						
Especie vegetal	Tiempo h	Concentración µg/mL				
		0.0033	0.033	0.33	3.3	33
<i>Eryngium foetidum</i>	6	100	100	100	100	100
	12	100	100	100	100	100
	24	91.666	91.666	91.666	83.333	83.333
	48	91.666	91.666	83.333	75	83.333
	72	91.666	91.666	75	58.333	83.333
	100	91.666	91.666	66.666	50	25

En la gráfica 1 se representa el comportamiento obtenido sobre el % de supervivencia de los organismos vivos en relación al tiempo en horas, utilizando el extracto hexánico de *Eryngium foetidum* los cuales fueron evaluados de mayor a menor concentración como se observa en la tabla 1, y se reporta que este porcentaje aumento o disminuyo a través del tiempo; en el cual se comportaron de una manera similar al control negativo utilizado, es decir, a concentraciones bajas la supervivencia de los embriones fueron más altas y a concentraciones más altas la supervivencia del total de embriones evaluados en cada pozo fue menor.



Gráfica 1. Gráfica de supervivencia de los embriones evaluados en el modelo del pez cebra expuestos al extracto hexánico de *Eryngium foetidum* (EHEf). Control negativo con agua de garrafón (---◇---), Concentración 0.0033 µg/mL (-◇-), concentración 0.033 µg/mL (-Δ-), concentración 0.33 µg/mL (●●●●), concentración 3.3 µg/mL (-□-), concentración 33 µg/mL (-○-).

En la Gráfica 2, se puede observar el porcentaje de mortalidad de los embriones del pez cebra a diferentes concentraciones del EHEf. Mediante un análisis Probit, se encontró una CI50 de 4.14 mg/mL para el EHEf, demostrándose así la toxicidad del extracto. El límite de confianza de la prueba fue del 95%, con una R² de 0.9895. (Gráfica 2; Vazquez-Cancino, 2020).



Gráfica 2. Determinación del efecto toxicológico del extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* observando la mortalidad en concentraciones logarítmicas, usando los embriones del pez cebra. Tomado de Vazquez-Cancino, 2020.



JUSTIFICACIÓN



5. JUSTIFICACIÓN

México es uno de los países con mayor uso tradicional y con una biodiversidad de especies vegetales que se emplean en remedios naturales en el uso de la medicina herbolaria. En la actualidad, se sabe que el 80 % de la población utiliza las plantas para su atención primaria en general, la gente que utiliza las plantas cree que, por ser de origen natural, y no un compuesto sintetizado en un laboratorio, son amigables con el organismo, sin embargo, algunos de estos compuestos son altamente tóxicos, por lo que es de vital importancia determinar la toxicidad de los extractos de plantas usadas en la medicina tradicional para validar su uso seguro (Cambridge, 2019).

Debido a los pocos estudios reportados sobre los efectos tóxicos de ciertas plantas, y el gran uso que se les da, es por ello que la presente investigación busca determinar el perfil metabolómico a partir de la anotación de iones del extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* utilizada en la medicina tradicional del Estado de Tabasco, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, estableciendo así las condiciones de análisis más aptas para llevar a cabo la determinación del perfil metabólico, así como identificar moléculas y compuestos con un potencial terapéutico y tóxico presentes en la planta (Saftić, *et al.*, 2019).

Y este estudio fitoquímico tiene además como fin encontrar moléculas que no se habían reportado en esta especie vegetal que además hablando de la parte farmacológica pueden ser utilizadas como bases estructurales y e investigadas de manera individual para la búsqueda de nuevos fármacos para ciertas actividades.



HIPÓTESIS



6. HIPÓTESIS

La determinación del perfil metabólico del extracto hexánico de *Eryngium foetidum* utilizando LC/MS y GC/MS, permitirá identificar la presencia de metabolitos secundarios y otros compuestos posiblemente responsables de las propiedades farmacológicas o tóxicas atribuidas a la planta.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

**OBJETIVO
GENERAL**



7. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil metabolómico del extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum*, mediante el uso de las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (LC/MS), cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS) y la anotación de iones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



8. OBJETIVO ESPECÍFICOS

8.1 Seleccionar un método de separación cromatográfica mediante LC/MS y GC/MS que permita observar el contenido metabólico del extracto hexánico *Eryngium foetidum*.

8.2 Determinar el perfil metabólico del extracto hexánico *Eryngium foetidum* con enfoque no dirigido.

8.3 Estandarizar los pulsos de voltaje para fragmentar con un enfoque dirigido cada metabolito del extracto hexánico *Eryngium foetidum*.

8.4 Realizar la anotación de iones para corroborar el contenido metabólico del extracto hexánico *Eryngium foetidum*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

METODOLOGÍA



9. METODOLOGÍA

Se muestra un diagrama general sobre la metodología empleada para llevar a cabo la determinación del perfil metabólico mediante LC/MS Y GC/MS (Figura 9 y 10).

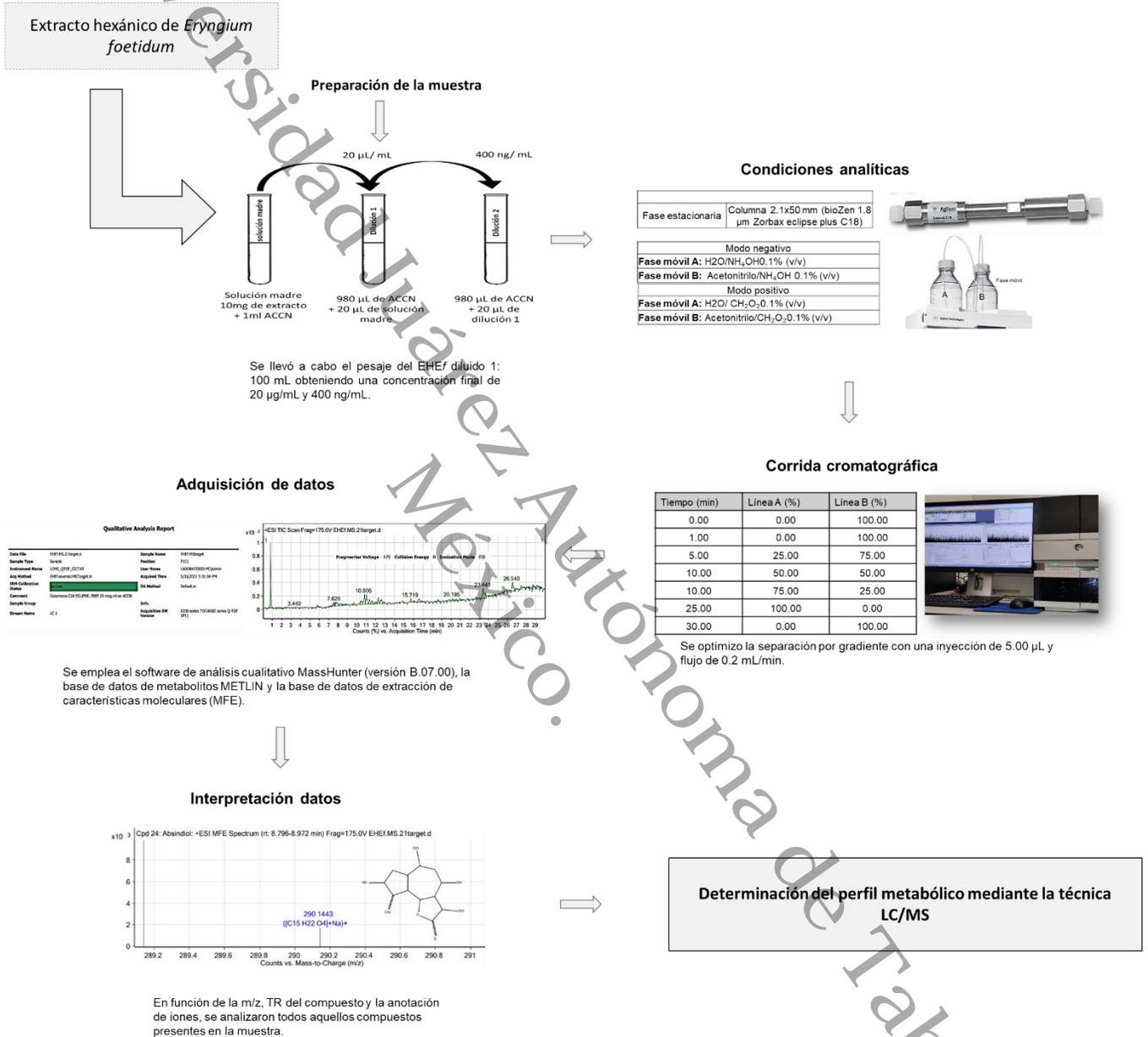


Figura 8. Esquema general de la metodología por LC/MS.

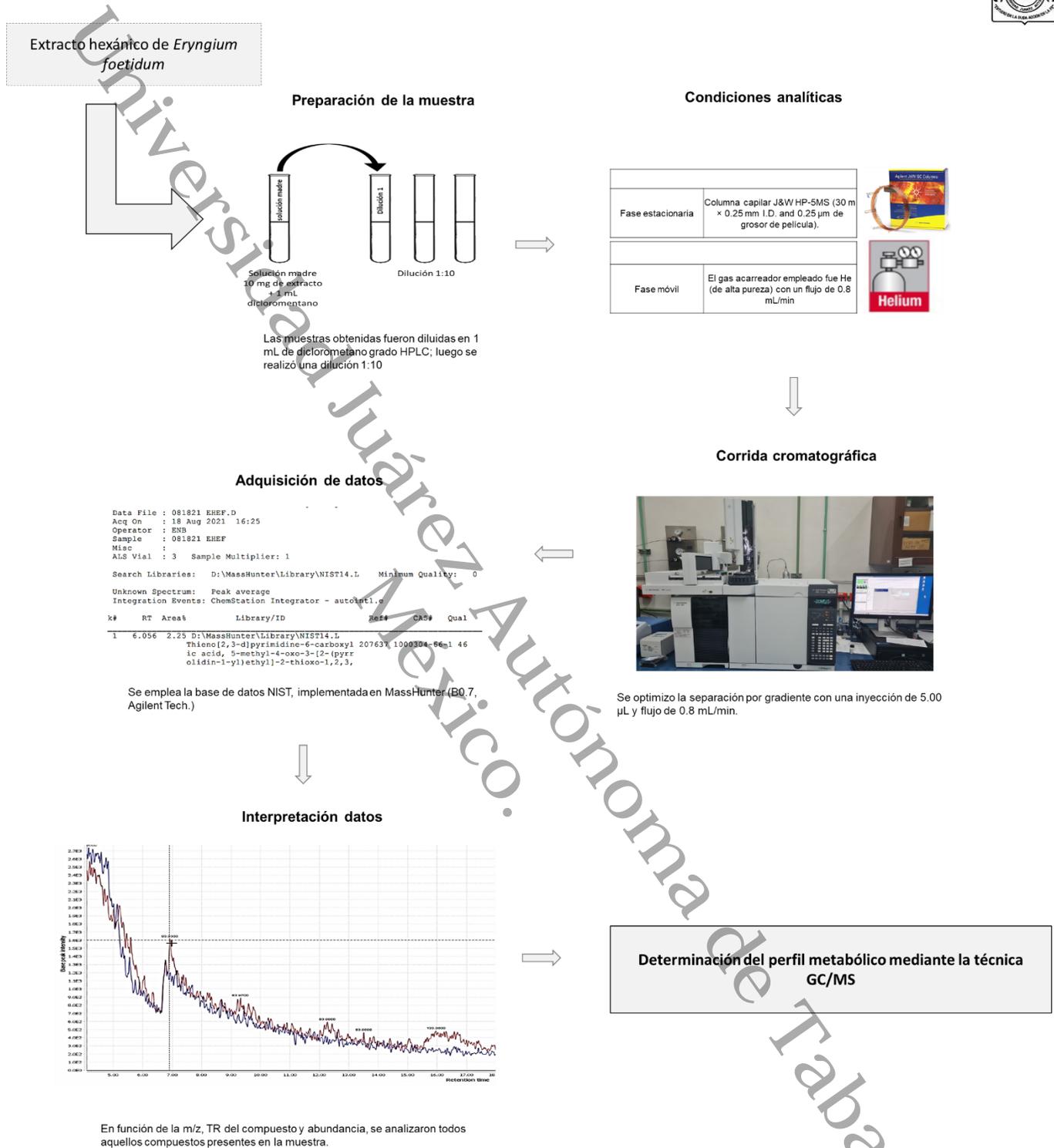


Figura 9. Esquema general de la metodología por GC/MS.



9.1 Determinación del perfil metabólico mediante la técnica LC/MS.

9.1.1 Preparación de la muestra mediante LC/MS.

Preparación de la muestra: 1 mg del EHEf fue colocado en 1 mL de acetonitrilo (ACN), y se agitó en vortex (DLAB, modelo MX-S, 0-2500 rpm, movimiento orbital de 4 mm, 110 V) durante 5 min. Se tomó 1 mL de la muestra, se filtró (acrodic syringe filter de 0.45µm) y se diluyó con ACN.

Los eluyentes utilizados para realizar el análisis del perfil cromatográfico fueron: acetonitrilo, agua y metanol, en conjunto con ácido acético o hidróxido de amonio (modo positivo y modo negativo, respectivamente).

9.1.2 Condiciones del análisis cromatográfico de LC/MS.

Para realizar el estudio metabólico se utilizó el sistema de cromatografía líquida de la serie Agilent 6545 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) Estados Unidos. Utilizando un sistema LC (1290 Infinity II, Agilent Technologies), equipado con una bomba cuaternaria y acoplado a un espectrómetro de masas de por ionización de electrospray (ESI) con detector de cuádrupolo de tiempo de vuelo (QTOF) en modo de ionización positiva y negativa), ubicado en el Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAT), de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en el municipio de Cunduacán.

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando como fase estacionaria una columna de 2.1 x 50 mm (bioZen 1.8 mm Zorbax eclipse plus C18) y las fases móviles A (H₂O/Ac. fórmico al 0.1% v/v) y B (acetonitrilo/Ac. fórmico al 0.1 % v/v) en el modo positivo. Las fases móviles para el modo negativo fueron A (H₂O/hidróxido de amonio al 0.1 % v/v) y B (acetonitrilo/hidróxido de amonio al 0.1 % v/v). Ambas fases se utilizaron en los modos masas y target.

La estandarización de la separación de la mezcla se realizó utilizando un método isocrático, a partir del cual se hizo un gradiente mediante inyección de 5 mL de muestra



y flujo de solvente de 0.2 mL/min. El gradiente se realizó de la siguiente manera: 0-1 min fase móvil A 0 %; 1-5 min fase móvil A 0–25 %; 5–10 min fase móvil A 25–50 %; 10–20 min fase móvil A 50–75 %; 20–25 min fase móvil A 75–100 %; 25-30 min fase móvil A 0 %; Para la fase móvil de la línea B el gradiente se realizó así: : 0-1 min fase móvil B 100 %; 1-5 min fase móvil B 100 %; 5–10 min fase móvil B 75–50 %; 10–20 min fase móvil B 50–25 %; 20–25 min fase móvil A 25–0 %; 25-30 min fase móvil A 100 %. Ambos métodos de gradiente analizados con un flujo de 0.2 mL/min.

9.1.3 Análisis y adquisición de datos de LC/MS.

El ACN se utilizó para lavar la fase estacionaria, como blanco y para la identificación de los compuestos ajenos a la muestra de interés, mediante una solución calibrante.

Los datos cromatográficos se procesaron utilizando el software MassHunter (versión B.07.00). Los compuestos se extrajeron de los datos utilizando el algoritmo de extracción de características moleculares (MFE) y la identificación de los compuestos se realizó utilizando la base de datos de metabolitos METLIN (www.metlin.scripps.edu) y el software de generación de fórmulas moleculares y programando el equipo a un voltaje de 20ev (Agilent Technologies; Rodríguez-Morales *et al.*, 2021).

La muestra se analizó mediante METLIN, una herramienta que identifica los compuestos por su relación m/z . La anotación de los iones, un procedimiento que permite identificar los iones provenientes de cada molécula, se realizó para cada compuesto de la muestra. Normalmente, en un espectro de masas un metabolito suele estar representado por varios picos con valores de m/z diferentes, aunque con tiempos de retención parecidos. La identificación de estos picos permite la identificación del metabolito (Rodríguez-Morales, *et al.*, 2021).



9.2 Determinación del perfil metabolómico mediante la técnica GC/MS.

9.2.1 Preparación de la muestra en GC/MS.

1 mg de la muestra del EHEf se disolvió en 1 mL de diclorometano y se agitó a X rpm durante 5 min en un vortex (Vortex DLAB MX-S, velocidad variable 0-2500 rpm, movimiento orbital 4 MM, 110/120v).

Los reactivos químicos utilizados para el análisis del perfil cromatográfico del extracto hexánico de la especie vegetal de *Eryngium foetidum* fueron: diclorometano, helio (He; Boldizsár, *et al.*, 2010).

9.2.2 Condiciones del análisis cromatográfico de GC/MS.

Las muestras obtenidas fueron diluidas en 1 mL de diclorometano grado HPLC; luego se realizó una dilución 1:10 de esta solución y se inyectó el sistema cromatográfico.

Para el análisis de muestras se utilizó un sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas Agilent Tech que consta de un cromatógrafo de gases 7980-B con un detector masas 5977B con un inyector automático 7693 A. La inyección del sistema se llevó a cabo en modo splitless (1 min) at 280 ° C. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar J&W HP-5MS (30 m x 0.25 mm I.D. and 0.25 µm de grosor de película). El gas acarreador empleado fue He (de alta pureza) con un flujo de 0.8 mL/min; La temperatura inicial del horno fue de 60°C, y luego se incrementó 4°C/min a 220°C (con 3 min finales con esta temperatura). Se obtuvieron los espectros de masas (m/z 50–550 uma) con una velocidad de cinco escaneos por segundo a 70 eV.



9.2.3 Análisis y adquisición de datos de GC/MS.

Las señales que se obtuvieron fueron analizadas con la base de datos NIST, implementada en MassHunter (B0.7, Agilent Tech.) El pre procesamiento de datos transforma los archivos de datos sin procesar (crudos) en una representación que facilita el acceso a las características de cada ion observado, incluida la relación masa carga (m/z), tiempo de retención del ion, medición de la intensidad del ion y abundancia del compuesto. La detección de picos convierte los datos sin procesar en una lista de iones. Posteriormente, los iones de diferentes muestras se emparejan y su tiempo de retención se alinea para permitir la comparación de múltiples muestras. La normalización corrige cualquier sesgo sistemático entre las muestras, que puede inducirse durante la preparación de la muestra y la adquisición de datos. Además, en función de la condición de los datos, la detección de valores atípicos, el filtrado y la corrección de la línea de base se realizan antes de la detección de picos para excluir los conjuntos de datos de LC/MS que difieren sustancialmente de otros, para mejorar la relación señal-ruido y corregir el cambio de la línea de base (Rency, *et al.*, 2012).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Determinación del perfil metabolómico mediante la técnica de LC/MS en modo de ionización positiva.

Sin embargo, a pesar de su importante actividad farmacológica, existen pocos estudios que hablen acerca de su actividad toxicológica. Aunado a lo anterior y debido que se desconocen los compuestos presentes dentro del metaboloma general de la planta, se hace interesante y necesario continuar con los estudios de su perfil metabólico. La identificación de los compuestos responsables de las actividades biológicas sería un aporte científico de gran impacto para la sociedad (Rodrigues, *et al.*, 2022).

Las ciencias ómicas y en específico la metabolómica, han tenido un desarrollo gigantesco en los últimos años, esto ha permitido un mejor análisis e identificación de los metabolitos de las plantas usadas comúnmente en la medicina tradicional y deben ser complementadas por métodos de análisis multivariantes, dentro de estos se encuentran las técnicas de LC/MS y GC/MS, ambas técnicas fueron utilizadas en este proyecto de investigación. Afortunadamente, los resultados obtenidos del análisis metabolómico permitieron identificar diversos metabolitos contenidos en *Eryngium foetidum*, no reportados anteriormente. (Rocha-Viggiano, *et al.*, 2018; Jaramillo y Duarte, 2011).

Los resultados obtenidos de la identificación de los metabolitos del EHEf serán clasificados de acuerdo al método utilizado para su separación (LC/MS, o GC/MS) y al modo de ionización.

Por LC/MS se lograron identificar 24 compuestos, de los cuales 15 se identificaron en modo positivo y 9 en modo negativo. En la figura 11 es posible observar los compuestos identificados en modo positivo. Estas moléculas fueron identificadas en función de su relación m/z y su tiempo de retención. En color negro se muestran las moléculas identificadas como metabolitos secundarios y en rojo los compuestos con actividad tóxica reportada en la literatura, además de ser moléculas que no pertenecen a la biogénesis de la especie vegetal, sino muy probablemente a contaminación ambiental ocasionada por intervención del ser humano en el



ecosistema o ciertos factores ambientales. y clasificados a su vez en compuestos que derivan de diversos grupos de metabolitos secundarios y como se conoce estos surgen como producto final de las reacciones o rutas metabólicas que pasan en el organismo y pueden por lo tanto generar información de su actividad bioquímica, es decir, se hayan contenidos en la composición general de toda la planta, normalmente son producto del metabolismo secundario de la especie vegetal, teniendo así, diversas actividades farmacológicas (Fiehn, 2002; González, *et al.*, 2004). Y compuestos que se encuentran también presentes en la planta, pero tienen una actividad tóxica.

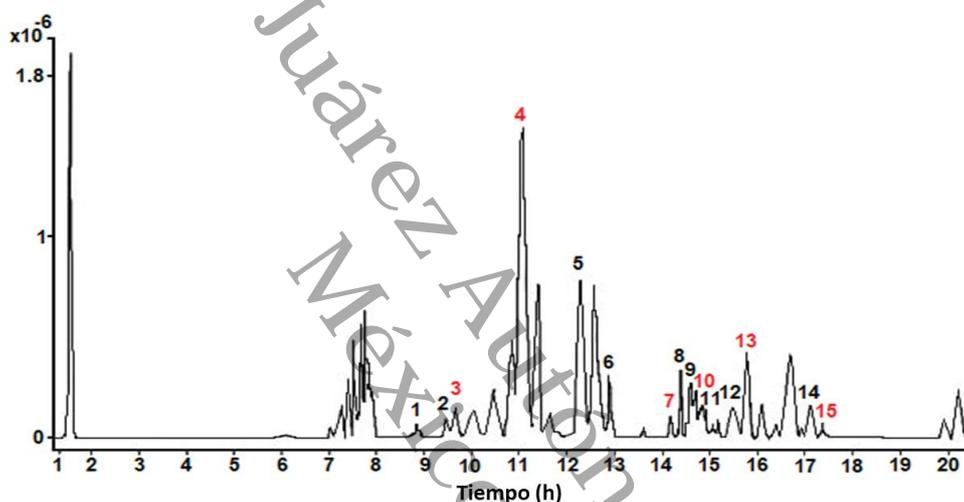


Figura 10. Cromatograma general de los metabolitos y compuestos tóxicos identificados en el extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* en modo positivo.

Mediante la anotación de los iones se logró llevar a cabo la identificación de los metabolitos y corroborar su presencia en el perfil metabólico de la especie vegetal. En la tabla 2, se observan los compuestos identificados por LC/MS en modo positivo de acuerdo a su tiempo de retención. En las columnas se pueden observar su identificación, la relación m/z , el ion molecular que forman y finalmente, la anotación de iones.


Tabla 2. Moléculas identificadas mediante la anotación de iones por el método de LC-MS en modo positivo.

#	TR (Min)	Identificación	Fórmula molecular	Tipo de ion	Experimental (m/z)	Teórica (m/z)	Fragmentos (MS/MS)
1	8.863	Absindiol	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	(M+Na) ⁺	289.1409	266.1500	175.11 121.05 337.20
2	9.672	Ácido (E)-5,8,12-trihidroxi-octadec-9-enoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	(M+Na) ⁺	353.2302	330.2415	281.14 261.18 188.10 121.05
3	9.626	1,1'-(6a-hidroxi-2,3a,5-trimetiltetrahydrofuro[2,3-d][1,3]dioxo-2,5-diyl)bis(etan-1-ona)	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	(M+Na) ⁺	281.0991	258.1100	132.97
4	11.366	Éter diglicídico de resorcinol	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	(M+Na) ⁺	245.0782	222.0900	214.91 261.15 244.11
5	12.253	Eplerenona	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	(M+Na) ⁺	437.1933	414.2036	175.07 121.05
6	12.918	Adipato de diisopropilo	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	(M+Na) ⁺	253.1408	230.1516	121.05
7	14.254	Anetol 3'	C ₁₀ H ₁₂ O	(M+H) ⁺	149.0961	148.0900	121.05
8	14.571	hidroxigeranihidroquinona	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	(M+Na) ⁺	285.1460	262.1568	143.00
9	14.872	Curcumenol	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	(M+H) ⁺	235.1690	234.1618	121.05
10	14.865	Alverina	C ₂₀ H ₂₇ N	(M+H) ⁺	282.2216	281.2100	173.07 143.00
11	14.998	Ácido (1Z,2Z,4E,8Z)-N-isobutilicosan-2,4,8-trienimidico	C ₂₄ H ₄₃ NO	(M+H) ⁺	362.3418	361.3346	304.28 121.05
12	15.147	17-fenil-trinor-PGE2	C ₂₃ H ₃₀ O ₅	(M+Na) ⁺	409.1986	386.2094	244.26 121.05 277.28
13	15.773	α-9(10)-EpODE	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	(M+H) ⁺	295.2265	294.2197	190.17 165.02 157.47
14	17.090	Ácido (Z)-12-oxooctadec-10-enoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	(M+H) ⁺	388.3579	296.2354	279.23 183.13 143.00
15	17.374	25-Azacolesterol	C ₂₆ H ₄₅ NO	(M+H) ⁺	388.3576	387.3500	301.14

Dentro de los metabolitos identificados en modo positivo, se encontraron: 9 metabolitos secundarios y 6 del metaboloma general con una actividad tóxica. Además, se anotaron los iones para cada uno de los compuestos.

Metabolitos secundarios. Se encontraron 9 compuestos de 2 familias. Dentro de la primer familia denominados terpenos, se encontraron: el absindiol, la eplerenona y



el curcumenol. Los terpenos derivan de la condensación de unidades isoprenicas en números variables, y se clasifican de acuerdo al número de unidades condensadas como: monoterpenos y sesquiterpenos que derivan directamente de las lactonas sesquiterpénicas son los más importantes desde el punto de vista farmacéutico (Sarmiento, *et al.*, 2018; Dalawai, *et al.*, 2021). Dentro de este grupo se encuentra el absindiol, que pertenece a los guayanólidos. La eplerenona es antagonista del receptor de la aldosterona similar a la espirolactona y tiene una actividad antihipertensiva (Masson, *et al.*, 2011).

El curcumenol, es un sesquiterpeno que posee actividad antioxidante e inhibidora del citocromo P-450 (Wang, *et al.*, 2021; Zhang, *et al.*, 2019).

Otro grupo de metabolitos secundarios presentes en el extracto, fueron los flavonoides. Estos compuestos poseen propiedades antimicrobianas y anticancerígenas, además de que se les usa comúnmente para el tratamiento de enfermedades cardíacas. En la muestra se identificaron: la 3-hidroxigeranilhidroquinona, compuesto con propiedades colorantes que se utiliza en la industria textil, alimentaria y cosmética. También se encontraron diversos derivados lineólicos y ácidos grasos de cadena larga como: el ácido 5,8,12-trihidroxi-9-octadecenoico, adipato de isopropilo, la isobutilamida del ácido 2,4,8-eicosatrienoico, la prostaglandina 17-fenil-trinor-PGE₂ y el ácido 12-oxo-10Z-octadecenoico (Sarmiento, *et al.*, 2018).

Compuestos del metaboloma general. Dentro de este grupo se encontraron 6 compuestos, entre los que destaca el ácido epoxigraso alfa-9(10)-EpODE. Este ácido es considerado una leucotoxina, debido al efecto tóxico que tiene sobre los leucocitos. También posee efectos cardiovasculares que podrían ocasionar la muerte (Walker, *et al.*, 2021; Fife, *et al.*, 202).

El diglicidil resorcinol éter, es un compuesto altamente corrosivo que daña la piel al contacto, pudiendo ocasionar cáncer. Se le utiliza en resinas epóxicas, en recubrimientos para herramientas de laminación y en adhesivos (Murthy, *et al.*, 1990; National Toxicology Program, 1986). El anetol, es un biomarcador potencial para el consumo de alimentos, aunque se ha demostrado que a concentraciones



altas genera toxicidad (Dosoky y Setzer, 2021; Akçan y Lale, 2016; Aprotosoai, *et al.*, 2016).

En la anotación de iones se encontraron los siguientes grupos de metabolitos secundarios. Terpenos: absindiol (1), eplerona (5) y curcumenol (9); flavonoides: 3-hidroxigeranihidroquinona (8) y diversos ácidos grasos: ácido 5,8,12-trihidroxi-9-octadecenoico (2), adipato de diisopropilo (6), Ácido (1Z,2Z,4E,8Z)-N-isobutilicosan-2,4,8-trienimidico (11), 17-fenil-trinor-PGE2 (12), ácido 12-oxo-10Z-octadecenoico (14).

Además, se anotaron moléculas que no pertenecen al metaboloma de la especie vegetal y poseen una actividad toxica reportada en la literatura, pero están presente en la especie vegetal como: (3) 1,1-tetrahidro-6a-hidroxi 2,3a, 5-trimetilfuro, 2,3-1,3-dioxol-2,5-diil,bis-etanona, (4) éter de diglicidil resorcinol, (7) anetole, (10) alverina, (13) α -9(10)-EpODE, (15) 25-Azacoesterol (Figura 12).

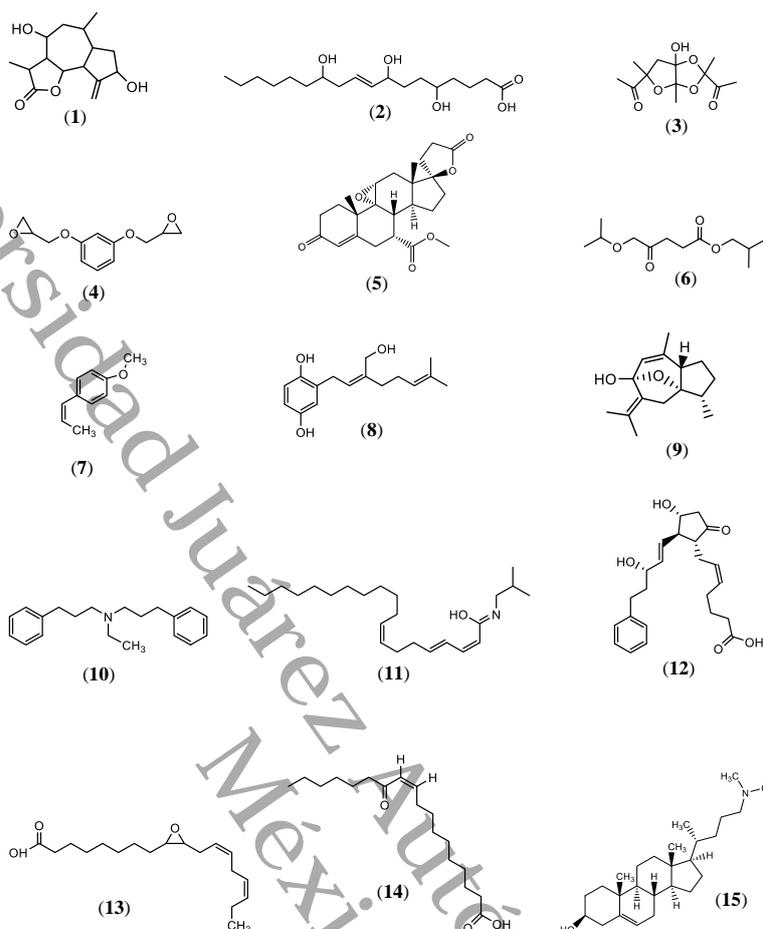


Figura 11. Estructuras químicas de los metabolitos y compuestos tóxicos identificados en el EHEf modo positivo.

10.2 Determinación del perfil metabolómico mediante la técnica de LC/MS en modo de ionización negativa.

En el modo de ionización negativo por gradiente, se utilizó hidróxido de amonio para la ionización. Mediante esta técnica se detectaron 9 compuestos, que fueron a su vez subclasificados de acuerdo a su procedencia de acuerdo a lo descrito para el modo de ionización positivo. Los compuestos detectados fueron identificados en función de su relación m/z y tiempo de retención. En la figura 13, se puede observar el cromatograma en fase negativa del EHEf, los números en color negro indican que los compuestos son metabolitos secundarios, mientras que el color rojo indica que poseen actividad tóxica, de acuerdo a lo reportado en la literatura.

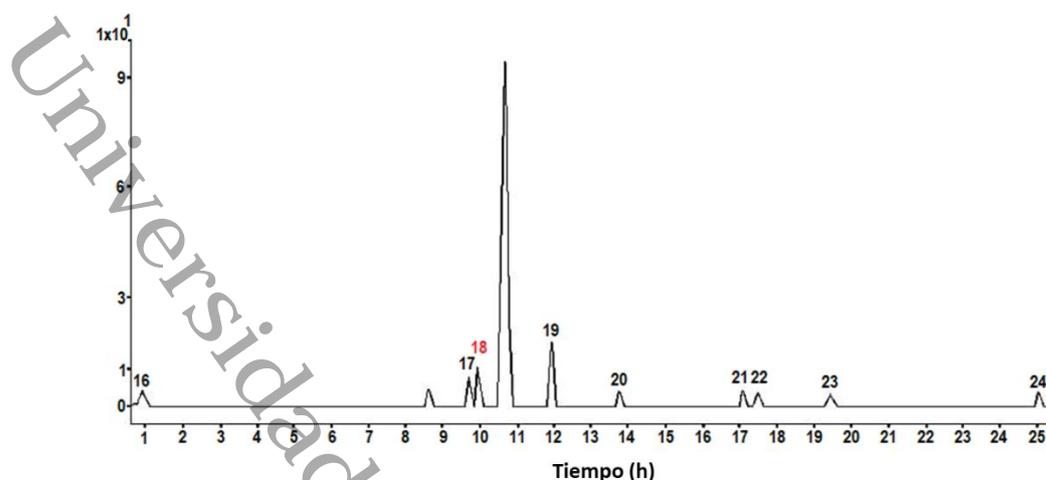


Figura 12. Cromatograma general de los metabolitos y compuestos tóxicos identificados en el extracto hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* en modo negativo.

Mediante la anotación de iones se logró llevar a cabo la identificación de los compuestos mencionados y se corroboró que efectivamente se encontraban presentes en el perfil metabólico de la especie vegetal. En la Tabla 3, se observan los 9 compuestos identificados, ordenados de acuerdo al tiempo de retención. En las columnas se pueden observar su identificación, la relación m/z , el ion molecular que forman y finalmente, la anotación de iones.


Tabla 3. Moléculas identificadas mediante LC-MS en modo negativo.

#	TR (Min)	Identificación	Fórmula molecular	Tipo de ion	Experimental (m/z)	Teórica (m/z)	Fragmentos (MS/MS)
16	0.780	Ácido (E)-3,5,12-trihidroxi-octadec-9-enoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	(M-H) ⁻	329.2335	330.2408	311.22 201.11 154.94
17	9.686	Ácido 9-metil-tridecanoico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	(M-H) ⁻	227.2021	228.2093	154.94
18	9.888	Dodecilsulfato de hidrógeno	C ₁₂ H ₂₆ O ₄ S	(M-H) ⁻	265.1484	266.1556	209.06
19	11.869	Ácido 14-metilheptadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	(M-H) ⁻	283.2651	284.2723	172.95 116.92
20	13.708	Ácido 3L,7D,11D-fitánico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	(M-H) ⁻	311.2958	312.3031	154.94
21	17.012	Hexanoato de hexadecilo	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	(M-H) ⁻	339.3269	340.3341	194.90
22	24.978	(R)-3,4-Dihidro-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-2H-1-benzopirano-6-ol	C ₂₅ H ₃₆ O ₂	(M-H) ⁻	339.3269	368.2712	325.18 136.93
23	17.594	Valerato de 6-octadecenilo	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	(M-H) ⁻	353.3427	354.3500	325.18 311.16 154.94
24	19.852	(E)-tetracos-20-en-1,18-diol	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	(M-H) ⁻	367.3583	368.3656	325.18 292.89 154.94

En la figura 14, se pueden observar las estructuras químicas de los compuestos identificados. Los cuales se pueden dividir en tres grupos. a) Ácidos grasos y derivados: ácido 5,8,12-trihidroxi-9-octadecenoico (**16**), ácido 9-metiltridecanoico (**17**), ácido 14-metilheptadecanoico (**19**) y ácido 3L,7D,11D-fitánico (**20**). Estos compuestos tienen funciones tensioactiva, emulsionante, estabilizante de las membranas y como surfactante en el área cosmética. b) Alcoholes grasos: 20-tetracosen-1,18-diol (**24**), (R)-3,4-dihidro-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-2H-1-benzopirano-6-ol (**22**) y 20-tetracosen-1,18-diol. c) El dodecilsulfato de hidrógeno (**18**) fue el único compuesto tóxico encontrado. Este compuesto se emplea como detergente, pesticida o adhesivo y provoca daños e irritación en la piel en altas concentraciones.

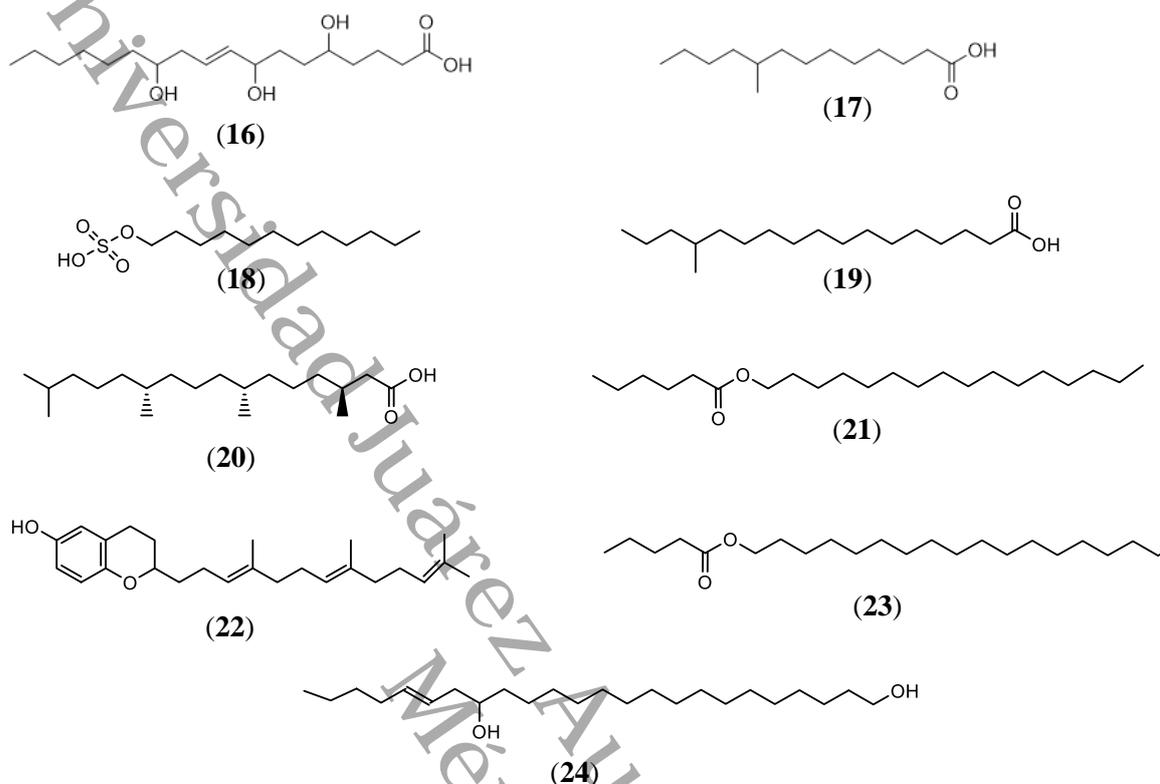


Figura 13. Estructuras químicas de los metabolitos y compuestos tóxicos identificados en el EHEf modo negativo.

De los 9 compuestos identificados, 8 son metabolitos secundarios, con excepción del dodecilsulfato de hidrógeno. (Burns, *et al.*, 1999; Watson, 2006; Funk, 1985).

Y el compuesto dodecilsulfato de hidrógeno es clasificado por su actividad toxica, siendo un sulfato de alquilo y un ácido conjugado de un sulfato de dodecil. Que a concentraciones altas provoca un efecto irritante o dañino en la barrera de la piel, pues es también empleado como pesticida o adhesivo (Frankild, *et al.*, 1995; Song *et al.*; 2020).



10.3 Determinación del perfil metabólico mediante la técnica de GC/MS.

Analizando a profundidad cada uno de los compuestos identificados por LC/MS se optó por enriquecer este proyecto llevando a cabo la determinación del perfil metabólico por una técnica más, la cual fue cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y es que es altamente reproducible por lo cual ha tenido un uso significativo en el área de perfiles de metabolitos pues las muestras extraídas se volatilizan antes de su separación en una columna capilar con una fase estacionaria adecuada para el análisis de los compuestos de interés (De Souza, 2013).

Se identificaron mediante la técnica de GC/MS un cromatograma en donde se muestran 13 compuestos derivados de ácidos grasos y grupos de familias de metabolitos secundarios, estos en función del tiempo de retención y el porcentaje de abundancia de cada compuesto (Figura 15).

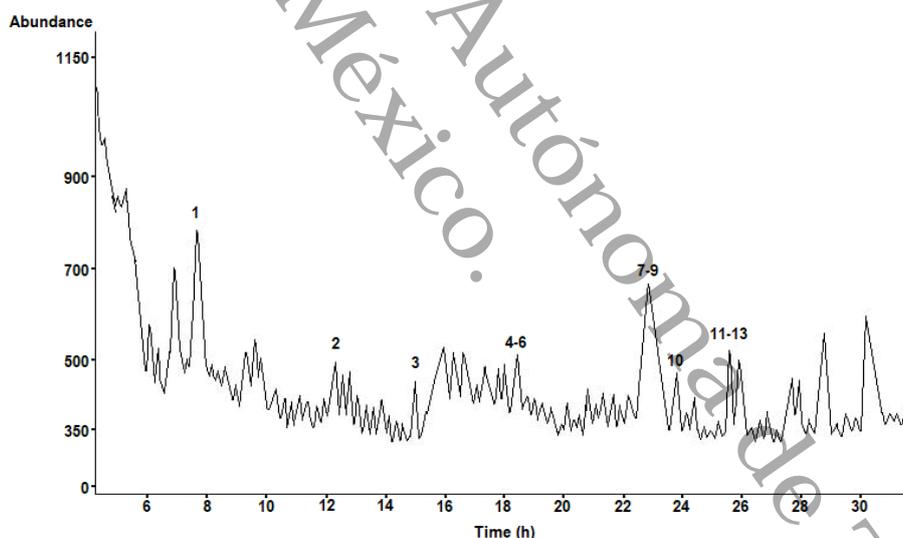


Figura 14. Cromatograma general de los metabolitos identificados en NIST del extracto de hexánico de la especie vegetal *Eryngium foetidum* mediante GC/MS.

Seguidamente se reportan dichos compuestos identificados en función del tiempo de retención, el peso molecular, fórmula química de cada compuesto (Tabla 4).



Tabla 4. Compuestos identificados por GC/MS del extracto hexánico de *Eryngium foetidum* mediante el método splitless.

Número de pico	RT (min)	Identificación	Formula molecular	Masa teórica
1	7.853	Ácido fumárico	C ₄ H ₄ O ₄	116.0109
2	12.277	Metilfenidato	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	233.1415
3	15.813	2,4-dimetil-benzaldehído	C ₉ H ₁₀ O	134.1751
4	18.455	1S,2S,5R-1,4,4-trimetiltriciclo[6.3.1.0(2,5)]dodec-8(9)-eno	C ₁₅ H ₂₄	204.1878
5	18.455	Aloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204.1878
6	18.455	1S,2S,5R-1,4,4-trimetiltriciclo[6.3.1.0(2,5)]dodec-8(9)-ene	C ₁₅ H ₂₄	204.1878
7	22.856	1H-cicloprop[e]azuleno	C ₁₁ H ₈	140.0626
8	22.856	Decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno	C ₁₅ H ₂₄ O	220.1827
9	22.856	Salicilideno solanocapsina	C ₃₄ H ₅₀ N ₂ O ₃	534.3821
10	23.809	Triciclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene-3-methanol	C ₁₅ H ₂₄ O	220.1827
11	25.858	Ciclopentanona 3-[3,5-decadienilo] (E,E)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.1827
12	25.858	Ácido 1H-indol-3-carboxílico	C ₉ H ₇ NO ₂	161.0476
13	25.858	Ácido 4-hidroxi-pentanoico	C ₅ H ₁₀ O ₃	118.0629

Y gracias a las condiciones del análisis y fundamento reportado previamente se obtuvo la caracterización e identificación de 13 compuestos clasificados como metabolitos secundarios como lo fueron el compuesto: ácido fumárico el cual es ampliamente utilizado en la preparación de alimentos, detergentes, bebidas y alimentos para perros, sin embargo, actualmente se ha ido empleando en diversos usos como la producción verde en el medio ambiente, más allá de su uso en la industria ambiental también tiene un gran uso en la industria farmacéutica pues es un compuesto que se ha demostrado que tienen una actividad antihipertensiva en el embarazo gestacional y múltiples usos en la terapia de medicamentos contra esclerosis múltiple (EM; Ilica, *et al.*, 2018; Haghikia, *et al.*, 2014; Zhou, *et al.*, 2021).



Otro de estos compuestos identificados es el metilfenidato el cual es un compuesto ampliamente utilizado dentro de la formulación de medicamentos psicoestimulantes para la terapia contra el déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en niños y dicha actividad se debe a que produce la inhibición del transportador de dopamina y norepinefrina, la actividad agonista en el receptor de serotonina tipo 1A (Faraone, 2018; Kimko, *et al.*, 1999).

Por otra parte, también se identificó al compuesto 2,4-dimetil-benzaldehído el cual pertenece al grupo de metabolitos conocidos como taninos y a la clase de compuestos orgánicos conocidos como derivados de benzoílo y es un compuesto usado como aditivos alimentarios y agentes aromatizantes (Tahir, *et al.*, 2017).

Derivados de la familia de terpenos y subfamilia como sesquiterpenos se identificaron los compuestos como el aloaromadendreno, 1H-cicloprop[e]azuleno, triciclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene-3-methanol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno, (1R,1aR,2aS,6R,6aS,7aS)-1,6,6a-trimetil-decahidro-1,2a metociclopropa[b]naftaleno y posee diversas actividades antimicrobianas, antifúngico, antiinflamatorio (Cutro, *et al.*, 2019; Piras, *et al.*, 2021; Leino, *et al.*, 2018; Madhumitha, *et al.*, 2011).

Y dentro del grupo de los metabolitos derivados de alcaloides se identificó al compuesto Salicilideno solanocapsina que se ha reportado con una actividad antibacteriano de *Solanum pseudocapsicum* (Mitscher, *et al.*, 1976; Jeyasankar, *et al.*, 2012).

Así mismo, se obtuvo la identificación de las estructuras químicas de cada compuesto identificado, teniendo como metabolitos secundarios a los compuestos derivados de ácidos grasos como: **(1)** ácido fumárico, **(12)** ácido 1H-indol-3-carboxílico **(13)** ácido 4-hidroxi-pentanoico, derivado de la familia de taninos se identificó al compuesto: **(3)** 2,4-dimetil-benzaldehído, terpenos, **(2)** metilfenidato, **(11)** ciclopentanona 3-[3,5-decadienilo] (*E,E*), **(6)** 1S,2S,5R-1,4,4-trimethyltriciclo[6.3.1.0(2,5)]dodec-8(9)-ene, **(4)** (1R,1aR,2aS,6R,6aS,7aS)-1,6,6a-trimetil-decahidro-1,2a-metociclopropa[b]naftaleno, **(5)** aloaromadendreno, **(7)** 1H-cicloprop[e]azuleno, **(8)** decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno, **(10)**



tricyclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene-3-methanol,
solanocapsina (Figura 16).

alcaloides: **(9)** salicilideno

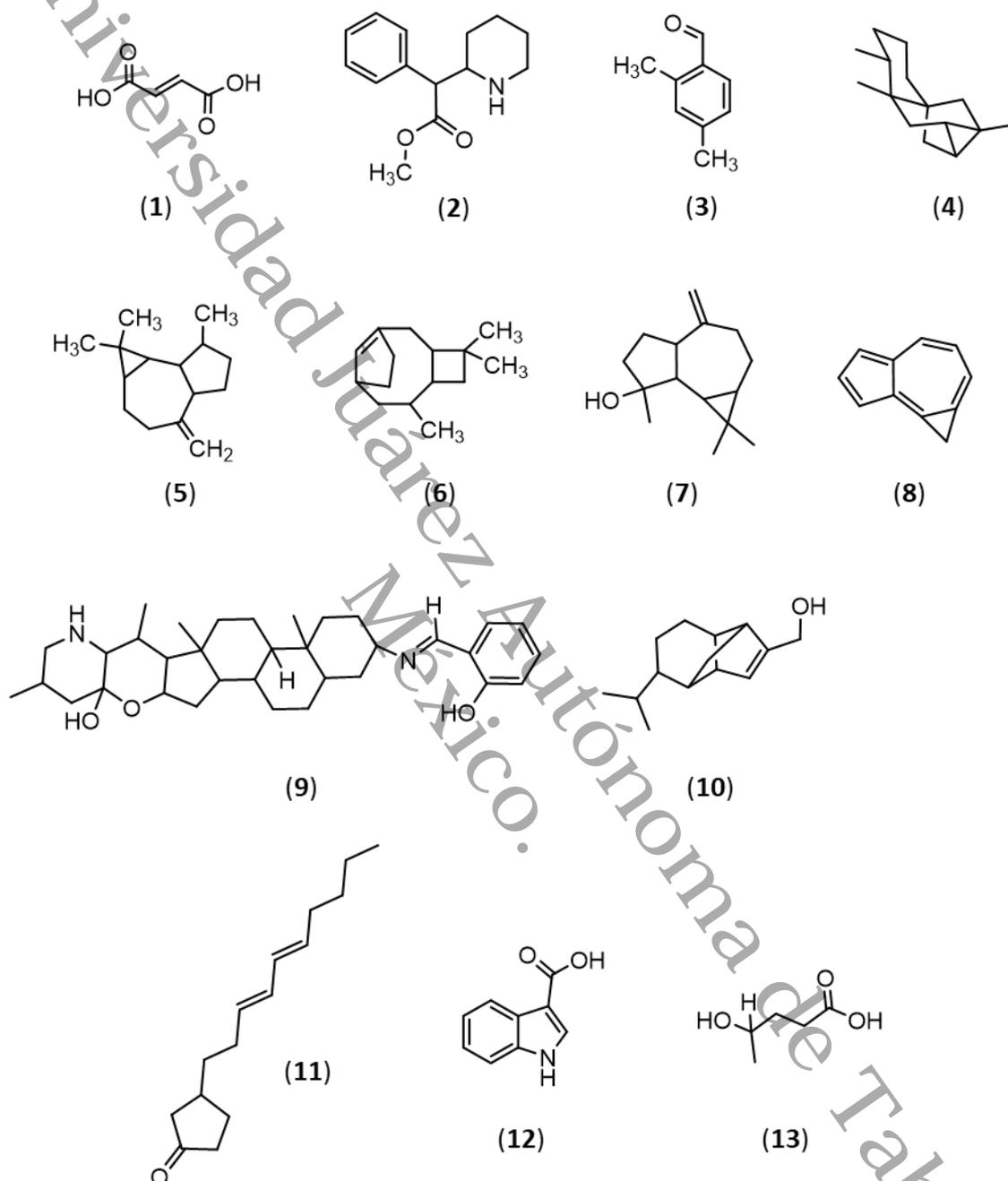


Figura 15. Estructuras químicas de los metabolitos anotados en el extracto hexánico de *Eryngium foetidum* mediante GC/MS.

Con los avances importantes en las técnicas cromatográficas y el uso de ella en la determinación del perfil metabólico se han logrado mejoras significativas tanto en la eficiencia de separación como en la disminución del tiempo de análisis de



muestras biológicas complejas y obteniendo la determinación del perfil metabólico de *Eryngium foetidum* encontrando compuestos que no habían sido antes reportados y que forman parte de su composición general, teniendo así en cuenta que estos compuestos se les puede atribuir a la planta sus diversas propiedades farmacológicas y toxicológicas

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CONCLUSIÓN



11. CONCLUSIONES

11.1 El estudio metabolómico realizado en la especie *Eryngium Foetidum* permitió identificar nuevos metabolitos que de acuerdo a su estructura química podrían ser los responsables de la actividad farmacológica que se le ha atribuido en la medicina tradicional desde tiempos ancestrales, sin embargo, también podrían explicar el efecto tóxico previamente reportado por nuestro grupo de investigación.

11.2 El estudio metabolómico permitió anotar e identificar diversos metabolitos secundarios como terpenos, flavonoides, ácidos grasos, vitaminas y alcaloides que no se habían reportado en la especie vegetal y que probablemente sean los responsables de las actividades farmacológicas atribuidas a la especie vegetal *Eryngium foetidum*.

11.3 Es el primer estudio metabolómico que se reporta para esta especie en el estado de Tabasco, que como es sabido tiene condiciones geográficas y climatológicas únicas que podrían influir en la composición y distribución de los metabolitos secundarios de esta especie y estos hallazgos transmitidos a los consumidores, permitirá el uso racional y responsable de los productos naturales.

11.4 Mediante la técnica analítica de GC/MS utilizando un método de *splitless* se encontraron 13 metabolitos secundarios derivados de ácidos grasos de bajo punto de fusión.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

PERSPECTIVAS



12. PERSPECTIVAS

12.1. Continuar el estudio fitoquímico del extracto hexánico por otra técnica analítica como Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

12.2. Diseñar una estrategia de retrosíntesis para sintetizar las moléculas anotadas en la presente investigación y mediante modelos *in vivo* e *in vitro* determinar sus actividades biológicas.

12.3. Realizar un acoplamiento molecular sobre blancos terapéuticos de metabolitos secundarios de *Eryngium foetidum* presentes en el extracto hexánico.

12.4. Evaluar la posible actividad antibacteriana y bactericida de los metabolitos identificados mediante LC/MS Y GC/MS de *Eryngium foetidum* en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, para establecer su espectro de acción antibiótica.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

BIBLIOGRAFÍA



13. BIBLIOGRAFÍA

1. Abidi, J., Ammar, S., Ben, S., Skalicka-Woźniak, K., Ghrabi-Gammar, Z., y Bouaziz, M. (2019). Use of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry system as valuable tool for an untargeted metabolomic profiling of *Rumex tunetanus* flowers and stems and contribution to the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 66–81.
2. Abolghasemi, M. M., y Piryaeei, M. (2020). Development of direct microwave desorption/gas chromatography mass spectrometry system for rapid analysis of volatile components in medicinal plants. *Journal of Separation Science*, 43(4), 782–787.
3. Akçan, R., y Lale, A. (2016). Trans-anethole concentrations in bogma raki. *Journal of Human y Experimental Toxicology*. 36(2), 203–204.
4. Allwood, J. W., y Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Journal In Phytochemical Analysis*. 1(1), 33–47.
5. Aprotosoiaie, C., Costache, I., y Miron, A. (2016). Anethole and Its Role in Chronic Diseases. *Journal of Drug Discovery from Mother Nature*, 247–267.
6. Artati, A., Prehn, C., Möller, G., y Adamski, J. (2012). Assay Tools for Metabolomics. *Journal Genetics meets metabolomics*.13-38.
7. Aslam B, Basit M, Nisar M, Khurshid M, Rasool M. (2017.) Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatogr Sci*. 55(2), 182-196.
8. Autino, J. C., Romanelli, G., y Ruiz, D. (2013). Introducción a la Química Orgánica. 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, editorial Edulp. 1-425
9. Benitez, J., Corrales, F., Martín Subero, I., y Ordovás, J. (2019). Informes Anticipando ciencias ómicas. *Journal Roche Institute Foundation*. 5-27.



10. Burns, Christopher J., Field, Leslie D., Hashimoto, Kikuko, Petteys, Brian J., Ridley, Damon D., Rose, Michael. (1999). Synthesis of stereoisomerically pure monoether lipids. *Journal of Australian Chemistry*. 52(5), 387-394.
11. Canuto, G. A. B., da Costa, J. L., da Cruz, P. L. R., de Souza, A. R. L., Faccio, A. T., Klassen, A., Rodrigues, K. T., y Tavares, M. F. M. (2018). Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. *Journal In Química Nova*. Sociedade Brasileira de Química. 41(1), 75–91.
12. Chambers, D., Carew, A., Lukowski, W., Powell, E. (2019). Transcriptómica y secuenciación de ARN unicelular. *Jornal of Respiriology*. 24(1), 29-36.
13. Cutro, A., Castelli, M., López, S., Rosales, M., Hollmann, A., y Rodriguez, S. (2019). Chemical composition of *Schinus areira* essential oil and antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Product Research*. 35(17), 2931–2936.
14. Dalawai, D., Aware, C., Jadhav, J., y Murthy, N. (2021). RP-HPLC analysis of diterpene lactones in leaves and stem of different species of *Andrographis*. *Journal Natural Product Research*, 35(13), 2239–2242.
15. Davey, M. (2017). Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. *Encyclopedia Of Applied Plant Sciences*. 462-467.
16. Dawila, S., Muangnoi, C., Praengamthanachoti, P., y Tuntipopipat, S. (2013). Anti-Inflammatory Activity of Bioaccessible Fraction from *Eryngium foetidum* Leaves. *Journal BioMed Research International*. 1-8.
17. De Souza, D. (2013). Detection of polar metabolites through the use of gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*. 29–37.
18. DeCorte, B. (2006). Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. *Journal Of Medicinal Chemistry*. 59 (20), 9295-9304.
19. Dosoky, N. S., y Setzer, W. (2021). Maternal Reproductive Toxicity of Some Essential Oils and Their Constituents. *Journal of Molecular Sciences*. 22(5), 2380.



20. Dunn, W., Erban, R., Weber, D., Creek, M., Brown, R., Breitling, T., Viant, R. (2013). Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Journal Metabolomics*. 44–66.
21. Faraone, S. (2018). The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Journal of Neuroscience y Biobehavioral Reviews*. 87, 255–270.
22. Fiehn, O. (2002). Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Journal Plant Molecular Biology*. 155–71.
23. Fife, K., Liu, Y., Schmelzer, K., Tsai, H., Kim, I., Morisseau, C., Hammock, B., y Kroetz, D. (2008). Inhibition of soluble epoxide hydrolase does not protect against endotoxin-mediated hepatic inflammation. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 327(3), 707–715.
24. Frankild, S., Andersen, K., y Nielsen, G. (1995). Effect of sodium lauryl sulfate (SLS) on in vitro percutaneous penetration of water, hydrocortisone and nickel. *Journal of Contact Dermatitis*. 32(6), 338–345.
25. Frigolet, M., y Gutiérrez Aguilar, R. (2017). Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud?. *Journal Digital University*, 18(7).
26. Fuhrer, T., y Zamboni, N. (2015). High-throughput discovery metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 31, 73–78.
27. Funk C. (1985). Powell WS: Release of prostaglandins and monohydroxy and trihydroxy metabolites of linoleic and arachidonic acids by adult and fetal aortae and ductus arteriosus. *Journal of Biol Chem*. 260(12), 7481-8.
28. García de Alba, G., Javier, E., Ramírez-Hernández, B., Robles-Arellano, G., Zañudo-Hernández, J., Salcedo-Rocha, A., y García de Alba-Verduzco, J. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos, Journal of Social Sciences* (39), 29-44.



29. García, L., Díaz, F., y León, J. (2015). Efectividad de la medicina herbolaria y su impacto en la calidad de vida de los pobladores de Curgos, Perú. *Journal of UCV-SCIENTIA*. 3(1), 23–34.
30. Gariglia, S., Melina, A., Soberón, J., Sampietro, D., y Vattuone, M. (2012). Cromatografía: Conceptos Y Aplicaciones. *Journal Arakuku*.1-6.
31. Giacomello, S. (2021). A new era for plant science: spatial single-cell transcriptomics. *Journal Current Opinion in Plant Biology*. 60, 102.
32. Gil de la Fuente, A., Godzien, J., Fernández-López, M., Rupérez, F., Barbas, C., y Otero, A. (2018). Knowledge-based metabolite annotation tool: CEU Mass Mediator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.154, 138–149.
33. Gómez-Alvares, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Journal of mexican phytotechnology*, 43-49.
34. González-Elizondo, M., López-Enriquez, I., González-Elizondo, M., Tena-Flores, J. (2004). Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas. México. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones del Instituto Politécnico Nacional. 11-31.
35. Gray, I.A., Lafit Z., y Sarker S. (2006). *Natural Products Isolation*. New Jersey. 2°ed. Human Press. 1-73.
36. Griffiths, W. (2008). Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling. *Journal of Royal Society of Chemistry*.161-194.
37. Grijalva-Pineda A. (2006). Flora útil Etnobotánica de Nicaragua. Managua, Nicaragua: MARENA. Primera edición. 73.
38. Haghikia, A., Linker, R., y Gold, R. (2014). Ácido fumárico como agente terapéutico para la esclerosis múltiple. 85(6):720-6.
39. Haghikia, A., Linker, R., y Gold, R. (2014). Fumarsäure in der Therapie der Multiplen Sklerose. *Journal of Der Nervenarzt*. 85(6), 720–726.



40. Horton, R. y Lucassen, A. (2019). Recent developments in genetic/genomic medicine. *Journal of Clinical Science*. 133(5), 697–708.
41. Ilica, R., Kloetzer, L., Galaction, A., y Caşcaval, D. (2018). Fumaric acid: production and separation. *Journal of Biotechnology Letters*. 41(1), 47–57.
43. Jaramillo, B., y Duarte, I. (2011). Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante Volatile chemical composition of the essential oil from colombian *Eryngium foetidum* L. and determination of its antioxidant activity. *Journal of Cuban Medicinal Plants*. 2, 16-32.
44. Jeyasankar, A., Premalatha, S., y Elumalai, K. (2012). Biological activities of *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner and armyworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asian Pac J Trop Biomed*. 2(12), 981-6.
45. Joseph, P. (2017). Transcriptomics in toxicology. *Food Chem Toxicol*. 109(1), 650-662.
46. Kats, L., y Baltz, R. (2016). Natural product Discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*. 44(2-3),155-176.
47. Kelly, R. (2020). Single-cell Proteomics: Progress and Prospects. *Journal of Mol Cell Proteomics*. 19(11), 1739-1748.
48. Kimko, H., Cross, J., y Abernethy, D. (1999). Pharmacokinetics and Clinical Effectiveness of Methylphenidate. *Journal of Clinical Pharmacokinetics*. 37(6), 457–470.
49. Kinghorn, A., Pan, L., Fletcher, J., y Chai, H. (2011). The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of natural products*. 1539-1555.
50. Kouitcheu, L., Eyoun, B., y Nguepi, E. (2016). In Vitro and Anti-Helicobacter Activities of *Eryngium foetidum* (Apiaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae), and



Galinsoga ciliata (Asteraceae) against Helicobacter pylori. Journal of BioMedic Research International.1-7.

51. Krastanov, A. (2010). Metabolomics - The state of art. Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment. 24(1),1537–1543).

52. Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona. Omega. 21-53.

53. Leino, T., Turku, A., Yli-Kauhaluoma, J., Kukkonen, J., Xhaard, H., y Wallén E. (2018). Azulene-based compounds for targeting orexin receptors. Journal of Medical Chemystre. 5(157), 88-100.

54. Lindon, J., Nicholson, J., y Holmes, E. (2007). El Manual de Metabonómica y Metabolómica. Journal of Elsevier. 307-322.

55. López, E. (2012). Aspectos Moleculares Del Envejecimiento. 1ª Edición, México. 23-35.

56. López-Rivera, A. (2020). Evaluación antibacteriana de las especies vegetales *Eryngium foetidum* y *Bixa Orellana* utilizadas en la medicina tradicional del estado de tabasco. Villahermosa, Tabasco: UJAT. 15-45.

57. Madhumitha, G., Rajakumar, G., Roopan, S., Rahuman, A., Priya, K., Saral, A., Khan, F., Khanna, V., Velayutham, K., Jayaseelan, C., Kamaraj, C., y Elango, G. (2012). Insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. Journal of Parasitol. 111(5):2189-99.

58. Manzanero-Medina, G., Flores-Martínez, A., Sandoval-Zapotitla, E., y Bye-Boettler, R. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. Journal of Polybotany. 27(1), 191-228.

59. Martín-Gómez, M., y Ballesteros-González, M. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Journal of Monographs of the Royal National Academy of Pharmacy.113–168.



60. Masson, S., Tejani, A., Stabler, S., Tsang, M., Tam, T., Wu, M., Tung, A., y Kinkade, A. (2011). Eplerenone for hypertension. In Cochrane Database of Journal of Systematic Reviews.1-12
61. Mayolo-Deloysa, K., Martinez, L., y Rito-Palomares, M. (2012). Chromatographic techniques and their application to studies of conformational changes, stability and refolding of proteins. Journal of Mexican Chemical Engineering.11(3). 415-429.
62. Mitscher L., Juvarkar J., y Beal J. (1976). Solacanine, a new steroidal alkaloid from *Solanum pseudocapsicum* possessing antimicrobial activity. Journal of Experientia. 32(4):415-416.
63. Monti, C., Zilocchi, M., Colugnat, I., y Alberio, T. (2019). Proteomics turns functional. Journal of Proteomics. 30(198), 36-44.
64. Murthy, A., McConnell, E., Huff, J., Russfield, A., y Good, A. (1990). Forestomach neoplasms in Fischer F344/N rats and B6C3F1 mice exposed to diglycidyl resorcinol ether epoxy resin. Journal of Food Chem Toxicol. 28(10), 723-9.
65. National Toxicology Program. NTP (1986). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Diglycidyl Resorcinol Ether (Technical Grade) (CAS No. 101-90-6) In F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Journal of Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 257, 1-222.
66. Naz, S., Garcia, A., Rusak, M., y Barbas, C. (2013). Method development and validation for rat serum fingerprinting with CE-MS: Application to ventilator-induced-lung-injury study. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry. 405(14). 4849–4858.
67. Nuengchamnong, N., Sookying, S., y Ingkaninan, K. (2016). LC-ESI-QTOF-MS based screening and identification of isomeric jujubogenin and pseudojujubogenin aglycones in *Bacopa monnieri* extract. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 129, 121–134.



68. Ocampo-Medina, B. (2019). Efecto vasorrelajante de la especie vegetal *Malvaviscus arboreus*. Villahermosa-Tabasco. UJAT. 22-40.
69. Pang, B., Zhu, Y., Lu, L., Gu, F., y Chen, H. (2016). The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass spectrometry in the analysis of traditional Chinese medicine. *Journal of Evidence-based complementary and alternative medicine*. 1-7.
70. Papadimitropoulos, M., Vasilopoulou, C., Maga-Nteve, C., y Klapa, M. (2018). Untargeted GC-MS metabolomics. *Journal of Methods in Molecular Biology Humana Press*. 1738, 133–147.
71. Park, S., Sadanala, K., y Kim, E. (2016). A Metabolomic Approach to Understanding the Metabolic Link between Obesity and Diabetes. *Journal of Molecules and Cells*. 587-596.
72. Patti, G., Yanes, O., y Siuzdak, G. (2013). Metabolomics: the apogee or the omic trilogy. *Nature. Journal of Molecular Cell Biol.* 263–269.
73. Paul, J., Seaforth, C., y Tikasingh, A. (2011). Fitoterapia (*Eryngium foetidum*). *Journal of Elsevier*. 302-308.
74. Pierce, B. (2009). *Genética: Un Enfoque Conceptual*. Ed. Médica Panamericana. 35-45.
75. Piras, A., Maccioni, A., Falconieri, D., Porcedda, S., Gonçalves, M., Alves-Silva, J., Silva, A., Cruz, M., Sagueiro, L., y Maxia, A. (2021). Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Teucrium scordium* L. subsp. *scordioides* (Schreb.) Arcang. (Lamiaceae) de la isla de Cerdeña (Italia). *Journal of Natural Product Research*. 1-8.
76. Putri, S., Yamamoto, S., Tsugawa, H., y Fukusaki, E. (2013). Current metabolomics: Technological advances. In *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116 (1), 9–16.
77. Ramawat, K. (2004). *Biotechnology of Medicinal Plants Vitalizer and Therapeutic*. 4 ed. Estados Unidos. *Journal of Science Publishers*. 1-5.



78. Rency, S., Nezami Ranjbar, Z., Zhao, M., y Resson, H. (2012). Ion annotation-assisted analysis of LC-MS based. *Journal of Proteome Science*. 2-9.
79. Rocha-Viggiano, A., Salgado-Bustamante, M., y López-Hernández, Y. (2018). El futuro de la metabolómica en el diagnóstico clínico. *Journal of Potosi University Students*. 22-27.
80. Rodrigues, T., Silva, M., Gurgel, E., Oliveira, M., y Lucas, F. (2022). *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae): A Literature Review of Traditional Uses, Chemical Composition, and Pharmacological Activities. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1–15.
81. Rodríguez, J., y Castro, A. (2014). Estructura química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. "siuca culantro". Lima, Peru: Universidad Nacional Mayor De San Marcos. 15-25.
82. Rodríguez-Morales, S., Ocampo-Medina, B., Romero-Ceronio, N., Alvarado-Sánchez, C., Vilchis-Reyes, M., Roa de la Fuente, L., Ortiz-Andrade, R., y Hernández-Abreu, O. (2021). Metabolic Profiling of Vasorelaxant Extract from *Malvaviscus arboreus* by LC/QTOF-MS. *Journal of Chemistry and Biodiversity*, 18(4), 1-8.
83. Romero, G., Fernández, M., Plaza, B., Garrido, F., y Martínez, V. (2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: Hacia la seguridad alimentaria. *Journal of Spanish Public Health*. 461-474.
84. Ruíz, M., y Mejía, F. (2020). Plants Used In Traditional Medicine For Viral Respiratory Conditions. *Journal of Rebiol*. 40(1), 109–130.
85. Saftić, L., Peršurić, Ž., Fornal, E., Pavlešić, T., y Kraljević Pavelić, S. (2019). Targeted and untargeted LC-MS polyphenolic profiling and chemometric analysis of propolis from different regions of Croatia. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 162–172.



86. Sana, T., Roark, J., Li, X., Waddell, K., y Fischer, S. (2008). Molecular Formula and METLIN Personal Metabolite Database Matching. *Journal of Biomolecular Techniques*. 58–266.
87. Sánchez, A., y González, M. (2002). Tema 12., Técnicas de recolecta de plantas y herborización. 123-133.
88. Sánchez-Flores, J. (2013). Botanical Medicine in clinical practice. México. *Journal of Invest Med Sur Mex*. 124-130.
89. Sarmiento, M., Barros, R., Diomedes, A., Paternina, G., Mejía, A., Devis, T., y Rivero, S. (2018). Productos Naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales. 1-45.
90. Sepúlveda, J., Porta, D., y Rocha, S. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Journal of Mexican Physiopathology*. 21, 355-363.
91. Simonsen, H., Weitzel, C., y Christensen, S. (2013). Guaianolide Sesquiterpenoids: Pharmacology and Biosynthesis. In: Ramawat K., Mérillon JM. *Journal of Natural Products*. 1-4.
92. Soares, J., Rosalen, P., Lazarini, J. G., Massarioli, A., da Silva, C., Nani, B. D., Franchin, M., y de Alencar, S. (2019). Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. *Journal of Food Chemistry*. 281, 178–188.
93. Song, Y., Lee, J., Jung, I., Seo, B., y Hwang, H. (2020). Molecular Dynamics Simulations of Micelle Properties and Behaviors of Sodium Lauryl Ether Sulfate Penetrating Ceramide and Phospholipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B*. 1-15.
94. Tahir, N., Azeez, H., Muhammad, K., Faqe, S., y Omer, D. (2017). Exploring of bioactive compounds in essential oil acquired from the stem and root derivatives of *Hypericum triquetrifolium* callus cultures. *Journal of Natural Product Research*. 1–5.



95. Vazquez-Cancino, R. (2020). Estudio toxicológico de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional. Villahermosa, Tabasco: UJAT. 7-36.
96. Waizel, J. (2006). Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria. Instituto Politécnico Nacional. México. 409-488.
97. Walker, R., Savinova, O., Pedersen, T., Newman, J., y Shearer, G. (2021). Effects of inflammation and soluble epoxide hydrolase inhibition on oxylipin composition of very low-density lipoproteins in isolated perfused rat livers. *Journal of Physiological Reports*, 9(4), 1.6.
98. Wang, S., Ma, Q., Xie, Z., Shen, Y., Zheng, B., Jiang, C., Yuan, P., An, Q., Fan, S., y Jie, Z. (2021). An Antioxidant Sesquiterpene Inhibits Osteoclastogenesis Via Blocking IPMK/TRAF6 and Counteracts OVX-Induced Osteoporosis in Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 36(9), 1850–1865.
99. Want, E., y Masson, P. (2011) Procesamiento y análisis de datos de metabolómica basados en GC/LC-MS. *Journal of Molecular Biology Methods*. 708, 277–298.
100. Watson, A. (2006). Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. *Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. Journal of Lipid Res.* 47(10), 2101-11.
101. Watson, R., y Preedy, R. (2008). *Botanical Medicine in clinical practice*. London. Journal of Cromwell Press. 64, 131-136; 66, 547-560.
102. Wheeler, M., Hutchinson, J., y Honour, J. (2006.). GC-MS 53 53 From: *Methods in Molecular Biology: Hormone Assays in Biological Fluids Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Methods in molecular biology.* 324:53-74.
103. Williams, S., Liyu, A., Tsai, C., Moore, R., Orton, D., Chrisler, W., Gaffrey, M., Liu, T., Smith, R., Kelly, R., PasaTolic, L., y Zhu, Y. (2020). Automated Coupling of Nanodroplet Sample Preparation with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for High-Throughput Single-Cell Proteomics. *Jorunal Chem.* 4;92(15), 10588-10596.



104. Wilson, P., Ledru, N., y Humphreys, B. (2020). Epigenómica y el riñón. *Journal of Curr Opin Nephrol Hypertens.* 29(3), 80-285.
105. Yamamoto, H., Tsukahara, M., Yamano, Y., Wada, A., y Yazaki, K. (2020). Alcohol dehydrogenase activity converts 3"-hydroxygeranylhydroquinone to an aldehyde intermediate for shikonin and benzoquinone derivatives in *Lithospermum erythrorhizon*. *Journal of Plant and Cell Physiology.* 1-9.
106. Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., y Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Journal of Analyst Royal Society of Chemistry.* 137(2), 293–300.
107. Zhang, L., Shen, S., Gao, Y., Shi, S., Zhou, C., Mo, J., Xu, Y., Lin, L., y Gan, L. (2019). Tautomerism and bioactivities of curcumenol, a common sesquiterpenoid widely existing in edible plants. *Journal of Food and Function.* 10(3), 1288–1294.
108. Zhou, Y., Zhang, F., Jiang, H., Xu, D., y Deng, D. (2021). Fumaric acid and succinic acid treat gestational hypertension by downregulating the expression of KCNMB1 and TET1. *Journal of Experimental and therapeutic medicine.* 22(4), 1072.
109. Zubiri-Gaitán, A. (2018). Análisis metabolómico no dirigido en dos líneas de conejos seleccionadas de forma divergente para grasa intramuscular. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. 35-42.