



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



Estudio del perfil metabólico, huella metabólica y efecto hipoglucemiante de hojas de *Cecropia spp.* obtenidas de las cinco subregiones del estado de Tabasco

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Química Orgánica

PRESENTA

M. en C. Eric Jaziel Medrano Sánchez

DIRECTORES

Dr. Abraham Gómez Rivera - DACB

Dr. Carlos Ernesto Lobato García - DACB

ASESOR EXTERNO

Dr. Manasés González Cortazar – CIBIS, IMSS

Cunduacán, Tabasco.

Marzo 2024



UJAT

UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

Cunduacán, Tabasco a 08 de marzo de 2024

**M.C. ERIC JAZIEL MEDRANO SÁNCHEZ
PASANTE DE DOCTORADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ORGÁNICA
PRESENTE**

Por medio de la presente me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **“Estudio del perfil metabólico, huella metabólica y efecto hipoglucemiante de hojas de *Cecropia spp.* obtenidas de las cinco subregiones del estado de Tabasco”**; en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL y obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Química Orgánica.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE.


**DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA**



C.c.p.- Archivo

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

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 **“Estudio del perfil metabólico, huella metabólica y efecto hipoglucemiante de hojas de *Cecropia spp.* obtenidas de las cinco subregiones del estado de Tabasco”** 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 mas 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 Villahermosa, Tabasco a los 22 días del mes de marzo del año 2024.

AUTORIZA



Eric Jaziel Medrano Sánchez
202a25001

Agradecimientos

Dr. Abraham Gómez Rivera, por darme la oportunidad de participar en este proyecto que, a pesar de no haber trabajado mano a mano, aprendí mucho de usted, gracias por la confianza que tuvo en mi para culminar mi formación.

Dr. Carlos Ernesto Lobato García que, durante la realización de este proyecto, usted ha sido quien me ha guiado en el complicado proceso. Le doy gracias por brindarme su tiempo, por sus consejos, compañía y por impulsar el desarrollo en mi formación académica.

Dr. Manasés González Cortazar, por su tiempo y dedicación, por permitirme entrar a su laboratorio para poder llevar a cabo este gran proyecto, por la amabilidad con la que me ha recibido durante estos últimos años de conocerla.

A mis amigos de este grupo de investigación, a los cuales considero como mi familia, por su apoyo, ánimos, regaños que impulsaron la culminación de este proyecto de vida a la Dra. Ammy Joana Gallegos García, al Dr. Ricardo López Rodríguez y al L.Q. Cristian Octavio Barredo Hernández.

Gracias a todos ustedes, no cabe duda de fui bien recibido por un gran equipo de investigadores.

A la comisión revisora

Gracias por su dedicación y observaciones a lo largo de la revisión de este trabajo.

Dr. Miguel Ángel Vilchis Reyes, Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, Dra. Nelly Cristina Aguilar Sánchez, Dra. Nancy Romero Ceronio.

Dedicatoria

A mis padres

Quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo, Amor. A quienes, sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida, para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida a sido convertirme en persona de provecho.

Por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por sus esfuerzos y su amor que para mí es invaluable, gracias por darme todo lo que he necesitado, por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

Por esto y más ... gracias.

E.J.M.S

Índice

	Pag.
1. Abstract	xi
2. Resumen	xiii
3. Introducción	1
4. Antecedentes	
4.1. Estudios fitoquímicos en especies de <i>Cecropia</i>	2
4.2. <i>Cecropia</i> y su aplicación terapéutica como agente hipoglucemiante	5
5. Marco Teórico	
5.1. Aspectos botánicos del género <i>Cecropia</i>	9
5.2. Regiones del estado de Tabasco	11
5.3. Marcadores químicos	14
5.4. Espectrofotometría UV-Vis	14
5.4.1. Cuantificación de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu	14
5.4.2. Cuantificación de flavonoides mediante colorimetría	15
5.5. Cromatografía	16
5.5.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	16
5.6. Resonancia Magnética Nuclear	17
5.7. Análisis Multivariado	19
5.8. Determinación de azúcares reductores	19
6. Justificación	20
7. Objetivo general	
7.1. Objetivos específicos	21
8. Metodología	
8.1. Material vegetal y obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de especies <i>Cecropia</i>	22
8.2. Contenido de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	23
8.3. Contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	23

8.4.	Análisis de CLAR-DAD y cuantificación de ácido clorogénico, isoorientina, orientina y vitexina en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	
8.5.	Perfiles de RMN- ¹ H y análisis multivariado del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	25
8.6.	Determinación del contenido de azúcares reductores en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	26
8.7.	Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	27
8.7.1.	Diseño Experimental	27
8.8.	Análisis estadístico	28
9.	Resultados y discusión	
9.1.	Contenido de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i> .	30
9.2.	Contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	32
9.3.	Análisis de CLAR-DAD del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	33
9.4.	Análisis multivariado de los perfiles de RMN- ¹ H	39
9.5.	Determinación de azúcares reductores en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i> .	44
9.6.	Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i> en el modelo de CTG	46
10.	Conclusiones	52
11.	Perspectivas	53
12.	Referencias	54
13.	ANEXOS	60

Índice de Tablas

	Pag.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del género <i>Cecropia</i>	9
Tabla 2. Principales diferencias entre <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	10
Tabla 3. Parámetros de adquisición de los espectros de RMN- ¹ H del extracto hidroalcohólico de las especies de <i>Cecropia</i>	25
Tabla 4. Geolocalización del sitio de colecta e identificación taxonómica de las especies de <i>Cecropia</i>	29
Tabla 5. Nomenclatura y porcentaje del extracto hidroalcohólico obtenido de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co)	30
Tabla 6. Análisis del perfil metabólico mediante CLAR-DAD del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> y <i>C. obtusifolia</i>	34
Tabla 7. CPT, CFT y CTQM en especies de <i>Cecropia</i>	39

Índice de Figuras

	Pag.
Figura 1. Marcadores químicos presentes en especies de <i>Cecropia</i> , 1 : ácido clorogénico; 2 : isoorientina; 3 : orientina; 4 : vitexina	5
Figura 2. Hojas de <i>Cecropia spp.</i> Imagen propia	9
Figura 3. Regiones que conforman el estado de Tabasco; mapa creado mediante el programa QGIS® v 3.30.3	11
Figura 4. Subregiones del estado de Tabasco; mapa creado mediante el programa QGIS® v 3.30.3	12
Figura 5. Mecanismo de reacción implicado en el método de Folin-Ciocalteu	15
Figura 6. Mecanismo de reacción de la formación de los quelatos entre las estructuras de los flavonoides y el ion Al ³⁺	15
Figura 7. Representación de un cromatograma analítico	17
Figura 8. Movimiento de precesión	18
Figura 9. Reacción general de conversión de azúcares reductores mediante DNS	19

Figura 10. Esquema general de la metodología	22
Figura 11. Diseño experimental de la evaluación hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de <i>Cecropia spp.</i> un ensayo de Curva de tolerancia a la glucosa	27
Figura 12. Puntos de colecta en Tabasco, México, de hojas de <i>C. peltata</i> (Cp1- Cp4) y <i>C. obtusifolia</i> (Co5); mapa creado mediante el programa QGIS® v 3.30.3	29
Figura 13. Análisis del contenido de polifenoles totales (CPT) en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	30
Figura 14. Análisis del contenido de flavonoides totales (CFT) en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	32
Figura 15. Cromatogramas de CLAR-DAD del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	33
Figura 16a. Concentración (mg/g) de ácido clorogénico (a), isoorientina (b) en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	35
Figura 16b. Concentración (mg/g) de orientina (c) y el análogo de vitexina (d) en el extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	36
Figura 17. Perfiles de RMN- ¹ H (D ₂ O, 600 MHz; región δ 8.00 a 0.00 ppm) del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	40

Figura 18. Expansión del espectro de RMN- ¹ H (D ₂ O, 600 MHz; región de δ 3.40 - 4.20 ppm) del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	41
Figura 19. Análisis de componentes principales <i>score plot</i> (PC1 vs. PC2, 65.2% de la varianza explicada) de los perfiles de RMN- ¹ H del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	42
Figura 20. Metabolitos definidos mediante el análisis de Importancia Variable en la Proyección (VIP) a partir de los perfiles de RMN- ¹ H del extracto hidroalcohólico de especies de <i>Cecropia</i>	43
Figura 21. Análisis del contenido de azúcares reductores (CAR) en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	45
Figura 22. Curso temporal del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	47
Figura 22. Área bajo la curva de la evaluación en el modelo CTG del extracto hidroalcohólico de <i>C. peltata</i> (Cp) y <i>C. obtusifolia</i> (Co). Subregiones: Cp1 , Centro; Cp2 , Chontalpa; Cp3 , Pantanos; Cp4 , Ríos y Co5 , Sierra	48

1. Abstract

The *Cecropia* genus is widely used in traditional medicine of Tabasco, Mexico, mainly for the treatment of diabetes; despite its traditional use, there is no correct distinction between the species of this genus, which can lead to their inappropriate use, with the potential risk of causing side effects and damage to health. According to the above, the objective of this work was to analyze the metabolic content of *Cecropia* species collected in the five sub-regions of the state of Tabasco, where the taxonomic identification allowed us to distinguish between two collected species: *Cecropia peltata* (**Cp1-Cp4**) and *Cecropia obtusifolia* (**Co5**). The use of spectrophotometric techniques such as UV-Vis, demonstrated that the **Cp4** extract (*C. peltata* from the Ríos sub-region) presented the highest values of CPT (155 ± 9.1 mg GAE/g E) and CFT (724 ± 22.2 mg RE/g E). On the other hand, metabolic analysis using chromatographic techniques such as High-Resolution Liquid Chromatography showed a similar profile for the five samples analyzed, with variations in the concentrations of the chemical markers. Thus, it was found that **Cp3** (*C. peltata* from the Pantanos sub-region) presented the highest concentrations for chlorogenic acid (39.8 ± 2.3 mg/g) and isoorientin (51.5 ± 2.9 mg/g), **Cp4** (*C. peltata* from the Ríos sub-region) for orientin (49.9 ± 0.6 mg/g) and **Cp2** (*C. peltata* from the Chontalpa sub-region) for the vitexin analog (6.2 ± 0.2 mg/g). Furthermore, the metabolic fingerprint analysis using spectroscopic techniques such as Nuclear Magnetic Resonance showed intra-species differences between *C. peltata* samples and inter-species differences between *C. peltata* and *C. obtusifolia*, when applying a multivariate analysis, it was shown that these differences were attributed to variations in the groups of metabolites, as well as in the proportion of sugars such as glucose and xylose. In this way, to understand the results obtained from the multivariate analysis, it was decided to perform the quantification of reducing sugars, where **Cp4** was the sample that presented the highest content (476.3 ± 11.35 mg EGlu/g E), followed by **Co5** (396.2 ± 12.88 mg EGlu/g E), this is consistent with the results obtained from the multivariate analysis. Finally, in order to observe the hypoglycemic effect of the samples under study, the glucose tolerance curve test was used. Thus, **Cp3** was the sample that showed the best hypoglycemic effect (137.0 ± 8.5 mg/dL) from minute 60 in the CTG test, similar

to metformin (114 ± 8.5 mg/dL). It should be noted that this same sample exhibited the highest levels of chlorogenic acid and isoorientin, metabolites related to the hypoglycemic effect in *Cecropia* species, therefore, the effect shown can be attributed to the high content of both metabolites. On the other hand, the presence of metabolites in low concentrations that contribute to the effect shown by the study samples is not ruled out. Likewise, it is important to highlight that biotic and abiotic factors can influence the production of certain metabolites, which is reflected in biological activity, which sets a guideline for the study of the factors that contribute to the metabolic content and therefore the biological activity attributed to a species.

México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

2. Resumen

El género *Cecropia* es utilizado ampliamente en la medicina tradicional de Tabasco, México, principalmente para el tratamiento de la diabetes; a pesar de su uso tradicional no hay distinción correcta entre las especies de este género, lo que puede llevar a un uso inadecuado de estas, con el riesgo potencial de provocar efectos secundarios y daños a la salud. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar el contenido metabólico de especies de *Cecropia* colectadas en las cinco subregiones del estado de Tabasco, donde, la identificación taxonómica permitió distinguir entre dos especies colectadas: *Cecropia peltata* (**Cp1- Cp4**) y *Cecropia obtusifolia* (**Co5**). Asimismo, el empleo de técnicas espectrofotométricas como UV-Vis, demostró que el extracto **Cp4** (*C. peltata* de la subregión Ríos) presentó los valores más altos de CPT (155 ± 9.1 mg GAE/g E) y CFT (724 ± 22.2 mg RE/g E). Por otra parte, el análisis metabólico a partir de técnicas cromatográficas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, mostró un perfil similar para las cinco muestras analizadas, con variaciones en las concentraciones de los marcadores químicos. Así se encontró que **Cp3** (*C. peltata* de la subregión Pantanos) presentó las concentraciones más altas para ácido clorogénico (39.8 ± 2.3 mg/g) e isoorientina (51.5 ± 2.9 mg/g), **Cp4** (*C. peltata* de la subregión Ríos) para orientina (49.9 ± 0.6 mg/g) y **Cp2** (*C. peltata* de la subregión Chontalpa) para vitexina (6.2 ± 0.2 mg/g). Además, el análisis de huella metabólica mediante técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear mostró diferencias intra especies entre muestras de *C. peltata* e inter especies entre *C. peltata* y *C. obtusifolia*, donde al aplicarse un análisis multivariado, se demostró que estas diferencias fueron atribuidas a variaciones en los grupos de metabolitos, así como en la contribución de los desplazamientos químicos que pueden estar asociados a azúcares como glucosa y xilosa. De esta forma, para comprender los resultados obtenidos del análisis multivariado, se optó por realizar la cuantificación de azúcares reductores, donde, **Cp4** fue la muestra que presentó el mayor contenido (476.3 ± 11.35 mg EGlu/g E), seguido de **Co5** (396.2 ± 12.88 mg EGlu/g E), lo cual es consistente con los resultados obtenidos a partir del análisis multivariado. Finalmente, para observar el efecto

hipoglucemiante de las muestras en estudio, se empleó el ensayo de curva de tolerancia a la glucosa. Así, **Cp3** fue la muestra que mostró el mejor efecto hipoglucemiante (137 ± 8.5 mg/dL) a partir del minuto 60 en la prueba de CTG, similar a metformina (114 ± 8.5 mg/dL). Cabe destacar que esta misma muestra exhibió los niveles más altos de ácido clorogénico e isoorientina, metabolitos relacionados con el efecto hipoglucemiante en especies de *Cecropia*, por lo que, el efecto mostrado puede atribuirse al alto contenido de ambos metabolitos. Por otra parte, no se descarta la presencia de metabolitos en bajas concentraciones que contribuyan al efecto mostrado por las muestras de estudio, asimismo, es importante destacar que los factores bióticos y abióticos puedan influir en la producción de ciertos metabolitos lo cual se vea reflejado en la actividad biológica, lo cual marca una pauta para el estudio de los factores que contribuyan al contenido metabólico y por ende la actividad biológica atribuida a una especie.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3. Introducción

Las plantas medicinales se han utilizado desde tiempos ancestrales para el tratamiento de diversas enfermedades, debido a su bajo riesgo de provocar efectos secundarios. Sin embargo, la coexistencia de diferentes especies conocidas con el mismo nombre tradicional puede dar lugar a una identificación errónea y un uso potencialmente inapropiado. Asimismo, poco se sabe si la sustitución de una especie vegetal por otra conlleva efectos negativos sobre la salud. En ese sentido, un grupo de plantas que presenta retos en la diferenciación del contenido metabólico es el género *Cecropia*, empleado en la medicina tradicional como un agente en el tratamiento de diabetes mellitus y del cual se ha demostrado experimentalmente que presenta actividad hipoglucemiante atribuida principalmente al ácido clorogénico e isoorientina, quienes se han identificado como metabolitos secundarios mayoritarios en esta planta; no obstante, existen reportes de variabilidad en el efecto hipoglucemiante de especies de *Cecropia*, dependiendo de la región geográfica en donde se colecta la planta, lo cual está relacionado con el contenido de los marcadores químicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar el perfil metabólico mediante diferentes técnicas analíticas, como la espectrofotometría UV-Vis, realizar una identificación de compuestos específicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución y mediante el uso de la RMN-¹H, seguido de un análisis multivariado, determinar las diferencias intra e inter especie. Por último los extractos fueron evaluados en un modelo *in vivo* para determinar si hubo una variación en el efecto hipoglucemiante dependiendo del contenido metabólico y subregión de colecta.

4. Antecedentes

4.1. Estudios fitoquímicos en especies de *Cecropia*

Los estudios del contenido metabólico en plantas tienen una gran importancia, ya que permiten conocer y comparar la composición metabólica de diferentes especies de interés, lo que puede llevar a determinar el impacto que tienen diversos factores ambientales en el metabolismo o bien, conocer la tolerancia al estrés generada en las plantas por agentes abióticos y bióticos; así como establecer la complejidad del contenido metabólico entre especies de un mismo género [1-3]. Un primer acercamiento para determinar el perfil metabólico puede efectuarse empleando técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, mediante la cuantificación de grupos metabólicos específicos, como polifenoles y flavonoides. Ejemplos de ello es un estudio realizado por Rivera-Mondragón [4], donde determinaron el contenido de polifenoles y flavonoides totales en cuatro especies de *Cecropia* colectadas en Panamá, mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y el método colorimétrico de triclورو de aluminio, respectivamente, esto con ayuda de la espectrofotometría UV-Vis, donde la especie que presentó el mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales fue *C. obtusifolia*, en comparación con *C. hispidissima*, *C. insignis* y *C. peltata*. Además, en ese mismo estudio se realizó un análisis metabólico empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a un Detector de Arreglo de Fotodiodos (CLAR-DAD), lo que permitió la identificación de marcadores químicos de interés, distinguiendo a *C. hispidissima* y *C. peltata* de las demás muestras de estudio [4].

Por otro lado, un enfoque que permite comparar de manera simultánea el contenido metabólico global de diversas especies, es el análisis de la huella metabólica mediante la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN-¹H), ya que muestra un panorama amplio del contenido metabólico en extractos vegetales, con la ventaja de detectar metabolitos de diversas polaridades y fácil cuantificación, además de que provee suficiente información para la elucidación estructural y no necesita derivatización [5]. En este sentido, la facilidad de tratamiento de los espectros de RMN-¹H, empleando diversos programas computacionales, así como

el procesamiento, interpretación y análisis estadístico de los datos, hacen de esta técnica una herramienta rápida, conveniente y efectiva en la discriminación de especies en función de su contenido metabólico [6, 7]. De esta forma, los componentes químicos presentes en el extracto vegetal se pueden ver simultáneamente con una “huella metabólica” en un espectro de RMN-¹H y puede ser visualizada mediante la aplicación de métodos estadísticos multivariados con el objetivo de reducir la complejidad de los datos [8]. Así, por ejemplo, un estudio reciente muestra el uso de la RMN-¹H combinada con un análisis multivariado, como herramienta eficaz para evaluar diferencias en el contenido de metabolitos relacionados con diferentes etapas de crecimiento de *Peganum harmala* L., la cual fue colectada en los meses de mayo, agosto, octubre y diciembre. Los resultados mostraron que los metabolitos más abundantes en las muestras colectadas en mayo fueron vasicina, colina y sucrosa, mientras que las muestras colectadas en agosto mostraron mayor contenido de betaína, lisina, 4-hidroxiisoleucina y prolina, en comparación con los otros periodos de colecta. Los autores sugieren que hay una relación entre los componentes químicos y el estado fisiológico de una planta el cual se puede ver afectado por el entorno de crecimiento [9].

Por otra parte, Hari-Murti *et al* [10], emplearon RMN-¹H combinada con un análisis multivariante en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) resistentes y susceptibles a *Ralstonia solanacearum*, con el objetivo de identificar los compuestos bioquímicos que desempeñan un papel crucial en los mecanismos de defensa del tomate contra el daño bacteriano. En ese sentido, se identificaron diversos compuestos, siendo leucina y la valina los metabolitos distinguibles de los cultivos resistentes y susceptibles, demostrándose que los cultivos resistentes tenían un mayor contenido de leucina en comparación con los susceptibles. Por lo tanto, la disminución de valina puede estar relacionada con la mayor necesidad de leucina lo que desempeña un papel en el sistema inmunitario de la planta contra la bacteria en estudio.

Un grupo de plantas que presenta retos en la definición de su perfil metabólico lo constituye el género *Cecropia*, el cual se distribuye desde la selva tropical y

subtropical de México hasta América del Sur y está integrado por 61 especies, la mayoría de las cuales son nombradas de manera tradicional como “guarumo” o variantes de este nombre, por ejemplo “guarumbo” o “yarumbo”. Particularmente, en la lengua yokot’an hablada en el estado de Tabasco, se utiliza el término “k’olok” [11,12]. Cabe destacar que la nomenclatura tradicional no distingue entre especies de este género, lo que implica retos en el conocimiento sistemático de su uso en la medicina tradicional. Distintos reportes para *Cecropia spp.*, hacen énfasis de su uso en el tratamiento de la diabetes e hipertensión; además, de emplearse para el tratamiento de la inflamación y el dolor, así como antimicrobiano y antipalúdico [13-23]. De igual manera, se han demostrado diversas aplicaciones biológicas, particularmente para *C. obtusifolia* como relajante muscular y depresor del Sistema Nervioso Central [19].

En el estado de Tabasco, las dos especies con mayor distribución y empleo son *C. peltata* y *C. obtusifolia* [24], la coexistencia de ambas especies con igual nombre popular puede llevar a un uso potencialmente inadecuado derivado de la nula diferenciación entre ellas, con el riesgo de que la sustitución de una especie vegetal por otra pueda tener implicaciones en el efecto terapéutico que se busca, así como reacciones adversas a la salud humana [25]; más aún, es importante indicar que el contenido metabólico de una planta puede presentar diferencias dependiendo de la región donde se colecte [26-28].

Diversos reportes han definido al ácido clorogénico (1) e isoorientina (2) como marcadores químicos, ya que, de acuerdo con los criterios de inclusión, se ha demostrado que son responsables de la actividad hipoglucemiante que se le atribuye a especies de *Cecropia*. Además, se ha reportado la presencia de análogos estructurales a isoorientina como: orientina (3) y vitexina (4) también catalogados como marcadores químicos ya que, a pesar de no estar relacionados con la actividad hipoglucemiante, son metabolitos característicos en especies de *Cecropia*, y se ha demostrado su actividad como antihipertensivos y antiinflamatorios [29]. La estructura de los compuestos 1-4 se presenta en la Figura 1.

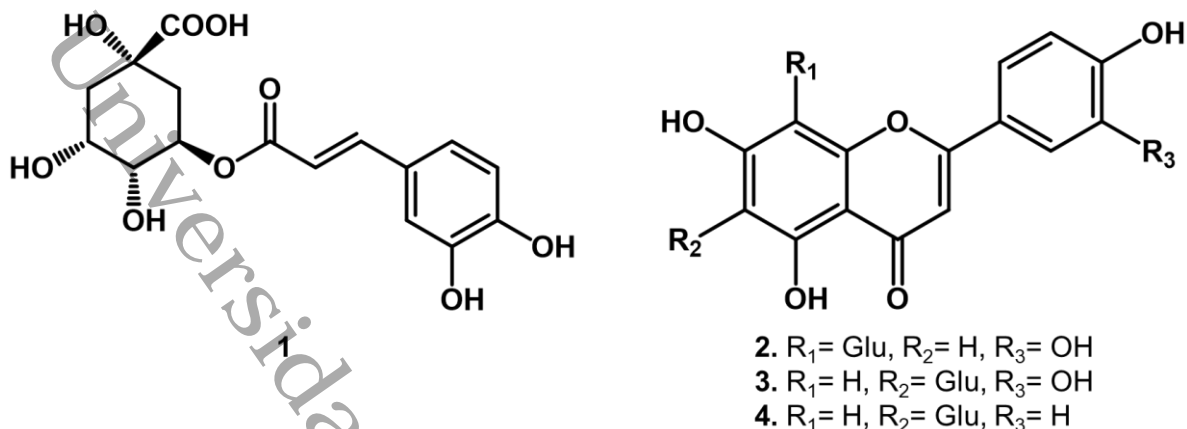


Figura 1. Marcadores químicos presentes en especies de *Cecropia*, 1: ácido clorogénico; 2: isoorientina; 3: orientina; 4: vitexina

4.2. *Cecropia* y su aplicación terapéutica como agente hipoglucemiante

Cecropia obtusifolia ha sido empleada en la medicina tradicional como una infusión para el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente como un agente en el tratamiento de diabetes mellitus [30]. Esta propiedad biológica ha sido corroborada mediante diferentes modelos experimentales, por ejemplo, se evaluó la actividad hipoglucemiante del extracto acuoso de la hoja de *Cecropia obtusifolia* colectada en el estado de Oaxaca en conejos con diabetes inducida mediante aloxano, esto a una dosis de 20 mg/kg de peso, mostrando una disminución en los niveles de glucosa [31]. Por otra parte, se realizó la evaluación de un extracto acuoso de las hojas de *Cecropia obtusifolia* colectada en Puebla, México, siendo evaluado en perros mestizos sanos y con pancreatectomía parcial o total, donde se empleó una dosis de 150 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de peso; la administración del extracto logró la disminución de la glucemia en un 54% en animales a los cuales se le extirpó el páncreas parcialmente y en un 43% en los animales a los que se le extirpó el páncreas totalmente. En ese sentido, los autores sugieren que el efecto hipoglucemiante de *Cecropia obtusifolia* no es insulinomimético y que probablemente se relaciona con la estimulación de células β del páncreas [32]. Asimismo, un estudio realizado por Román-Ramos [33], demostró la actividad hipoglucemiante del extracto acuoso de la hoja de *Cecropia obtusifolia* en conejos sanos a los cuales se le administró glucosa en una dosis de 2 g/kg de peso,

mostrando una disminución de los niveles de glucosa en un 17.6% con respecto al grupo control, esto después de dos horas de iniciada la evaluación.

Posteriormente, un estudio realizado por Herrera-Arellano [13], demostró que la administración de una infusión preparada, empleando 3 g de hojas por día de *Cecropia obtusifolia* colectada en Xalapa, Veracruz, la cual contenía 2.99 ± 0.14 mg de ácido clorogénico por 1 g de hoja seca, presentó efectos benéficos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos cuando se administraba como un complemento en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con mala respuesta al tratamiento médico convencional, confirmando el uso tradicional de *Cecropia obtusifolia* como un agente antihiper glucémico.

Por otra parte, se evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de las hojas de dos especies de *Cecropia* en ratones Balb-c, a una dosis de 1g/kg, las especies de *Cecropia* fueron colectadas en dos entidades diferentes: Cunduacán, Tabasco y Gutiérrez Zamora, Veracruz, con el objetivo de correlacionar su actividad con el contenido de ácido clorogénico. En ese sentido, se evaluó el efecto hipoglucemiante de estas especies en una curva de tolerancia a la glucosa, donde el extracto de *C. peltata* colectada en el estado de Tabasco, mostró un mejor efecto hipoglucemiante (52.8%), comparado con las dos muestras de *C. obtusifolia* que mostraron una actividad similar (Tabasco 33.3% y Veracruz 35.7%), además, se determinó su nivel de ácido clorogénico por cada gramo de extracto (*C. peltata* Tabasco 19.84 ± 1.6 mg/g; *C. obtusifolia* Tabasco 13.3 ± 3.2 mg/g y *C. obtusifolia* Veracruz 13.1 ± 1.6 mg/g), los autores sugieren que esta diferencia podría estar relacionada con el factor de especie, el hábitat (suelo, temperatura, altitud y humedad ambiental), así como el periodo de recolección del material vegetal [14].

Por otra parte, se reportó el efecto hipoglucemiante de *Cecropia peltata* colectada en Chikinzonot, Yucatán, evaluada a 200 mg/kg, esto en un modelo de diabetes en ratas inducido mediante estreptozotocina. Los resultados obtenidos fueron menores a lo presentado previamente con *Cecropia obtusifolia*; después de comparar el contenido químico de ambas especies, se observó que *Cecropia*

peltata presentaba concentraciones más bajas de ácido clorogénico. En ese sentido, los autores sugieren que el efecto hipoglucemiante en ambas especies de *Cecropia* se debe a la concentración de ácido clorogénico e isoorientina en sus extractos, lo cual se puede ver afectado por la variación fenotípica o estacional [15].

Asimismo, un estudio efectuado con un extracto acuoso de las hojas de *Cecropia obtusifolia* recolectadas en el estado de Hidalgo, demostró tener un efecto hipoglucemiante en 12 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) a una dosis de 13.5 g planta/día en 1 L de agua por 32 semanas. No obstante, los autores mostraron que en solo 4 semanas después de comenzar la administración del extracto acuoso de *Cecropia obtusifolia*, se presentó un efecto hipoglucemiante significativo y sostenido hasta las 32 semanas [34].

Derivado de los hallazgos del efecto hipoglucemiante que ejercen las plantas del género *Cecropia*, se han realizado estudios tendientes a explicar los posibles mecanismos involucrados en esta actividad, así como la evaluación de su potencial toxicidad.

De esta forma, Andrade-Cetto y colaboradores [16], determinaron un posible mecanismo por el cual el extracto acuoso de *Cecropia obtusifolia* ejerce su actividad, al administrar los extractos de *C. obtusifolia* en un modelo de diabetes inducido por STZ en ratas, a una dosis de 90 mg/kg, se observó que su efecto hipoglucemiante es mediante la inhibición de α -glucosidasa, disminuyendo la absorción de glucosa a nivel de intestino, efecto similar al obtenido por la administración de acarbosa en el tratamiento de diabetes mellitus.

De igual manera, se determinó que el extracto acuoso de la hoja de *Cecropia obtusifolia* colectada en Querétaro, México y su componente activo (ácido clorogénico) ejercen su efecto antidiabético mediante la estimulación en la captación de glucosa en adipocitos sensibles y resistentes a la insulina sin mostrar efectos pro-adipogénicos apreciables [17].

También se determinó que la administración del extracto acuoso de la hoja de *Cecropia obtusifolia* recolectada en el estado de Hidalgo, no produce efectos genotóxicos y citotóxicos, esto en modelos *in vitro*. Por lo tanto, la falta de toxicidad, citotoxicidad y/o genotoxicidad de esta mezcla soporta su uso en la medicina popular para el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2 e indica que puede emplearse de manera segura como fitomedicamento [35].

Posteriormente, otro estudio realizado por Andrade-Cetto [36], demostró el efecto hipoglucemiante de *Cecropia obtusifolia* y *Cecropia peltata* colectadas en los estados de Hidalgo y Yucatán, respectivamente; esto mediante una curva de tolerancia al piruvato en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, empleando una dosis de 150 mg/kg del extracto butanólico de ambas especies, proponiendo que el efecto probablemente se lleva a cabo mediante la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa, ya que, al administrar una carga oral de piruvato, los tratamientos bloquean el aumento de las concentraciones de glucosa, lo anterior, debido a que el piruvato, después de un tiempo de ayuno prolongado, resulta como sustrato para la producción de glucosa hepática, por lo tanto, este efecto se ve reflejado en el bloqueo del aumento de las concentraciones de glucosa.

Recientemente, un estudio determinó que el efecto hipoglucémico del extracto acuoso de la hoja de *Cecropia obtusifolia* colectada en Oaxaca; implica un mecanismo de doble acción, promoviendo por un lado la secreción de insulina, la acumulación de glucógeno hepático y la hepatoprotección, mientras que por otro lado mejora el metabolismo de los lípidos, debido en parte al proliferador de peroxisoma activado por receptor- α (PPAR- α) [18]. Sin embargo, la actividad de los componentes principales aislados de *Cecropia obtusifolia* resultó menor a la mostrada por los extractos crudos, lo cual sugiere que, además de los compuestos ya reportados, otros constituyentes poseen o son importantes para ejercer el efecto hipoglucémico. En ese sentido, es importante resaltar que, si bien la presencia del ácido clorogénico e isoorientina son los metabolitos de mayor efecto, también pueden encontrarse otros que dependiendo de su presencia y concentración pueden contribuir al efecto hipoglucemiante.

5. Marco Teórico

5.1. Aspectos botánicos del género *Cecropia*

El género *Cecropia* presenta una gran variabilidad morfológica y ecológica que puede atribuirse a su amplia distribución (desde los 800 a 2400 m.s.n.m) y a su presencia en algunas regiones con hábitats relativamente secos o muy húmedos. Estas especies se caracterizan por ser árboles de aproximadamente 20 metros de alto, con un tronco simple o ligeramente ramificado; presentan hojas con peciolo largos, con una lámina suborbicular con 10 a 15 lóbulos, además, presentan frutos masculinos y femeninos de 15 a 30 cm de largo, los cuales están separados por espigas (Figura 2) [12].



Figura 2. Hojas de *Cecropia peltata*. Imagen propia

La clasificación taxonómica de esta planta se presenta en la Tabla 1

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Cecropia*

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Urticales
Familia	Moraceae
Género	<i>Cecropia</i>

Dentro del género *Cecropia*, en México existen dos especies que tienen mayor presencia, estas son *Cecropia peltata* y *Cecropia obtusifolia*, las cuales se encuentran distribuidas en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Quintana Roo, Yucatán, Tamaulipas, San Luis Potosí y Tabasco [12]. En ese sentido, cuando se hace referencia a estas dos especies, es un reto llevar a cabo una diferenciación correcta de cada una de ellas, ya que comparten características similares, como su follaje perennifolio, hojas cartáceas, además de su asociación simbiótica con poblaciones de hormigas del género *Azteca*, que habitan los entrenudos huecos de los tallos y ramas [37]. Sin embargo, es posible establecer características propias de cada especie [12]. Además de tener la experiencia visual de sus principales características (Tabla 2).

Tabla 2. Principales diferencias entre *C. peltata* y *C. obtusifolia*

Característica	<i>C. peltata</i>	<i>C. obtusifolia</i>
Altura del árbol	15 a 25 m	12 a 35 m
Forma de las ramas	Fronosas de 1.5 a 4 cm de espesor con un color verde	Fronosas de 1.5 a 5 cm de espesor, con colores verdes o ligeramente violáceos
Tamaño de las hojas	Ancho: de 10 a 20 cm Largo: hasta 60 cm	Ancho: 15 a 30 cm Largo: hasta 90 cm
Numero de lóbulos por hoja	10 a 12	8 a 11
Tamaño de sinuosidad	De 12 a 20 cm	De 15 a 30 cm
Forma del ápice	Corto-acuminado a redondeado	Obtusos a redondeados
Características de las flores	Estaminadas, perianto tubular de 1 a 1.5 mm de largo con pelos cortos y rígidos	Estaminadas, perianto tubular de 1 a 1.5 mm de largo
Características del fruto	Ovoide a elipsoide con 2 mm de largo, tuberculado de color marrón oscuro	Elipsoide, de 2 a 2.5 mm de largo, liso y de color marrón oscuro

5.2. Regiones del estado de Tabasco

Cuando se habla del sureste de México, se hace referencia a los estados que lo conforman, como Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. Particularmente, el estado de Tabasco está delimitado al norte por el Golfo de México, al sur con el estado de Chiapas, al este con el estado de Campeche, al oeste con el estado de Veracruz y al sureste con Guatemala [38]. Además, el estado de Tabasco se divide en dos regiones: región Grijalva y región Usumacinta, las cuales están delimitadas y toman los nombres de las cuencas que conforman los dos grandes ríos que cruzan el estado, que son el río Grijalva y el Usumacinta (Figura 3).

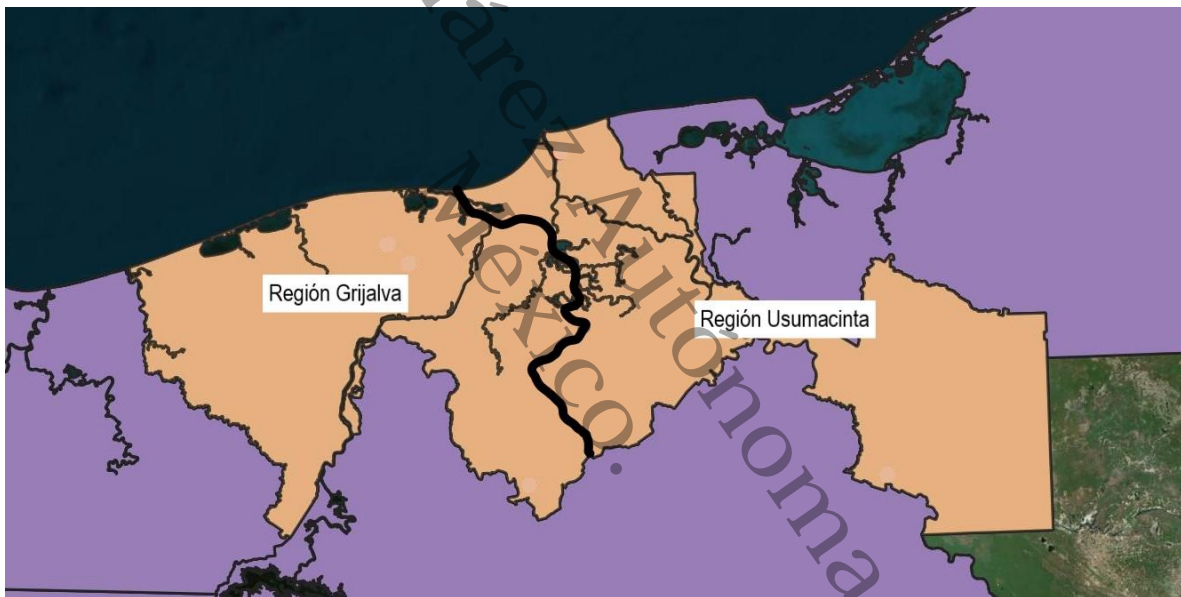


Figura 3. Regiones que conforman el estado de Tabasco; mapa creado mediante el programa QGIS® v 3.30.3.

Dentro de las regiones se agrupan subregiones que abarcan a municipios con características geográficas y productivas similares entre sí, actualmente se reconoce oficialmente la clasificación del estado de Tabasco en cinco subregiones, las cuales integran a los 17 municipios (Figura 4).

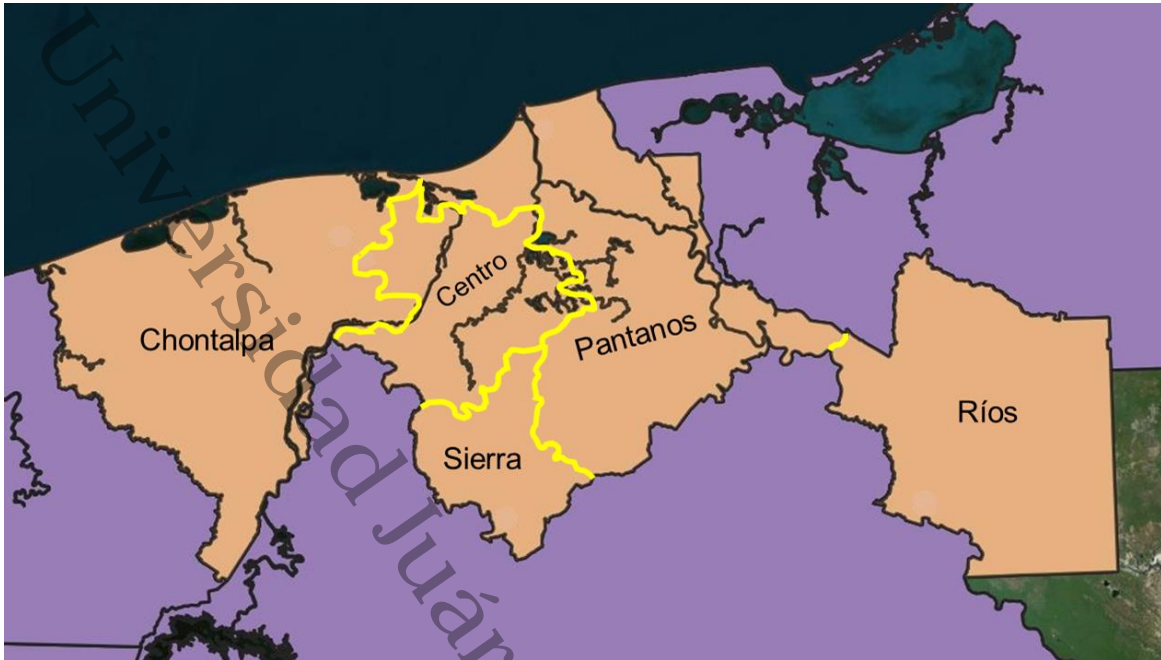


Figura 4. Subregiones del estado de Tabasco; mapa creado mediante el programa QGIS® v 3.30.3.

Cada una de las subregiones muestra características propias las cuales se mencionan a continuación:

La subregión Centro cuenta con una extensión de 2572.8 km², lo que corresponde al 10.15% de la superficie estatal. Los municipios que integran esta subregión son Centro, Jalpa de Méndez y Nacajuca. Cabe señalar que es en la subregión Centro donde se ubica la ciudad de Villahermosa que es la capital del estado. El ecosistema presenta un predominio de los pastizales con presencia escasa de selva subperennifolia cerca de zonas con suelos inundables. Asimismo, el municipio de Centro cuenta con una zona industrial muy importante, donde se realiza el procesamiento de productos como: cacao, arroz, cítricos, ganado bovino y porcino, los cuales han llevado a un uso exhaustivo del suelo [38].

La subregión Chontalpa incluye a los municipios de Cárdenas, Comalcalco, Cunduacán, Huimanguillo y Paraíso, con una extensión de 7606 km², lo que corresponde al 31% de la superficie estatal. Esta subregión está formada por llanuras susceptibles a inundación. Las principales actividades económicas son la ganadería bovina y ovina, para el caso de los municipios de Cárdenas y

Huimanguillo. Además, es importante la agricultura de riego temporal, donde los cultivos de maíz, frijol, cacao y caña de azúcar son los de mayor trascendencia. La industria petrolera tiene un papel económico muy importante, destacándose sobre todo en los municipios de Cárdenas, Cunduacán y Paraíso [38].

La subregión Pantanos cuenta con una superficie de 6588.4 km², que comprende a los municipios de Centla, Jonuta y Macuspana (33.74 %). La subregión Pantanos está denominada de esta forma, por la presencia de numerosos cuerpos acuáticos como pantanos y lagunas, esto como resultado de abundantes lluvias en colinas y montañas adyacentes. En esta subregión se encuentra ubicada la Reserva de la Biósfera de los Pantanos de Centla y en el municipio de Macuspana se presentan yacimientos alumínicos, principalmente de arcillas latéricas, caliuíticas y bauxíticas, así como bancos de arena, dolomita y grava, además de presentar yacimientos petrolíferos [38].

La subregión Ríos, con una superficie de 6234.2 km², que representa el 24.67 % del total del estado, incluye a los municipios de Balancán, Emiliano Zapata y Tenosique. Su nombre deriva de los ríos Usumacinta, San Pedro y Chacamax los cuales son los más importantes de esta subregión, donde se encuentra la reserva selvática más importante del país. Una de las actividades que predomina en esta subregión es la pesca, debido a los cuerpos de agua existentes [38].

La subregión Sierra, cuenta con una extensión de 1799.4 km², que representa el 7.35% de la superficie territorial, está conformada por los municipios de Jalapa, Tacotalpa y Teapa. Su nombre se debe a que se encuentra en el inicio de la Sierra Madre Central del estado de Chiapas, donde el tipo de vegetación consiste en un selva alta perennifolia y media subperennifolia, así como pastizales y algunos popales. Los cultivos de mayor importancia son cacao, café, frijol, maíz y plátano, dado que las características del suelo permiten una intensiva actividad agrícola. Además, esta subregión muestra una gran actividad pecuaria, dando lugar a agostaderos, lo que lleva a un cambio drástico en el uso del suelo, con pérdida de pastizales. Asimismo, el municipio de Teapa cuenta con yacimientos de minerales de tipo alumínicos y bancos de dolomita, grava y arena [38].

5.3. Marcadores químicos

Actualmente la caracterización fitoquímica de una planta medicinal se apoya principalmente en la determinación de los marcadores químicos [39], esta denominación se confiere a metabolitos o grupos de metabolitos definidos para una especie vegetal o sus derivados, los cuales sirven para establecer controles de calidad, independientemente si muestran o no una actividad farmacológica. En ese sentido, existen dos criterios que permiten establecer a los marcadores químicos: por una parte, metabolitos secundarios responsables de la actividad farmacológica de una especie vegetal y, por otra parte, los metabolitos que sean característicos de cada especie o taxón [40]. La determinación analítica de los marcadores químicos puede realizarse mediante diversos procedimientos [7].

5.4. Espectrofotometría UV-Vis

Se caracteriza por la absorción de radiación en moléculas orgánicas, donde el resultado es la interacción de los fotones y electrones que participan en la formación de enlaces o que se encuentran cerca de heteroátomos como: oxígeno, azufre, nitrógeno o halógenos. La región del espectro electromagnético donde se lleve a cabo la absorción va a depender de la fuerza de los enlaces que se encuentren en una estructura molecular, generalmente, estas estarán situadas en la región de longitud de onda ultravioleta (180 - 400 nm) y Visible (400 – 780 nm) [41].

5.4.1. Cuantificación de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu

Este método permite la cuantificación de metabolitos del tipo fenol presentes en un extracto vegetal, mediante el empleo del reactivo Folin-Ciocalteu (FC), como agente principal, el cual consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, lo que resulta en una solución de color amarillo, a partir de esta mezcla, se producen iones de molibdato y tungsteno. La reacción ocurre en condiciones alcalinas, generalmente a pH 10, con el propósito de generar el ion fenolato que reduzca al reactivo FC mediante una reacción redox y con ello se forme un complejo de Mo (V), el cual muestra una coloración azul, cuya longitud de onda de máxima absorción es de 760 nm (Figura 5) [42].

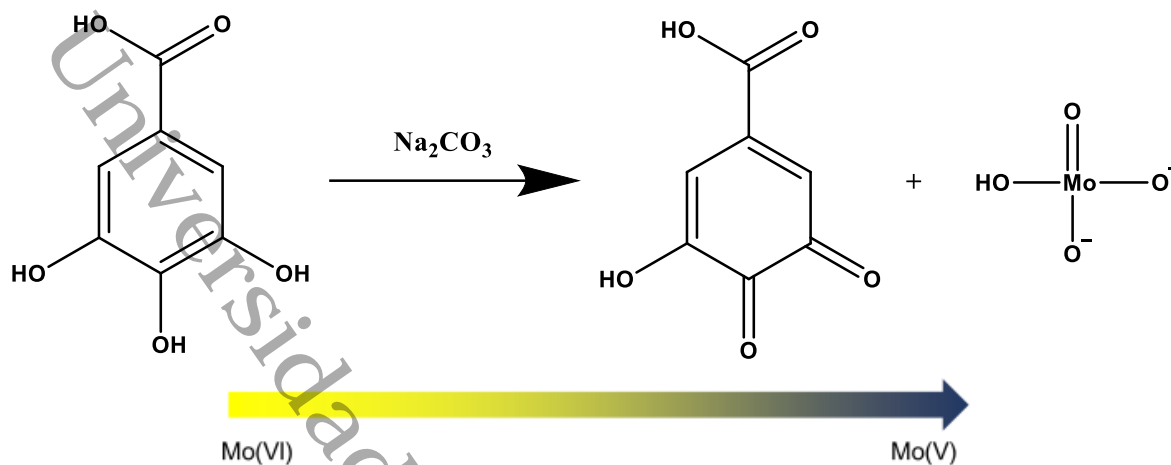


Figura 5. Mecanismo de reacción implicado en el método de Folin-Ciocalteu

5.4.2. Cuantificación de flavonoides mediante colorimetría

Los compuestos del tipo flavonoide con una estructura 3',4'-dihidroxi-sustituida pueden generar complejos coloridos al reaccionar con el sistema $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$, la reacción se lleva a cabo entre los iones de aluminio y las estructuras de los flavonoides, en medio alcalino, formando quelatos de color rojo y que presentan una banda de absorción máxima a 510 nm (Figura 6) [43].

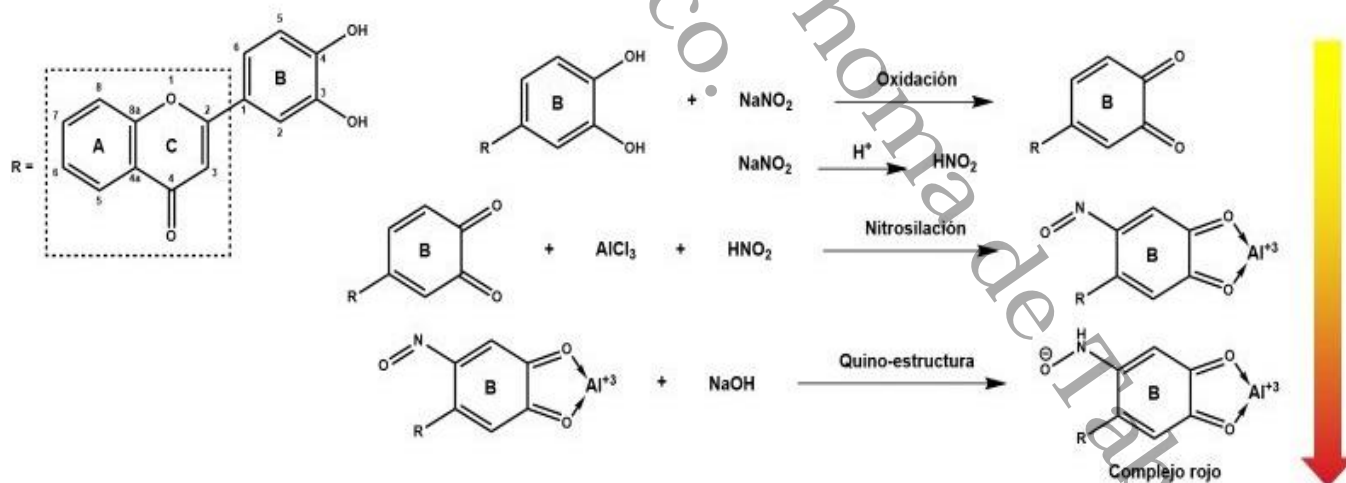


Figura 6. Mecanismo de reacción de la formación de los quelatos entre las estructuras de los flavonoides y el ion Al^{3+} .

5.5. Cromatografía

Es un método de análisis que permite la separación de componentes de una mezcla por medio de adsorción selectiva, esto mediante la interacción que se lleva a cabo entre los solutos de una mezcla, una fase estacionaria y una fase móvil.

La relación entre la polaridad de la fase estacionaria y la polaridad de la fase móvil permite diferenciar dos métodos cromatográficos, como la fase “normal” la cual está constituida por una fase estacionaria polar y una fase móvil de baja polaridad, donde los compuestos de alta polaridad se quedan retenidos en la fase estacionaria por más tiempo, mientras que los compuestos de baja polaridad tienen mayor afinidad por la fase móvil y por lo tanto, permanecen menos tiempo retenidos en la fase estacionaria. Por otra parte, se habla de la fase “reversa”, la cual se caracteriza por tener una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, de esta manera, los compuestos poco polares son retenidos por más tiempo en la fase estacionaria, mientras que los compuestos más polares son arrastrados por la fase móvil al mostrar una mayor afinidad [44].

5.5.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Es una técnica analítica la cual comprende dos aspectos principales, como la cinética de migración de la zona cromatográfica, la cual es responsable de ensanchamiento de la banda y el aspecto termodinámico, como responsable de la retención de los analitos en la columna. Asimismo, la velocidad de migración de la zona cromatográfica está determinada por interacciones entre el analito, la superficie de la fase estacionaria y la afinidad con la fase móvil.

Un enfoque de la separación desde el punto de vista analítico, es llevar a cabo una separación completa, lo que se traduce a la mejora de la resolución. En ese sentido, la información que se puede obtener a partir de un cromatograma obtenido de una cromatografía líquida de alta resolución, se presenta en la Figura 7, donde los descriptores se utilizan para informar las características de la columna cromatográfica, el sistema y separación, como el tiempo de retención, anchura del pico, eficiencia y resolución [45].

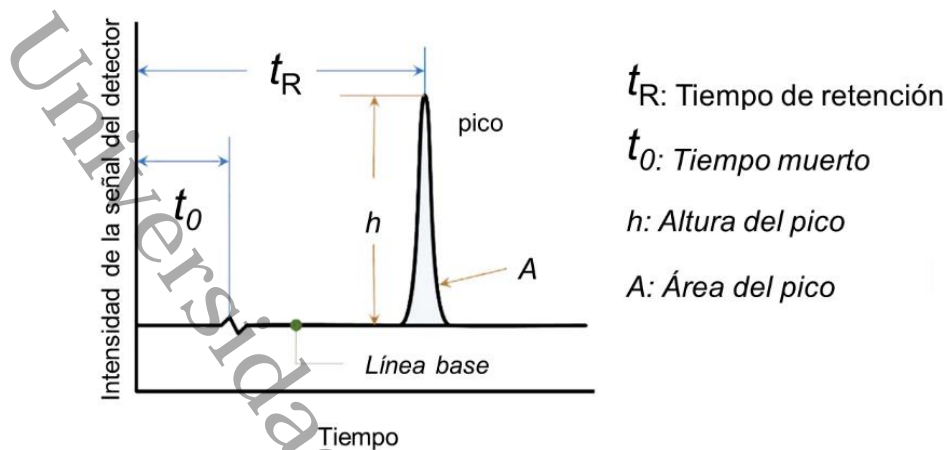


Figura 7. Representación de un cromatograma analítico. Construcción propia a partir de Shimadzu [46].

5.6. Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica que permite el estudio estructural de una molécula a través de un fenómeno que ocurre por la interacción electromagnética, en el orden de radiofrecuencias, con los núcleos de ciertos átomos que se encuentran inmersos en un campo magnético externo y que presenten un número impar de protones, neutrones o ambos. De acuerdo con lo anterior, el fenómeno se centra en el núcleo del átomo, el cual está caracterizado por mostrar un movimiento de rotación sobre su eje (*spin*), creando un momento magnético en el núcleo. Así, el *spin* en ausencia de un campo magnético externo se orienta de manera aleatoria y cuando se aplica un campo magnético B_0 , los núcleos se alinean en la dirección del campo magnético pero el sentido queda determinado por la dirección del giro del núcleo, dando lugar a dos poblaciones; por una parte, una población con un estado de alta energía y por otro, una población con un estado de baja energía. En ese sentido, una vez que se aporte la energía necesaria mediante pulsos de radiofrecuencias, los núcleos de baja energía pasan a un estado de alta energía. Al cesar el pulso, el vector comienza a precesar libremente liberando energía, caracterizada por una frecuencia portadora con potencia y duración (Figura 8), posterior a la incidencia de un pulso electromagnético, el vector de magnetización volverá a su posición de equilibrio y esto ocurrirá mediante dos procesos de relajación, conocidos como relajación

longitudinal (T_1), el cual se refiere a que la magnetización se va recuperando en la misma dirección que el campo magnético externo y la relajación transversal (T_2), que se refiere a que la magnetización transversal precesa en un plano perpendicular al eje del campo magnético externo. Al colocar un detector en alguno de los ejes perpendiculares, se puede detectar indirectamente el decaimiento de la magnetización para obtener la señal de RMN o FID (*Free Induction Decay*, por sus siglas en inglés); finalmente, se debe aplicar una Transformada de Fourier para poder convertir la magnitud tiempo a frecuencias de contenida en la señal FID [47].

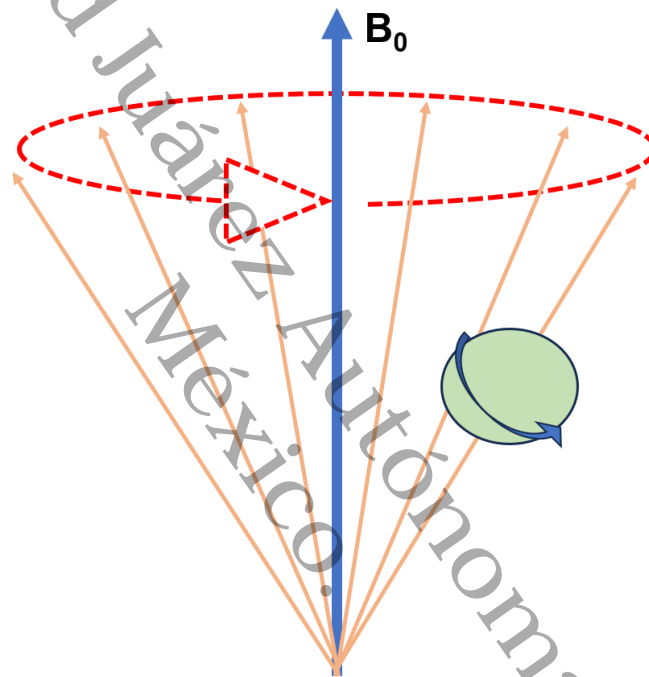


Figura 8. Movimiento de precesión. Construcción propia a partir de Prasad [48].

Una vez obtenidos los datos espectrales de una muestra en estudio, se realiza una serie de operaciones básicas que incluyen la corrección de fase del espectro, corrección de línea base y el ajuste del desplazamiento químico, con el objetivo de corregir el aumento o disminución del valor auténtico de las variables que se pretenden determinar. La combinación de la espectroscopia de RMN con el análisis estadístico constituye una herramienta para aumentar la extracción de la información presente en los complejos datos espectrales.

5.7. Análisis multivariado

El análisis de datos multivariado integra el estudio estadístico de variables medidas en elementos de una muestra, con el objetivo de resumir los datos mediante un pequeño conjunto de variables, construidas a partir de transformaciones de los datos originales, con la mínima pérdida de información. Esto permitirá encontrar grupos en los datos, clasificar nuevas observaciones en grupos definidos y relacionar dos conjuntos de variables [6].

5.8. Determinación de azúcares reductores

El método Miller, indica que los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo ciertas condiciones. Cuando el DNS es reducido en presencia de calor, por acción de los azúcares reductores que entran en contacto con él, se observa un cambio de color (de amarillo a rojo; Figura 9). El cambio de coloración puede entonces determinarse espectrofotométricamente a una determinada longitud de onda [49].

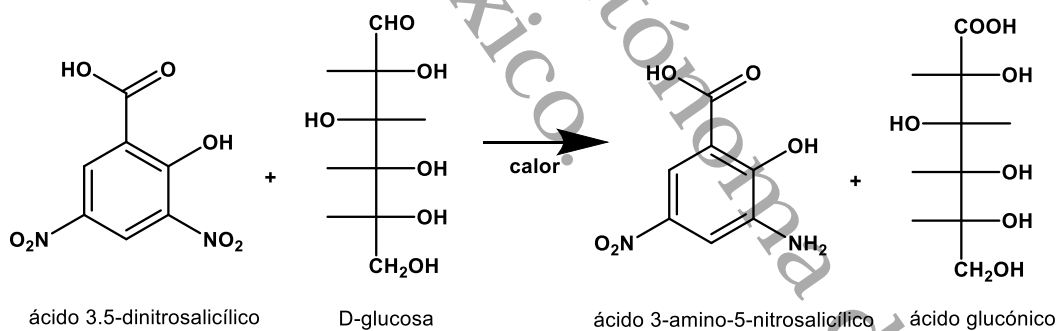


Figura 9. Reacción general de conversión de azúcares reductores mediante DNS.

6. Justificación

El contenido metabólico de una planta es amplio y una extraordinaria reserva de nuevas moléculas. Asimismo, en los últimos años, el interés por la búsqueda de productos naturales como fuente de nuevos agentes terapéuticos no ha dejado de crecer. Por otra parte, el desarrollo de sistemas de análisis que permitan combinar diferentes técnicas analíticas representa un avance significativo en el campo de la fitoquímica. Esta evolución instrumental ha permitido combinar las ventajas que presentan las diferentes técnicas de análisis para poder dar una respuesta global al problema biológico mediante el estudio del contenido metabólico, empleando técnicas cromatográficas y espectrofotométricas. En este sentido, un modelo de estudio del contenido metabólico con la intervención conjunta de estas técnicas lo representa el género *Cecropia*, dado que es una planta empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Asimismo, se reconoce también la variabilidad regional donde se encuentren localizadas estas especies lo que podría influir en diferencias en el contenido metabólico. Particularmente, en el estado de Tabasco, ubicado en el sureste mexicano, integrado por cinco subregiones (Centro, Chontalpa, Pantanos, Ríos y Sierra) delimitadas por aspectos geográficos, culturales y productivos, sus habitantes emplean tradicionalmente las hojas de ambas especies de *Cecropia* en forma de infusión para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, no se han encontrado reportes donde se efectúe un análisis fitoquímico y metabolómico de las especies de *Cecropia spp.* utilizadas en las diferentes subregiones de Tabasco; por lo que, para promover el uso racional de los extractos y productos derivados de estas plantas, se requiere contar con información que permita un reconocimiento adecuado de sus contenidos fitoquímicos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue caracterizar y comparar la composición metabólica del extracto hidroalcohólico de las hojas de especies de *Cecropia spp.*, recolectadas en las cinco subregiones del estado de Tabasco, enfatizando en el estudio del ácido clorogénico, isoorientina, orientina y un análogo de vitexina, reconocidos como marcadores químicos para este género, además, aplicando un enfoque analítico multivariado, con la finalidad de tener una visión integral de la composición química de estas especies.

7. Objetivo general

Establecer el perfil metabólico y la huella metabólica, así como el efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de especies de *Cecropia*, colectadas en las cinco subregiones del estado de Tabasco.

7.1. Objetivos específicos

- ✓ Recolectar e identificar taxonómicamente el material vegetal en las cinco subregiones del estado de Tabasco y obtener el extracto hidroalcohólico correspondiente mediante maceración.
- ✓ Determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico mediante técnicas colorimétricas.
- ✓ Caracterizar y cuantificar mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) los marcadores químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia*.
- ✓ Realizar el análisis de RMN-¹H del extracto hidroalcohólico obtenido de las especies de *Cecropia* y efectuar un análisis multivariado de los perfiles espectroscópicos obtenidos.
- ✓ Determinar el contenido de azúcares reductores en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cecropia spp.*
- ✓ Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia* mediante una curva de tolerancia a la glucosa en ratones.

8. Metodología

La Figura 10 muestra el esquema general de la metodología a seguir en este proyecto.

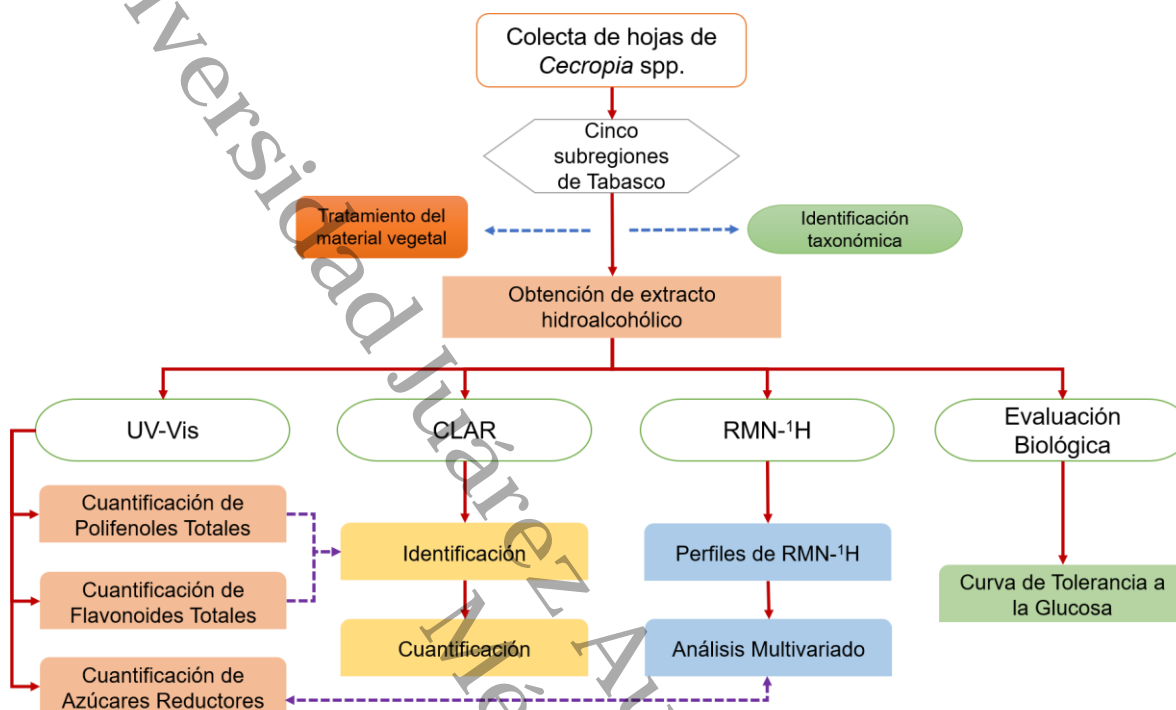


Figura 10. Esquema general de la metodología.

8.1. Material vegetal y obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de especies *Cecropia*

La colecta de las hojas de las especies de *Cecropia* fue realizada de manera aleatoria, la cual abarcó las cinco subregiones del estado de Tabasco (Centro, Chontalpa, Pantanos, Ríos y Sierra), en los periodos de marzo - mayo y agosto de 2021. La colecta fue de especímenes maduros, para ello se tomó como referencia una altura de la planta mayor a 2 metros y se realizó por triplicado, con el objetivo de obtener una muestra representativa de las hojas de cada especie, generando un total de 15 extractos. Los datos correspondientes a la geolocalización de cada uno de los puntos de colectada fueron tomados mediante la aplicación de Google maps®. Finalmente, un espécimen de cada colecta fue depositado en el Herbario de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México, para su identificación taxonómica y resguardo.

Las hojas de *Cecropia spp.* fueron secadas al abrigo de la luz durante 72 h, con posterior molienda (4-6 mm) en un molino Pulvex MP300. Los extractos fueron obtenidos mediante maceración, empleando una mezcla etanol:agua en una proporción 70:30. Después, los extractos fueron filtrados y concentrados en un rotaevaporador (Büchi R-300, FLaxil). Posteriormente, los extractos fueron liofilizados empleando una liofilizadora (Freeze Dryer, Scientz-10N). El proceso anterior se llevó a cabo por triplicado en cada colecta, para una extracción exhaustiva. Finalmente, se realizó el cálculo del rendimiento obtenido del extracto hidroalcohólico, mediante la siguiente ecuación [50].

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

8.2. Contenido de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El contenido de fenoles totales fue determinado de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu. Se disolvieron 10 mg de cada extracto en 1 mL de MeOH y se tomó una alícuota de 100 μ L agregando 250 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu y 1400 μ L de H₂O con incubación de 3 minutos. Posteriormente, se añadieron 250 μ L de NaCO₃ al 20 % e incubando la mezcla durante 2 h al abrigo de la luz. La absorbancia fue determinada a 760 nm en un espectrofotómetro (GENESYS™ 10S UV-Visible Spectrophotometers, Thermo Scientific). La curva de calibración fue preparada con soluciones estándar de ácido gálico en MeOH (0.001, 0.002, 0.004, 0.006 y 0.007 mg/mL); la cual mostró una R² de 0.9991 (Véase Anexo 13.1) y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg EAG/g E). Este análisis se realizó por triplicado [42].

8.3. Contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El contenido de flavonoides totales fue realizado mediante un ensayo colorimétrico, mezclando una alícuota de 100 μ L de cada extracto previamente diluido en MeOH (5 mg/mL), con 1675 μ L de H₂O y 75 μ L de NaNO₂ (5% v/v). Después de 5 minutos se incorporaron 150 μ L de AlCl₃ (10% v/v) y la reacción fue detenida 6 minutos

después por la adición de 500 μL de NaOH (1 M). La absorbancia de la muestra fue determinada a 510 nm en un espectrofotómetro (GENESYS™ 10S UV-Visible Spectrophotometers, Thermo Scientific) y la curva de calibración fue preparada con soluciones de un estándar de rutina (10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la cual mostró una R^2 de 0.9994 (Véase Anexo 13.1). Finalmente, los resultados fueron expresados como mg equivalentes de rutina por g de extracto (mg ER/g E). El análisis fue realizado por triplicado [43].

8.4. Análisis de CLAR-DAD y cuantificación de ácido clorogénico, isoorientina, orientina y vitexina en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El análisis cromatográfico fue realizado de acuerdo con lo descrito por Gallegos-García [51], empleando un cromatógrafo Waters 2695 con un módulo de separación Waters 2696 y un detector de arrastre de fotodiodos con un software Empower Pro (Waters Corporation). Se utilizó una columna Supercosil LC-F (4.6 mm x 250 mm i.d., tamaño de partícula de 5 μm ; Sigma-Aldrich). Asimismo, la fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.5%, como solvente A y acetonitrilo como solvente B, con el siguiente gradiente: 0-1 min, 0% de B; 2-3 min, 5% de B; 4-20 min, 30% de B; 21-23 min, 50% de B; 24-25 min, 80% de B; 26-27 min, 100% de B; 28-30 min, 0% de B; con un caudal de 0.9 mL/min. El volumen empleado para cada muestra fue de 10 μL . Posteriormente, se realizó un escaneo espectrofotométrico de 200 a 600 nm y se observó que, al ajustar el detector a 330 nm, la distorsión de la línea base disminuyó, los picos se mostraron más definidos y las bandas de absorción presentaron una mayor definición para los compuestos identificados.

La cuantificación de ácido clorogénico, isoorientina, orientina y vitexina fue realizada utilizando curvas de calibración de un estándar externo. Cada curva fue construida mediante la inyección de 50 μL de una serie de diluciones de ácido clorogénico (C3878-Sigma-Aldrich), isoorientina (78019-Sigma-Aldrich) u orientina (55736-Sigma-Aldrich), para el caso de vitexina, se preparó una curva con soluciones estándar de apigenina (42251-Sigma-Aldrich), todos estos estándares se disolvieron en MeOH (12, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las curvas de calibración se tomaron con base en el área de los picos obtenidos de los cromatogramas a 330

nm para el caso del ácido clorogénico y a 350 nm para isoorientina, orientina y vitexina. Las curvas de calibración mostraron un R^2 de 0.998, 0.999, 0.999 y 0.998, respectivamente (Véase Anexo 13.2). Los resultados se presentan como mg por g de extracto. [14, 52]. Finalmente, para visualizar las diferencias en el contenido de los marcadores químicos en las especies de *Cecropia*, fue determinado el Contenido Total de Marcadores Químicos (CTMQ), el cual fue expresado como la suma de las concentraciones de cada marcador químico (ácido clorogénico, isoorientina, orientina y el análogo de vitexina) en cada una de las muestras.

8.5. Perfiles de RMN-¹H y análisis multivariado del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

Los experimentos de RMN-¹H fueron realizados de acuerdo con lo descrito por Hernández-Bolio [53]. Las muestras fueron procesadas a 25°C en un equipo Varian 600 MHz AR Premium Compact. Se disolvieron 10 mg de cada extracto en 700 µL de D₂O (0.05% TSP) a un pH de 7.3 transfiriéndose la mezcla a un tubo de RMN de 5-mm de diámetro. Cada espectro de RMN-¹H fue registrado bajo los siguientes parámetros: ancho de pulso: 5.9 µs, tiempo de relajación: 1.0 s, tiempo de adquisición 3 s, número de transientes: 64 con datos recogidos en 65k puntos de datos (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de adquisición de los espectros de RMN-¹H del extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia*.

Parámetros	
Temperatura	25°C
pH	7.3
Ancho de pulso	5.9 µs
Tiempo de relajación	1.0 s
Tiempo de adquisición	3 s
Número de transientes	64
Datos recogidos	65k

Además, se usó una secuencia de presaturación para suprimir la señal de H₂O residual con irradiación selectiva de baja potencia a la frecuencia de H₂O durante el retraso de reciclado.

Los espectros resultantes se procesaron de la siguiente manera: se aplicó una función gaussiana con un factor de ensanchamiento de la línea a 0.3 Hz, con un

ajuste manual de la fase y una corrección automática de la línea base. La referencia se fijó con 3-trimetilsilil-[2,2,3,3-d4]-propionato de sodio (TSP; 0.0 ppm) mediante el programa MNova versión 12.0 (Mestrelab Research). Después de apilar los espectros, se eliminó la región de desplazamientos químicos entre 4.6 - 4.8 ppm (correspondiente a D₂O), para descartar los efectos de estas señales abundantes en el análisis multivariado. A continuación, los espectros fueron normalizados con respecto a la señal de TSP y divididos en intervalos de 0.04 ppm, para obtener un total de 300 regiones. Los perfiles de RMN-¹H se modificaron al formato *.csv mediante MNova y exportados a Excel (Microsoft®, 2016). El análisis multivariado fue realizado mediante un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) usando el software MetaboAnalyst en su versión 5.0 [54]. Las señales que mostraron diferencias entre especies y/o que influenciaron la discriminación de las muestras fueron atribuidas a metabolitos específicos usando el Software Chenomx NMR suite (v8.3, versión de evaluación, Chenomx Inc.).

8.6. Determinación del contenido de azúcares reductores en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El ensayo de azúcares reductores se realizó mediante la reacción con DNS, descrito por Miller en 1959 [49]. Para la aplicación de este método, se disolvieron 0.8 g de NaOH en agua destilada, añadiendo 15 g de tartrato de sodio y potasio, manteniendo en agitación hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se agregaron 0.5 g de DNS, aforando a 50 mL con agua destilada. Esta solución se mantuvo en agitación 24 h después de su preparación en un frasco ámbar, para evitar la formación de precipitados. Para el ensayo, se mezclaron 100 µL de cada muestra con 250 µL del reactivo DNS, llevando a ebullición por 5 min en baño maría, posteriormente se detuvo la reacción con baño de hielo, se agregaron 2.5 mL de agua destilada y 15 minutos después se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro GENESYSTM 10S (Thermo Scientific). Este análisis se realizó por triplicado para cada muestra. La curva de calibración fue preparada con soluciones estándar de glucosa en agua destilada (200, 250, 300, 350 y 400 µg/mL); la cual mostró una R² de 0.998 (Véase Anexo 13.1). Los resultados fueron

expresados como mg de equivalentes de glucosa por g de extracto (mg E glucosa/g E).

8.7. Evaluación preliminar del efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El empleo de animales se realizó siguiendo los protocolos de cuidado y uso de animales del laboratorio que se encuentran en la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 [55].

8.7.1. Diseño Experimental

En la Figura 11 se muestra de manera general la evaluación del efecto hipoglucemiante mediante el ensayo de curva de tolerancia a la glucosa (CTG), de acuerdo con lo descrito por Zhou [56], con ligeras modificaciones.

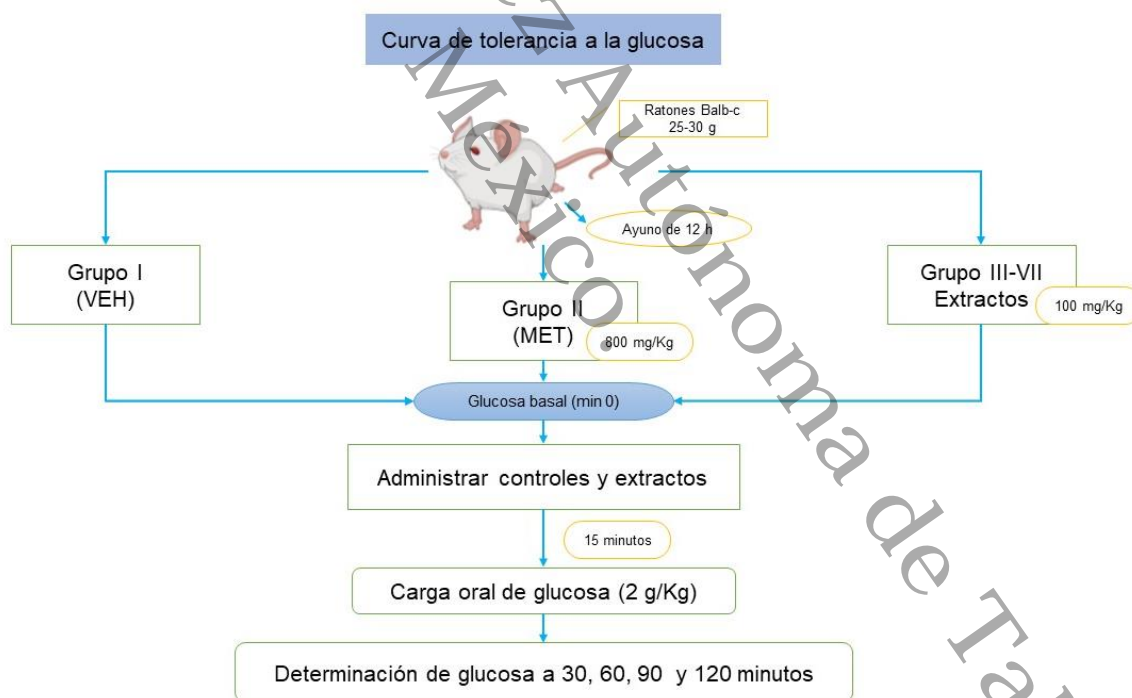


Figura 11. Diseño experimental de la evaluación hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *Cecropia spp.* un ensayo de Curva de tolerancia a la glucosa

De manera general, fueron empleados ratones Balb-c macho adaptados a condiciones de bioterio con periodos de luz/oscuridad de 12 x 12 horas y una temperatura ambiente promedio de 25 °C, con acceso libre de alimento comercial Harlan para roedores y agua purificada. Fueron considerados siete grupos de

ratones con un peso inicial aproximado de 25-30 g ($n=6$). Los grupos se estructuraron de la siguiente manera: **VEH**, control de vehículo Tween 80; **MET**, al cual se le administró metformina como fármaco de referencia (800 mg/kg) y los cinco grupos restantes administrados con el extracto hidroalcohólico (100 mg/kg) de las muestras de *Cecropia spp.*, analizadas. Cabe mencionar que las dosis empleadas en este trabajo son preliminares, con la finalidad de marcar una pauta para posteriores evaluaciones que permitan evidenciar el efecto hipoglucemiante de las muestras de *Cecropia spp.* Los ratones fueron empleados con ayuno de 12 horas previas a la prueba, evaluando en primer término la concentración de glucosa basal a cada ratón, por punción directa en la vena caudal de la cola empleando un glucómetro (Accu-Chek®, Roche DC), considerándose esta determinación como minuto cero, posteriormente los controles y los extractos de *Cecropia spp.*, fueron administrados por vía oral. Después de 15 minutos, fue administrada una carga oral de glucosa (2 g/kg), con posterior determinación de los niveles de glucosa a los 30, 60, 90 y 120 minutos [56].

8.8. Análisis estadístico

Para el contenido total de polifenoles, flavonoides y azúcares reductores, así como para la cuantificación de ácido clorogénico, isoorientina, orientina y el análogo de vitexina, los datos fueron expresados como la media \pm error estándar ($n=3$), aplicando un análisis ANOVA, seguido de un análisis de Tukey, con un nivel de significancia del 95% ($p<0.05$).

En el caso del modelo de curva de tolerancia a la glucosa, los datos se expresaron como la media \pm error estándar ($n=6$) de un curso temporal de 120 min. Posteriormente, se determinó el área bajo la curva de todo el curso temporal, a estos resultados se le realizó un análisis estadístico mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunnett, con un nivel de significancia del 95% ($*p<0.05$). El análisis estadístico fue realizado empleando el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software).

9. Resultados y discusión

La Tabla 4 presenta los datos correspondientes a las coordenadas geográficas de los puntos donde fueron colectadas cada una de las muestras de *Cecropia*. La identificación taxonómica permitió distinguir dos especies de *Cecropia* colectadas en las cinco subregiones de Tabasco, de las cuales cuatro corresponden a *Cecropia peltata* y una a *Cecropia obtusifolia*, asimismo, se muestra el número de identificación (NID) asignado para cada una de las muestras colectadas (Véase anexo 13.3).

Tabla 4. Geolocalización del sitio de colecta e identificación taxonómica de las especies de *Cecropia*

No.	Subregión	Municipio	Coordenadas	Especie	NID
1	Centro	Jalpa de Méndez	N 18°11'50.046" / W 93°10'15.2544"	<i>C. peltata</i>	36575
2	Chontalpa	Comalcalco	N 18°15'47.0916" / W 93°14'22.884"	<i>C. peltata</i>	36575
3	Pantanos	Centla	N 18°32'22.8084" / W 92°38'11.7852"	<i>C. peltata</i>	36666
4	Ríos	Tenosique	N 18°11'50.046" / W 93°10'15.2544"	<i>C. peltata</i>	36575
5	Sierra	Tacotalpa	N 17°27'28.2024" / W 92°46'46.2108"	<i>C. obtusifolia</i>	36667

Los puntos de colecta se muestran en la Figura 12.

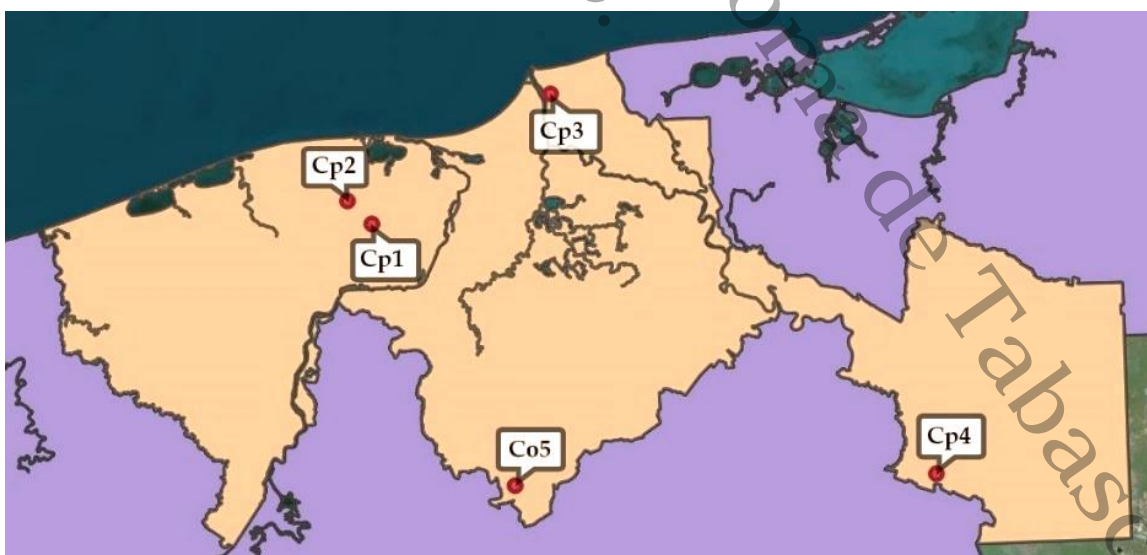


Figura 12. Puntos de colecta en Tabasco, México, de hojas de *C. peltata* (Cp1- Cp4) y *C. obtusifolia* (Co5); mapa creado mediante el programa QGIS® v 3.30.3.

Finalmente, se obtuvieron un total de 15 extractos y se identificaron como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Nomenclatura y porcentaje del extracto hidroalcohólico obtenido de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co).

Subregión	Nomenclatura*	Rendimiento %
Centro	Cp1a- c	9.3 ± 2.5
Chontalpa	Cp2a-c	10.5 ± 3.2
Pantanos	Cp3a-c	13.2 ± 2.6
Ríos	Cp4a-c	8.6 ± 1.8
Sierra	Co5a-c	10.5 ± 2.2

*a-c, corresponde al triplicado de cada muestra

La obtención del extracto hidroalcohólico por triplicado permitió realizar una cuantificación de los diferentes grupos de metabolitos establecidos en los objetivos de este trabajo.

9.1. Contenido de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

Los resultados del contenido polifenoles son mostrados en la Figura 13.

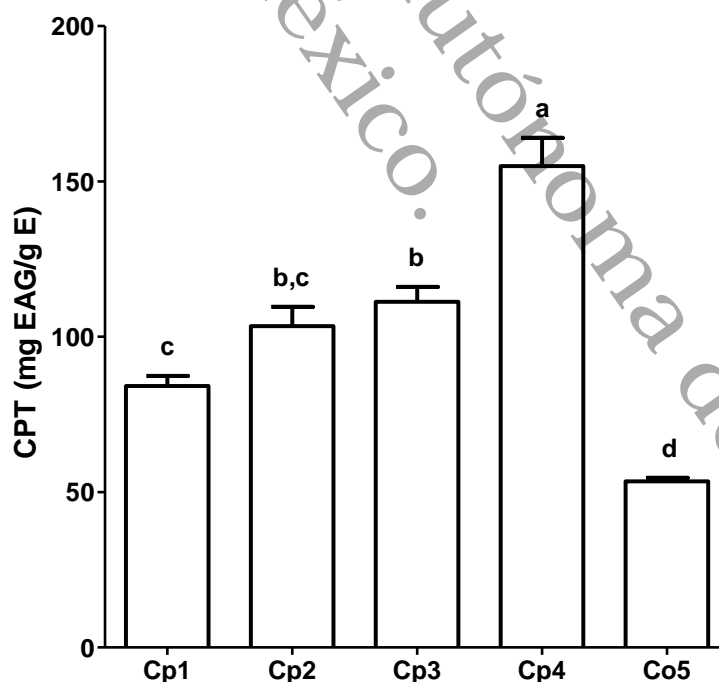


Figura 13. Análisis del contenido de polifenoles totales (CPT) en el extracto hidroalcohólico de hojas de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. CPT; mg EAG/g E: equivalentes de ácido gálico por g de extracto. Barras con misma letra representa que no hay diferencia entre los grupos a $p < 0.05$.

Se destaca que *C. peltata* de la subregión Ríos (**Cp4**) fue la que mostró mayor concentración de CPT (155 ± 9.1 mg EAG/g E), diferente significativamente con respecto a las demás, por otra parte, desde el punto de vista estadístico, **Cp2** de la región Chontalpa y **Cp3** de la región Pantanos (103.4 ± 6.3 y 111.3 ± 4.8 mg EAG/g E, respectivamente) no presentaron diferencias significativas entre sí. Asimismo, este agrupamiento estadístico fue observado con **Cp2** y **Cp1** de la región Centro (84.1 ± 3.3 mg EAG/g E). Cabe señalar que el extracto de *C. obtusifolia* de la región Sierra (**Co5**) fue el de menor concentración de polifenoles totales (53.5 ± 1.1 mg EAG/g E) y mostró diferencia significativa con respecto a las muestras de *C. peltata*. Estos resultados se compararon con reportes previos, ejemplo de ello fue el trabajo de Rivera-Mondragón [4], en donde se realizó el análisis de contenido de polifenoles totales en especies de *Cecropia* colectadas en diferentes sitios de Panamá, señalando que la especie con mayor contenido de estos metabolitos fue *C. obtusifolia* (437.9 mg EAG/g E). Estos hallazgos difieren con lo encontrado en este trabajo en donde son las muestras de *C. peltata* las que presentan el mayor contenido de polifenoles y es la muestra de *C. obtusifolia* la de menor contenido, lo que marca diferencias inter especie. Además, es importante destacar que las muestras en estudio presentan diferencias intra especie, como podemos observar con *C. peltata* de la subregión Ríos, la cual se distingue de las demás muestras de su misma especie por tener el mayor valor en CPT, asimismo, *C. peltata* de la subregión Chontalpa, muestra similitudes con *C. peltata* de las subregiones Centro y Pantanos, sin embargo, estas últimas, son diferentes entre sí. Estas diferencias pueden atribuirse a factores bióticos y abióticos como: el tipo de suelo, condiciones climáticas y localización geográfica, propios de cada región, lo cual se ve reflejado en el contenido de metabolitos específicos [2, 57]. Por lo tanto, estos resultados marcan una pauta para realizar estudios que permitan correlacionar los factores ambientales propios de cada subregión del estado de Tabasco y la producción de compuestos de tipo polifenólico en las especies de *Cecropia*.

9.2. Contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

En la Figura 14 se muestran los resultados del contenido de flavonoides totales.

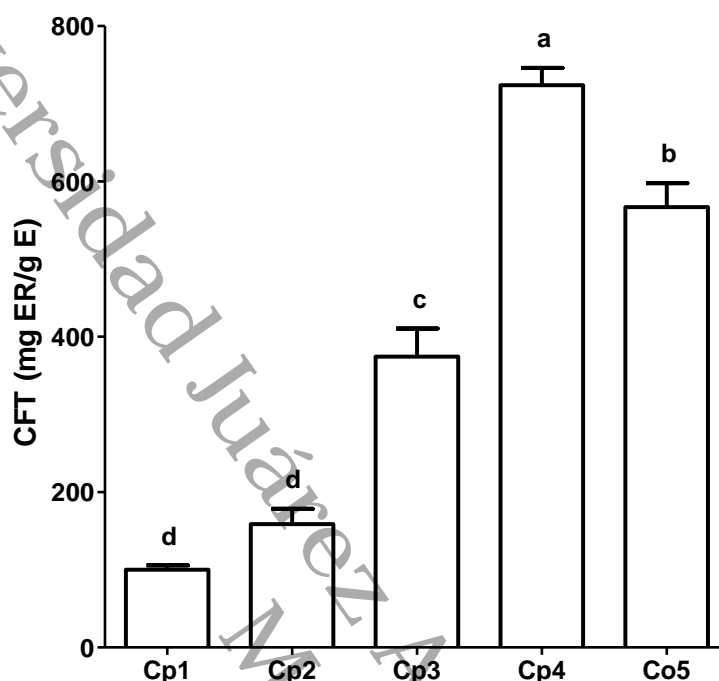


Figura 14. Análisis del contenido de flavonoides totales (CFT) en el extracto hidroalcohólico de hojas de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. CFT: mg ER/g E: equivalentes de rutina por g de extracto. Barras con misma letra representa que no hay diferencia entre los grupos a $p < 0,05$.

En el que *C. peltata* de la subregión Ríos (**Cp4**) fue la que mostró el mayor CFT (724 ± 22.2 mg ER/g E), diferente significativamente con respecto a las demás muestras, seguido de *C. obtusifolia* de la subregión Sierra (**Co5**; 567.1 ± 30.57 mg ER/g E) y *C. peltata* de la subregión Pantanos (**Cp3**; 374.5 ± 36.1 mg ER/g E) con diferencias significativas entre sí. Por otro lado, las muestras de *C. peltata* de la subregión Centro (**Cp1**) y subregión Chontalpa (**Cp2**), mostraron un contenido de flavonoides similar (100.1 ± 5.5 y 158.8 ± 19.6 mg RE/g E, respectivamente), sin diferencia significativa entre ambos extractos, resultando ser las muestras con menor CFT. De igual manera, estos resultados contrastan con lo descrito por Rivera-Mondragón [4], donde indica que *C. obtusifolia* es la especie que muestra un mayor contenido de flavonoides. En el caso de este grupo de metabolitos, se encontraron nuevamente diferencias intra e inter especie sin embargo, el perfil de las variaciones encontradas es diferente al caso de los compuestos polifenólicos.

De esta forma, la muestra de *C. obtusifolia* que presentó los niveles más bajos de polifenoles, está también separada de las muestras de *C. peltata* al analizar el contenido de flavonoides, pero en este caso porque tiene una concentración de estos metabolitos mayor al que presentan las muestras de *C. peltata* de tres subregiones. Por otro lado, las diferencias intra especie también se manifiestan, dado que la muestra de la subregión Ríos, mostró los niveles más altos de flavonoides totales. Cabe destacar nuevamente que estas diferencias pueden estar relacionadas a factores externos, como la localización geográfica y el tipo de clima de cada región [57]. Por lo tanto, se reafirma la necesidad de realizar estudios de correlación de los factores ambientales que influyen en la producción de metabolitos secundarios por parte de una planta, como la altitud, que, en ciertos estudios, muestra que hay una menor producción de este tipo de metabolitos.

9.3. Análisis de CLAR-DAD del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El análisis de los cromatogramas de CLAR-DAD obtenidos del extracto hidroalcohólico de *Cecropia spp.*, mostró la presencia de cinco compuestos, cuatro de mayor polaridad con tiempos de retención (t_R) que oscilan entre 8.5 a 9.1 min y un compuesto de baja polaridad ubicado en un t_R de 24.9 min (Figura 15).

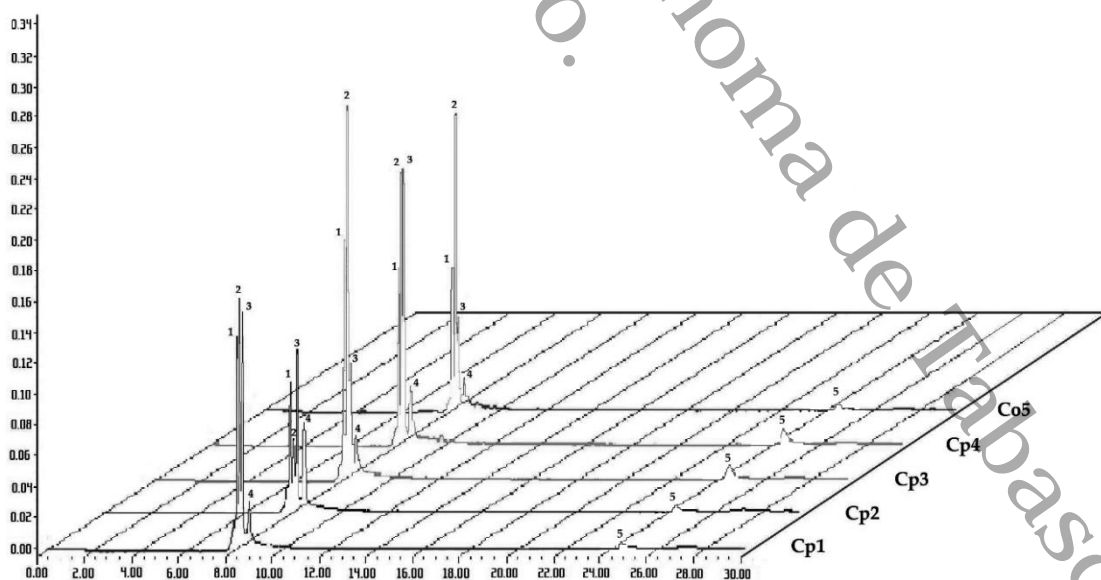


Figura 15. Cromatogramas de CLAR-DAD del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. Los picos se enumeran de manera ascendente de acuerdo con su t_R ($\lambda = 330$ nm). **1**, ácido clorogénico; **2**, isoorientina; **3**, orientina; **4**, análogo de vitexina; **5**, análogo de catequina.

En la Tabla 6 se muestra un resumen de los picos observados en los cromatogramas del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*, caracterizados de la siguiente forma: el pico 1, mostró bandas de absorción a λ_{\max} = 220.4 y 327.6 nm y un t_R de 8.53 min que coincidieron con las del estándar de ácido clorogénico, analizado en las mismas condiciones experimentales. Asimismo, los picos 2 y 3 fueron identificados como isoorientina (t_R de 8.65) y orientina (t_R de 8.78 min) con bandas a λ_{\max} = 208.7, 269.8, 351.7 y 215.7, 268.6, 345.8 nm, respectivamente, lo que coincide con los estándares analizados en las mismas condiciones experimentales. En el caso del pico 4, con un t_R 9.06 min y sus λ_{\max} = 215.7, 268.6 y 336.3 nm mostraron similitud con las bandas reportadas para un flavonoide glicosilado tipo flavona que puede atribuirse a un análogo de vitexina, compuesto que ha sido reportado para el género *Cecropia* [58 - 60]. Además, de los cuatro marcadores químicos, se identificó el pico 5, con un t_R de 24.9 min y bandas de absorción λ_{\max} = 209.9 y 279.3 nm, mostró similitud con un análogo esterificado de catequina (Véase Anexo 13.4a-b) el cual ha sido reportado previamente para este género [29]. Cabe destacar que los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por diversos autores para el estudio fitoquímico de *Cecropia spp.* [61 - 63].

Tabla 6. Análisis del perfil metabólico mediante CLAR-DAD del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

Pico	Tiempo de retención (min)	Bandas de absorción (nm)	Compuesto identificado	Referencia
1	8.53	220.4, 327.6	Ácido clorogénico	Estándar [54]
2	8.65	208.7, 269.8, 351.7	Isoorientina	Estándar [54]
3	8.78	215.7, 268.6, 345.8	Orientina	Estándar [54]
4	9.06	215.7, 268.6, 336.3	Análogo de vitexina	[54-56]
5	24.9	209.9, 279.3	Análogo de catequina	[29]

Asimismo, los resultados de la cuantificación mediante CLAR-DAD de los compuestos **1-4** son mostrados en la Figura 16a-b.

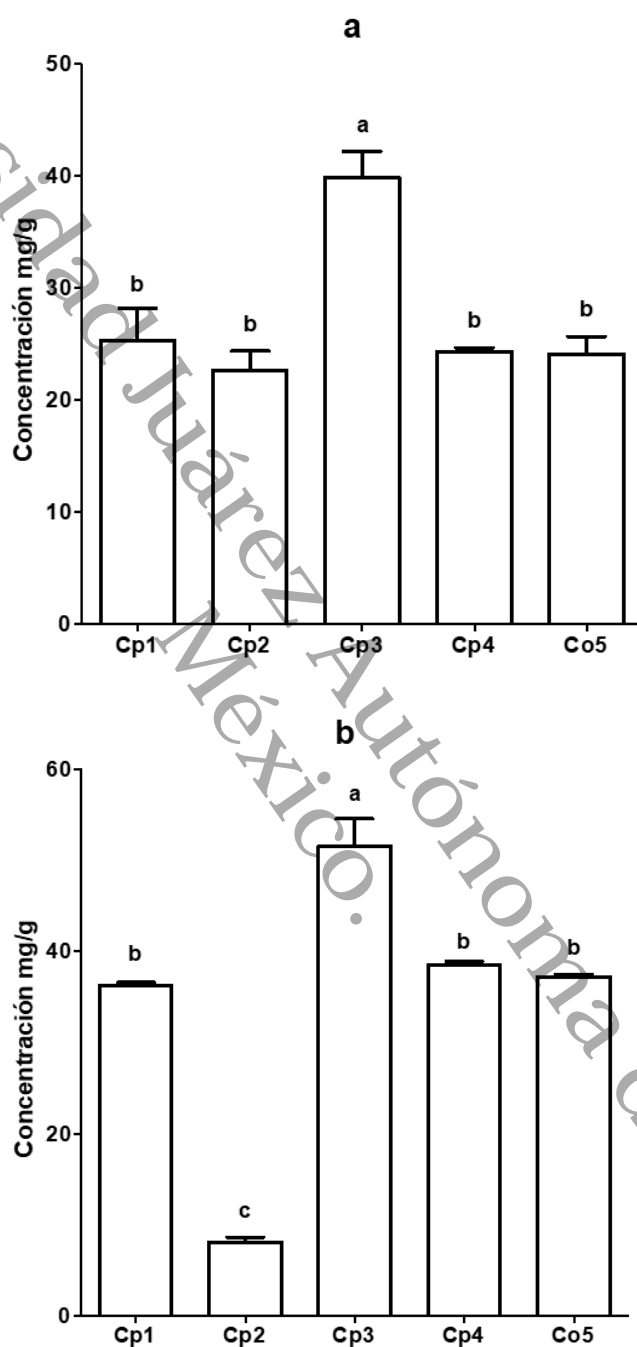


Figura 16a. Concentración (mg/g) de ácido clorogénico (**a**), isoorientina (**b**) en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (**Cp**) y *C. obtusifolia* (**Co**). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. Los datos son expresados como la media \pm error estándar ($n=3$) para cada extracto. La significancia estadística fue determinada usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey. Barras con misma letra (a-c) representa que no hay diferencia entre los grupos a $p < 0.05$.

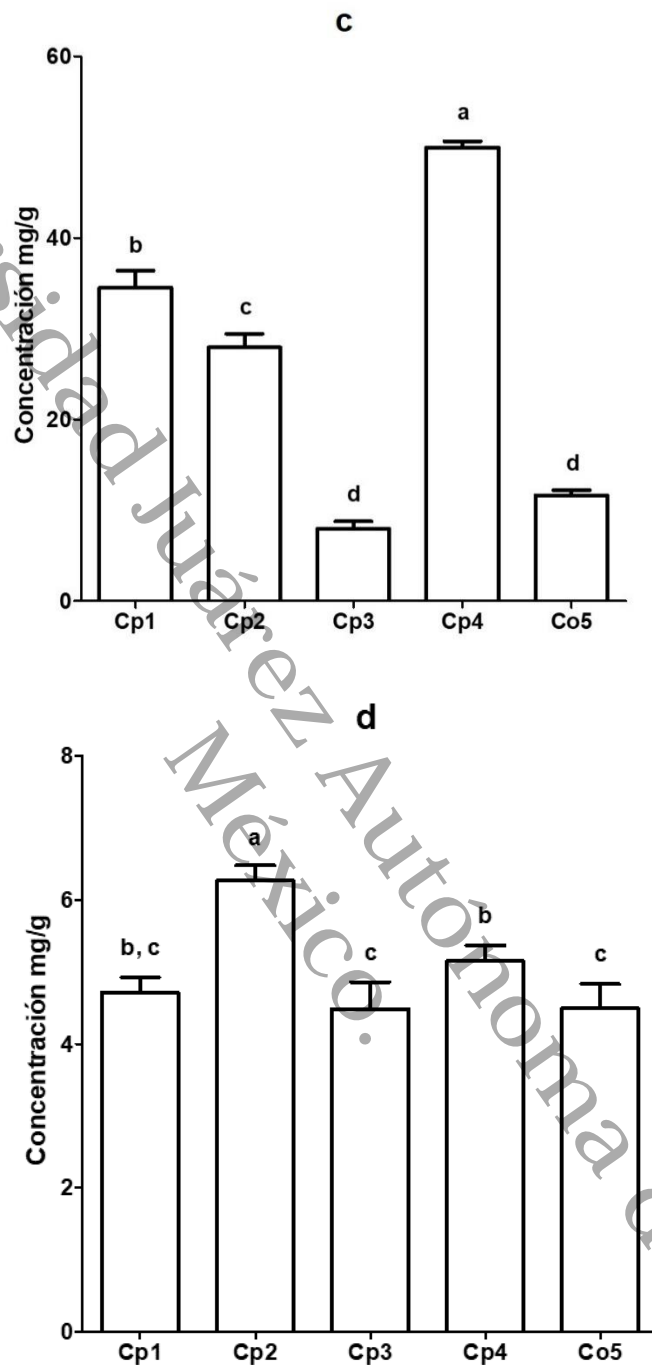


Figura 16b. Concentración (mg/g) de orientina (c) y el análogo de vitexina (d) en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. Los datos son expresados como la media \pm error estándar ($n=3$) para cada extracto. La significancia estadística fue determinada usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey. Barras con misma letra (a-d) representa que no hay diferencia entre los grupos a $p < 0.05$.

La muestra **Cp3** presentó las concentraciones más altas de ácido clorogénico e isoorientina: 39.8 ± 2.3 mg/g y 51.5 ± 2.9 mg/g, respectivamente. Además, los extractos de *C. peltata* (**Cp1** y **Cp4**) y el extracto de *C. obtusifolia* (**Co5**), no mostraron diferencias significativas para ambos marcadores: ácido clorogénico (25.3 ± 2.8 , 24.3 ± 0.3 y 24.1 ± 1.5 mg/g, respectivamente) e isoorientina (36.2 ± 0.3 , 38.5 ± 0.3 y 37.2 ± 0.2 mg/g, respectivamente). Sin embargo, un caso particular fue **Cp2**, porque si bien mostró similitud en su contenido de ácido clorogénico (22.6 ± 1.7 mg/g) con respecto a **Cp1**, **Cp4** y **Co5**, fue la muestra con menor concentración de isoorientina (8.1 ± 0.4 mg/g), con diferencia significativa al compararse con los demás extractos. En el caso de orientina, **Cp4** obtuvo el mayor contenido (49.9 ± 0.6 mg/g), seguido de **Cp1** (34.5 ± 1.8 mg/g) y **Cp2** (27.9 ± 1.5 mg/g), con diferencias significativas entre las muestras; asimismo, **Cp3** y **Co5** fueron las de menor concentración (7.9 ± 0.8 y 11.6 ± 0.6 mg/g, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos. Además, para el análogo de vitexina, es posible indicar que **Cp2** mostró el mayor contenido (6.2 ± 0.2 mg/g) diferente significativamente a todas las muestras, seguido de **Cp1** y **Cp4** (4.7 ± 0.2 , 5.1 ± 0.2 mg/g, respectivamente), sin diferencia entre ellos. Asimismo, **Cp1**, obtuvo un contenido similar, comparado con **Cp3** (4.4 ± 0.4 mg/g) y **Co5** (4.5 ± 0.3 mg/g), sin embargo, **Cp4** fue diferente significativamente a **Cp3** y **Co5**. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han mostrado la presencia y variabilidad regional en la concentración de estos marcadores químicos, lo cual puede impactar en el uso que se le atribuye a la especie en la medicina tradicional [4, 14, 36]. Asimismo, la cuantificación de los marcadores químicos responsables de la actividad hipoglucemiante en especies de *Cecropia*, i.e. ácido clorogénico e isoorientina, puede correlacionarse con los resultados obtenidos a partir de la evaluación biológica que se describe más adelante. Además, el análisis del perfil metabólico permitió corroborar la presencia de compuestos como orientina y vitexina, los cuales también han sido catalogados como marcadores químicos para el género *Cecropia* dado que son compuestos característicos del mismo, además de estar asociados a la actividad antihipertensiva y antiinflamatoria en especies de este género. En ese sentido, la identificación de los marcadores químicos puede ser muy útil para

comparar similitudes y diferencias entre especies, ya sean del mismo género o especies colectadas en diferentes regiones [29]. Estos resultados marcan un punto de partida para realizar estudios que permitan relacionar datos estadísticos sobre variables estacionales, fenotípicas y/o demográficas con el contenido metabólico de una especie en particular.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de CPT, CFT y el contenido total de marcadores químicos (CTMQ) a partir de los métodos espectrofotométricos y cromatográficos utilizados no son comparables entre sí, ya que cada uno tiene alcances y limitaciones particulares. Tal como CPT y CFT, los cuales son métodos en donde se emplea la espectrofotometría UV-Vis. Para el caso de CPT se trata de un ensayo con baja especificidad, ya que la relación de color tiene lugar con cualquier grupo hidroxilo oxidable, lo que puede provocar interferencias en el análisis. Para CFT, la reacción se lleva a cabo entre flavonoides 3',4'-dihidroxisustituidos y el ion Al^{3+} , lo que resulta en la formación de quelatos rojos, por lo tanto, cualquier compuesto que presente en su estructura una dihidroxisustitución vecinal, llevará a la formación de estos quelatos, provocando interferencias en el método. Sin embargo, a pesar de las limitaciones que muestran las determinaciones de CPT y CFT, también muestran ciertas ventajas, la cuales radican en los bajos costos de análisis, su alta reproducibilidad, así como la disminución del tiempo de análisis de un número elevado de muestras. Además, estas determinaciones muestran un perfil general de los grupos de metabolitos en estudio, lo que permite observar diferencias en el contenido metabólico entre muestras colectadas en diferentes regiones. Por otra parte, el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución permite llevar a cabo la separación de compuestos presentes en un extracto, mediante interacciones entre una fase estacionaria, una fase móvil y el analito, que, con ayuda de un detector de arreglo de fotodiodos, permite obtener en tiempo real un espectro de UV, que proporciona información acerca de las λ_{max} características para cromóforos de metabolitos específicos [41-43]. Por lo tanto, no fue posible establecer una relación directa entre los valores de CPT, CFT y CTMQ. Sin embargo, fue posible observar una tendencia que marcó diferencias tanto intra especies, donde *C. peltata* (**Cp4**) de la subregión Ríos se diferenció de las demás

muestras de la misma especie (**Cp1**, **Cp2** y **Cp3**), con los valores más altos de CPT, CFT y CTMQ. Como diferencias inter especie, donde *C. obtusifolia* (**Co5**) mostró una variación estadísticamente significativa en CPT y CFT con respecto a todas las muestras de *C. peltata* y solo fue similar a **Cp2** en CTMQ (Tabla 7).

Tabla 7. CPT, CFT y CTMQ en especies de *Cecropia**.

	Cp1	Cp2	Cp3	Cp4	Co5
CPT (mg EAG/g E)	84.1 ± 3.3 ^c	103.4 ± 6.3 ^{b,c}	111.3 ± 4.8 ^b	155 ± 9.1 ^a	53.5 ± 1.1 ^d
CFT (mg ER/g E)	100.1 ± 5.5 ^d	158.8 ± 19.6 ^d	374.5 ± 36.1 ^c	724 ± 22.2 ^a	567.1 ± 30.5 ^b
CMQT (mg/g)	100.8 ± 4.2 ^b	64.9 ± 1.0 ^c	103.9 ± 4.7 ^b	118.0 ± 0.7 ^a	77.4 ± 1.1 ^c

*CPT: Contenido de Polifenoles Totales; CFT: Contenido de Flavonoides Totales y CTMQ: Contenido Total de Marcadores Químicos del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (**Cp1-Cp4**) y *C. obtusifolia* (**Co5**). La significancia estadística fue determinada mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un análisis de Tukey. Valores con la misma letra (a-d) representa que no hay diferencia significativa a $p < 0.05$, para el mismo ensayo.

9.4. Análisis multivariado de los perfiles de RMN-¹H

Los perfiles metabólicos por RMN-¹H de cada uno del extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia* son mostrados en la Figura 17, donde se observan señales abundantes en la región de protones alifáticos (δ 0.5 - 2.0 ppm), además, se observaron señales abundantes en la región de 2.0 a 4.5 ppm en donde se ubican metinos unidos a grupos electroattractores como por ejemplo, hidroxilos.

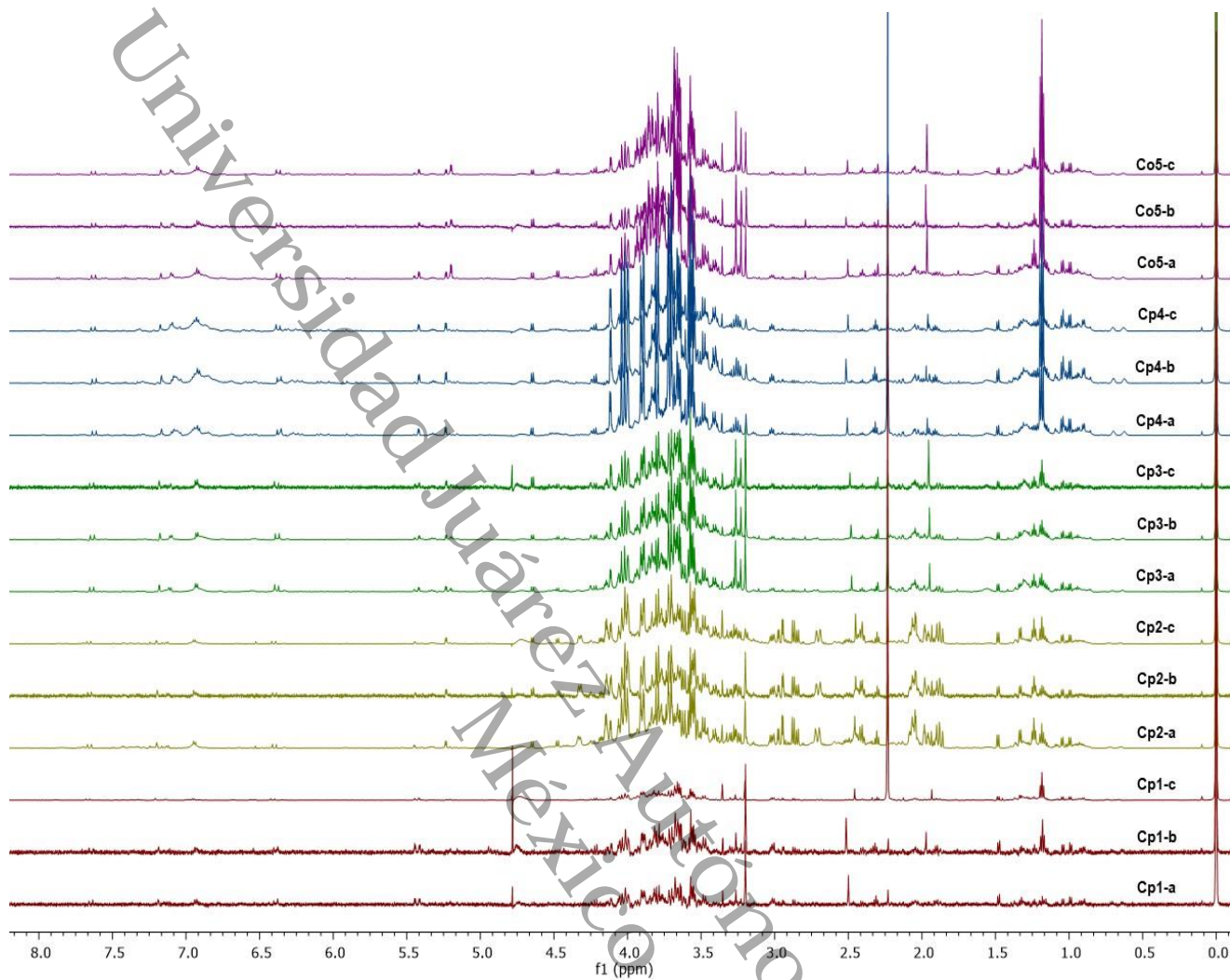


Figura 17. Perfiles de RMN-¹H (D₂O, 600 MHz; región δ 8.00 a 0.00 ppm) del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra.; a-c, corresponde al triplicado de cada muestra.

Por otra parte, en la Figura 18, se muestra una ampliación de la región de 3.4 a 4.2 ppm del espectro de RMN-¹H de los extractos de *C. peltata* y *C. obtusifolia*.

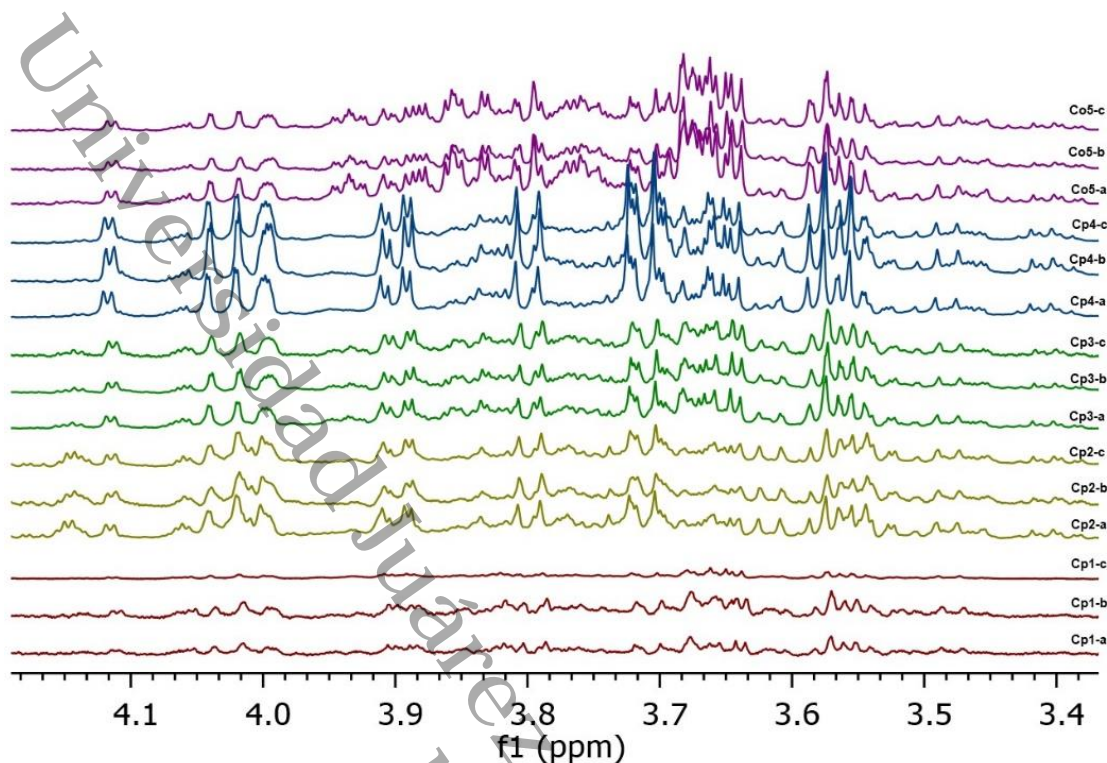


Figura 18. Expansión del espectro de RMN-¹H (D₂O, 600 MHz; región de δ 3.40 - 4.20 ppm) del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra.; a-c, corresponde al triplicado de cada muestra.

En este sentido, la abundancia de señales en esta región, en la cual se ubican grupos como metinos de bases oxigenadas, puede atribuirse a la presencia de azúcares, tal como glucosa, xilosa o ramnosa, los cuales han sido reportados en especies de *Cecropia* [4].

A partir de los datos de RMN-¹H, se obtuvo el análisis de componentes principales y el gráfico de puntuación PCA (PC1 vs. PC2) con un 65.2% de la varianza explicada, como se muestra en la Figura 19.

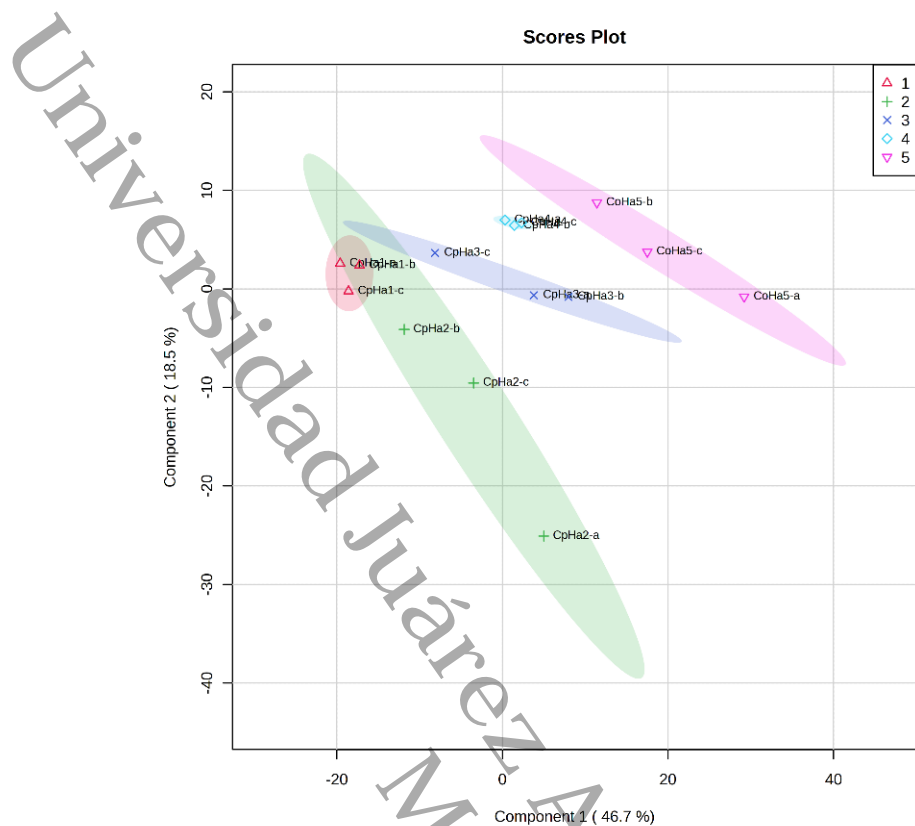


Figura 19. Análisis de componentes principales *score plot* (PC1 vs. PC2, 65.2% de la varianza explicada) de los perfiles de RMN-¹H del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra.; a-c, corresponde al triplicado de cada muestra.

Este estudio permitió identificar una variación en el contenido metabólico, tanto intra como inter especie. En el caso de las diferencias intra especie, se observó que un grupo lo formó *C. peltata* de la subregión Ríos (**Cp4**), el cual presentó diferencias con las muestras de su misma especie, por otro lado, las muestras de *C. peltata* de las subregiones Centro (**Cp1**), Chontalpa (**Cp2**) y Pantanos (**Cp3**) fueron ubicados en un mismo grupo, donde, **Cp1** y **Cp3** muestran diferencias entre sí, pero son similares a **Cp2**, por otra parte, en el caso de las variaciones inter especie, la diferencia fue muy marcada, dado que, la muestra de *C. obtusifolia* de la subregión Sierra (**Co5**) representó un agrupamiento independiente a todas las muestras de *C. peltata*.

A partir de los datos del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA), se realizó un análisis de Importancia Variable en la Proyección (VIP), con

la finalidad de identificar las señales que por su contribución marcan diferencias entre las muestras analizadas (Figura 20).

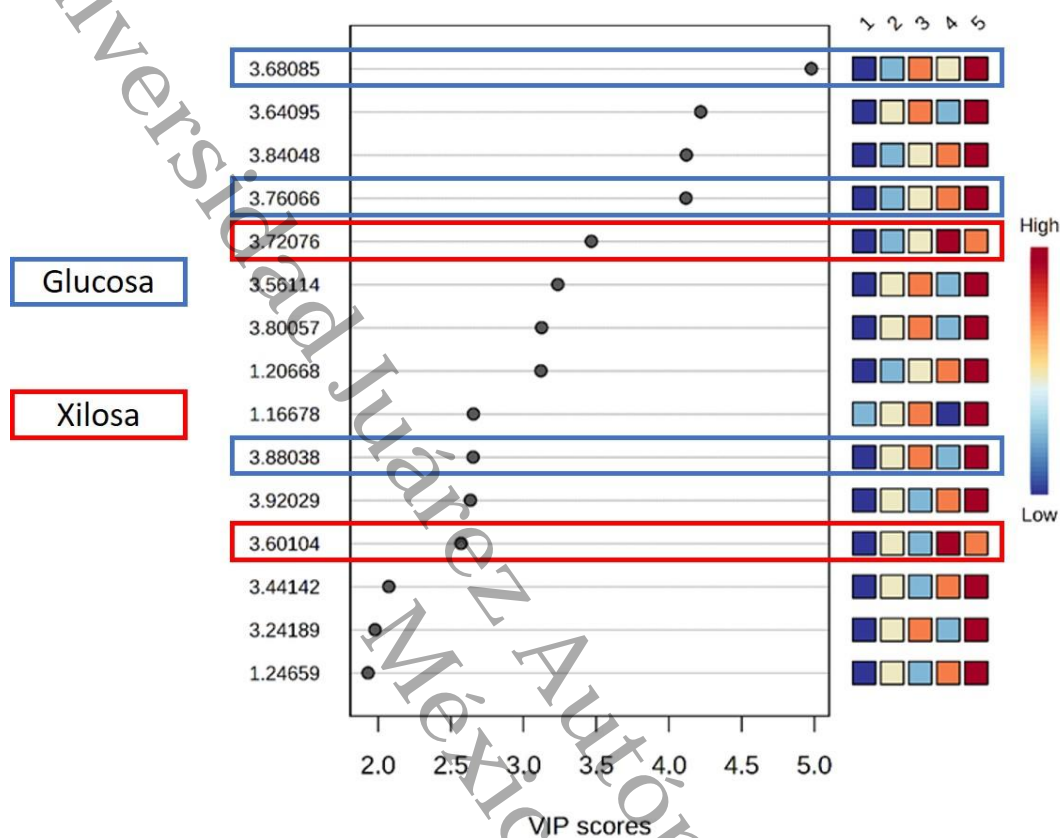


Figura 20. Metabolitos definidos mediante el análisis de Importancia Variable en la Proyección (VIP) a partir de los perfiles de RMN-¹H del extracto hidroalcohólico de especies de *Cecropia*.

A partir del análisis VIP se corroboraron las diferencias intra especie observadas en el PCA, donde *C. peltata* de la subregión Ríos (**Cp4**) se agrupó de manera independiente a las muestras de su misma especie, esto como resultado de una mayor contribución en los desplazamientos químicos que pueden atribuirse a la presencia de xilosa (δ 3.60 y δ 3.72 ppm) de acuerdo con los desplazamientos químicos reportados en la literatura para este azúcar [64]; otra tendencia intra especie que se corroboró, fue el agrupamiento entre **Cp1**, **Cp2** y **Cp3**, analizando la contribuciones de los desplazamientos químicos atribuidos a xilosa, además de los correspondientes a glucosa (δ 3.68, δ 3.76 y δ 3.88 ppm) según los desplazamientos reportados en la literatura [65]. Se encontró que para **Cp1** la contribución en los valores VIP de estos conjuntos de señales fue baja en todos los

casos, asemejándose al comportamiento observado para **Cp2**, el cual a su vez presenta similitud con **Cp3**. La agrupación de estas tres subregiones ya se había encontrado en el análisis del CPT y de CFT, así como en la CMQT. En el caso de las diferencias inter especie, se encontró que *C. obtusifolia* (**Co5**), presenta un perfil diferente dado que alcanzó una mayor contribución en los desplazamientos químicos para ambos azúcares, en comparación con todas las muestras de *C. peltata*. De acuerdo con lo anterior, se consideró pertinente realizar la cuantificación de azúcares reductores en el extracto hidroalcohólico de las muestras de estudio, con la finalidad de abundar en la comprensión de los resultados obtenidos a partir del análisis multivariado de los perfiles de RMN-¹H. Los resultados se describen a continuación.

9.5. Determinación de azúcares reductores en el extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*

El contenido de azúcares reductores es mostrado en la Figura 21. Donde la muestra que presentó el mayor contenido fue *C. peltata* de la subregión Ríos (**Cp4**; 476.3 ± 11.35 mg EGlu/g E), diferente significativamente a las demás muestras, seguido de *C. obtusifolia* de la subregión Sierra (**Co5**; 396.2 ± 12.88 mg EGlu/g E) y *C. peltata* de la subregión Pantanos (**Cp3**; 297.3 ± 4.78 mg EGlu/g E), con diferencia significativa entre ellos. Por otra parte, las muestras de *C. peltata* de la subregión Centro (**Cp1**) y Chontalpa (**Cp2**) mostraron un contenido de azúcares reductores similar (224.3 ± 3.62 y 208.7 ± 4.21 mg EGlu/g E, respectivamente), sin diferencia significativa entre los extractos, resultando ser las muestras con menor CAR.

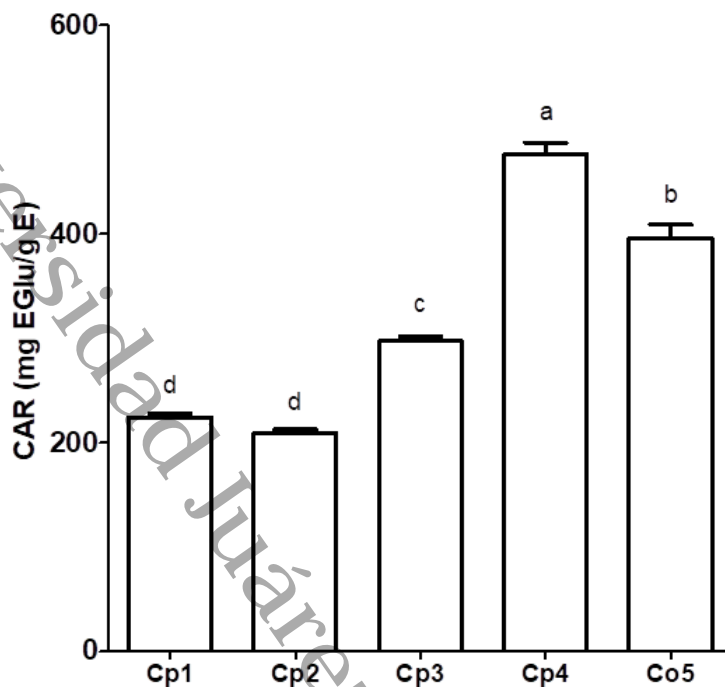


Figura 21. Análisis del contenido de azúcares reductores (CAR) en el extracto hidroalcohólico de hojas de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. CAR: mg Eglu/g E: equivalentes de glucosa por g de extracto. Barras con misma letra representa que no hay diferencia entre los grupos a $p < 0.05$.

Cabe destacar, que estos resultados muestran una tendencia acorde con lo reportado por el análisis multivariado realizado a partir de los perfiles de RMN-¹H del extracto hidroalcohólico, dado que las tres subregiones que presentaron el menor contenido de azúcares reductores totales (**Cp1**, **Cp2** y **Cp3**), son aquellas en donde se encontró una menor contribución de los desplazamientos químicos atribuidos a glucosa y xilosa en el análisis VIP. Mientras que en términos generales **Cp4** y **Co5**, cuyo contenido de azúcares reductores totales es más alto, son las que en el análisis VIP presentan una mayor contribución de señales atribuidas a ambos azúcares.

Es importante indicar que los diferentes métodos analíticos aplicados en este trabajo conducen a encontrar diferencias intra e inter especies en las muestras de *Cecropia* estudiadas; ya sea mediante la cuantificación espectrofotométrica de grupos de metabolitos (CPT, CFT); la cuantificación mediante técnicas cromatográficas de marcadores químicos específicos (CTMQ); así como el análisis de un patrón de la huella metabólica mediante los perfiles de RMN-¹H de extractos completos o incluso

con la determinación espectrofotométrica de azúcares reductores totales. Se observó que los diferentes análisis mantuvieron tendencias generales que permitieron identificar la diversidad entre muestras. Estos resultados resaltan la importancia de aplicar diversas técnicas analíticas para obtener una visión más completa de las diferencias metabólicas que pueden estar involucradas en el análisis de muestras de una misma especie obtenidas de diferentes subregiones, o muestras de diferentes especies del mismo género. Además, estos resultados marcan una pauta para realizar estudios que permitan considerar los diferentes factores bióticos o abióticos que rodean a estas especies, lo cual podría estar relacionado en la producción de ciertos grupos de metabolitos y por tanto verse afectado su efecto biológico [2, 7, 26, 29].

Por otra parte, las muestras en estudio fueron evaluadas en un ensayo de Curva de tolerancia a la glucosa, con el objetivo de observar su efecto hipoglucemiante y establecer una relación con el contenido metabólico estudiado con anterioridad; los resultados son mostrados en la siguiente sección.

9.6. Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia* en el modelo de CTG

Los resultados del curso temporal de la evaluación hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia* son mostrados en la Figura 22.

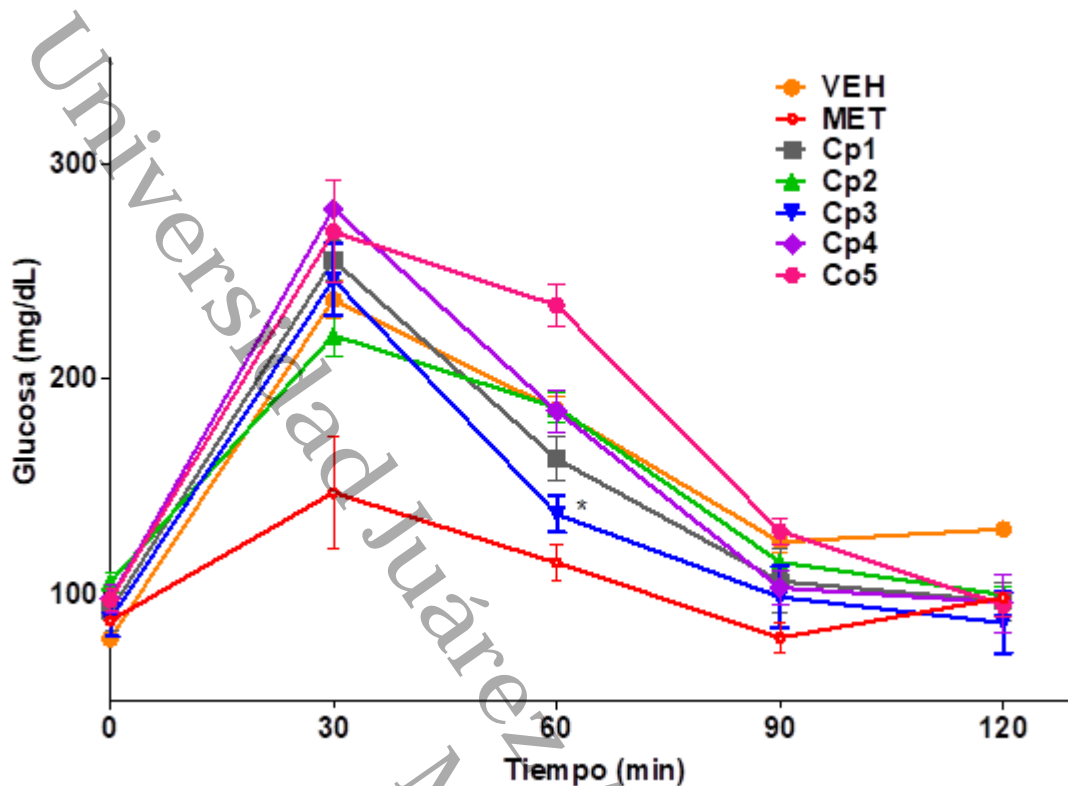


Figura 22. Curso temporal del extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (Cp) y *C. obtusifolia* (Co). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar ($n=6$) de un curso temporal de 120 min, mediante un análisis ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Dunnett en cada punto de evaluación con un nivel de significancia del 95% (* $p<0.05$).

Este curso temporal de 120 minutos, mostró que todos los tratamientos presentaron un aumento de los niveles de glucosa a partir del minuto 30, esto debido a la administración de la carga de glucosa, posteriormente, a los 60 minutos, se observó que los valores de glucosa disminuyen de manera gradual hasta el minuto 90, manteniéndose sobre los 120 minutos. Cabe mencionar, que todos los tratamientos muestran una disminución de los niveles de glucosa a partir del minuto 60, de la misma manera que el vehículo, sin embargo, **Co5** sigue por arriba de estos niveles. Por otra parte, el análisis estadístico determinó que los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia*, no presentaron diferencias significativas con respecto al vehículo. No obstante, se observó que a partir del minuto 60, fue **Cp3** de la subregión Pantanos, la que logró un efecto hipoglucemiante (137.0 ± 8.5 mg/dL) significativamente diferente al grupo control y similar a los valores obtenidos por **MET** (114 ± 8.5 mg/dL). Por lo anterior, el curso

temporal de los tratamientos mostró, que **Cp3** alcanzó un efecto similar a **MET** en el doble de tiempo y los demás tratamientos alcanzaron un efecto similar a **MET** en el triple de tiempo.

Asimismo, se determinó el área bajo de la curva (ABC), a partir del curso temporal de un periodo de 120 minutos en el modelo de CTG (Figura 23).

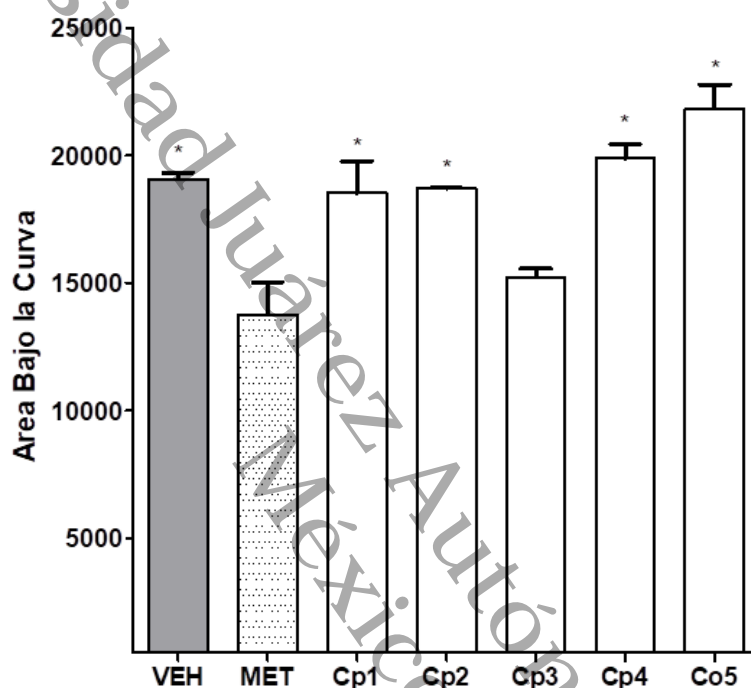


Figura 23. Área bajo la curva de la evaluación en el modelo CTG de extracto hidroalcohólico de *C. peltata* (**Cp**) y *C. obtusifolia* (**Co**). Subregiones: **Cp1**, Centro; **Cp2**, Chontalpa; **Cp3**, Pantanos; **Cp4**, Ríos y **Co5**, Sierra. los datos se expresaron como la media \pm error estándar ($n=6$) del área bajo la curva de un curso temporal de 120 min, con un nivel de significancia del 95% ($*p<0.05$), mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Dunnett.

Donde, **VEH** (19075 ± 261.3) mantuvo su mismo ABC, es decir, no presentó variación significativa en la concentración de glucosa durante el periodo de evaluación. Asimismo, al comparar los extractos de *C. peltata* (**Cp1**, **Cp2** y **Cp4**) y el extracto de *C. obtusifolia* (**Co5**), mostraron diferencias significativas en el ABC por arriba de **MET** (18530 ± 1249 , 18720 ± 37.7 , 19905 ± 552.4 y 21850 ± 933.7 , respectivamente). Sin embargo, el extracto de *C. peltata* de la subregión Pantanos (**Cp3**), disminuyó el ABC (15862 ± 872.0) en la prueba de CTG, en una forma similar a lo obtenido por el fármaco de referencia metformina, sin diferencia significativa entre ellos.

De acuerdo con los resultados de la evaluación hipoglucemiante, los diferentes tratamientos del extracto hidroalcohólico de *Cecropia spp.* mostraron una disminución de los valores de glucosa en un periodo de 120 minutos, esto en animales sanos en ayuno. Cabe destacar, que **Cp3** disminuyó los niveles de glucosa a partir del minuto 60, diferente significativamente al grupo control, lo cual se vio reflejado en la disminución del área bajo la curva, proponiendo a *C. peltata* de la subregión Pantanos, a una dosis de 100 mg/kg como un tratamiento con potencial efecto hipoglucemiante. Además, es importante indicar, que fue esta muestra la que presentó las concentraciones más altas de ácido clorogénico e isoorientina: 39.8 ± 2.3 mg/g y 51.5 ± 2.9 mg/g, respectivamente. Lo cual apunta a que, por cada gramo de este tratamiento, se administraron $0.39 \mu\text{g/kg}$ de ácido clorogénico y $0.52 \mu\text{g/kg}$ de isoorientina.

Contrastando estos resultados con diversos reportes que muestran la actividad hipoglucemiante de especies de *Cecropia*, se muestra un reporte previo realizado por Nicasio [14], donde evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de *C. peltata* y *C. obtusifolia*, colectadas en diferentes regiones de México, empleando una dosis de 1g/kg, esto en un modelo de curva de tolerancia a la glucosa en ratones normoglicémicos, indicando que fue *C. peltata* colectada en Tabasco la que obtuvo un mejor efecto hipoglucemiante (45.6 %), comparado con dos muestras de *C. obtusifolia* colectadas en Tabasco (33.3%) y Veracruz (35.7%). Cabe mencionar, que al correlacionar el efecto hipoglucemiante con la concentración de ácido clorogénico, se observó que *C. peltata* fue la que presentó el mayor contenido de este metabolito (18.9 mg/g extracto), con respecto a las muestras de *C. obtusifolia* de Tabasco (13.3 mg/g extracto) y *C. obtusifolia* de Veracruz (13.1 mg/g extracto), estos resultados muestran que por cada gramo de extracto metanólico de *C. peltata*, se administraron 18.9 mg de ácido clorogénico, lo cual supera en concentración con respecto a lo reportado en este trabajo, por lo tanto, es importante explorar diferentes dosis que permitan determinar si el comportamiento del efecto hipoglucemiante de las muestras de *Cecropia spp.*, es mayor al aumentar las concentraciones de los marcadores químicos responsables de la actividad hipoglucemiante y que marquen una diferencia al compararlo contra el vehículo.

Por otra parte, un estudio realizado por Andrade-Cetto [66], evaluó la administración de un extracto acuoso y butanólico de dos muestras de *C. obtusifolia* colectadas en los estados de Hidalgo y Oaxaca, a diferentes dosis, en un modelo de curva de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos. Donde se observó que el extracto, acuoso a una dosis de 90 mg/kg disminuyó los niveles de glucosa a partir del minuto 60 con una diferencia significativa de $p < 0.001$, con respecto al grupo control, posterior a los 60 minutos hasta los 120 minutos. Asimismo, esta tendencia se observó al evaluar al ácido clorogénico e isoorientina (10 mg/kg) de manera individual, ya que disminuyeron los niveles de glucosa a partir del minuto 60, con un efecto máximo hasta el minuto 180, con una diferencia significativa de $p < 0.001$, con respecto al control.

Por otra parte, un estudio realizado por Andrade-Cetto [36], demostró que uno de los mecanismos probables por el cual se lleva a cabo el efecto hipoglucemiante en especies de *Cecropia*, es mediante la inhibición de la gluconeogénesis, esto se determinó, mediante la evaluación en un ensayo de curva de tolerancia al piruvato, en ratas. Donde se evaluó el extracto butanólico (150 mg/kg) de *C. obtusifolia* y *C. peltata*, colectadas en Hidalgo y Yucatán, respectivamente. Asimismo, se evaluó su componente principal, el ácido clorogénico a una dosis de 5 mg/kg. Así, después de la administración de piruvato, tanto los extractos como el ácido clorogénico lograron bloquear el aumento en las concentraciones de glucosa en sangre a partir del 60 min, mientras que el efecto de la metformina (un inhibidor de la gluconeogénesis) se observó hasta los 120 min.

Estos resultados ayudan a comprender el efecto hipoglucemiante en especies de *Cecropia*, donde se ve involucrado más de un mecanismo de acción. En este caso, para *Cecropia obtusifolia* y *Cecropia peltata*, uno de los mecanismos que permitió explicar su efecto hipoglucemiante fue mediante la inhibición de la gluconeogénesis.

De esta forma, los resultados obtenidos están acordes con lo que se ha reportado previamente en cuanto al efecto hipoglucemiante de *Cecropia spp.*, ya que fue *C. peltata* de la subregión Pantanos, el tratamiento que mostró el mejor efecto hipoglucemiante a una dosis de 100 mg/kg, similar a metformina. De acuerdo con

lo anterior, uno de los factores que podría intervenir en el efecto observado en los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia*, podría deberse a la dosis empleada en este estudio, por lo tanto, se sugiere la necesidad de profundizar con estudios que permitan establecer condiciones adecuadas para el uso racional de ambas especies para el tratamiento de la diabetes, principal enfermedad para la cual se emplean las especies de *Cecropia*.

México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

10. Conclusiones

Actualmente, el uso de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades va en incremento, por lo tanto, es importante destacar que la identificación correcta de especies vegetales conocidas con el mismo nombre tradicional es una herramienta crucial para la validación y seguridad en el uso de plantas y sus derivados. En el presente trabajo, la identificación taxonómica permitió distinguir entre dos especies del género *Cecropia*, tal como: *C. peltata* y *C. obtusifolia*, las cuales fueron ubicadas en las cinco subregiones del estado de Tabasco. El primer acercamiento mediante la aplicación de diversas técnicas analíticas permitió encontrar diferencias intra especie entre las muestras de *C. peltata*. donde se revelaron tendencias en el contenido de grupos de metabolitos específicos, que si bien, mostraron agrupamientos entre muestras de la misma especie, como fue el caso de *C. peltata* de las subregiones Centro, Chontalpa y Pantanos, también se observaron patrones particulares, que permitieron diferenciar a *C. peltata* de la subregión Ríos de las muestras de su misma especie. Además, fue posible establecer una diferencia inter especie, donde *C. obtusifolia*, a pesar de mostrar variaciones en el contenido metabólico, su tendencia siempre fue diferente a las especies de *C. peltata*. Asimismo, la evaluación preliminar del efecto hipoglucemiante logró establecer a la especie con mejor efecto lo cual podría atribuirse a un mayor contenido de los marcadores químicos establecidos como responsables de la actividad biológica que se les confiere a las especies de *Cecropia*, tal como se observó con *C. peltata* de la subregión Pantanos. Sin embargo, es necesario profundizar en más estudios que demuestren la actividad biológica de estas especies y que permita relacionarlos con las variaciones en el contenido metabólico. Este reporte enriquece el conocimiento relativo a las especies del género *Cecropia* colectadas en la región sureste de México, en particular, mostrando la variabilidad regional del contenido químico de estas plantas. Finalmente, este trabajo busca apoyar el diseño de acciones específicas encaminadas al uso racional de los productos herbolarios derivados de plantas de este género.

11. Perspectivas

Determinar los factores propios de cada subregión (tipo de suelo, altitud, condiciones climáticas) del estado de Tabasco.

Evaluar el extracto hidroalcohólico de las especies de *Cecropia* en modelos hipoglucemiantes, mediante el empleo de dosis mayores a la estudiadas en este trabajo.

Correlacionar el efecto hipoglucemiante y el contenido metabólico de las especies de *Cecropia* con los factores ambientales de las subregiones del estado de Tabasco, mediante un enfoque multivariado.

México.

Autónoma de Tabasco.

12. Referencias

1. Razaq, A.; Sadia, B.; Raza, A.; Khalid Hameed. M.; Saleem, F. Metabolomics: A way forward for crop improvement. *Metabolites* **2019**, 9(12), 303.
2. Piasecka, A.; Kachlicki, P.; Stobiecki, M. Analytical methods for detection of plant metabolome changes in response to biotic and abiotic stresses. *Int J Mol Sci* **2019**, 20(2), 379.
3. Han, S.; Micallef, S.A. Environmental metabolomics of the tomato plant surface provides insights on *Salmonella enterica* colonization. *Appl Environ Microbiol* **2016**, 82(10), 3131-3142.
4. Rivera-Mondragón, A.; Bitttebier, S.; Tuentner, E.; Custers, D.; Ortíz, O. O.; Pieters, L.; Caballero-George, C.; Foubert, K. Phytochemical characterization and comparative studies of four species collected in Panama using multivariate data analysis. *Sci Rep* **2019**, 9(1), 1763.
5. Krishnan, P.; Kruger, N. J.; Ratcliffe, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot* **2005**, 56(410), 255-265.
6. Kumar, R.; Bohra, A.; Pandey, A.K.; Pandey, M.K.; Kumar, A. Metabolomics for plant improvement: status and prospects. *Front. Plant Sci* **2017**, 8, 1302.
7. Patel, M.K.; Pandey, S.; Kumar, M.; Haque, M.I.; Pal, S.; Yadav, N.S. Plants metabolome study: Emerging tools and techniques. *Plants* **2021**, 10, 2409.
8. Baylei, N. J., Wnag, Y.; Sampson, J.; Davis, W.; Whitcombe, I. Prediction of antiplasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: Application of ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. *J Pharm. Bio. Anal.* **2004**, 35, 117-126.
9. Li, Y.; He, Q.; Geng, Z.; Du, S.; Deng, Z.; Hasi, E. NMR-based metabolomic profiling of *Peganum harmala* L. reveals dynamic variations between different growth stages. *R Soc Open Sci* **2018**, 5(7), 171722.
10. Murti, R.H.; Afifah, E.N.; Nuringtyas, T.R. Metabolomic response of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) against Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) using ¹H-NMR spectroscopy. *Plants* **2021**, 10, 1143.
11. Magaña, A.A.M.; Campillo, L.M.G.; Méndez, R.M. El uso de las plantas medicinales en las comunidades maya-chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica* **2010**, 29, 213-2062.
12. Berg, C.; Franco, P. *Cecropia. Organization for flora neotropica*, 94th ed.; The New York Botanical Garden Press, **2005**.

13. Herrera-Arellano, A.; Aguilar-Santamaría, L.; García-Hernández, B.; Nicasio-Torres, P.; Tortoriello, J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 561-566.
14. Nicasio, P.; Aguilar-Santamaría, L.; Aranda, E.; Ortiz, S.; González, M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phyther Res* **2005**, *19*, 661-664.
15. Andrade-Cetto, A.; Cárdenas, R.; Ramírez-Reyes, B. Hypoglycemic effect of *Cecropia peltata* L. on N5-STZ type 2 diabetic rats. *Pharmacologyonline* **2007**, *3*, 203-210.
16. Andrade-Cetto, A.; Becerra-Jiménez, J.; Cárdenas-Vázquez, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol* **2008**, *116*, 27-32.
17. Alonso-Castro, A.J.; Miranda-Torres, A.C.; González-Chávez, M. M.; Salazar-Olivo, L. A. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J Ethnopharmacol* **2008**, *120*, 458-464.
18. Fortis-Barrera, M. D. L. Á.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Becerril-García, A.; Flores-Sáenz, J. L. E.; Almanza-Pérez, J. C.; García-Lorenzana, M.; Lazzarini-Lechuga, R.C.; Román-Ramos, R.; Blancas-Flores, G. Mechanism of the hypoglycemic activity and hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* Bertol. *J Med Food* **2020**, *23*(7), 783-792.
19. Vidrio, H.; García-Márquez, F.; Reyes, J.; Soto, R. M. Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*. *J Pharm Sci* **1982**, *71*, 475-476.
20. Salas, I.; Brenes, J. R.; Morales, O. M. Antihypertensive effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) leaf extract on rats. *Rev Biol Trop* **1987**, *35*, 127-130.
21. Pérez-Guerrero, C.; Herrera, M. D.; Ortiz, R.; de Sotomayor, M. A.; Fernández, M. A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *J Ethnopharmacol* **2001**, *76*(3), 279-284.
22. Rojas, J. J.; Ochoa, V. J.; Ocampo, S. A.; Muñoz, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med* **2006**, *6*(1), 1-6.
23. Rivera-Mondragón, A.; Tuentner, E.; Bijttebier, S.; Cos, P.; Apers, S.; Caballero-George, C.; Foubert, K.; Pieters, L. Two new antiplasmodial flavonolignans from the leaves of *Cecropia obtusifolia*. *Phytochem Lett* **2019**, *31*, 118-120.

24. GBIG. Global Biodiversity Information Facility. Available online: <https://www.gbif.org/species/2984473> (accessed on 08 march 2023).
25. Bussmann, R.W.; Paniagua Zambrana, N.Y.; Moya Huanca, L.A.; Hart, R.E. Changing markets – medicinal plants in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J Ethnopharmacol* **2016**.
26. Iwanycki Ahlstrand N.; Havskov Reghev N.; Markussen B.; Bruun Hansen H.C.; Eiriksson F.F.; Thorsteinsdóttir M.; Rønsted N.; Barnes C.J. Untargeted metabolic profiling reveals geography as the strongest predictor of metabolic phenotypes of a cosmopolitan weed. *Ecol Evol* **2018**, 8(13):6812-6826.
27. Cardoso-Taketa, A. T.; Pereda-Miranda, R.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; Villarreal, M. L. Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Planta Med* **2008** 74(10), 1295-1301.
28. Kim, H. K.; Khan, S.; Wilson, E. G.; Kricun, S. D. P.; Meissner, A.; Goraler, S.; Deelder, A.M.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* **2010**, 71(7), 773-784.
29. Rivera-Mondragón, A.; Ortiz, O. O.; Bijttebier, S.; Vlietinck, A. Apers, S.; Pieters, L.; Caballero-George, C. Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharm Biol* **2017**, 55(1), 1500-1512.
30. Pérez, R.M.; Ocegueda, A.; Muñoz, J.L.; Avila, J.G.; Morrow, W.W. A study of the hypoglycemic effect of some mexican plantas. *J Ethnopharmacol* **1984**, 12, 253-262.
31. Román-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar F.; Lara-Lemus, A.; Flores-Saenz, J.L. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch Med Res* **1991**, 22, 87-93.
32. Mellado, V.; Lozoya, M. Effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* on the blood sugar of normal and pancreatectomized dogs. *Int. J. Crude Drug Res* **1984**, 22, 11-16.
33. Román-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar, F.; Lara-Lemus, A.; Flores-Saenz, J.L. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch Med Res* **1992**, 23, 59-64.
34. Revilla-Monsalve, M.C.; Andrade-Cetto, A.; Palomino, M.; Wiedenfeld, H.; Islas, S. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *J Ethnopharmacol* **2007**, 111, 636-640.

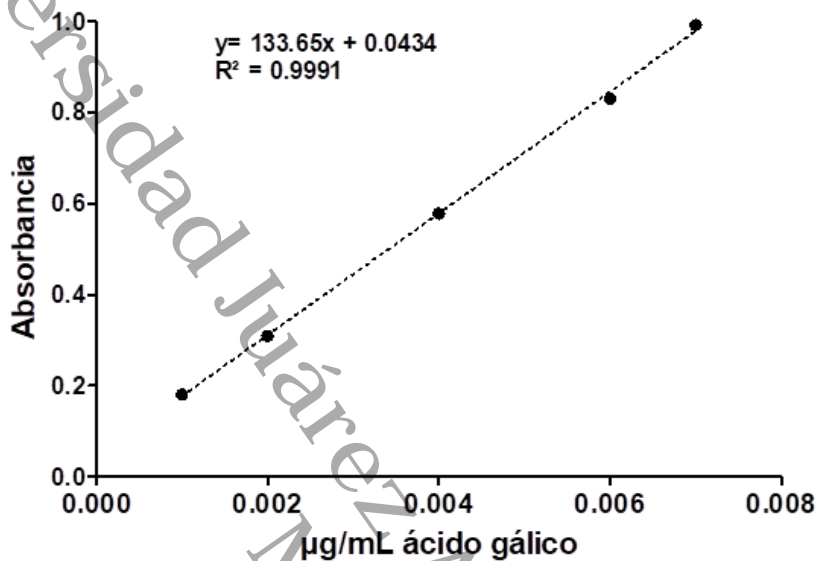
35. Martínez, V.; Ordáz, M. G.; Castañeda, A. N.; Andrade-Cetto, A.; Rodríguez-Arnaiz, R. Genotoxicity testing of *Cecropia obtusifolia* extracts in two in vivo assays: The wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila* and the human cytokinesis-block micronucleus test. *J Ethnopharmacol* **2008**, 116, 58-63.
36. Andrade-Cetto, A.; Vázquez, R.C. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *J Ethnopharmacol* **2010**, 130(1):93-7.
37. Dejean, A.; Leroy, C.; Corbara, B.; Cereghino, R.; Roux, O.; Herault, B.; Rossi, V.; Guerrero, R.J.; Delabie, J.H.; Orivel, J. A temporary social parasite of tropical plant-ants improves the fitness of a myrmecophyte. *Naturwissenschaften* **2010**, 97:925-934.
38. GET (Gobierno del Estado de Tabasco). (2021). Regiones de Tabasco. Disponible en: <https://tabasco.gob.mx/regiones-de-tabasco> [Fecha de consulta: 17/03/2023].
39. Bensoussan A., Lee S., Murray C., Bouchier S., Van der Kooy F., Pearson J. L., Liu J., Chang D. Khoo C. S. (2015). Choosing chemical markers for quality assurance of complex herbal medicines: Development and application of the herb MaRS criteria. *Clin Pharmacol Ther*, 9(6): 628-640.
40. European Medicines Agency [EMA] - Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) 2008. Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicine products. EMEA/HMPC/253629/2007, 15 July 2008. [Internet]. [cited 2023 Jan 15]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003196.pdf.
41. Skoog, D.; Holler, F.; Crouch, S. *Principios de Análisis Fundamental*; 6ta Ed.; Cengage Learning; México, **2008**.
42. Difonzo, G.; Crescenzi, M. A.; Piacente, S.; Altamura, G.; Caponio, F.; Montoro, P. Metabolomics Approach to Characterize Green Olive Leaf Extracts Classified Based on Variety and Season. *Plants* **2022**, 11(23), 3321.
43. Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal Methods* **2010**, 3, 90-97.
44. Skoog, S.; West, D.; Holler, D.; Crouch, F. *Química Analítica*; 6ta ed.; McGraw-Hill: México, **2001**.
45. Swadesh, J. K. *HPLC: Practical and Industrial Applications*, 2nd ed.; CRC Press; New York, **2000**.

46. Shimadzu. How to Read a Chromatogram https://www.shimadzu.com/an/service_support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html (Fecha de consulta 07/04/2023).
47. Levitt, M. H. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2nd ed.; Wiley- Blackwell: New York, **2008**.
48. Prasad, P. V.; Storey, P. *Magnetic Resonance Imaging Molecular Biomethods*, 2nd ed.; Humana Press: Totawa NY, **2008**.
49. Miller, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **1959**, 31: 426-428.
50. Barredo-Hernández, C.O. Perfil fitoquímico mediante técnicas cromatográficas de extractos orgánicos de *Hampea rovirosae* Standl. Tesis de Licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Marzo, 2023.
51. Gallegos-García, A. J.; Lobato-García, C. E.; González-Cortazar, M.; Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; Álvarez-Fitz, P.; Pérez-García, M.D.; López-Rodríguez, R.; Ble-González, E.A.; Medrano-Sánchez, E.J.; Feldman, M.R.; Bugarin, A.; Gómez-Rivera, A. Preliminary Phytochemical Profile and Bioactivity of *Inga jinicuil* Schltdl & Cham. ex G. Don. *Plants* **2022**, 11(6), 794.
52. Qiu, X.L.; Zhang, Q. F. Identification and quantification of main flavonoids in the leaves of *Bambusa multiplex* cv. Fernleaf. *Nat. Prod. Res* **2020**, 34(14), 2076-2079.
53. Hernández-Bolio, G. I.; Fagundo-Mollineda, A.; Caamal-Fuentes, E. E.; Robledo, D.; Freile-Pelegrin, Y.; Hernández-Núñez, E. NMR metabolic profiling of *Sargassum* species under different stabilization/extraction processes. *J Phycol* **2021**, 57(2), 655-663.
54. Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; Morais D.; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.E.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucl Acids Res* **2021**
55. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001), NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Diario Oficial de la Federación
56. Zhou, X.; Han, D.; Xu, R.; Li, S.; Wu, H.; Qu, C.; Zhao, Y. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *Plos one* **2014**, 22.
57. Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. *Fruits and fruit products. Food Chemistry*, 3rd ed.; Springer, Berlin; **2009**

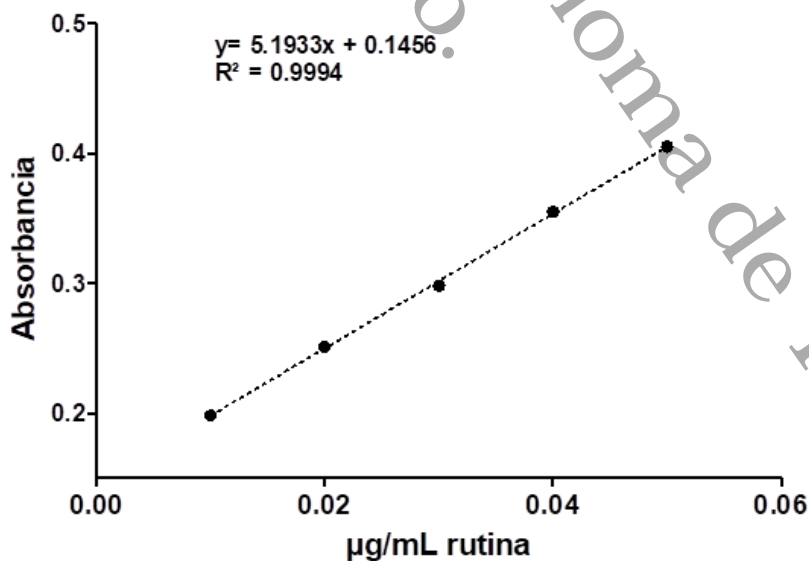
58. Costa, G. M.; Ortmann, C.F.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *J Braz Chem Soc* **2011**, 22, 1096-1102.
59. da Silva Mathias, M.; Rodrigues de Oliveira, R. Differentiation of the phenolic chemical profiles of *Cecropia pachystachya* and *Cecropia hololeuca*. *Phytochem Anal* **2019**, 30(1), 73-82.
60. Ortiz, O.O.; Rivera-Mondragón, A.; Pieters, L.; Foubert, K.; Caballero-George, C. *Cecropia telenitida* Cuatrec. (Urticaceae: Cecropieae): Phytochemical diversity, chemophenetic implications and new records from Central America. *Biochem Syst Ecol* **2019**, 86, 103935.
61. Rivera-Mondragón, A.; Broeckx, G.; Bijttebier, S.; Naessens, T.; Fransen, E.; Kiekens, F.; Foubert, K. Ultrasound-assisted extraction optimization and validation of an HPLC-DAD method for the quantification of polyphenols in leaf extracts of *Cecropia* species. *Sci Rep* **2019**, 9, 1-16.
62. Nicasio-Torres, M.P.; Meckes-Fischer, M.; Aguilar-Santamaría, L.; Garduño-Ramírez, M.L.; Chávez-Ávila, V.M.; Cruz-Sosa, F. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate starvation. *Acta Physiol Plant* **2012**, 34, 307-316.
63. Costa, G.M.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun* **2011**, (6):913-20.
64. Duus, J. Ø.; Gotfredsen, C. H.; Bock, K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chem Rev* **2000**, 100(12), 4589-4614.
65. Bubb, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts Magn Reson Part A Bridg Educ Res* **2003**, 19(1), 1-19.
66. Andrade-Cetto, A.; Wiedenfeld, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **2001**, 78, 145-149.

13. ANEXOS

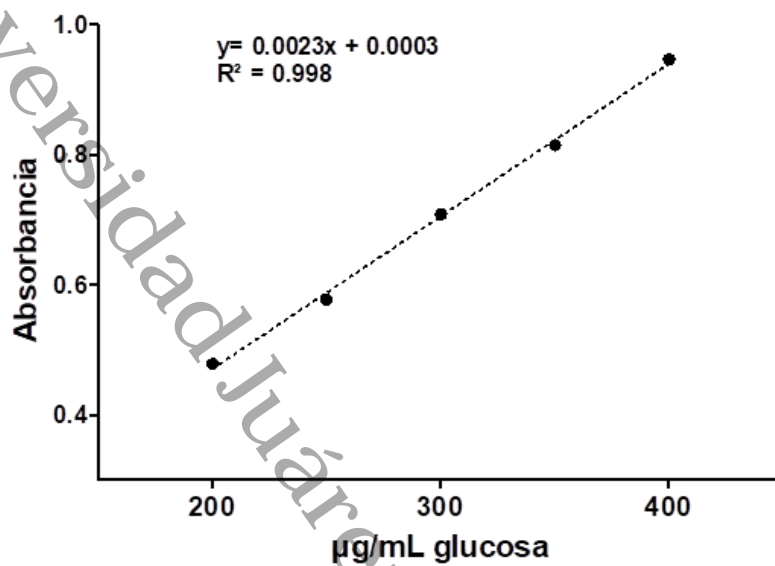
13.1. Curvas de calibración construidas para la determinación del contenido de polifenoles, flavonoides y azúcares reductores, mediante métodos espectrofotométricos.



Curva de calibración construida para la determinación del contenido de polifenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

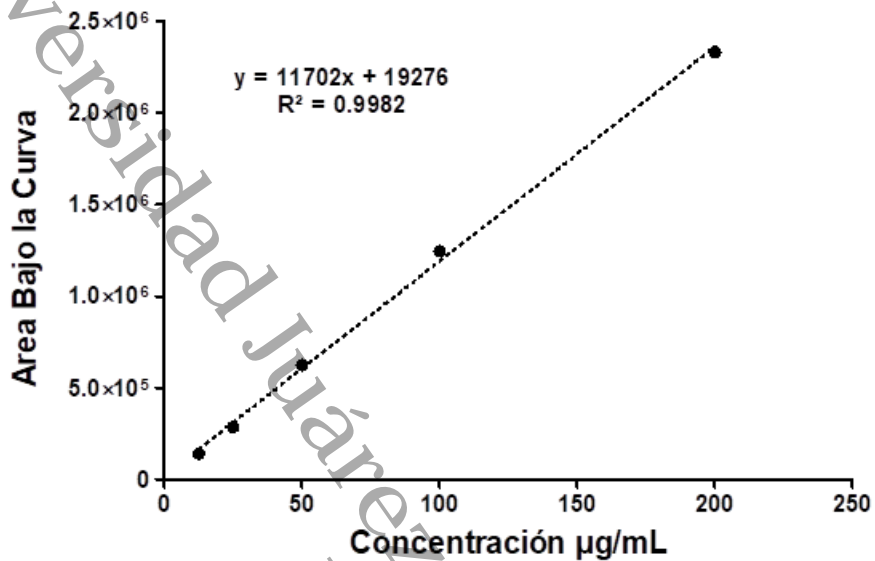


Curva de calibración construida para la determinación del contenido de flavonoides totales mediante un ensayo colorimétrico.

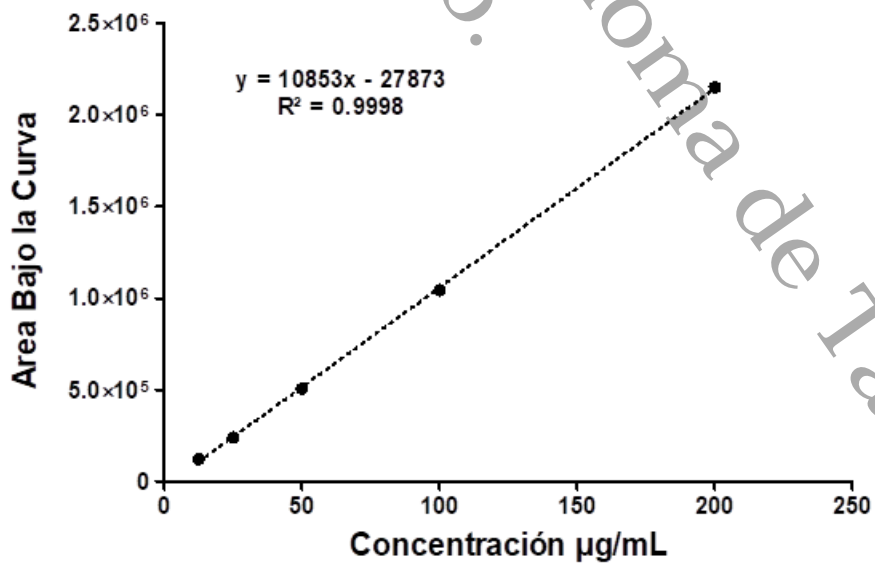


Curva de calibración construida para la determinación del contenido de azúcares reductores mediante el ensayo DNS.

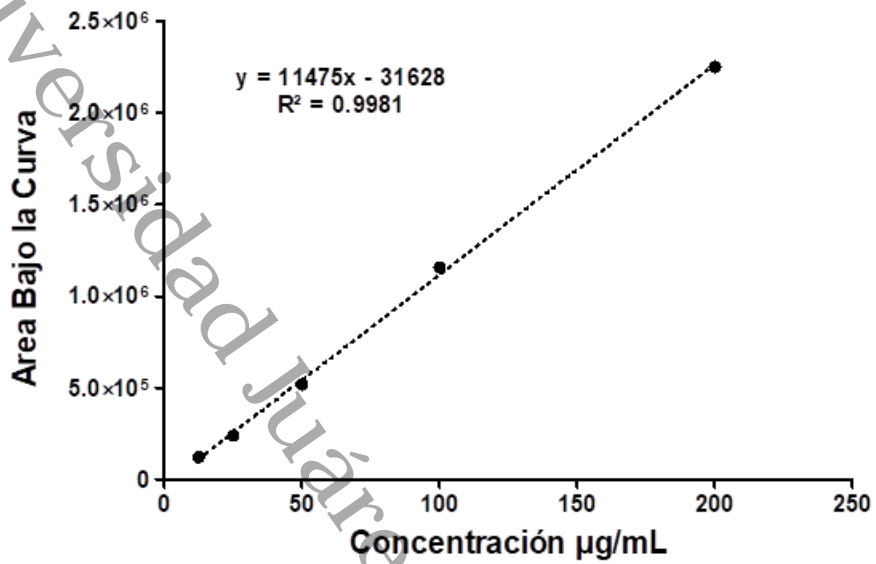
13.2. Curvas de calibración construidas para la determinación del contenido de marcadores químicos (ácido clorogénico, isoorientina, orientina y vitexina).



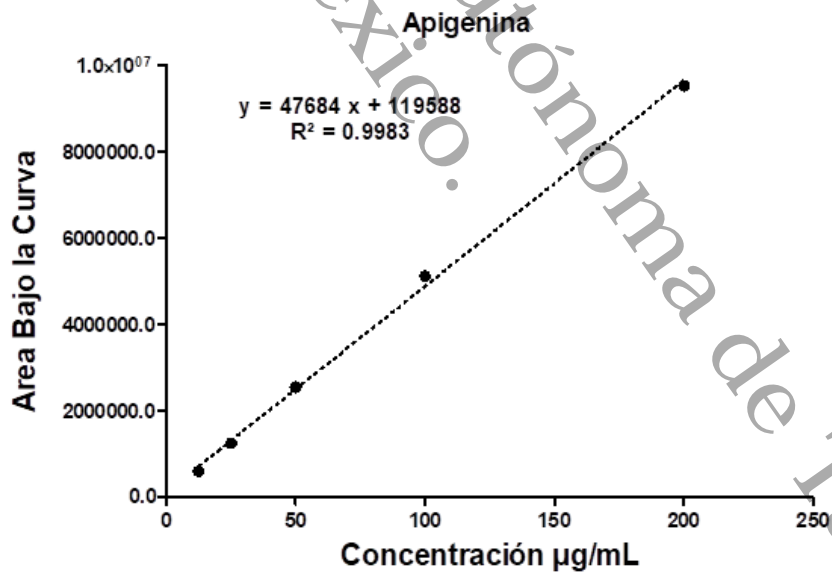
Curva de calibración construida para la determinación de la concentración de ácido clorogénico.



Curva de calibración construida para la determinación de la concentración de isoorientina.



Curva de calibración construida para la determinación de la concentración de orientina.



Curva de calibración construida para la determinación de la concentración de vitexina.

Anexo 13.3. Oficios de asignación de número de identificación para cada una de las muestras colectadas de especies de *Cecropia*.

Villahermosa, Tabasco a 07 de julio de 2021

C. ERIC JAZIEL MEDRANO SÁNCHEZ
UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
PRESENTE

Por medio de la presente, le hago llegar las determinaciones de los tres especímenes botánicos recibidos el día 20 de mayo del presente año:

Especímen: EJMS 1, Localidad: Comalcalco, Tabasco.

Nombre científico: *Cecropia peltata* L. (Familia Urticaceae).

Especímen: EJMS 2, Localidad: Jalpa de Méndez, Tabasco.

Nombre científico: *Cecropia peltata* L. (Familia Urticaceae).

Especímen: EJMS 2, Localidad: Tenosique, Tabasco.

Nombre científico: *Cecropia peltata* L. (Familia Urticaceae).

Folio Herbario UJAT: 36575

El ejemplar foliado quedará a resguardo y disponible para consulta en la Colección de Plantas Vasculares del herbario UJAT.

Sin otro particular, me despido, agradeciendo de antemano la gentileza de su atención

Atentamente



Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez
Curador Colección de Plantas Vasculares
Herbario UJAT
División Académica de Ciencias Biológicas
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

C.c.p. Interesado

Villahermosa, Tabasco a 02 de febrero de 2022

C. ERIC JAZIEL MEDRANO SÁNCHEZ
UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
PRESENTE

Por medio de la presente, le hago llegar las determinaciones de los dos especímenes botánicos recibidos el día 09 de enero del presente año:

Especímen: Eric Jaziel Medrano Sánchez 4, Localidad: Frontera, Centla, Tabasco.

Nombre científico: *Cecropia peltata* L. (Familia Urticaceae).

Folio Herbario UJAT: 36666

Especímen: Eric Jaziel Medrano Sánchez 5, Localidad: Tapijulapa, Tacotalpa, Tabasco.

Nombre científico: *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Familia Urticaceae).

Folio Herbario UJAT: 36667

Estos ejemplares se encuentran a resguardo y disponibles para consulta en la Colección de Plantas Vasculares del herbario UJAT.

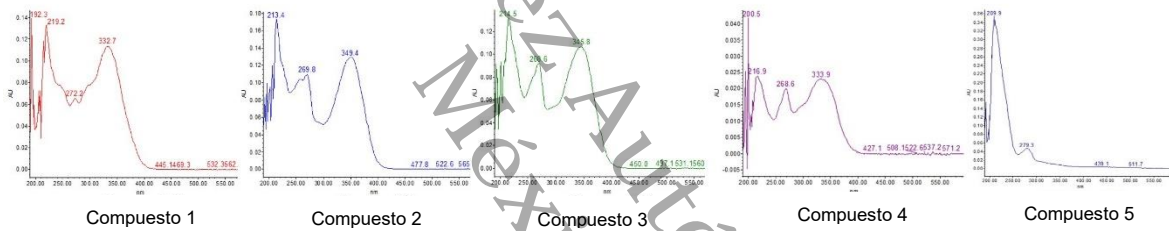
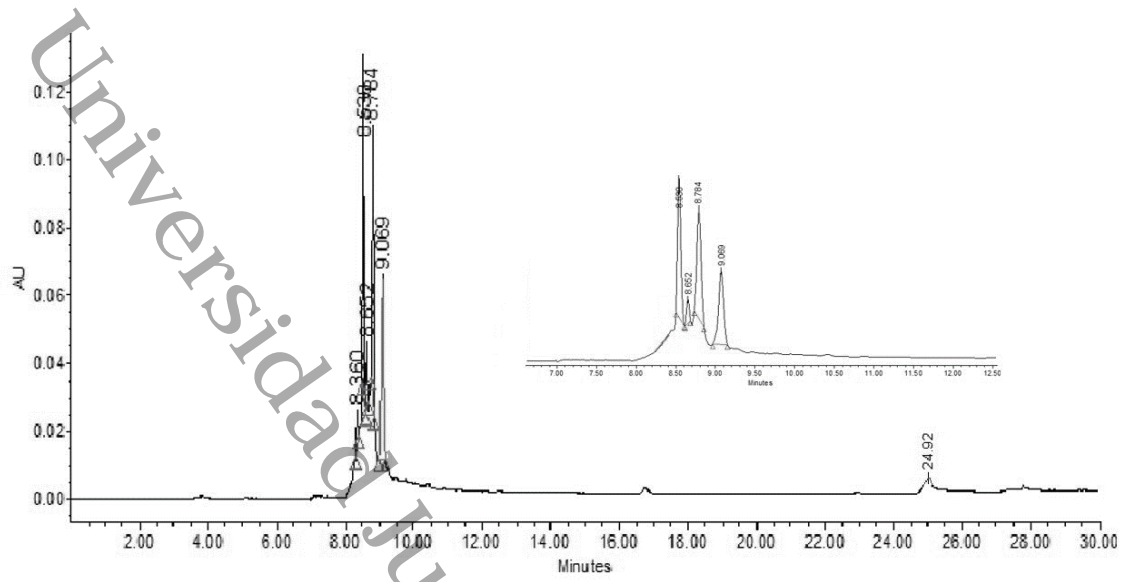
Sin otro particular, me despido, agradeciendo de antemano la gentileza de su atención

Atentamente

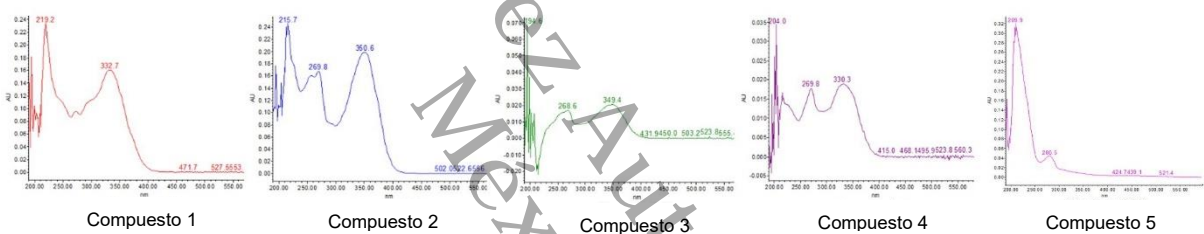
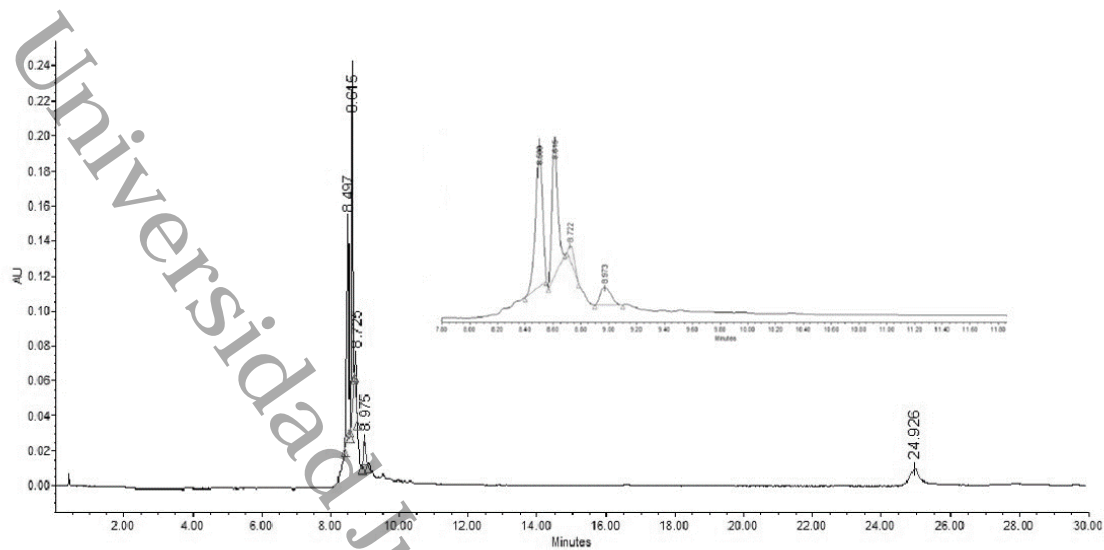


Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez
Curador Colección de Plantas Vasculares Herbario UJAT
División Académica de Ciencias Biológicas
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

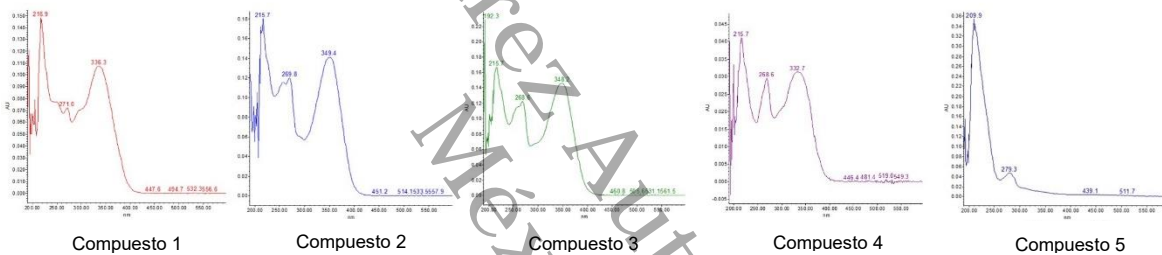
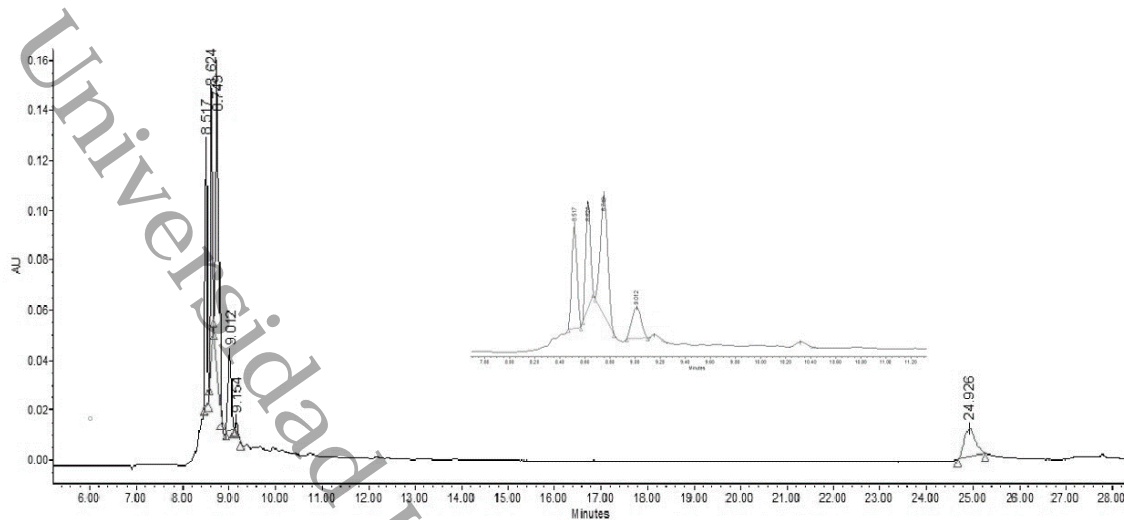
C.c.p. Interesado



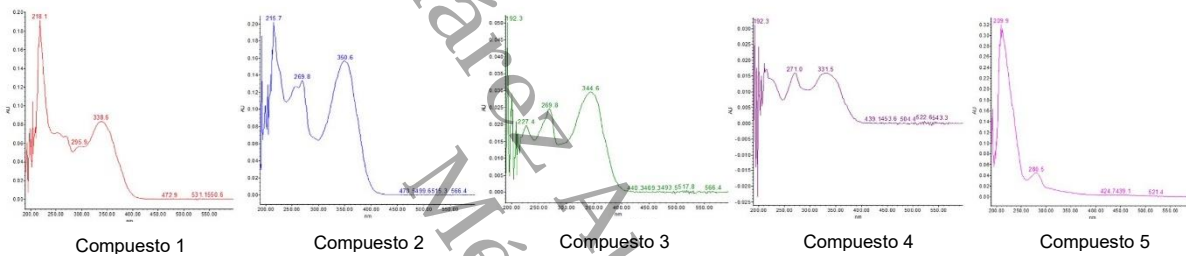
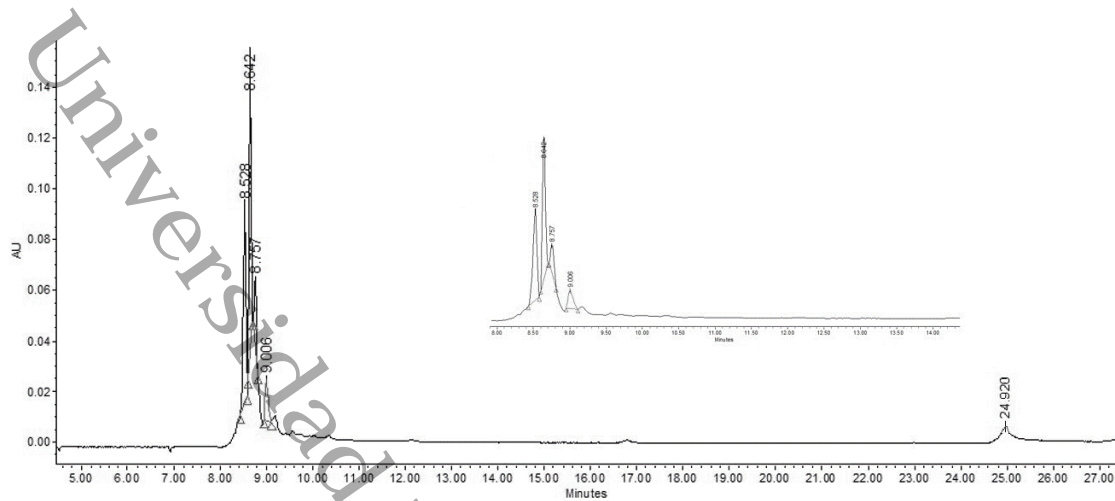
Cromatograma de CLAR y espectro UV de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de *Cecropia peltata* de la subregión Chontalpa (Cp2)



Cromatograma de CLAR y espectro UV de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de *Cecropia peltata* de la subregión Pantanos (Cp3)

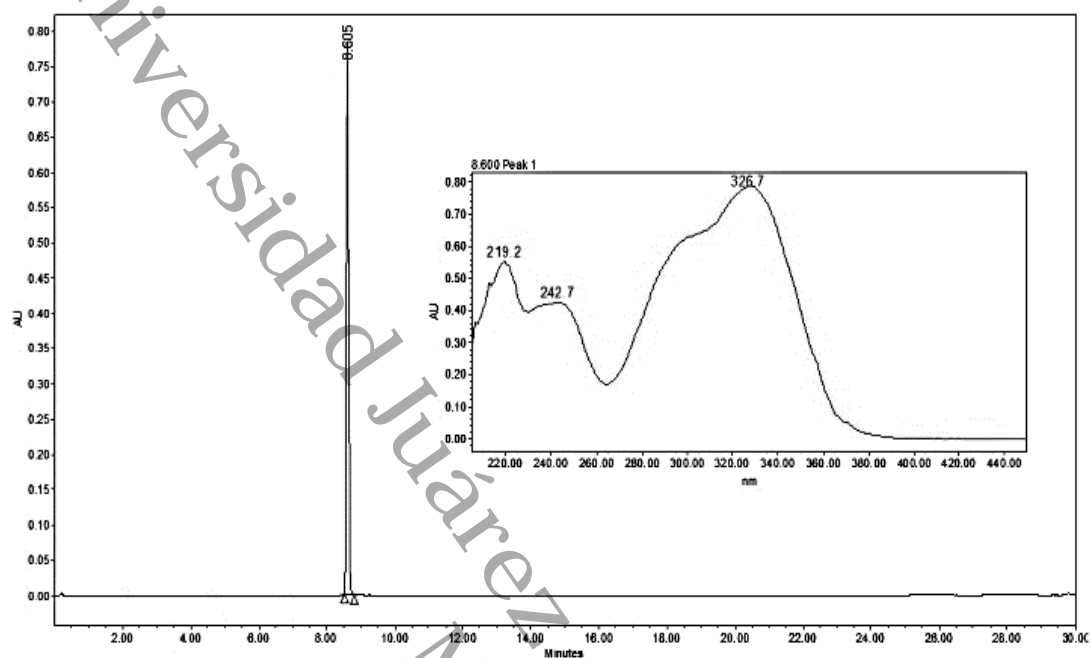


Cromatograma de CLAR y espectro UV de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de *Cecropia peltata* de la subregión Ríos (Cp3)

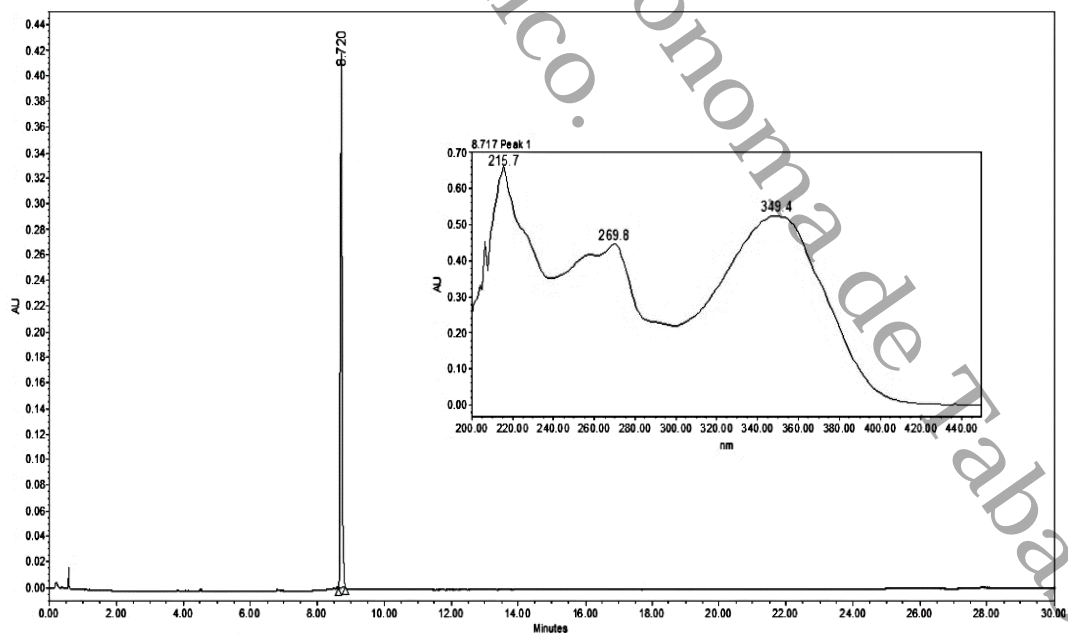


Cromatograma de CLAR y espectro UV de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de *Cecropia obtusifolia* de la subregión Sierra (Co5)

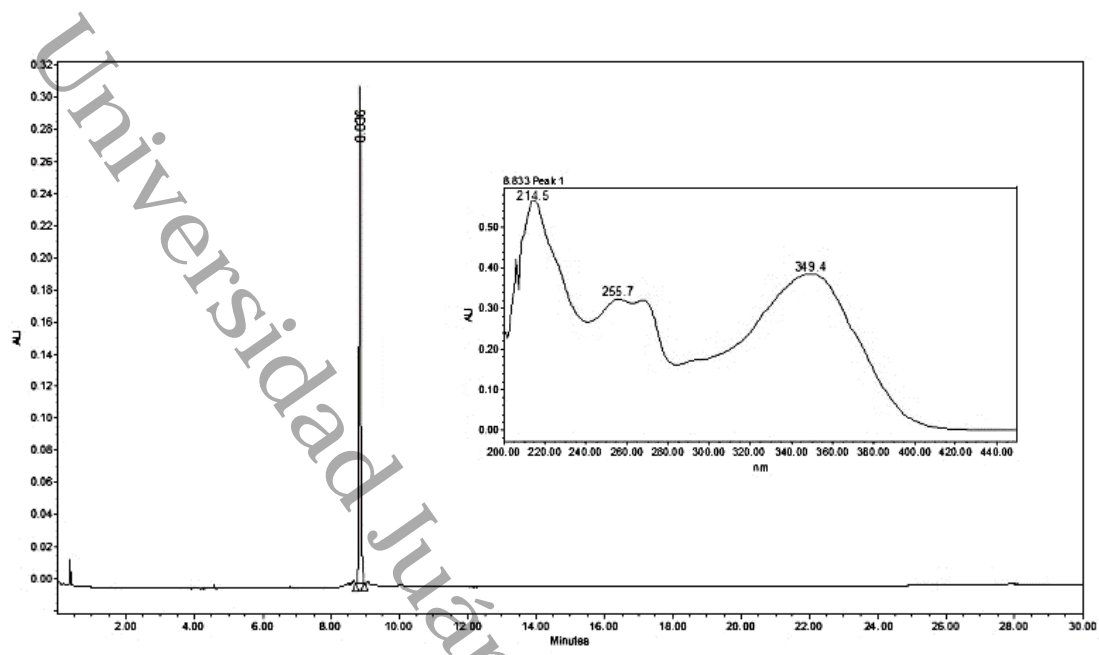
13.4b. Cromatogramas y espectros UV de los estándares comerciales empleados en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución.



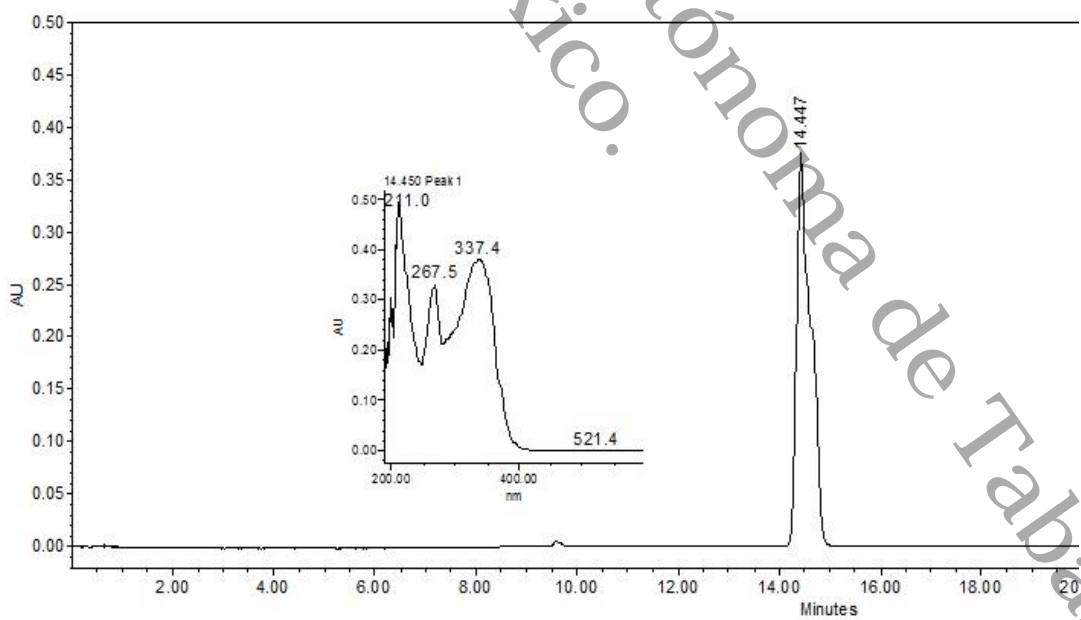
Cromatograma y espectro UV del ácido clorogénico $\lambda = 330$ nm



Cromatograma y espectro UV de isoorientina a $\lambda = 350$ nm











Cromatograma y espectro UV del orientina a $\lambda = 350$ nm



Cromatograma y espectro UV de apigenina a $\lambda = 350$ nm

Article

Intra- and Interspecies Differences of Two *Cecropia* Species from Tabasco, Mexico, Determined through the Metabolic Analysis and ¹H-NMR-Based Fingerprinting of Hydroalcoholic Extracts

Eric Jaziel Medrano-Sánchez ¹, Gloria Ivonne Hernández-Bolio ^{2,*}, Carlos Ernesto Lobato-García ¹, Manasés González-Cortazar ^{3,*}, Mayra Antunez-Mojica ⁴, Ammy Joana Gallegos-García ⁵, Cristian Octavio Barredo-Hernández ¹, Ricardo López-Rodríguez ¹, Nelly Cristina Aguilar-Sánchez ⁶ and Abraham Gómez-Rivera ^{1,*}

- ¹ División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa Km. 0.5, Cunduacán 86690, Tabasco, Mexico; ericsanz123@gmail.com (E.J.M.-S.); carlos.lobato@ujat.mx (C.E.L.-G.); cristian_ba99@hotmail.com (C.O.B.-H.); ricardo.lopezr@ujat.mx (R.L.-R.)
 - ² Departamento de Física Aplicada, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida, Antigua Carretera a Progreso Km. 6, Mérida 97310, Yucatán, Mexico
 - ³ Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, Mexico
 - ⁴ CONACYT-Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; myam@uaem.mx
 - ⁵ División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Popular de la Chontalpa-Carretera Cárdenas-Huimanguillo Km 2 S/N, Ranchería, Invitab Paso y Playa, Heroica, Cárdenas 86556, Tabasco, Mexico; joana90102010@gmail.com
 - ⁶ División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Estatal Libre Villahermosa Comalcalco Km 27 S/N, Ranchería Rivera Alta, Jalpa de Méndez 86205, Tabasco, Mexico; nelly.aguilar@ujat.mx
- * Correspondence: hbolio@gmail.com (G.I.H.-B.); gmanases2000@gmail.com (M.G.-C.); abgori@gmail.com (A.G.-R.); Tel.: +52-(999)-222-2580 (G.I.H.-B.); +52-(777)-361-2155 (M.G.-C.); +52-(993)-358-1500 (ext. 4711) (A.G.-R.)



Citation: Medrano-Sánchez, E.J.; Hernández-Bolio, G.I.; Lobato-García, C.E.; González-Cortazar, M.; Antunez-Mojica, M.; Gallegos-García, A.J.; Barredo-Hernández, C.O.; López-Rodríguez, R.; Aguilar-Sánchez, N.C.; Gómez-Rivera, A.

Intra- and Interspecies Differences of Two *Cecropia* Species from Tabasco, Mexico, Determined through the Metabolic Analysis and ¹H-NMR-Based Fingerprinting of Hydroalcoholic Extracts. *Plants* **2023**, *12*, 2440. <https://doi.org/10.3390/plants12132440>

Academic Editor: Mauro Comisso

Received: 18 May 2023

Revised: 13 June 2023

Accepted: 19 June 2023

Published: 25 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The genus *Cecropia* is used in the traditional medicine of Tabasco, Mexico, in diabetes and hypertension treatments, mainly without distinction of the species. This contribution aimed to carry out the metabolic analysis and Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR) spectroscopy-based fingerprinting of the hydroalcoholic leaf extracts of *Cecropia peltata* (Cp) and *Cecropia obtusifolia* (Co) collected in five sub-regions of the State of Tabasco (Cp1, “Centro”; Cp2, “Chontalpa”; Cp3, “Pantanos”; Cp4, “Ríos” and Co5, “Sierra”). Firstly, the extracts were evaluated for their Total Phenol Content (TPC) and Total Flavonoid Content (TFC) by spectrophotometric methods. In addition, metabolic analysis was performed using High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection HPLC–DAD, which allowed the quantification of the chemical markers: chlorogenic acid, isoorientin, and orientin, as well as a vitexin analog. Finally, metabolomic analysis was carried out based on the ¹H-NMR spectra. The Cp4 extract (*C. peltata* from the “Ríos” sub-region) presented the highest values of TPC (155 ± 9.1 mg GAE/g E) and TFC (724 ± 22.2 mg RE/g E). The metabolic analysis was similar among the five samples; the highest concentrations of the four chemical markers were found in Cp3 (*C. peltata* from the “Pantanos” sub-region) for chlorogenic acid (39.8 ± 2.3 mg/g) and isoorientin (51.5 ± 2.9 mg/g), in Cp4 for orientin (49.9 ± 0.6 mg/g), and in Cp2 (*C. peltata* from the “Chontalpa” sub-region) for the vitexin analog (6.2 ± 0.2 mg/g). The metabolic analysis and the ¹H-NMR fingerprint analysis showed intraspecies differences among the *C. peltata* samples and interspecies between *C. peltata* and *C. obtusifolia*, which were attributed to variations in the metabolite groups as well as in the proportion of sugars such as glucose and xylose.

Keywords: *Cecropia peltata*; *Cecropia obtusifolia*; metabolomic profile; chemical markers

1. Introduction

Plant metabolomics is a field of increasing interest due to different applications, such as knowing the impact that different environmental factors have on metabolism, determining the tolerance to stress by abiotic and biotic agents, as well as determining the complexity of the metabolic content between species of the same genus [1–3]. A first approach to determine the metabolic profile of a plant species is to use spectrophotometric and chromatographic techniques that allow the quantification of groups of metabolites as well as the identification of chemical markers of interest [4,5]. In addition, Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) is one of the main analytical tools used to perform metabolomic studies, as this technique shows a broad overview of the metabolic content in plant extracts, with the advantage of detecting metabolites of various polarities, easily allowing their quantification. Furthermore, NMR provides enough information to carry out studies of structural elucidation without requiring derivatization processes [6]. The ease of processing the $^1\text{H-NMR}$ spectra using several computer programs, as well as the managing, interpretation, and statistical analysis of the data, makes this technique a fast and convenient tool for discriminating species based on their metabolic content [7,8]. For instance, a recent study showed the effectiveness of using $^1\text{H-NMR}$ to evaluate differences in chemical markers related to the different growth stages of *Peganum harmala* L. [9].

In this sense, the genus *Cecropia* constitutes a group of plants that presents challenges in defining of its metabolic profile. This genus is distributed from the tropical and subtropical jungle of Mexico to South America and is made up of 61 species—most of them are traditionally named “guarumo” or variants of this name such as “guarumbo” or “yarumbo”; in the Yokot’ an language spoken in the state of Tabasco, the word “k’olok” is employed [10,11]. It is noteworthy that folk names do not distinguish between species of this genus, which implies challenges in the systematic knowledge of their use in traditional medicine. Different reports on *Cecropia* spp. emphasize the use of these plants in diabetes [12,13] and hypertension [14,15] treatments, as well as in the alleviation of inflammation and pain [16]. In addition, antimicrobial [17] and antimalarial properties have also been reported [18]. In Tabasco State, Mexico, *C. peltata* and *C. obtusifolia* are the two species with the greatest distribution and use [19]. The coexistence of both species with the same popular name can lead to potentially inappropriate use derived from the null differentiation between them, with the concomitant risk that the substitution of one plant species for another may have implications for the therapeutic effect that is being sought, including potentially adverse health reactions. In this sense, the evaluation of the hypoglycemic effect of methanolic extracts from the leaves of *C. peltata* and *C. obtusifolia* demonstrated a greater effectiveness for the first species, attributed to a higher concentration of chlorogenic acid, which is the main metabolite related to this activity [20]. Furthermore, it is important to indicate that the metabolic content of a plant may present differences depending on the region where it is collected [21–23].

The state of Tabasco is located in the southeast of Mexico and is officially divided into five sub-regions (“Centro”, “Chontalpa”, “Pantanos”, “Ríos”, and “Sierra”) that are delimited by geographical, cultural, and productive aspects [24]. In these sub-regions, inhabitants traditionally use the leaves of both *Cecropia* species (*C. peltata* and *C. obtusifolia*) as an infusion for the treatment of diabetes [10,25]. However, reports concerning the phytochemical and/or metabolomic analyses of these *Cecropia* species are scarce. In order to promote the rational use of extracts and herbal products derived from these plants, it is necessary to generate information that allows an adequate recognition of their phytochemical contents. In this sense, the objective of this study was to characterize the metabolic composition of the hydroalcoholic extracts from the leaves of *C. peltata* and *C. obtusifolia* collected in each of the five sub-regions of the state of Tabasco, emphasizing the study of the quantification of chlorogenic acid, isoorientin, orientin, and a vitexin analog, which are well recognized as chemical markers for this genus [26]. Additionally, a multivariate analytical approach was applied by the assessment of $^1\text{H-NMR}$ fingerprinting of the aforementioned extracts in order to have a comprehensive view of the chemical composition of these species.

2. Results and Discussion

2.1. Total Phenol Content (TPC) and Total Flavonoid Content (TFC) of Hydroalcoholic Extracts from *Cecropia* Species

The quantification of TPC and TFC in the five samples analyzed is shown in Figure 1. The sample identified as *C. peltata* from the “Ríos” sub-region (**Cp4**) showed the highest concentration of both groups of metabolites. The TPC from extract **Cp4** (155 ± 9.1 mg GAE/g E) presented significant differences with respect to the other samples, whereas **Cp2** from the “Chontalpa” sub-region and **Cp3** from the “Pantanos” sub-region did not show significant differences in the TPC values (103.4 ± 6.3 and 111.3 ± 4.8 mg GAE/g E, respectively). It is noteworthy that **Cp2** also did not show significant differences in the content of phenolic compounds when compared to **Cp1** from the “Centro” sub-region (84.1 ± 3.3 mg GAE/g E). It should also be noted that the extract of *C. obtusifolia* from the “Sierra” sub-region (**Co5**) presented the lowest concentration of TPC (53.5 ± 1.1 mg GAE/g E) and exhibited a significant difference with respect to the *C. peltata* samples. Regarding the quantification of TFC, **Cp4** showed a content of 724 ± 22.2 mg RE/g E, with a significant difference compared to the other extracts. The extracts **Co5** (567.1 ± 30.5 mg RE/g E) and **Cp3** (374.5 ± 36.1 mg RE/g E) were the second and third samples, respectively, with the highest content of flavonoids, with a significant difference between them. On the other hand, the **Cp1** and **Cp2** samples presented the lowest TFC (100.1 ± 5.5 and 158.8 ± 19.6 mg RE/g E, respectively), with no significant difference between them.

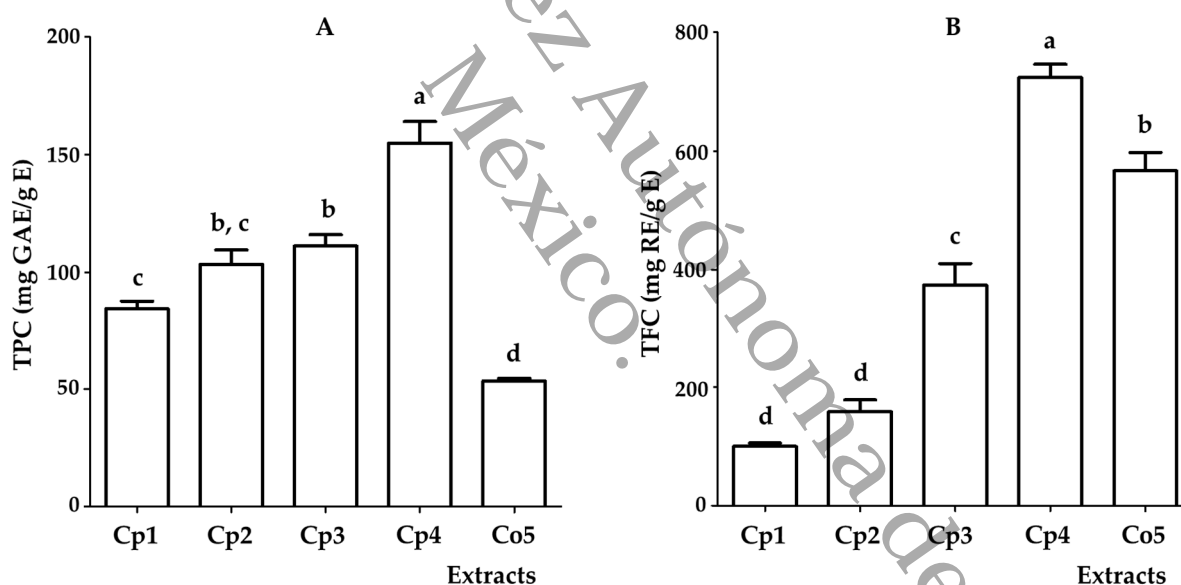


Figure 1. Comparison of TPC (A) and TFC (B) in the hydroalcoholic extracts of *C. peltata* (Cp1–Cp4) and *C. obtusifolia* (Co5). TPC: Total phenol content; mg GAE/g E: Gallic acid equivalents per gram of extract. TFC: Total flavonoid content; mg RE/g E: rutin equivalents per gram of extract. The data represent the mean \pm standard error ($n = 3$) of each extract. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey test. Bars with the same letter (a–d) represent no significant difference at $p < 0.05$.

These results contrast with those reported by Rivera-Mondragón et al. 2019, concerning the TPC and TFC contents of several species of *Cecropia* in Panama; *C. obtusifolia* had the highest content of these metabolites [27]. However, in the present study, the *C. peltata* samples (Cp1–Cp4) presented higher levels of TPC in contrast to the *C. obtusifolia* sample (Co5), which presented the lowest content of this group of metabolites. Similarly, when comparing the values of TFC, an extract of *C. peltata* (Cp4) was the one with the highest concentration of flavonoids, followed by the *C. obtusifolia* sample (Co5).

2.2. Preliminary HPLC Analysis of Hydroalcoholic Extracts from *Cecropia* Species

The analysis of the HPLC chromatograms obtained from the hydroalcoholic extracts of the *Cecropia* spp. (Figures S1–S5) allowed the identification of five peaks with a retention time (t_R) ranging from 8.5 to 24.9 min (Figure 2). They were characterized as follows: Peak 1 with a t_R of 8.53 min showed absorption bands at $\lambda_{max} = 220.4$ and 327.6 nm; these parameters coincided with those of the chlorogenic acid standard analyzed under the same experimental conditions. Likewise, peaks 2 and 3 were identified as isoorientin (t_R of 8.65 min) and orientin (t_R of 8.78 min); the absorption bands of both peaks at $\lambda_{max} = 208.7$, 269.8, and 351.7 nm and at 215.7, 268.6, and 345.8 nm, respectively, coincided with the standards analyzed under the same experimental conditions. In the case of peak 4, with a t_R of 9.06 min, the absorption bands at $\lambda_{max} = 215.7$, 268.6, and 336.3 nm showed similarity with those reported for a flavone-type glycosylated compound that can be attributed to a vitexin analog that was previously reported in *Cecropia* spp. [27–30]. Additionally, the chromatograms showed peak 5, with a t_R of 24.9 min and absorption bands at $\lambda_{max} = 209.9$ and 279.3 nm, which exhibited similarity to an esterified catechin analog that has been reported for this genus [26]. It is worth noting that the results obtained are in good agreement with previous reports on the phytochemical content of this genus [31–35]. Likewise, this study highlights the presence of a similar metabolic profile for these four metabolites in the extracts analyzed from *C. peltata* and *C. obtusifolia*.

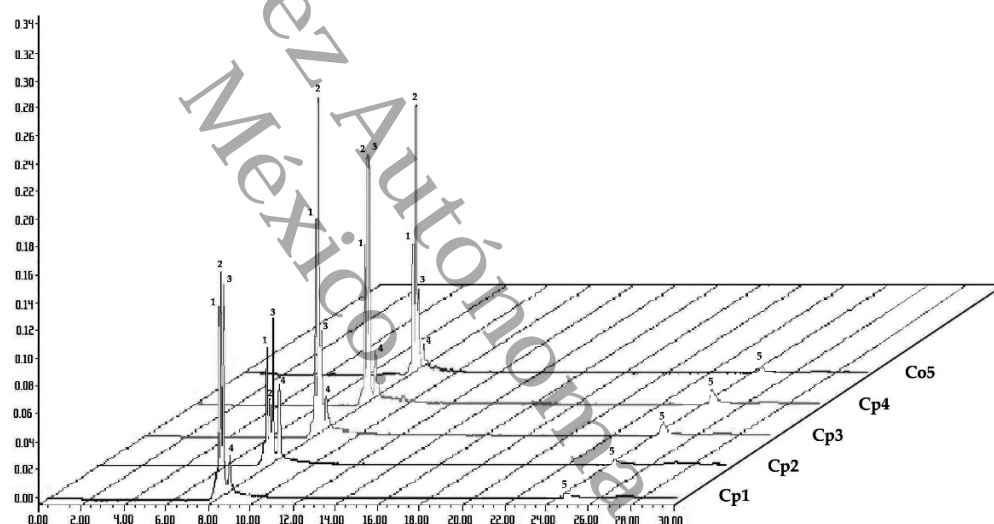


Figure 2. HPLC chromatograms of the hydroalcoholic extracts of *C. peltata* (Cp1–Cp4) and *C. obtusifolia* (Co5). The peaks are numbered in ascending order according to their retention times ($\lambda = 330$ nm). 1, chlorogenic acid; 2, isoorientin; 3, orientin; 4, vitexin analog; 5 catechin analog.

Chlorogenic acid, isoorientin, orientin, and the vitexin analog have been established as chemical markers in quality control for the medicinal use of *Cecropia* species [26,30]. The quantification of these metabolites by HPLC are summarized in Figure 3. The Cp3 sample presented the highest concentrations of chlorogenic acid and isoorientin: 39.8 ± 2.3 mg/g and 51.5 ± 2.9 mg/g, respectively, whereas two extracts of *C. peltata* (Cp1 and Cp4) and the extract of *C. obtusifolia* (Co5), did not show significant differences for both chemical markers: chlorogenic acid (25.3 ± 2.8 , 24.3 ± 0.3 , and 24.1 ± 1.5 mg/g, respectively) and isoorientin (34.6 ± 0.3 , 38.5 ± 0.3 , and 37.2 ± 1.5 mg/g, respectively). However, a particular case was detected when analyzing the extract Cp2; although it showed similarity in its chlorogenic acid content (22.61 ± 1.7 mg/g) with respect to Cp1, Cp4, and Co5, it was the sample with the lowest concentration of isoorientin (8.1 ± 0.4 mg/g), with a significant difference when compared with the other extracts. In the case of orientin, Cp4 showed the highest content (49.9 ± 0.6 mg/g), followed by Cp1 (34.5 ± 1.8 mg/g) and Cp2 (27.9 ± 1.5 mg/g), with significant differences between them; likewise, Cp3 and

Co5 exhibited the lowest concentrations (7.9 ± 0.8 and 11.6 ± 0.6 mg/g, respectively), with no significant difference between them. For the vitexin analog, the quantification was performed by employing the aglycone moiety apigenin, and the sample with the highest content was **Cp2** (6.2 ± 0.2 mg/g), which was significantly different from the other samples, followed by **Cp4** (5.1 ± 0.2 mg/g) and **Cp1** (4.7 ± 0.2 mg/g), which were not different. The samples with the lowest concentration of this compound were **Cp3** (4.4 ± 0.4 mg/g) and **Co5** (4.5 ± 0.3 mg/g); these values were significantly different from **Cp4**, but they were statistically similar to **Cp1**. Regarding the esterified catechin analog, the area under the curve obtained was unsuitable for quantification. These results are consistent with those of previous studies that showed regional variability in the concentration of these chemical markers, which may impact the use attributed to the species in traditional medicine [20,27,34].

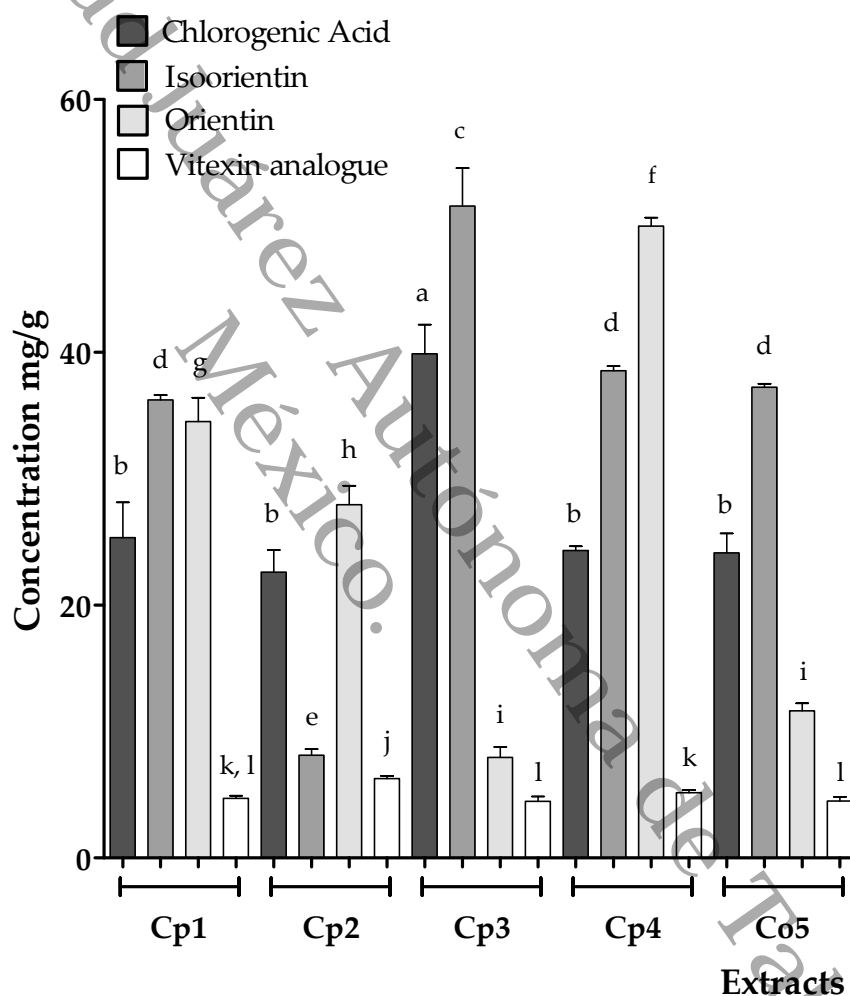


Figure 3. Concentration (mg/g) of chlorogenic acid, isoorientin, orientin, and the vitexin analog in the hydroalcoholic extracts of *C. peltata* (**Cp1–Cp4**) and *C. obtusifolia* (**Co5**). The data represent the mean \pm standard error ($n = 3$) for each extract. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey test. Bars with the same letter (a–l) represent no significant difference at $p < 0.05$.

The spectroscopic and chromatographic methods used for the quantification of TPC, TFC, and the total chemical marker content (TCMC) are not comparable to each other, as each one has particular scopes and limitations [36–38]. Therefore, it was not possible to establish a direct relationship between the TPC, TFC, and TCMC values. However, it was possible to observe a trend that marked differences both within and between species, where

C. peltata (Cp4) from the “Ríos” sub-region differed from the other samples of the same species (Cp1, Cp2, and Cp3), with higher values of TPC, TFC, and TCMC. On the other hand, *C. obtusifolia* (Co5) showed a statistically significant variation in TPC and TFC with respect to all *C. peltata* samples and was similar only to Cp2 in TCMC (Table 1).

Table 1. TPC, TFC, and TCMC in species of *Cecropia* *.

	Cp1	Cp2	Cp3	Cp4	Co5
TPC (mg GAE/g E)	84.1 ± 3.3 ^c	103.4 ± 6.3 ^{b,c}	111.3 ± 4.8 ^b	155 ± 9.1 ^a	53.5 ± 1.1 ^d
TFC (mg RE/g E)	100.1 ± 5.5 ^d	158.8 ± 19.6 ^d	374.5 ± 36.1 ^c	724 ± 22.2 ^a	567.1 ± 30.5 ^b
TCMC (mg/g)	100.8 ± 4.2 ^b	64.9 ± 1.0 ^c	103.9 ± 4.7 ^b	118.0 ± 0.7 ^a	77.4 ± 1.1 ^c

* TPC: Total Phenol Content; TFC: Total Flavonoid Content and TCMC: Total Chemical Marker Content of the hydroalcoholic extracts of *C. peltata* (Cp1–Cp4) and *C. obtusifolia* (Co5). Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey test. Values with the same letter (a–d) represent no significant difference at $p < 0.05$, for the same assay.

2.3. Multivariate Analysis of ¹H-NMR Profiles

The ¹H-NMR metabolic profiles of each of the hydroalcoholic extracts of *Cecropia* spp. are shown in Figure 4.

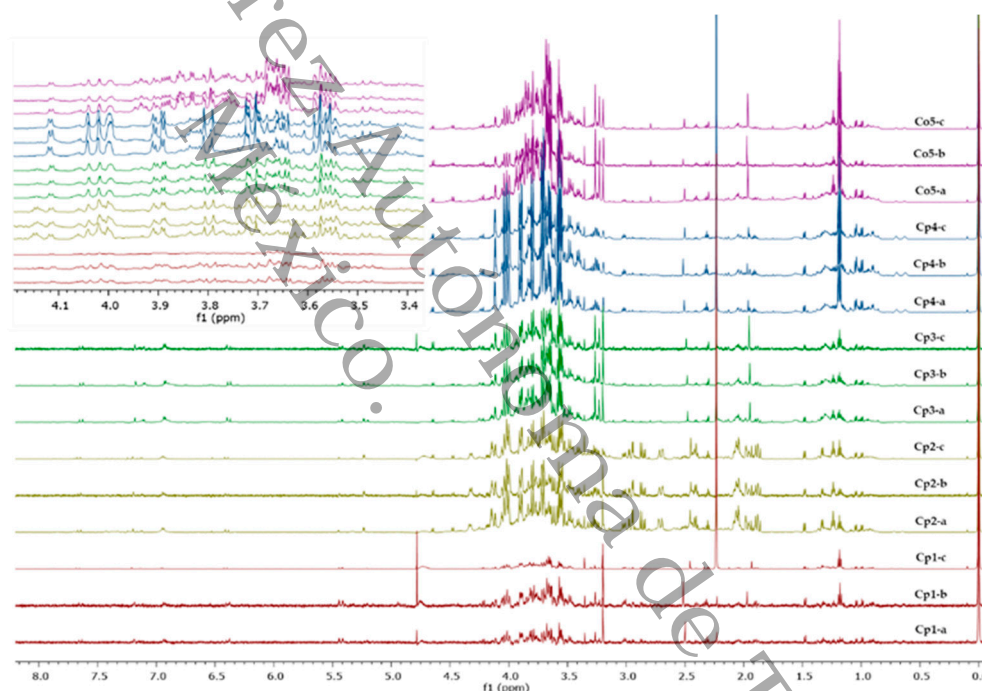


Figure 4. ¹H-NMR profiles (D₂O, 600 MHz; region δ 8.00 to 0.00 ppm) of the hydroalcoholic extracts of *C. peltata* (Cp1–Cp4) and *C. obtusifolia* (Co5); a–c corresponds to triplicates of each sample. Inserted spectra show the region from δ 3.40 to δ 4.20 ppm with the characteristic signals of sugars.

The ¹H-NMR data, used in the principal component analysis and the PCA score graph (PC1 vs. PC2), were obtained with 65.2% explained variance, as shown in Figure 5A. This allowed the identification of differences in the metabolic content for both intra- and interspecies. In the first case, Cp4 represented an independent group differentiated from the other three samples of the same species, while, Cp1, Cp2, and Cp3 belonged to the same group, with Cp1 and Cp3 being different from each other but similar to Cp2. On the other hand, the interspecies differences were very noticeable, as the sample of *C. obtusifolia* (Co5) represented an independent grouping with no affinity to *C. peltata*.

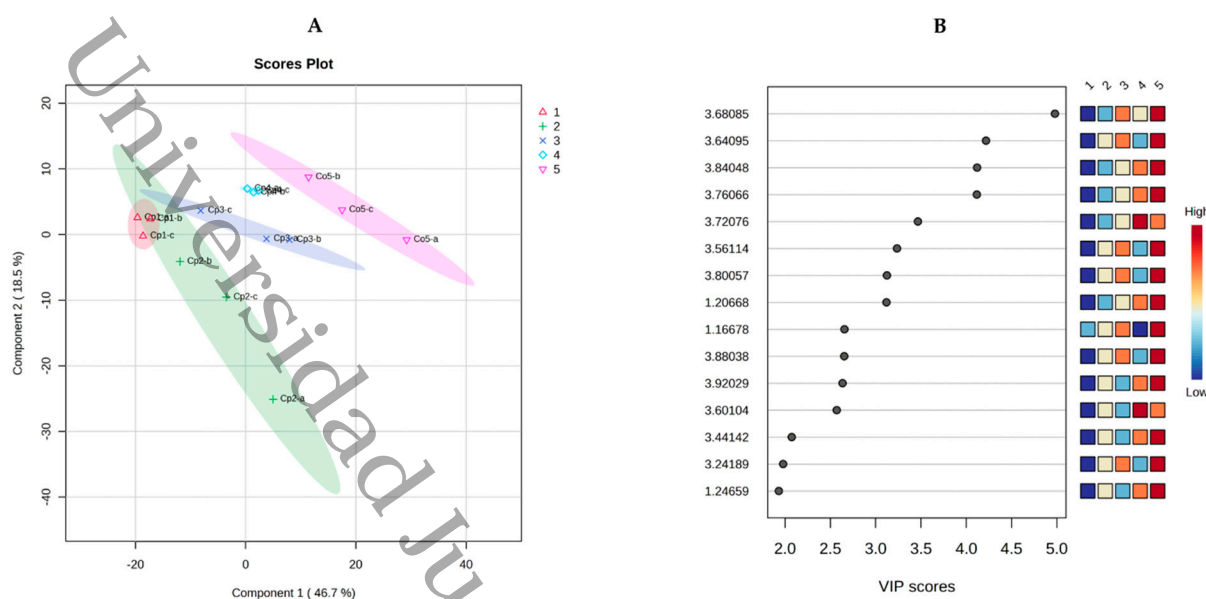


Figure 5. Principal component analysis score plot (PC1 vs. PC2, 65.2% explained variance); (A) $^1\text{H-NMR}$ profiles of the hydroalcoholic extracts of *C. peltata* (Cp1–Cp4) and *C. obtusifolia* (Co5); a–c correspond to triplicates of each sample. (B) Variable Importance in Projection (VIP) of the defined metabolites of the $^1\text{H-NMR}$ profiles of the hydroalcoholic extracts from *Cecropia* species.

The PLS-DA generated the VIP values (Figure 5B), where the chemical shifts with the highest score were located mainly in the region of methines of oxygenated bases (δ 3.24– δ 3.92 ppm) that can be attributed, according to the literature [39,40], to the presence of sugars such as glucose (δ 3.68, δ 3.76, and δ 3.88 ppm) and xylose (δ 3.60 and δ 3.72 ppm), which have been previously reported in *Cecropia* species [27]. These results are consistent with the intraspecies differences observed in the PCA, as the independent group of *C. peltata* from the “Ríos” sub-region (Cp4) obtained a higher score in chemical shifts attributed to xylose than Cp1, Cp2, and Cp3. By contrast, the intraspecies differences observed in the PCA between Cp1 and Cp3 can be associated with a higher score, in the second sample, for the chemical shifts attributed to glucose and xylose. The interspecies differences were also corroborated, as *C. obtusifolia*, which represented an independent group in the PCA, was the sample with the highest score for the chemical shifts attributed to both sugars.

It is noteworthy that the analytical methods applied in this contribution revealed intra- and interspecies differences in the *Cecropia* samples studied, by quantifying specific groups of metabolites (TPC, TFC, and TCMC) and by analyzing the pattern in the $^1\text{H-NMR}$ fingerprinting of whole extracts. The general tendencies that allowed the identification of the diversity between samples remained the same. These results highlight the importance of applying diverse analytical techniques in order to obtain a more comprehensive view of the metabolic differences that may be involved in the analysis of samples of the same species obtained from different sub-regions or samples of different species of the same genus.

Finally, it is important to highlight that the presence of polyphenols and flavonoids, as well as that of the four chemical markers, correlates with the use of these species in traditional medicine. However, the intra- and interspecies differences in the concentrations of these metabolites suggest the need to establish adequate conditions for the rational use of both species for the treatment of diabetes and hypertension, the main diseases for which *Cecropia* species are employed.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material and Extraction of *Cecropia* Species

Mature specimens of *Cecropia* spp. (with a height greater than 2 m) [11] were identified at the five sampling points (Figure 6). The leaves of *Cecropia* spp. were collected in triplicate

in the five sub-regions of the state of Tabasco, Mexico, in the periods of March–May and August 2021.

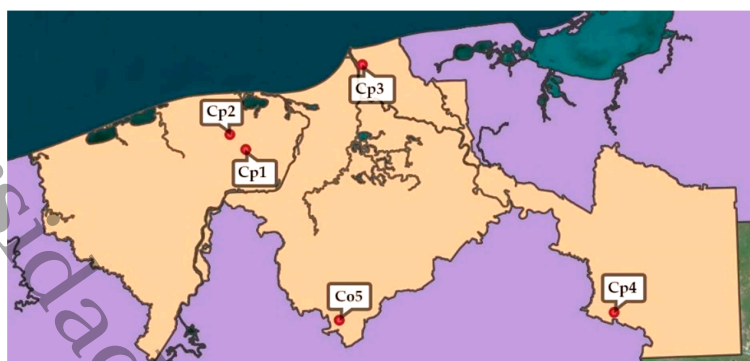


Figure 6. Collection points in Tabasco, Mexico, of leaves of *C. peltata* (Cp1–Cp4) and *C. obtusifolia* (Co5); map was made using QGIS® v. 3.30.3 (Beaverton, OR, USA).

Table 2 shows the data corresponding to the geolocation (Google Maps®, Mountain View, CA, USA) of the points where each of the samples was collected. One specimen from each collection was deposited in the Herbarium of the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico.

Table 2. Geolocation of collection sites and taxonomic identification of *Cecropia* species.

Sub-Region	Municipality	Geographical Coordinates	Species	Voucher Number
“Centro”	Jalpa de Méndez	N 18°11′50.046″ / W 93°10′15.2544″	<i>C. peltata</i>	36575
“Chontalpa”	Comalcalco	N 18°15′47.0916″ / W 93°14′22.884″	<i>C. peltata</i>	36575
“Pantanos”	Centla	N 18°32′22.8084″ / W 92°38′11.7852″	<i>C. peltata</i>	36666
“Ríos”	Tenosique	N 18°11′50.046″ / W 93°10′15.2544″	<i>C. peltata</i>	36575
“Sierra”	Tacotalpa	N 17°27′28.2024″ / W 92°46′46.2108″	<i>C. obtusifolia</i>	36667

The leaves were dried at room temperature in the dark for 72 h and ground (4–6 mm) using a Pulvex MP300. The dried plant materials (500 g each) were extracted by maceration with a mixture of reaction-grade solvents (ethanol:water 7:3 (2 L); Merck, Darmstadt, Germany); the maceration procedure was performed three times (24 h each) for each sample in order to ensure an exhaustive extraction. These extracts were filtered, concentrated in a rotary evaporator (Büchi R-300, Flawil, Switzerland), and then lyophilized (Freeze Dryer, Scientz-10N); a total of 15 extracts were obtained, and the labels for their identification and their average yield are shown in Table 3.

Table 3. Nomenclature and percentages for hydroalcoholic extracts obtained from *C. peltata* (Cp) and *C. obtusifolia* (Co).

Sub-Region	Label *	Average Yield %
“Centro”	Cp1a–c	9.3 ± 2.5
“Chontalpa”	Cp2a–c	10.5 ± 3.2
“Pantanos”	Cp3a–c	13.2 ± 2.6
“Ríos”	Cp4a–c	8.6 ± 1.8
“Sierra”	Co5a–c	10.5 ± 2.2

* a–c corresponds to triplicates of each sample.

3.2. Total Phenol Content of the Hydroalcoholic Extracts of *C. peltata* and *C. obtusifolia*

The total phenol content was determined according to the Folin–Ciocalteu method described by Difonzo et al., 2022. The extract (10 mg) was properly diluted in 1 mL of MeOH (179337, Merck, Darmstadt, Germany); an aliquot of 100 μ L was mixed with 250 μ L of Folin–Ciocalteu reagent (47641, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1400 μ L of H₂O; this mixture was incubated for 3 min and subsequently, 250 μ L of 20% of Na₂CO₃ (223530, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added; the solution was incubated in the dark for 2 h at room temperature. The absorbance was measured at 760 nm using a spectrophotometer (GENESYS™ 10S UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Scientific, Madison, WI, USA). A calibration curve was prepared with standard solutions of gallic acid (398225, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in MeOH (1.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 7.0 μ g/mL). The curve had an R² of 0.9991. The results were expressed as mg of gallic acid equivalent per g of extract (mg GAE/g E). The analyses were carried out in triplicate [41].

3.3. Total Flavonoid Content of the Hydroalcoholic Extracts of *C. peltata* and *C. obtusifolia*

The total flavonoid content was measured by a colorimetric assay developed by Zhu et al., 2010. An aliquot of the diluted sample in MeOH (100 μ L) was mixed with 1675 μ L of H₂O, and 75 μ L of NaNO₂ (5%, w/w; 221341, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the flask. After 5 min, 150 μ L of AlCl₃ (10% w/w; 206911, Merck, Darmstadt, Germany) was incorporated, and the reaction was quenched 6 min later by the addition of 500 μ L of NaOH (1 M; 221465, Merck, Darmstadt, Germany); the solution was incubated in the dark for 2 h at room temperature. The absorbance of the mixture was determined at 510 nm using a spectrophotometer (GENESYS™ 10S UV-Visible Spectrophotometers, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, USA). A calibration curve was prepared with rutin standard solutions (10.0, 20.0, 30.0, 40.0, and 50.0 μ g/mL; 78095, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The calibration curve had an R² of 0.9994. The results were expressed as mg of rutin equivalents per g of extract (mg RE/g E). The analyses were carried out in triplicate [37].

3.4. Preliminary HPLC Analysis and the Quantification of Chlorogenic Acid, Isoorientin, Orientin, and the Vitexin Analog in Hydroalcoholic Extracts of *C. peltata* and *C. obtusifolia*

The chromatographic analysis was performed as described by Gallegos-García et al., 2022. In general, it was performed using a Waters 2695 chromatograph with a Waters 2696 separation module and a photodiode array detector with Empower Pro software (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A Supelcosil LC-F column (4.6 mm \times 250 mm i.d., particle size 5 μ m; Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) was used. The mobile phase consisted of a 0.5% aqueous solution of trifluoroacetic acid (302031, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as solvent A and acetonitrile (34851, Merck, Darmstadt, Germany) as solvent B, with the following gradient: 0–1 min, 0% of B; 2–3 min, 5% of B; 4–20 min, 30% of B; 21–23 min, 50% of B; 24–25 min, 80% of B; 26–27 min, 100% of B; 28–30 min, 0% of B; the flow rate was 0.9 mL/min. The sample volume was 10 μ L of a methanolic solution of each extract (2 mg/mL) [42]. Likewise, a spectrophotometric scan was performed from 200 to 600 nm, and it was observed that by adjusting the detector to 330 nm, the distortion of the linear base decreased, and the peaks became more defined with a greater definition of the absorption bands corresponding to the identified compounds.

Quantification of the chlorogenic acid, isoorientin, orientin, and the vitexin analog was performed using calibration curves of external standards. Each calibration curve was constructed by injecting 50 μ L of serial dilutions of pure chlorogenic acid (C3878, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), isoorientin (78019, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and orientin (55736, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); in the case of the vitexin analog, the quantification was performed with apigenin standard (42251, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); all extracts and standards were dissolved in MeOH (12, 25, 50, 100, and 200 μ g/mL). The calibration curves were based on peak areas of the HPLC chromatograms and had an R² of 0.998, 0.999, 0.999, and 0.9998, respectively. The results are represented as

mg per g of extract [20,43]. To visualize the differences in the content of chemical markers in the *Cecropia* species, the Total Chemical Marker Content (TCMC) was expressed as the sum of the concentrations of each chemical marker (chlorogenic acid, isoorientin, orientin, and the vitexin analog) in each sample.

3.5. ¹H-NMR Fingerprinting and Multivariate Analysis of the Hydroalcoholic Extracts of *C. peltata* and *C. obtusifolia*

¹H-NMR experiments were performed as described by Hernández-Bolio et al., 2021, with some modifications. The samples were processed at 25 °C on a Varian AR Premium Compact at 600 MHz. In brief, 10 mg of each extract was dissolved in 700 µL of D₂O (0.05% TSP; 450510, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and transferred to a 5 mm NMR tube. The ¹H-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width: 5.9 µs, relaxation time: 1.0 s, number of transients: 64 with data collected from 65K data points. During the recycle delay, a pre-saturation sequence was employed to suppress the residual H₂O signal with a selective low-power irradiation at the water resonance frequency. The resulting spectra were processed using MNova 12.0 (Mestrelab Research S.L.) as described below. The phase was manually adjusted and the baseline was automatically corrected, a Gaussian function with a line-broadening factor of 0.3 Hz was applied, and the reference was set to sodium 3-trimethylsilyl [2, 2, 3, 3-d₄] propionate (TSP; 0.0 ppm). After the spectra were stacked, the region from δ 4.6–4.8 corresponding to residual water was deleted to discard the effects of these intense signals in the multivariate analysis. Afterwards, the spectra were normalized to the TSP signal and divided into intervals of equal size of 0.04 ppm each to obtain a total of 301 regions. The multivariate data were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) by MetaboAnalyst Software version 5.0 (www.metaboanalyst.ca, Alberta, Canada; accessed on 26 January 2023). Those metabolites relative to the different species and/or influencing the discrimination of the samples were identified using Chenomx NMR suite software (v. 8.3, evaluation version, Chenomx Inc. Edmonton, Canada) [44].

3.6. Statistical Analysis

The total phenol, flavonoid, chlorogenic acid, isoorientin, orientin, vitexin analog, and total chemical marker contents were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM), and statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) with a confidence level of 95% (* $p \leq 0.05$) followed by the Tukey test. All statistics analyzed were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Conclusions

The hydroalcoholic extracts of the *Cecropia* species collected in the five sub-regions of the state of Tabasco, Mexico, presented both intra- and interspecies differences based on the content of the metabolic groups analyzed. *C. peltata* from the “Ríos” sub-region showed the highest values of TPC, TFC, and TCMC compared to the other samples of the same species; on the other hand, *C. obtusifolia* from the “Sierra” sub-region showed differences in TPC and TFC with respect to the *C. peltata* samples, but it was similar in TCMC to *C. peltata* from the “Chontalpa” sub-region. Likewise, a similar behavior was demonstrated in the multivariate analysis of the ¹H-NMR-fingerprinting, in which the differences were based on the proportions of those signals attributed to sugar moieties present in the samples; *C. peltata* from the “Ríos” sub-region again showed a difference when compared to the other samples of the same species by presenting a higher proportion of signals attributed to xylose. By contrast, the *C. obtusifolia* sample was completely differentiated from all *C. peltata* samples, as it presented the highest proportion of signals attributed to glucose. It should be noted that the application of various analytical techniques found differences in the metabolic content of plants of the same species collected in different sub-regions, as well as in species belonging to the same genus. This report constitutes a first study, to our knowledge, among species of the genus *Cecropia* collected in the southeastern region of

Mexico; therefore it contributes to the knowledge of the chemical contents of these plants. Finally, this work seeks to support the design of specific actions aimed at the rational use of herbal products derived from plants of this genus.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants12132440/s1>, Figure S1: HPLC chromatogram and UV spectra of the main compounds of hydroalcoholic extracts of Cp1; Figure S2: HPLC chromatogram and UV spectra of the main compounds of hydroalcoholic extracts of Cp2; Figure S3: HPLC chromatogram and UV spectra of the main compounds of hydroalcoholic extracts of Cp3; Figure S4: HPLC chromatogram and UV spectra of the main compounds of hydroalcoholic extracts of Cp4; Figure S5: HPLC chromatogram and UV spectra of the main compounds of hydroalcoholic extracts of Co5.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.-R., C.E.L.-G. and M.G.-C.; methodology, E.J.M.-S. and G.I.H.-B.; validation, G.I.H.-B. and C.E.L.-G.; formal analysis, A.G.-R.; investigation, A.G.-R. and C.E.L.-G.; resources, M.A.-M., R.L.-R. and N.C.A.-S.; data curation, C.O.B.-H., A.J.G.-G. and R.L.-R.; writing—original draft preparation, E.J.M.-S., C.O.B.-H., R.L.-R. and A.J.G.-G.; writing—review and editing, A.G.-R., C.E.L.-G. and M.G.-C.; visualization, M.A.-M. and N.C.A.-S.; supervision, G.I.H.-B.; project administration, A.G.-R. and C.E.L.-G.; funding acquisition, A.G.-R. and C.E.L.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a CONACYT postdoctoral fellowship (866998).

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Material.

Acknowledgments: The authors wish to thank Jonathan Orduño and Ixchel Palacios (CIBIS-IMSS) and Dora Elena Aguilar Dominguez and Wilbert Pérez Fuentes (DACB-UJAT) for technical and analytical assistance. E.J.M-S wishes to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the Ph.D. scholarship (CVU number: 934872).

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

References

1. Razzaq, A.; Sadia, B.; Raza, A.; Khalid Hameed, M.; Saleem, F. Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement. *Metabolites* **2019**, *9*, 303. [CrossRef] [PubMed]
2. Piasecka, A.; Kachlicki, P.; Stobiecki, M. Analytical Methods for Detection of Plant Metabolomes Changes in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 379. [CrossRef] [PubMed]
3. Han, S.; Micallef, S.A. Environmental Metabolomics of the Tomato Plant Surface Provides Insights on Salmonella enterica Colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 3131–3142. [CrossRef] [PubMed]
4. Plaza, A.; Rodríguez, L.; Concha-Meyer, A.A.; Cabezas, R.; Zurob, E.; Merlet, G.; Palomo, I.; Fuentes, E. Effects of Extraction Methods on Phenolic Content, Antioxidant and Antiplatelet Activities of Tomato Pomace Extracts. *Plants* **2023**, *12*, 1188. [CrossRef] [PubMed]
5. Zheleva-Dimitrova, D.; Petrova, A.; Zengin, G.; Sinan, K.I.; Balabanova, V.; Joubert, O.; Zidorn, C.; Voynikov, Y.; Simeonova, R.; Gevrenova, R. Metabolite profiling and bioactivity of *Cicerbita alpina* (L.) Wallr. (Asteraceae, Cichorieae). *Plants* **2023**, *12*, 1009. [CrossRef]
6. Krishnan, P.; Kruger, N.J.; Ratcliffe, R.G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 255–265. [CrossRef]
7. Kumar, R.; Bohra, A.; Pandey, A.K.; Pandey, M.K.; Kumar, A. Metabolomics for Plant Improvement: Status and Prospects. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1302. [CrossRef]
8. Patel, M.K.; Pandey, S.; Kumar, M.; Haque, M.I.; Pal, S.; Yadav, N.S. Plants Metabolome Study: Emerging Tools and Techniques. *Plants* **2021**, *10*, 2409. [CrossRef]
9. Li, Y.; He, Q.; Geng, Z.; Du, S.; Deng, Z.; Hasi, E. NMR-based metabolomic profiling of *Peganum harmala* L. reveals dynamic variations between different growth stages. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5*, 171722. [CrossRef]
10. Alejandro, M.A.M.; Campillo, L.M.G.; Méndez, R.M. El Uso de las Plantas Medicinales en las Comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica* **2010**, *29*, 213–2062.
11. Berg, C.C.; Franco, P. *Cecropia*. In *Organization for Flora Neotropica Monograph 94 Bronx*; The New York Botanical Garden Press: New York, NY, USA, 2005.
12. Herrera-Arellano, A.; Aguilar-Santamaría, L.; García-Hernández, B.; Nicasio-Torres, P.; Tortoriello, J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 561–566. [CrossRef] [PubMed]

13. Andrade-Cetto, A.; Cárdenas, R.; Ramírez-Reyes, B. Hypoglycemic effect of *Cecropia peltata* L. on N5-STZ type 2 diabetic rats. *Pharmacologyonline* **2007**, *3*, 203–210.
14. Vidrio, H.; García-Márquez, F.; Reyes, J.; Soto, R.M. Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 475–476. [[CrossRef](#)]
15. Salas, I.; Brenes, J.R.; Morales, O.M. Antihypertensive effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) leaf extract on rats. *Rev. Biol. Trop.* **1987**, *35*, 127–130.
16. Pérez-Guerrero, C.; Herrera, M.D.; Ortiz, R.; de Sotomayor, M.A.; Fernández, M.A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 279–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rojas, J.J.; Ochoa, V.J.; Ocampo, S.A.; Muñoz, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement. Altern. Med.* **2006**, *6*, 2. [[CrossRef](#)]
18. Rivera-Mondragón, A.; Tuenter, E.; Bijttebier, S.; Cos, P.; Apers, S.; Caballero-George, C.; Foubert, K.; Pieters, L. Two new antiplasmodial flavonolignans from the leaves of *Cecropia obtusifolia*. *Phytochem. Lett.* **2019**, *31*, 118–120. [[CrossRef](#)]
19. GBIG. Global Biodiversity Information Facility. Available online: <https://www.gbif.org/species/2984473> (accessed on 8 March 2023).
20. Nicasio, P.; Aguilar-Santamaría, L.; Aranda, E.; Ortiz, S.; González, M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phyther. Res.* **2005**, *19*, 661–664. [[CrossRef](#)]
21. Iwanycki Ahlstrand, N.; Havskov Reghev, N.; Markussen, B.; Bruun Hansen, H.C.; Eiriksson, F.F.; Thorsteinsdóttir, M.; Rønsted, N.; Barnes, C.J. Untargeted metabolic profiling reveals geography as the strongest predictor of metabolic phenotypes of a cosmopolitan weed. *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 6812–6826. [[CrossRef](#)]
22. Cardoso-Taketa, A.T.; Pereda-Miranda, R.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R.; Villarreal, M.L. Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1295–1301. [[CrossRef](#)]
23. Kim, H.K.; Khan, S.; Wilson, E.G.; Kricun, S.D.P.; Meissner, A.; Goral, S.; Deelder, A.M.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 773–784. [[CrossRef](#)]
24. Tuñón-Pablos, E. *Diagnostico Estatal y Regional de los Sistemas de Ciencia, Tecnología e Innovación: Perspectivas para su Desarrollo Regional*; CONACyT/ECOSUR: San Cristobal de las Casas, Chiapas, Mexico, 2012.
25. Gómez-Álvarez, R. Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Rev. Fitotec. Mex.* **2012**, *35*, 43–49. [[CrossRef](#)]
26. Rivera-Mondragón, A.; Ortiz, O.O.; Bijttebier, S.; Vlietinck, A.; Apers, S.; Pieters, L.; Caballero-George, C. Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1500–1512. [[CrossRef](#)]
27. Rivera-Mondragón, A.; Bijttebier, S.; Tuenter, E.; Custers, D.; Ortiz, O.O.; Pieters, L.; Caballero-George, C.; Foubert, K. Phytochemical characterization and comparative studies of four *Cecropia* species collected in Panama using multivariate data analysis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Costa, G.M.; Ortmann, C.F.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1096–1102. [[CrossRef](#)]
29. Jang, D.; Jung, Y.S.; Kim, M.S.; Oh, S.E.; Nam, T.G.; Kim, D.O. Developing and Validating a Method for Separating Flavonoid Isomers in Common Buckwheat Sprouts Using HPLC-PDA. *Foods* **2019**, *8*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. da Silva Mathias, M.; Rodrigues de Oliveira, R. Differentiation of the phenolic profiles of *Cecropia pachystachya* and *Cecropia hololeuca*. *Phytochem. Anal.* **2019**, *30*, 73–82. [[CrossRef](#)]
31. Ortiz, O.O.; Rivera-Mondragón, A.; Pieters, L.; Foubert, K.; Caballero-George, C. *Cecropia telenitida* Cuatrec. (Urticaceae: Cecropieae): Phytochemical diversity, chemophenetic implications and new records from Central America. *Biochem. Syst. Ecol.* **2019**, *86*, 103935. [[CrossRef](#)]
32. Rivera-Mondragón, A.; Broeckx, G.; Bijttebier, S.; Naessens, T.; Fransen, E.; Kiekens, F.; Foubert, K. Ultrasound-assisted extraction optimization and validation of an HPLC-DAD method for the quantification of polyphenols in leaf extracts of *Cecropia* species. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2028. [[CrossRef](#)]
33. Nicasio-Torres, M.P.; Meckes-Fischer, M.; Aguilar-Santamaría, L.; Garduño-Ramírez, M.L.; Chávez-Ávila, V.M.; Cruz-Sosa, F. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate starvation. *Acta Physiol. Plant* **2012**, *34*, 307–316. [[CrossRef](#)]
34. Andrade-Cetto, A.; Vázquez, R.C. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 93–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Costa, G.M.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 913–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Muñoz-Bernal, Ó.A.; Torres-Aguirre, G.A.; Núñez-Gastélum, J.A.; de la Rosa, L.A.; Rodrigo-García, J.; Ayala-Zavala, J.F.; Álvarez-Parrilla, E. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo de Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación de Polifenoles Totales. *TIP* **2017**, *20*, 23–28. [[CrossRef](#)]
37. Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal. Methods* **2010**, *3*, 90–97. [[CrossRef](#)]
38. Skoog, S.; West, D.; Holler, D.; Crouch, F. *Química Analítica*, 7th ed.; McGraw-Hill: Ciudad de Mexico, Mexico, 2001.

39. Bubb, W.A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts Magn. Reson. Part A Educ. J.* **2003**, *19*, 1–19. [[CrossRef](#)]
40. Duus, J.Ø.; Gottfredsen, C.H.; Bock, K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4589–4614. [[CrossRef](#)]
41. Difonzo, G.; Crescenzi, M.A.; Piacente, S.; Altamura, G.; Caponio, F.; Montoro, P. Metabolomics Approach to Characterize Green Olive Leaf Extracts Classified Based on Variety and Season. *Plants* **2022**, *11*, 3321. [[CrossRef](#)]
42. Gallegos-García, A.J.; Lobato-García, C.E.; González-Cortazar, M.; Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; Álvarez-Fitz, P.; Pérez-García, M.D.; López-Rodríguez, R.; Ble-González, E.A.; Medrano-Sánchez, E.J.; et al. Preliminary Phytochemical Profile and Bioactivity of *Inga jinicuil* Schltdl & Cham. ex G. Don. *Plants* **2022**, *11*, 794.
43. Qiu, X.L.; Zhang, Q.F. Identification and quantification of main flavonoids in the leaves of *Bambusa multiplex* cv. *Fernleaf*. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 2076–2079. [[CrossRef](#)]
44. Hernández-Bolio, G.I.; Fagundo-Mollineda, A.; Caamal-Fuentes, E.E.; Robledo, D.; Freile-Pelegri, Y.; Hernández-Núñez, E. NMR metabolic profiling of *sargassum* species under different stabilization/extraction processes. *J. Phycol.* **2021**, *57*, 655–663. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.