



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

---

**“Efecto antiproliferativo del extracto hidroalcohólico  
de *Decatropis bicolor* L. en un modelo *in vitro* de  
cáncer de mama triple negativo”**

**Tesis**

**Que para obtener el título de:**

**Licenciada en Farmacia**

**Presenta:**

**Lluvia De Abril Castro Villalobos**

**Asesor:**

**Dr. Miguel Ángel Ortiz Flores**

**Coasesores:**

**Dra. Nayelli Nájera García**

**L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE



VOTO APROBATORIO

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN ALDERRAMA BRAVO  
del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautilán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**.

**Efecto antiproliferativo del extracto hidroalcohólico de Decatropis bicolor L. en un modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo.**

Que presenta la pasante: **Lluvia de Abril Castro Villalobos**

Con número de cuenta: **317266070** para obtener el título de: **Licenciada en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautilán Izcalli, Méx. a 10 de Enero de 2024.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez</u>	<u><i>Brígida del Carmen</i></u>
<b>VOCAL</b>	<u>L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez</u>	<u><i>Trejo Rodríguez Miguel A.</i></u>
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. Mariana Dolores Hernández</u>	<u><i>Mariana</i></u>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	<u><i>Aranda</i></u>
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Q. Miriam Ivette Jiménez Huerta</u>	<u><i>Miriam</i></u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*



# Agradecimientos

- ♥ A Mike, por compartir conmigo sus grandes conocimientos, por ser un gran maestro, por asesorarme en este proyecto, por ser tan paciente y por brindarme su amistad.
- ♥ A Miguel Trejo, por abrirme las puertas de su pequeño laboratorio, por ser un gran amigo, profesor, e introducirme al grandioso mundo de la fitoquímica.
- ♥ A la Dra. Nayelli y al Dr. Ceballos por recibirme en su laboratorio y hacerme parte de la familia del LICAM, por compartir su sabiduría y por apoyarme en este proyecto.
- ♥ Al Dr. Ricardo, por ser un gran profesor, por haber impartido mi clase favorita: síntesis orgánica, por permitirme procesar mis muestras en el HPLC del instituto de química, y por ser un gran amigo.
- ♥ A los compañeros del LICAM, por apoyarme en este proyecto y por su amistad.
- ♥ A mis mejores amigos: Zahori, Adamari, Fátima y Oxi, por hacer que la vida sea más bonita y divertida, por escucharme y por apoyarme tanto.

- ♥ A mi familia, en especial a mi tía Carmen, por su ternura, amor y comprensión, a mi tío Luis QEPD por ser un gran amigo y siempre creer en mí, a mi hermano Hugo y a mi sobrina Melanie por siempre escucharme y motivarme a seguir y a mi tía Liz por su apoyo incondicional.
  
- ♥ A mi mami, por apoyarme en todo, por darme la bendición siempre antes de salir, por sus comidas deliciosas, por sus abrazos, por brindarme calma, por escucharme, y por ser la maravillosa persona que es.
  
- ♥ A mi papá, por no dudar ni un segundo en mí, por siempre estar a mi lado, por compartir su sabiduría conmigo, por aconsejarme, por esforzarse tanto, por la educación y por ser un señor tan buena onda.
  
- ♥ A Joshualdo, por todo tu amor, por escucharme todo el tiempo, por estar en las buenas y en las malas, por ser tan comprensivo, por todos tus abrazos que me daban impulso y por hacer la vida más bonita.
  
- ♥ A mi mejor amigo Oso QEPD, por acompañarme durante más de la mitad de mi vida, por tu amor incondicional, por siempre estar ahí, por tus pelitos, por las alergias y por las aventuras que pasamos juntos.

# Índice

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1 CÁNCER.....	16
2.2 CÁNCER DE MAMA .....	18
2.2.1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD.....	18
2.2.2 <i>Clasificación del cáncer de mama</i> .....	19
2.2.3 <i>Cáncer de mama triple negativo</i> .....	20
2.6 <i>DECATROPIS BICOLOR L.</i> .....	22
2.6.1 <i>Descripción</i> .....	22
2.6.2 <i>Distribución geográfica</i> .....	23
2.6.3 <i>Sinonimia popular</i> .....	23
2.6.4 <i>Usos</i> .....	23
2.7 METABOLITOS SECUNDARIOS .....	24
2.7.1 DEFINICIÓN .....	24
2.7.2 <i>Vías de metabolitos secundarios</i> .....	24
2.7.3 <i>Compuestos fenólicos</i> .....	26
2.7.4 <i>Alcaloides</i> .....	28
2.7.5 <i>Lactonas sesquiterpénicas</i> .....	29
2.7.6 <i>Fitoesteroles</i> .....	30
2.7.7 <i>Quinonas</i> .....	30
2.7.8 <i>Carotenoides</i> .....	31
2.7.9 <i>Metabolitos secundarios identificados en la Decatropis bicolor L.</i> .....	31
2.8 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN .....	32



2.8.1 Soxhlet.....	33
2.9 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	35
2.9.1 Concentración inhibitoria 50.....	35
2.9.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTT .....	37
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
5.1 GENERAL .....	39
5.2 PARTICULARES .....	39
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
6.1 MATERIA PRIMA.....	41
6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	41
6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO.....	42
6.4 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO .....	43
6.4.1 Cualitativo.....	43
6.4.1.1 Perfil fitoquímico preliminar.....	43
6.4.2 Cuantitativo .....	47
6.4.2.1 Cuantificación de fenoles totales.....	47
6.5 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICAS.....	48
6.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO.....	49
6.6.1 Cultivo Celular .....	49
6.6.2 Estimulación celular .....	50
6.6.3 Ensayos de viabilidad celular .....	51
6.7 CARACTERIZACIÓN POR HPLC DE LAS FRACCIONES CON MAYOR EFECTO ANTIPROLIFERATIVO. ....	53
<b>7.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>

7.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO .....	55
7.2 <i>Diseño Experimental</i> .....	56
7.3 CARACTERIZACIÓN .....	64
7.3.1 <i>Cualitativo</i> .....	64
7.3.1.1 <i>Perfil fitoquímico preliminar</i> .....	64
7.3.2 <i>Cuantitativo</i> .....	67
7.3.2.1 <i>Cuantificación Polifenoles</i> .....	67
7.4    TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICAS.....	68
7.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO .....	71
7.5.1 <i>Extracto completo</i> .....	71
7.6.2 <i>Fracciones del extracto hidroalcohólico</i> .....	74
7.5.3 <i>Análisis de los valores IC<sub>50</sub></i> .....	79
7.6 CARACTERIZACIÓN POR HPLC DE LAS FRACCIONES CON MAYOR EFECTO ANTIPROLIFERATIVO. ....	81
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>99</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Diseño experimental de la extracción hidroalcohólica de la <i>Decatropis bicolor</i> L. ....	41
Tabla 2 Características del extracto hidroalcohólico .....	55
Tabla 3 Concentraciones de fenoles totales para cada tratamiento.....	56
Tabla 4 Hipótesis planteadas para el análisis de varianza.....	57
Tabla 5 Análisis de Varianza (ANOVA) para Influencia de factores en la concentración de polifenoles.....	57
Tabla 6 Tabla de comparación de concentraciones por nivel de factor utilizando la prueba de Tukey. ....	62
Tabla 7 Comparación de concentraciones entre grupos. ....	63
Tabla 8 Resultados del perfil fitoquímico preliminar. ....	65
Tabla 9 Concentraciones de fenoles totales en la mejor condición (mg/mL). ....	68
Tabla 10. Concentraciones de fenoles totales en fracciones (mg/mL).....	70
Tabla 11. Comparación de IC <sub>50</sub> de las fracciones 2, 3 y 9.....	79
Tabla 12. Moléculas asociadas con cada pico en el cromatograma de la fracción 2. ....	81
Tabla 13 . Moléculas asociadas con cada pico en el cromatograma de la fracción 9.....	84
Tabla 14 . Moléculas asociadas con cada pico en el cromatograma de la fracción 3.....	87

## Índice de figuras

Figura 1 Rasgos característicos del cáncer.....	17
Figura 2 Decatropis bicolor L.....	22
Figura 3 Diagrama de los metabolitos secundarios derivados de las cuatro vías biosintéticas .	26
Figura 4 Estructura general de los compuestos fenólicos .....	26
Figura 5 Estructura general de los flavonoides.....	27
Figura 6 Estructura de un alcaloide cíclico (higrina) y uno no cíclico (colchicina).....	29
Figura 7 Estructura química de la lactona sesquiterpenica dehidrobrachilenolida.....	29
Figura 8 Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno .....	30
Figura 9 Estructura de la o-benzoquinona y p-benzoquinona .....	30
Figura 10 Estructura del $\beta$ -Caroteno .....	31
Figura 11. Diagrama del equipo de extracción Soxhlet.....	34
Figura 12. Reacción de reducción de MTT a cristales de formazán.....	37
Figura 13 Diagrama de la metodología llevada a cabo en el presente trabajo .....	40
Figura 14 Extracción en Soxhlet de D. bicolor L.....	42
Figura 15 Diagrama metodológico del perfil fitoquímico preliminar.....	46
Figura 16 Extracto hidroalcohólico obtenido.....	55
Figura 17. Gráfico cuantil-cuantil: normalidad de los residuos en el análisis de regresión. ....	58
Figura 18. Distribución de los residuos en términos de su densidad de probabilidad.....	59
Figura 19. Gráfico de dispersión que relaciona los valores del modelo estadístico “Decatropis” con los residuos.....	60
Figura 20. Gráfico de Leverage-Residuos vs Combinaciones de Niveles del Factor.....	61
Figura 21. Gráfico de Scale-Location, evalúa la homogeneidad de los datos.....	61
Figura 22 Curva de calibración de ácido gálico.....	67

Figura 23 Separación del extracto hidroalcohólico mediante cromatografía en placa de sílice con mezcla de cloroformo-ácido acético 50:50. visualización bajo luz UV .....	69
Figura 24 Cromatografía en columna (sílica gel 60) del extracto hidroalcohólico de <i>D. bicolor</i> L. usando como fase móvil cloroformo-ácido acético 50:50. ....	69
Figura 25 Cromatografía en placa de las 10 fracciones .....	70
Figura 26. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT del extracto completo en células 4T1 al 5to día, por duplicado.....	71
Figura 27. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al 1, 3 y 5to día del extracto completo en células 4T1.....	72
Figura 28. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al 1, 3 y 5to día del extracto completo en células C2C12.....	73
Figura 29. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día para las 10 fracciones en células 4T1.....	74
Figura 30. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día para las 10 fracciones en células C2C12.....	75
Figura 31. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día de la fracción 2 en células 4T1 y C2C12.....	76
Figura 32. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día de la fracción 9 en células 4T1 y C2C12.....	77
Figura 33. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día de la fracción 3 en células 4T1 y C2C12.....	78
Figura 34. Cromatograma de la fracción 2 con picos enumerados según su tiempo de retención. ....	81
Figura 35 Cromatograma de la fracción 9 con picos enumerados según su tiempo de retención. ....	84
Figura 36 Cromatograma de la fracción 3 con picos enumerados según su tiempo de retención. ....	87

## Índice de abreviaturas

- Analisis de Varianza: ANOVA
- Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification: CFM.ID
- Concentración Inhibitoria 50: CI50
- ensayo cristal violeta: CV
- Laboratorio de Investigación Integral Cardio Metabólica: LIICAM
- Cancer de Mama Triple Negativo TNBC
- Metil-eritritol-fosfato: MEP
- Nicotinamida adenina dinucleótido: NADH
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato: NADPH
- Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano: HER2
- Receptores de estrógeno: ER
- Receptores de progesterona: PR
- Factor de retención : Rf
- Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio: MTT
- Vía del mevalonato: MVA

## 1. Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad devastadora que contribuye significativamente a la mortalidad de las mujeres a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023), el cáncer de mama es causa de la mortandad de 685,000 mujeres, lo que representa un alarmante 15 por ciento de todas las defunciones femeninas relacionadas con el cáncer. En México, la situación es igualmente preocupante, con 190,000 nuevos casos y más de 84,000 fallecimientos reportados anualmente, lo que se traduce en una tasa de incidencia de 40.5 casos por cada 100,000 mujeres (Martinez & Medrano, 2022).

No todos los tipos de cáncer de mama son iguales, y uno de los más desafiantes es el Cáncer de Mama Triple Negativo (TNBC, por sus siglas en inglés). Esta variante, caracterizada por la falta de receptores hormonales de estrógeno y progesterona, así como la ausencia de la proteína HER2 (Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2), presenta desafíos únicos en su tratamiento. Esta variante del cáncer de mama tiende a afectar a mujeres menores de 40 años y presenta una tasa de supervivencia a 5 años del 62 por ciento, pero las tasas son más bajas para las personas cuyo cáncer se ha diseminado (Gonçalves Homero, 2018). Enfocarse en comprender las particularidades de este subtipo de cáncer de mama es fundamental para explorar nuevas vías de tratamiento y prevención.

La carencia de receptores en el cáncer de mama triple negativo (TNBC) presenta un desafío significativo en su tratamiento médico. En este contexto, la quimioterapia es una estrategia fundamental, implicando la administración intravenosa de una combinación de medicamentos como antraciclinas, taxanos etc. Sin embargo, estos tratamientos pueden desencadenar una amplia gama de efectos secundarios, que van desde náuseas, vómitos y fatiga, hasta la caída del cabello y posibles impactos en órganos vitales como los riñones, el hígado y el corazón (Pathol, 2022).

Por otro lado, el potencial de las plantas como fuente de descubrimiento de medicamentos y desarrollo de la quimioprevención del cáncer es indiscutible. De hecho, más del 60% de los agentes anticancerígenos en uso en la actualidad, como el paclitaxel, la vincristina y la vinblastina, se derivan de fuentes naturales (Nidhi Agarwal, 2012). Además, se destaca que las plantas medicinales presentan una ventaja en cuanto a toxicidad en comparación con los medicamentos modernos o alopáticos. Debido a esto es crucial estudiar nuevos productos

naturales con actividad anticancerígena, no solo para aprovechar su bioactividad y mecanismo de acción. Un ejemplo concreto es la *Decatropis bicolor* L., conocida también como aranto y originaria de Sudamérica, localizada también en México. En comunidades como El Cardonal, en el estado de Hidalgo, sus hojas se utilizan para preparar infusiones. Estas infusiones son consumidas diariamente como agua de uso, contribuyendo al tratamiento del cáncer de mama (Sánchez-González, 2008).

Además, estudios respaldan sus propiedades medicinales relacionadas con la actividad antifúngica y antiinflamatoria, así como su potencial citotóxico contra las células de cáncer de mama (Jaimez Ordaz Judith, 2021). Sin embargo, es necesario continuar con más investigación para evaluar la seguridad y eficacia de la *Decatropis bicolor* L. como tratamiento para el TNBC.

Tomando en cuenta lo antes mencionado, el presente estudio se enfoca en identificar los metabolitos secundarios presentes en la *Decatropis bicolor* L. y su posible relación con la actividad antiproliferativa en el cáncer de mama triple negativo. Esta investigación contribuirá al conocimiento científico sobre las propiedades medicinales de la *Decatropis bicolor* L. y se explorará su potencial efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama triple negativo. Además, los resultados obtenidos podrían sentar las bases para futuros estudios de sus metabolitos secundarios.



## **2. Marco teórico**

### **2.1 Cáncer**

El término "cáncer" denota una categoría diversa y compleja de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células anómalas en el organismo. Esta desregulación en la multiplicación celular es el resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas que desencadenan un desequilibrio en los mecanismos de control celular normales (Vinay Kumar, 2015). A diferencia de las células sanas, las células cancerosas no responden a los factores que usualmente limitan su crecimiento y división, lo que propicia su acumulación y eventual formación de tumores. Los tumores, que son acumulaciones de células cancerosas, se clasifican en benignos o malignos.

Mientras que los tumores benignos son localizados, no invaden tejidos circundantes y rara vez se diseminan a otras áreas del cuerpo, los tumores malignos, conocidos como cánceres, poseen la capacidad de infiltrar tejidos circundantes y de propagarse a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo, originando tumores secundarios en áreas distantes, un fenómeno llamado metástasis.

Estas características de los tumores malignos son solo una parte de los ocho cambios fundamentales en la fisiología celular que se consideran rasgos distintivos del cáncer (Fig. 1). Estos cambios incluyen la capacidad de los tumores para proliferar de manera autónoma, incluso sin estímulos externos, a menudo debido a la activación de genes oncogénicos, y la falta de respuesta a señales que normalmente inhiben la proliferación celular, en gran parte debido a la inactivación de genes supresores de tumores que codifican componentes de estas vías inhibitorias. Además de estos cambios, las células tumorales experimentan un cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica, conocido como el efecto Warburg, lo que favorece la síntesis de macromoléculas necesarias para su rápido crecimiento.

Estos rasgos distintivos, junto con la resistencia a la apoptosis, poseen un potencial de replicación ilimitado, similar al de las células madre, lo que les permite evitar la senescencia celular y problemas mitóticos. Así mismo, para mantener su crecimiento, los tumores inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la angiogénesis sostenida.

Otro rasgo crucial es la capacidad de invasión y metástasis, lo que significa que las células cancerosas pueden diseminarse a través del organismo, a menudo causando la mayoría de las muertes por cáncer. Por último, las células cancerosas han desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmunológica del cuerpo, lo que les permite persistir y proliferar sin ser detectadas ni eliminadas por las células inmunitarias (Vinay Kumar, 2015).



Figura 1 Rasgos característicos del cáncer (Vinay Kumar, 2015)

En este contexto, es importante comprender que el cáncer no es una entidad homogénea; más bien, es una entidad heterogénea con una multitud de subtipos, cada uno con características biológicas y patológicas únicas. Estos subtipos pueden responder de manera diferente a los tratamientos y tienen distintos patrones de crecimiento y propagación. La clasificación de los tipos de cáncer se basa en el tipo de célula de origen y la ubicación en el cuerpo donde se desarrolla (Tolosa, 2022).

Por lo tanto, las causas del cáncer son multifactoriales. Factores genéticos, exposiciones ambientales, estilo de vida y predisposición hereditaria pueden contribuir al desarrollo del cáncer. El proceso de carcinogénesis, que es la transformación de células normales en células

cancerosas, implica una serie de etapas que pueden abarcar años o décadas. Estas etapas incluyen la iniciación, promoción y progresión del crecimiento celular descontrolado (Vinay Kumar, 2015).

## **2.2 Cáncer de mama**

El cáncer de mama se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea, que engloba diversas manifestaciones patológicas y presenta una variabilidad significativa en su comportamiento clínico. Estas diferencias se originan a nivel molecular, donde una serie compleja de alteraciones genéticas impacta de manera profunda en los procesos celulares relacionados con esta enfermedad (Simpson Peter T, 2005).

Esta heterogeneidad del cáncer de mama se refleja en su historia natural, que implica la progresión a través de etapas patológicas y clínicas definidas, comenzando con hiperproliferación ductal, con evolución posterior a carcinomas in situ e invasivos, y finalmente a enfermedad metastásica. El inicio del cáncer de mama se debe a eventos de transformación (genéticos y epigenéticos) en una sola célula. La progresión posterior del tumor es impulsada por la acumulación de cambios genéticos adicionales combinados con la expansión y selección clonal. En cuanto a la estructura de la glándula mamaria se sabe que es un órgano único que sufre una extensa remodelación y diferenciación incluso en adultos (Simpson Peter T, 2005).

Es relevante destacar que la distribución de los subtipos de cáncer de mama no es aleatoria en la población, y se observan variaciones significativas cuando se analizan los diagnósticos según la edad, la raza/etnia, la historia reproductiva, el índice de masa corporal, la situación socioeconómica o la ubicación geográfica. Por ejemplo, las mujeres más jóvenes, en general, y especialmente las mujeres negras jóvenes, presentan con mayor frecuencia el subtipo triple negativo de cáncer de mama, que se caracteriza por su agresividad y su resistencia al tratamiento en comparación con otros tumores. Además, las mujeres de origen latino también enfrentan de manera desproporcionada tumores triples negativos altamente agresivos (Gray Janet M., 2017).

### **2.2.1 Incidencia y mortalidad**

En México, el cáncer de mama se sitúa como el segundo tipo de cáncer más común en la población, después del cáncer de próstata. No obstante, entre las mujeres, es el cáncer con

mayor incidencia, representando alrededor del 25% de los casos. En el periodo de 2011 a 2016, se observó un aumento en las defunciones debido a esta enfermedad, llegando a una mortalidad de 16 personas por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años. Por ende, el cáncer de mama es considerado la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres en México, afectando principalmente a aquellas de entre 50 y 59 años.

Desde una perspectiva geográfica, durante la década de 2000-2010, los estados con tasas más altas de mortalidad y morbilidad por cáncer de mama fueron Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Coahuila, Baja California, Nuevo León y Ciudad de México. Esta tendencia se mantuvo en el año 2015, según un estudio del Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (CNEGSR, 2015) (T. Maria, 2021).

### **2..2.2 Clasificación del cáncer de mama**

El espectro del cáncer de mama abarca una plétora de subtipos y clasificaciones que resultan de las características distintivas de las células cancerosas. Los carcinomas mamarios luminales, originados en los conductos mamarios, se dividen en Luminal A y Luminal B, siendo el primero el más común y con mejor pronóstico. Por otro lado, Luminal B, menos frecuente y con peor pronóstico, muestra receptores de estrógeno y/o progesterona de baja positividad, HER2 variable, y una mayor tasa de proliferación. Aunque también es sensible a la hormonoterapia, responde mejor a la quimioterapia y tiene una supervivencia inferior.

El subtipo HER2 positivo, constituyendo el 12-20% de los casos, carece de receptores hormonales y ha mejorado su pronóstico con medicamentos como el trastuzumab, efectivo contra HER2. En el mosaico de subtipos, se destaca el cáncer de mama triple negativo, cuyo sello distintivo es la carencia de receptores de estrógeno, progesterona y HER2. Esta peculiaridad conlleva un perfil agresivo que desafía su tratamiento eficaz. Más aún, entre las clasificaciones adicionales, se incluye el carcinoma inflamatorio de mama, junto con el cáncer de mama HER2-positivo, caracterizado por una alta expresión de HER2. Adicionalmente, se distinguen subtipos menos prevalentes como el carcinoma medular, que a menudo presenta una respuesta más favorable al tratamiento, y el carcinoma mucinoso, caracterizado por la producción de mucina,

esta amplia gama de clasificaciones fortalece la noción de que el cáncer de mama no se presenta como una entidad uniforme, lo que reafirma la importancia de un enfoque personalizado en su diagnóstico y tratamiento (Gray Janet M., 2017).

### **2.2.3 Cáncer de mama triple negativo**

El cáncer de mama triple negativo (TNBC), es un subtipo específico de cáncer de mama que carece de la expresión de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), se caracteriza por atributos clínicos notables que incluyen una alta invasividad, un potencial metastásico elevado, una propensión a la recaída y un pronóstico desfavorable. El TNBC también se subdivide en 6 subgrupos diferentes según la heterogeneidad molecular: tipo basal; de tipo mesenquimatoso; en forma de tallo mesenquimatoso; expresión luminal AR; inmunomodulador; y tipo inestable (Won & Spruck, 2020). Dado que los tumores TNBC no responden a terapias endocrinas ni a tratamientos dirigidos al HER2 debido a la ausencia de estas expresiones, persiste una carencia de enfoques terapéuticos estandarizados para esta variante.

En un contexto alarmante, la tasa de mortalidad de pacientes con TNBC dentro de los tres meses siguientes a la recurrencia puede alcanzar hasta un 75%. Los datos epidemiológicos reflejan que el TNBC prevalece principalmente en mujeres jóvenes premenopáusicas menores de 40 años, constituyendo aproximadamente un 15-20% del total de pacientes con cáncer de mama. En comparación con otros subtipos, el tiempo de supervivencia en pacientes con TNBC es considerablemente más breve, presentando una tasa de mortalidad del 40% durante los primeros cinco años post diagnóstico. Es esencial destacar que la invasividad es una característica preeminente del TNBC, con alrededor del 46% de los pacientes experimentando metástasis a distancia. El tiempo promedio de supervivencia tras la aparición de metástasis se reduce significativamente a tan solo 13.3 meses, mientras que la tasa de recurrencia tras cirugía se eleva hasta un 25% (Engebraaten Olav, 2013).

En este contexto, el tratamiento del cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa un desafío clínico considerable debido a la ausencia de receptores hormonales y el receptor HER2 como blancos terapéuticos habituales. En este escenario multidisciplinario, la quimioterapia, ya sea antes de la cirugía (neoadyuvante) o después (adyuvante), se convierte en un pilar fundamental para reducir el tamaño del tumor y prevenir la recurrencia. Los fármacos de

quimioterapia utilizados incluyen agentes como la doxorubicina, la ciclofosfamida, el paclitaxel y la carboplatina. Algunos de estos agentes, como el paclitaxel, se derivan de fuentes naturales, como la corteza del árbol del tejo. Además, en ciertas regiones del mundo, la medicina tradicional y las terapias basadas en extractos naturales de plantas han sido exploradas como complementos al tratamiento convencional del TNBC (Won & Spruck, 2020), aunque se necesita más investigación para evaluar su eficacia. Por otro lado, la cirugía, que puede implicar mastectomía o lumpectomía, se adapta al estadio y características individuales del paciente. La radioterapia, que sigue a menudo a la cirugía, tiene como objetivo reducir el riesgo de recurrencia local. En casos con mutaciones genéticas específicas (por ejemplo, en los genes BRCA1 y BRCA2), se consideran terapias dirigidas como los inhibidores de PARP, como olaparib y talazoparib. Estos fármacos pueden ofrecer una opción terapéutica eficaz para un subconjunto de pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) que poseen estas mutaciones (Won & Spruck, 2020).

Sin embargo, es importante señalar que, hasta la fecha, el uso de terapias combinadas que involucran fármacos provenientes de plantas o medicina tradicional en el tratamiento del TNBC ha sido objeto de investigación incipiente (Sumya Pathak, 2019). Aunque existen indicios preliminares de que ciertos extractos naturales podrían tener propiedades beneficiosas, se requieren estudios clínicos más amplios y rigurosos para determinar su eficacia y seguridad en combinación con las terapias estándar. En este sentido, la medicina tradicional y los remedios basados en plantas pueden desempeñar un papel complementario en el tratamiento del TNBC, pero su integración en la práctica clínica debe ser respaldada por evidencia científica sólida.

## 2.6 *Decatropis bicolor* L.

### 2.6.1 Descripción

La *Decatropis bicolor* L. es un arbusto de 2 a 3 m de altura con pequeñas flores blancas en largas panículas terminales compuestas por 5 a 10 foliolos elípticos a lanceolados verdes en la parte superior y café-amarillentos en la inferior (Fig. 2) (Ortiz, 2021). En cuanto a su clasificación taxonómica, la *Decatropis bicolor* L. pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta* (plantas con flores), clase *Magnoliopsida*, Orden *Sapindales* (copales, maples), Familia *Rutaceae* (Rudas, Cítricos, Zapote Blanco Y Parientes), subfamilia *Zanthoxyloideae*, y género *Decatropis*. Su nombre científico completo es *Decatropis bicolor* L (Villavicencio, 1998).



Figura 2 *Decatropis bicolor* L.

### **2.6.2 Distribución geográfica**

Se distribuye desde México hasta Centroamérica. Es una especie de planta nativa de Sudamérica, y se encuentra en varias regiones de los Andes, incluyendo países como Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia y Venezuela. Es una planta que crece en altitudes que van desde los 1,000 hasta los 4,000 metros sobre el nivel del mar.

### **2.6.3 Sinonimia popular**

Conocida científicamente como *Decatropis bicolor* L., recibe diversos nombres populares según las regiones y culturas en las que se encuentra. En español, es conocida como "Hoja dorada", "Cigarrillo", "Rosa amarilla", "Santo Domingo", "Aranthó", entre otros. En la lengua Huasteca, es denominada "tzatzubtzá". Además, en el náhuatl se le conoce como "cococuáhuil", mientras que en otomí se refieren a ella como "rantó" (Ortiz, 2021). Estos nombres ilustran la riqueza lingüística y cultural que rodea a esta planta en diferentes partes del mundo, y son ejemplos de cómo las comunidades locales la han identificado a lo largo de la historia.

### **2.6.4 Usos**

En la medicina tradicional mexicana las partes aéreas de *D. bicolor* se utilizan tradicionalmente para dolencias, como dolor de espalda, dolor de cabeza, gripe, cálculos en la vesícula, diarreas, afecciones renales, así como para tratar infecciones bacterianas (Villavicencio, 1998). En comunidades como El Cardonal, en el estado de Hidalgo, México, las hojas de *D. bicolor* se utilizan para preparar infusiones con aproximadamente 5 g de partes aéreas por 1 litro de agua, hervidas durante 15 minutos y bebidas como agua diaria para el tratamiento del cáncer de mama (Sánchez-González, 2008).

Además, la planta se utiliza para tratar ciertas enfermedades inflamatorias y oxidativas y puede tener efectos anticancerígenos ya que hay una relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno, el origen de la oxidación y la inflamación que puede conducir al cáncer; así lo probaron Almaguer *et al.* en 2019 donde se observó en un modelo *in vivo* que la *D. bicolor* promovió la actividad antitumoral con extractos acuosos y etanólicos, presentando un mejor efecto con el extracto acuoso que con el extracto etanólico, el crecimiento tumoral se inhibió hasta un 84 % en relación con el control, por lo que este extracto aumentó los días de vida en un 50 % (Almaguer, 2019).



Por otro lado, según un estudio realizado por Gómez *et al.* en 2016, se evaluó el efecto citotóxico y apoptótico del aceite esencial de la *Decatropis bicolor* L. contra la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231. Los resultados mostraron que el aceite esencial de *Decatropis bicolor* tenía un efecto citotóxico significativo induciendo apoptosis a través de vías intrínsecas debido a la activación de Bax, caspasas 9 y 3, con un IC<sub>50</sub> de 53.81 ± 1.691 µg/mL (C. C. Estanislao Gómez, 2016).

## **2.7 Metabolitos secundarios**

### **2.7.1 Definición**

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos producidos por organismos, como las plantas, que no son esenciales para su crecimiento o desarrollo básico, pero desempeñan roles importantes en defensa, adaptación, atracción de polinizadores o interacciones con el entorno (Domínguez, 1988).

Desde una perspectiva biosintética, los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse estructuralmente en tres grupos principales: alcaloides, fenilpropanoides y terpenoides. Sin embargo, es importante destacar que se han identificado otros grupos, como los policétidos, los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos, en numerosas especies vegetales.

Químicamente, estos metabolitos también se pueden clasificar en diversas categorías, que incluyen terpenoides, alcaloides, glucosinolatos, benzenos, glucósidos cianogénicos, fenilpropanoides y flavonoides (Sumya Pathak, 2019). Esta diversidad química refleja la adaptación de las plantas a su entorno y su capacidad para interactuar con otros organismos en su ecosistema.

### **2.7.2 Vías de metabolitos secundarios**

Las vías biosintéticas de los metabolitos secundarios se llevan a cabo a través de cuatro rutas metabólicas: la vía del ácido shikímico, la vía del ácido malónico, la vía del ácido mevalónico y la vía MEP (metileritritol-fosfato). Estas vías biosintéticas utilizan las moléculas de glucosa producidas en la fotosíntesis. La glucosa desempeña un papel central en el metabolismo de los metabolitos secundarios, ya que se descompone en aminoácidos aromáticos, taninos,

flavonoides, lignina, fenoles, alcaloides y terpenos a través de estas cuatro vías biosintéticas en compartimentos celulares (Risanti Dhaniaputri, 2021).

La vía del ácido shikímico (o vía del shikimato) es el proceso fundamental para la biosíntesis de compuestos fenólicos y alcaloides, ocurre en los cloroplastos y da origen a los precursores fenilpropanoides (Fig. 3). Estos compuestos aromáticos son un tipo de metabolitos secundarios que se encuentran en abundancia en las plantas, y la expresión de los fenoles es desencadenada por factores de estrés ambiental, como ataques de patógenos y herbívoros, cambios inapropiados en el pH y la temperatura, radiación UV, estrés salino y metales pesados (Sumya Pathak, 2019).

La mayoría de los compuestos fenólicos y polifenoles son producidos en las plantas vasculares superiores a través de la vía del ácido shikímico, mientras que los compuestos fenólicos son sintetizados en bacterias y hongos a través de la vía del malonato. En las células vegetales, los cloroplastos convierten el dióxido de carbono del aire en gliceraldehído-3-fosfato a través del ciclo de Calvin. Los productos de estos sitios de unión se acumulan en carbohidratos y luego se degradan a través del proceso de glicólisis en el citosol (Risanti Dhaniaputri, 2021).

La vía del metil-eritritol-fosfato (MEP), que se integra con la vía del mevalonato (MVA), produce compuestos terpenoides en el citosol y los compartimentos celulares de los plastos. Además del colesterol, la vía MVA también sintetiza los compuestos terpenoides conectados junto con la vía del metileritritol-fosfato (MEP), utilizando las moléculas básicas de isoprenos (Fig. 3) (Risanti Dhaniaputri, 2021).

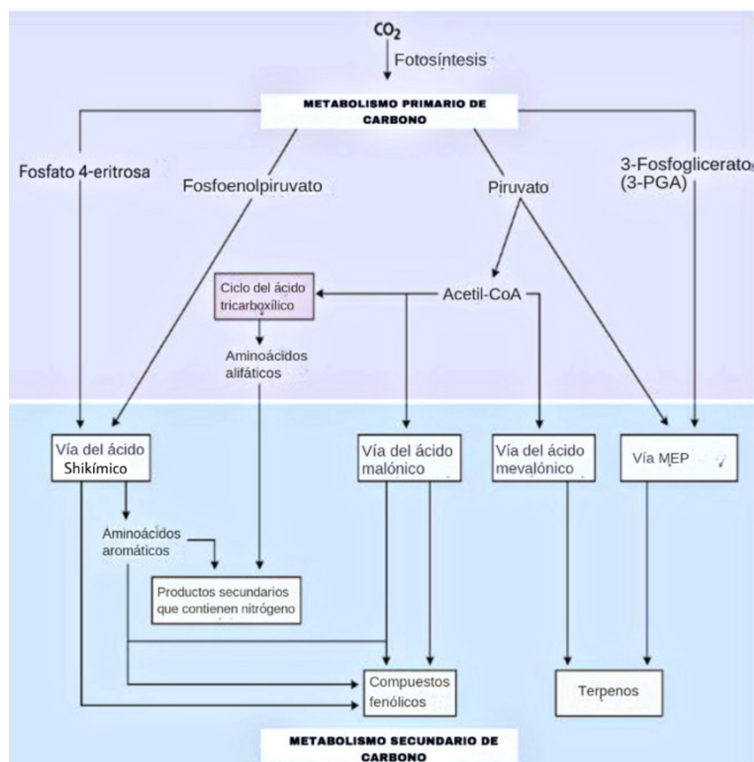


Figura 3 Diagrama de los metabolitos secundarios derivados de las cuatro vías biosintéticas, modificado de: (Risanti Dhaniaputri, 2021)

### 2.7.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (Fig. 4), son originados principalmente en el reino vegetal, representan una categoría significativa de metabolitos secundarios de las plantas. Estos fenoles se sintetizan *de novo* en las plantas y están sujetos a una regulación genética tanto en términos cualitativos como cuantitativos, si bien factores ambientales también desempeñan un papel en su expresión.

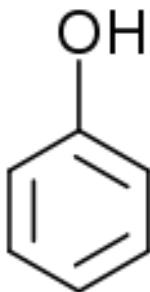


Figura 4 Estructura general de los compuestos fenólicos

Los polifenoles tienen una estructura básica compuesta por un anillo aromático de carbono con uno o más grupos hidroxilo unidos a él, el número y la posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático determinan el tipo de polifenol (Birt Diane F., 2001). Se distinguen dos grupos fundamentales: los no flavonoides y los flavonoides. Dentro de los no flavonoides, se encuentran dos subgrupos principales, a saber, los fenoles no carboxílicos y los ácidos fenoles, derivados tanto del ácido benzoico, como del ácido cinámico.

Por otro lado, los flavonoides se caracterizan por la unión de dos grupos bencénicos mediante un puente tricarbonado (Fig. 5). Los subgrupos de los flavonoides incluyen las antocianinas, las

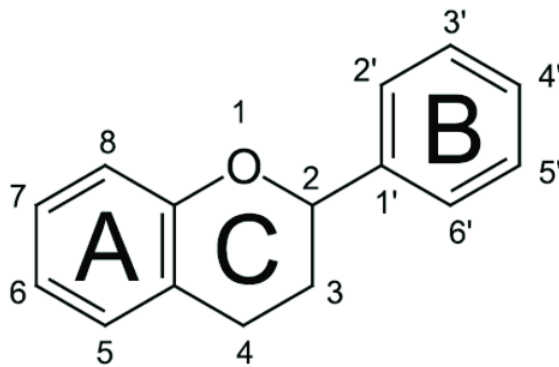


Figura 5 Estructura general de los flavonoides

flavonas, las flavononas, los flavanoles, los flavanonoles, los taninos condensados, los lignanos, entre otros. (Birt Diane F., 2001).

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son particularmente notables. Por un lado, exhiben una alta susceptibilidad a la oxidación, mientras que, por otro, actúan como inhibidores de la acción catalítica de los metales en reacciones de oxidación. De esta forma, los grupos hidroxilo, cuando están unidos a un anillo bencénico, presentan una notable capacidad para que el par de electrones del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo. Esta interacción confiere características únicas a los grupos hidroxilo en comparación con otros tipos de alcoholes (Rice-Evans Catherine A., 1995).

Dentro de la amplia gama de compuestos fenólicos, los flavonoides son particularmente prevalentes en la naturaleza, y entre ellos, los flavanoles destacan por su notoria actividad antioxidante. Investigaciones epidemiológicas han demostrado una correlación inversa entre el consumo de flavonoides y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que los compuestos

antioxidantes como los flavonoles ayudan a contrarrestar este proceso al reducir la formación de radicales libres y proteger contra el daño oxidativo en el sistema cardiovascular (M G Hertog, 1993).

Estos compuestos ejercen efectos beneficiosos en múltiples niveles, incluyendo la reducción de los niveles de colesterol y la inhibición de la agregación plaquetaria debido a sus propiedades antioxidantes, que se manifiestan mediante la quelación de metales y la donación de hidrógeno, en gran parte mediada por sus grupos hidroxilo. De hecho, la actividad antioxidante tiende a correlacionarse positivamente con el número de grupos hidroxilo presentes (Rice-Evans Catherine A., 1995).

Por último, es relevante mencionar que dos subclases de compuestos fenólicos, las isoflavonas y los lignanos, presentan una estructura química notablemente similar a los estrógenos, lo que los clasifica como fitoestrógenos. Estas sustancias son sometidas a procesos metabólicos por parte de las bacterias intestinales, dando lugar a productos como la enterolactona, que tienen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos y ejercer efectos miméticos. Los fitoestrógenos, por ende, han sido asociados con una disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer que dependen de la acción hormonal (Birt Diane F., 2001).

#### **2.7.4 Alcaloides**

Los alcaloides son compuestos con estructuras heterocíclicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno. Se pueden clasificar en dos divisiones amplias según su estructura química. La primera división incluye a los alcaloides no heterocíclicos o atípicos, también conocidos como protoalcaloides o aminas biológicas, como la hordenina o la N-metil-tiramina, la colchicina y la eritromicina. La segunda división abarca a los alcaloides heterocíclicos o típicos, como las higrinas (Fig. 6) pertenecientes al grupo de pirrol y pirrolidina, y la quinina perteneciente al grupo de la quinolina. Los alcaloides pueden formar enlaces de hidrógeno con enzimas, receptores y proteínas debido a la presencia de átomos de nitrógeno que aceptan protones y átomos de hidrógeno de amina que donan protones. Los alcaloides poseen diversas propiedades farmacológicas, como estimulantes del sistema nervioso central como la cafeína, agentes

anticolinérgicos (como la atropina), actividad oxitócica y vasoconstrictora (como la ergometrina) y actividad antipalúdica (Leen Othman, 2019).

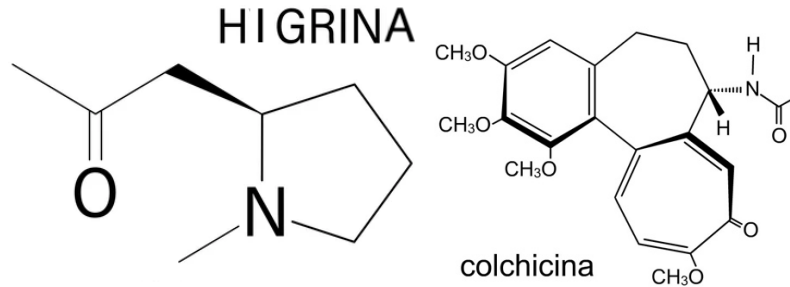


Figura 6 Estructura de un alcaloide cíclico (higrina) y uno no cíclico (colchicina) (Leen Othman, 2019).

### 2.7.5 Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas, también conocidas como sesquiterpenos lactónicos, son compuestos químicos de naturaleza terpenoide que se caracterizan principalmente por su estructura de 15 carbonos (Fig. 7). Estas moléculas son de interés debido a sus diversas actividades biológicas, destacando su acción antineoplásica y citotóxica, que están relacionadas con la función del grupo  $\alpha$ -metilén- $\gamma$ -lactona. Se cree que estas lactonas sesquiterpénicas interactúan con grupos tiol en la cisteína, lo que conduce a la inhibición de varias funciones celulares y, en última instancia, a la apoptosis (Domínguez, 1988).

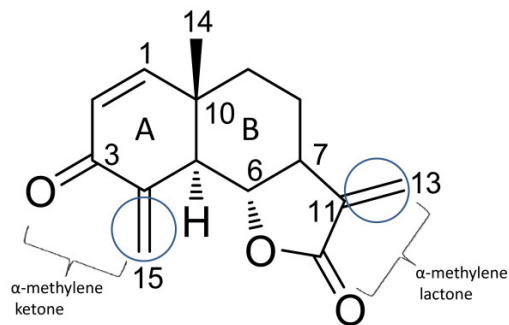


Figura 7 Estructura química de la lactona sesquiterpénica dehidrobrachilenolida.

### 2.7.6 Fitoesteroles

Los fitoesteroles y sus formas reducidas, los fitoestanoles, son esteroides de origen vegetal ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuya estructura es muy similar a la del colesterol, ya que comparten el mismo núcleo central de la molécula, conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 8), con el colesterol. Sin embargo, la diferencia estructural principal radica en la cadena lateral de hidrocarburos ubicada en el átomo de carbono C-17, que suele tener sustituyentes de tipo metilo o etilo. Esta diferencia en la estructura de la cadena lateral es responsable de los efectos hipocolesterolémicos únicos de los fitoesteroles y de su baja absorción en el tracto intestinal (Valenzuela Alfonso, 2004).

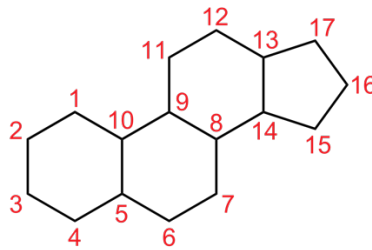


Figura 8 Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno

### 2.7.7 Quinonas

Las quinonas se caracterizan por tener un anillo aromático con dos grupos cetona, generalmente en posición orto o para, aunque también se pueden encontrar en posición meta (Fig. 9). La actividad antimicrobiana de las quinonas se debe a su capacidad para donar radicales libres. Además, pueden formar complejos irreversibles con aminoácidos en proteínas, inactivándolas. Estas propiedades permiten que las quinonas ataquen adhesiones superficiales, polipéptidos en la pared celular y enzimas de membrana. También pueden secuestrar sustratos necesarios para los microorganismos. Estas características hacen que las quinonas sean efectivas en el combate contra microorganismos (Leen Othman, 2019).

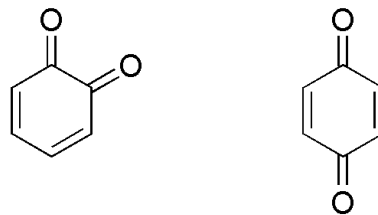


Figura 9 Estructura de la o-benzoquinona y p-benzoquinona

### 2.7.8 Carotenoides

Los carotenoides son el grupo más representativo de los tetraterpenos, compuestos que se caracterizan por una estructura con cuarenta átomos de carbono, aunque no todos los carotenoides se ajustan estrictamente a esta regla. Estos átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas en ocasiones terminadas en anillos de carbono (Fig. 10). Los hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas) son dos categorías principales de tetraterpenos. Dado que los carotenoides son lipófilos, tienen el mismo mecanismo de absorción que el de las grasas dietéticas. Los principales mecanismos por los cuales los carotenoides median su función antineoplásica son la detención del ciclo celular, la inmunomodulación, la inducción de la apoptosis, la inhibición de la metástasis y la alteración de varias vías de crecimiento y señalización bioquímica (L. Rowles III a, 2020).

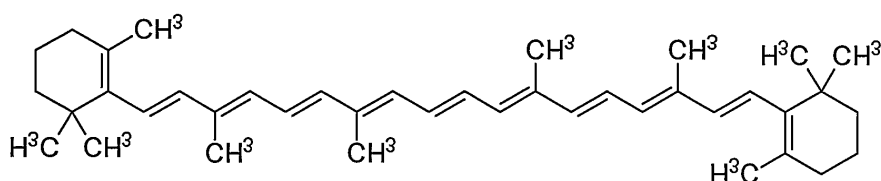


Figura 10 Estructura del  $\beta$ -Caroteno

### 2.7.9 Metabolitos secundarios identificados en la *Decatropis bicolor* L.

La *Decatropis bicolor* L. ha sido objeto de varios estudios fitoquímicos que han revelado la presencia de una amplia gama de metabolitos secundarios, en 1970, un estudio liderado por Dominguez identificó dos alcaloides de furoquinolina, la dictamnina y la skimmianina, así como el triacontano y el  $\beta$ -Sitosterol en la *Decatropis bicolor* L. Luego, en 1999, García-Arguez llevó a cabo un estudio que demostró la presencia de esteroides, cumarinas, flavonoides y triterpenos en el extracto acuoso. Posteriormente, en 2005, Cárdenas y su equipo encontraron diversos fitoesteroides, incluyendo beta-Sitosterol, campesterol y estigmasterol, en los extractos metanólicos y etanólicos de la *Decatropis bicolor* L. Finalmente, en 2021, Guzmán identificó cinco compuestos polifenólicos en el extracto metanólico de la *Decatropis bicolor*: rutina, vainillina, ácido ferúlico, ácido cumárico y ácido gálico.



## 2.8 Métodos de extracción

El aislamiento o separación de los diferentes metabolitos secundarios contenidos en las plantas medicinales, se lleva a cabo mediante el uso de un solvente adecuado y siguiendo procedimientos de extracción estándar (Abdullahi R. Abubakar, 2020). La elección del método de extracción está influenciada por varios factores cruciales.

(A) Estabilidad al calor: Los materiales vegetales que son estables al calor se someten a métodos de extracción como el Soxhlet o la extracción asistida por microondas. Por otro lado, los materiales vegetales que no son resistentes al calor se extraen preferiblemente mediante técnicas de maceración o percolación. Estas diferencias se deben a la necesidad de preservar la integridad de los compuestos termolábiles (Abdullahi R. Abubakar, 2020).

(B) Naturaleza del disolvente: La elección del método de extracción también depende del tipo de disolvente utilizado. Cuando se emplea agua o mezclas hidroalcohólicas como disolvente, la maceración es un método apropiado. Sin embargo, si se requiere el uso de un disolvente volátil, los métodos de percolación y extracción de Soxhlet se consideran más adecuados. Esto se debe a las propiedades específicas de los disolventes y su capacidad para extraer ciertos compuestos (Abdullahi R. Abubakar, 2020).

(C) Duración de la extracción: La duración de la extracción es un factor crítico. La maceración es adecuada para los materiales vegetales que requieren una exposición prolongada al proceso de extracción. En contraposición, técnicas más avanzadas como la extracción asistida por microondas o por ultrasonido se utilizan para reducir el tiempo de extracción (Abdullahi R. Abubakar, 2020).

(D) Volumen final requerido: La cantidad de producto final deseado influye en la elección del método de extracción. Productos de gran volumen, como las tinturas, se preparan comúnmente mediante maceración debido a su simplicidad y eficiencia. Los productos concentrados se producen mediante percolación o extracción de Soxhlet para lograr una mayor concentración de compuestos (Abdullahi R. Abubakar, 2020).

(E) Uso previsto: Finalmente, el uso previsto del extracto también es un criterio importante. Los extractos destinados al consumo humano, como suplementos naturales, suelen prepararse mediante el método de maceración, que es más adecuado para garantizar la seguridad en la

ingesta. Por otro lado, los productos destinados a pruebas experimentales o investigaciones pueden requerir otros métodos de extracción que permitan una mayor pureza o rendimiento en compuestos específicos, además de la maceración (Domínguez, 1988).

En la industria de la fitofarmacología y la investigación científica, la elección del método de extracción se basa en la combinación de estos factores para garantizar la eficacia, la economía y la calidad del producto final, dadas estas condiciones se decidió establecer como método de extracción al Soxhlet.

### **2.8.1 Soxhlet**

La técnica de extracción Soxhlet combina elementos de dos métodos, la percolación y la maceración. Fue desarrollada por Franz Von Soxhlet en 1879 y sigue siendo ampliamente empleada en la actualidad. El proceso se lleva a cabo utilizando un dispositivo especial conocido como aparato Soxhlet.

El Soxhlet es una técnica reconocida por su capacidad para extraer compuestos de manera eficiente y completa, especialmente cuando se trata de muestras que contienen una variedad de componentes. Su diseño permite ciclos repetitivos de extracción, lo que contribuye a una mayor eficacia en la obtención de los compuestos deseados. Además, el Soxhlet ofrece un equilibrio óptimo entre la economía de los recursos y la calidad del extracto final, haciendo de esta elección una estrategia integral para nuestros objetivos de investigación fitofarmacológica. A continuación, se proporciona una descripción más detallada del proceso Soxhlet y sus ventajas específicas en nuestro contexto de estudio.

Este dispositivo consta de una cámara de extracción que se encuentra conectada a un conducto de vapor, junto con un tubo de sifón que se extiende hasta la junta en la que se coloca un matraz de fondo redondo. Para evitar obstrucciones en el tubo del sifón cuando se añade el material en polvo, se utiliza un cartucho de papel de filtro o un tapón de algodón en la cámara de extracción (Fig. 11).

El procedimiento inicia con la colocación de la materia en el cartucho de extracción. Luego, se conectan un condensador y otro matraz de fondo redondo al aparato Soxhlet en sus respectivas posiciones. El siguiente paso consiste en verter el solvente desde la parte superior, lo que permite que este ingrese a la cámara de extracción.

Una vez que el nivel de solvente supera el codo del sifón, el disolvente fluye hacia el matraz a través del tubo del sifón. Para iniciar la extracción, el matraz se calienta, lo que provoca la ebullición del disolvente. Los vapores resultantes, a través del conducto de vapor, se dirigen hacia el condensador donde se condensan y las gotas resultantes caen sobre la materia prima en la cámara de extracción, lo que se conoce como percolación.

Simultáneamente, el cartucho de extracción se llena gradualmente con solvente, lo que permite que la materia prima permanezca en contacto con el disolvente, es decir, se lleva a cabo una maceración. Cuando el nivel de solvente supera el tubo de sifón, el solvente fluye de regreso al matraz de fondo redondo a través del tubo de sifón, lo que cierra el ciclo. Este proceso continuo evita la saturación del disolvente con solutos y, en consecuencia, la extracción Soxhlet es conocida como una extracción exhaustiva del material vegetal (Jai Malik, 2022).

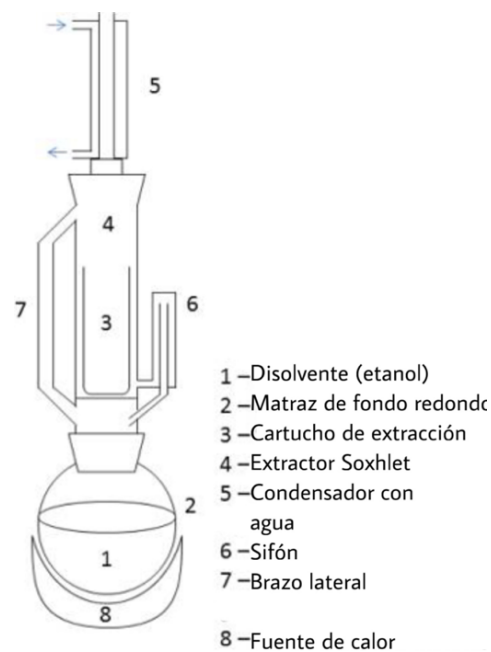


Figura 11. Diagrama del equipo de extracción Soxhlet (Redfern James, 2014).

## 2.9 Estudios de actividad biológica

La evaluación de compuestos mediante estudios de actividad biológica es crucial. Estos análisis permiten determinar la influencia de sustancias sobre procesos biológicos, proporcionando información esencial sobre sus efectos, en particular, en la inhibición del crecimiento celular. Dentro de este marco, se abordará específicamente la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ).

### 2.9.1 Concentración inhibitoria 50

La Concentración Inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) es un parámetro esencial que evalúa la cantidad de un compuesto químico o biológico necesaria para inhibir una actividad biológica específica en el 50% de una población. En el contexto de los ensayos de viabilidad celular, la  $CI_{50}$  se utiliza para cuantificar la toxicidad de un compuesto y se basa en la distribución normal, una probabilidad versátil para modelar fenómenos naturales. Esta distribución normal se adapta a la respuesta de las células a un compuesto en ensayos de viabilidad celular (Mahshid Ghasemi, 2021).

El proceso para determinar la  $CI_{50}$  implica un ensayo de inhibición del crecimiento celular, donde se expone un grupo de células a diferentes dosis de un compuesto en estudio durante un periodo de tiempo predefinido. La respuesta biológica en este caso se manifiesta como la reducción en la capacidad de las células para proliferar y sobrevivir en presencia del compuesto. La  $CI_{50}$  es la concentración específica de ese compuesto que resulta en la inhibición del 50% de las células en cultivo. Para medir esta respuesta, se emplean técnicas de ensayo de viabilidad como el ensayo MTT (metiltetrazolio) o el ensayo cristal violeta (CV).

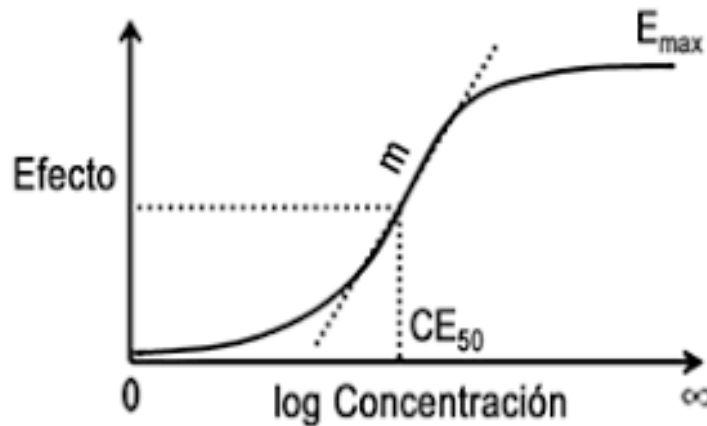


Fig. 12. Ejemplo de una curva concentración-respuesta

La  $CI_{50}$  se representa gráficamente mediante una curva concentración-respuesta (Fig. 12) , que ilustra la relación entre la cantidad del compuesto administrado y el porcentaje de células que sobreviven. La  $CI_{50}$  se establece como el punto de inflexión en esta curva, donde el efecto tóxico alcanza su nivel medio (Senem Kamiloglu, 2020). La  $CI_{50}$  es una medida altamente precisa y reproducible para evaluar la toxicidad de compuestos químicos y biológicos. Esta métrica desempeña un papel esencial tanto en el desarrollo de nuevos fármacos como en la investigación básica en biología celular. Proporciona información valiosa sobre la eficacia y seguridad de los compuestos.

### 2.9.2 Ensayo de viabilidad celular MTT

El ensayo de viabilidad celular MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio) es una técnica ampliamente utilizada que tiene sus raíces en la década de 1960. Fue desarrollado por primera vez por el científico Henry Mosmann en 1983 (Mahshid Ghasemi, 2021).

El MTT en sí mismo es una sal de tetrazolio que contiene grupos nitrogenados en su estructura molecular. Cuando se añade al medio de cultivo celular, las células vivas son capaces de internalizar el MTT debido a su naturaleza soluble en agua. Una vez dentro de la célula, el MTT entra en contacto con las mitocondrias, las organelas responsables de la producción de energía celular. En esta reacción, el MTT actúa como un aceptor de electrones. Las mitocondrias utilizan los electrones generados en su cadena de transporte de electrones durante la respiración celular, con la participación de coenzimas como el NADH y el NADPH, para reducir el MTT, transformándolo en formazán (Fig.12). La formación de formazán es una reacción específica de las mitocondrias en células viables y activas. Cuanto más activas sean las mitocondrias y mayor sea la densidad de células vivas, más formazán se producirá. El formazán resultante es insoluble en agua y se acumula en el interior de las células en forma de cristales púrpuras (Senem Kamiloglu, 2020). La cantidad de formazán generada es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el cultivo. Para cuantificar la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, se realiza una extracción del formazán, generalmente utilizando un solvente orgánico como el isopropanol. Luego, la cantidad de formazán extraído se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda específica, generalmente a 570-600 nanómetros (nm) (Mahshid Ghasemi, 2021).

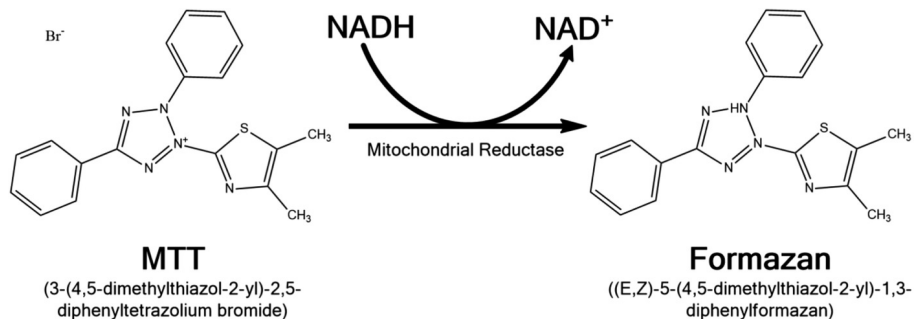


Figura 12. Reacción de reducción de MTT a cristales de formazán (Senem Kamiloglu, 2020).

### **3. Justificación**

El cáncer de mama triple negativo es un tipo de cáncer de mama agresivo caracterizado por la ausencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y no expresa la proteína HER2. Este tipo de cáncer es el segundo más común en México y tiene peor pronóstico que otros tipos de cáncer de mama. En el contexto de su tratamiento, la quimioterapia es una estrategia primordial, involucrando la administración intravenosa de una combinación de medicamentos. No obstante, estos medicamentos pueden inducir una gama de efectos secundarios, que van desde neuropatías periféricas, daño a las células sanguíneas, úlceras bucales y posibles afectaciones en órganos como los riñones, el hígado y el corazón (Pathol, 2022). Dadas estas consideraciones, surge la necesidad de explorar alternativas terapéuticas menos adversas. Es por esto por lo que en esta investigación se utilizará el extracto hidroalcohólico de la planta *Decatropis bicolor* L. para determinar su efecto antiproliferativo en células 4T1, las cuales son una línea celular de cáncer de mama triple negativo que representa un modelo reproducible con comportamiento similar al que se observa clínicamente (Kaur, Nagaraja, & Zheng, 2012).

### **4. Hipótesis**

El extracto hidroalcohólico de la *Decatropis bicolor* L. mostrará un efecto antiproliferativo en un modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo

## 5. Objetivos

### 5.1 General

Evaluar el efecto antiproliferativo del extracto hidroalcohólico de la *Decatropis bicolor* L. en células de cáncer triple negativo murino para determinar su potencial uso terapéutico.

### 5.2 Particulares

- Optimizar las condiciones de extracción de la parte aérea de *Decatropis bicolor* mediante la cuantificación de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu.
- Separar en fracciones el extracto hidroalcohólico a través de cromatografía en columna para su posterior evaluación in vitro.
- Obtener la concentración inhibitoria 50 de las fracciones mediante ensayos de viabilidad celular por el método de MTT en un modelo celular de cáncer de mama murino triple negativo.
- Caracterización química de las fracciones por HPLC/MS, permitiendo una evaluación detallada de la muestra.



## 6. Material y Métodos

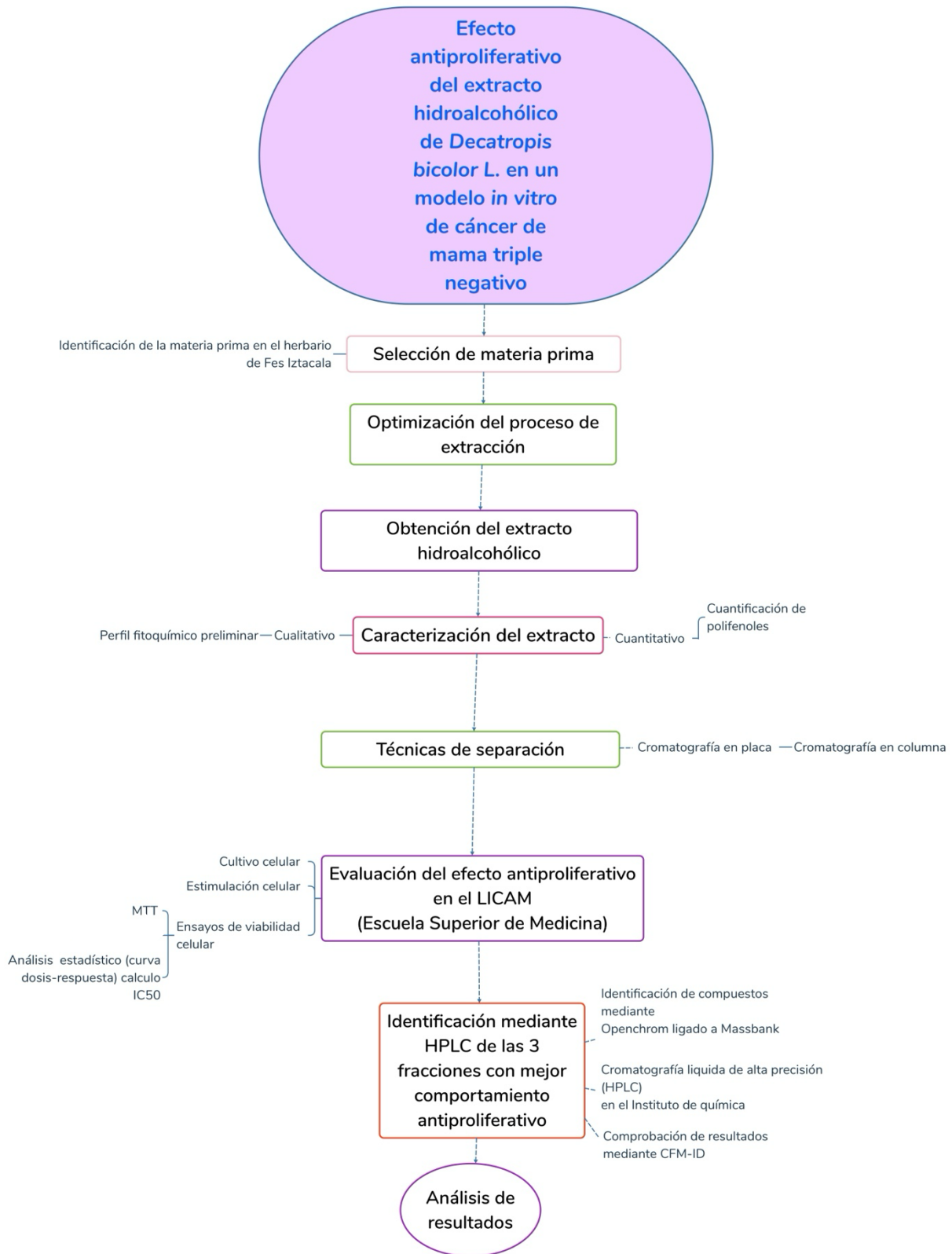


Figura 13 Diagrama de la metodología llevada a cabo en el presente trabajo

## 6.1 Materia prima

Se utilizó 1 Kg de muestras de *Arantho (Decatropis bicolor L.)*, dichas muestras se recolectaron en marzo y fueron adquiridas en la localidad de El arenal, Hidalgo, México (20.2265612 - 98.9052192). Las cuales se identificaron y depositaron en el herbario de la FES Iztacala, como voucher IZTA-3940.

Para garantizar la calidad y uniformidad de las muestras, se procedió a la selección de las partes aéreas de la planta, excluyendo ramas y elementos con alteraciones en la coloración. Posteriormente, estas partes aéreas se sometieron a un proceso de secado a una temperatura constante de 24°C, en condiciones de sombra, con el objetivo de preservar las propiedades químicas de los compuestos fenólicos presentes. Una vez secas, las hojas se sometieron a un proceso de molienda y tamizado para lograr una uniformidad en el tamaño de partícula siendo este de 0.5 mm, garantizando así una preparación homogénea y consistente para las etapas posteriores del estudio.

## 6.2 Diseño experimental

Para determinar las condiciones óptimas de extracción, se estableció un diseño experimental tipo factorial  $3^2$  en el cual se evaluaron el tiempo de extracción y la composición de los disolventes utilizados. La respuesta principal consistió en la cuantificación de los polifenoles presentes en las muestras, por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 1. Diseño experimental de la extracción hidroalcohólica de la *Decatropis bicolor L.*

Proporción de disolvente Etanol: Agua	tiempo:		
Temperatura 150°C	30 min	60 min	90 min
80:20	A1	B1	C1
60:40	A2	B2	C2
20:80	A3	B3	C3

### 6.3 Obtención del extracto hidroalcohólico

La elección de la extracción por Soxhlet se basa en su eficacia para la obtención de extractos de compuestos fenólicos a partir de materiales vegetales. Este método aprovecha el ciclo de calentamiento y enfriamiento del disolvente, que permite una extracción continua (Chemistry, 2015). Siguiendo el diseño experimental 3<sup>2</sup>, se llevó a cabo la extracción con Soxhlet utilizando un matraz de 500 mL, un condensador y un cartucho de papel filtro con poro de 8µm con 10 g de la materia prima. Se empleó una mezcla de disolventes compuesto por etanol y agua en sus diferentes proporciones, el cual se calentó hasta alcanzar el punto de ebullición de la mezcla de disolventes. El vapor de disolvente ascendió por el condensador y se condensó en el reflujo. Posteriormente, el disolvente condensado se distribuyó sobre la materia prima (Figura 14), permitiendo la extracción de los compuestos de interés. Para concentrar la solución y eliminar completamente el disolvente, el matraz se colocó en una estufa a 40°C durante un período de tres días o hasta que el extracto quedara completamente seco. Este enfoque de extracción se diseñó meticulosamente para garantizar la obtención de un extracto hidroalcohólico de *Decatropis bicolor* L. bajo condiciones controladas y altamente reproducibles, esenciales para los propósitos de la investigación.



Figura 14 Extracción en Soxhlet de *D. bicolor* L.

## 6.4 Caracterización del extracto

### 6.4.1 Cualitativo

#### 6.4.1.1 Perfil fitoquímico preliminar

El perfil fitoquímico preliminar es una serie de ensayos cualitativos que se utilizan para identificar la presencia de diferentes grupos funcionales asociados a los diferentes metabolitos secundarios que pueden encontrarse en una muestra de extracto. Las pruebas que se utilizaron en el perfil fitoquímico preliminar son:

- Prueba de *Dragendorff*: Es una prueba química utilizada para detectar la presencia de alcaloides en una muestra. El fundamento de la Prueba de *Dragendorff* se basa en la formación de complejos coloreados entre los alcaloides y el reactivo de *Dragendorff*. Este es una solución que generalmente contiene yoduro de potasio y una sal de bismuto, como el nitrato de bismuto. Cuando se mezcla con una solución que contiene alcaloides, se produce una reacción química que conduce a la formación de precipitados coloreados o a un cambio en el color de la solución, las reacciones químicas que ocurren en esta prueba son principalmente reacciones de precipitación y formación de complejos marrones (Harborne, 1998) (ver anexos Fig. 1).
- Prueba de *Baljet*: Es una prueba química utilizada para la detección de lactonas sesquiterpénicas en una muestra. Esta prueba implica la mezcla de dos soluciones, A y B, en iguales volúmenes antes de su uso. La solución A consiste en 1 gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol, mientras que la solución B contiene 10 gramos de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Cuando se ponen 1 mg de compuesto y unas 3-4 gotas de reactivo, la prueba es positiva si se forma una coloración anaranjada o roja oscura (Domínguez, 1988).
- Prueba de *Shinoda*: En esta prueba, se utiliza el ácido clorhídrico concentrado y limadura de magnesio para provocar reacciones con compuestos como las flavonas, flavononas, flavonoles o xantonas presentes en la muestra (ver anexos Fig. 2). La estructura de estos compuestos incluye anillos aromáticos y grupos funcionales que reaccionan con el ácido clorhídrico, dando lugar a colores específicos, como anaranjado y rojo (Domínguez, 1988).

- Prueba de saponinas. El fundamento se basa en la capacidad de las saponinas para formar espuma cuando se agitan en presencia de agua. A menudo, las saponinas son surfactantes naturales, lo que significa que pueden reducir la tensión superficial del agua y formar burbujas estables (Rondón María, 2018). El procedimiento típico de la prueba de saponinas implica los siguientes pasos: Se toma una muestra de la planta o extracto vegetal que se sospecha que contiene saponinas, la muestra se mezcla vigorosamente con agua en un tubo de ensayo, se agita la mezcla durante un período de tiempo especificado y se observa si se forma una espuma estable y duradera en la parte superior de la mezcla.
- Prueba de *Fehling*. Se compone de dos soluciones separadas: la solución A de Fehling, que contiene sulfato de cobre (II) y Fehling B con tartrato de sodio y potasio alcalino. Estas se combinan para crear un complejo de cobre que actúa como agente oxidante (Ver anexos Fig.3). La prueba detecta azúcares reductores, como monosacáridos de aldosa y cetosa, debido a su capacidad para detectar aldosas bajo condiciones alcalinas, lo que produce un resultado positivo en la prueba (Cong-Cong, Bing, & Yi-Qiong, 2017).
- Prueba de *Hager*. Consiste en una solución saturada de ácido pícrico en agua, este reactivo precipita la mayoría de los alcaloides, los picratos se pueden cristalizar y ello permite por medio de resinas intercambiadoras, separar los alcaloides. Cuanto mayor sea la concentración de alcaloides, más intenso será el color observado. (Harborne, 1998)
- Prueba de *Lieberman*. Se utiliza para detectar fitoesteroles y terpenos en muestras de plantas. Esta prueba se basa en la capacidad de los esteroides, incluyendo los fitoesteroles, para reaccionar con ácido sulfúrico concentrado y el reactivo de Lieberman, que generalmente consiste en una mezcla de anhídrido acético y cloroformo con ácido sulfúrico. Los esteroides con dos enlaces dobles conjugados pueden reordenarse y deshidratarse bajo estas condiciones, creando compuestos coloreados (Ver anexos Fig. 4). En lo que respecta a los fitoesteroles, esta reacción química suele manifestarse con un cambio de color hacia tonalidades rojo-moradas. Por otro lado, cuando se encuentran terpenos en la muestra, como es el caso de los triterpenos, la interacción con el reactivo de Lieberman puede desencadenar un cambio de color hacia matices verdosos (Domínguez, 1988) .

- Prueba de *Börtranger*. Esta prueba se emplea para detectar la presencia de naftaquinonas y antraquinonas. Se hierve un poco del material con hidróxido de potasio al 2-5 % durante unos 10 minutos. Luego, se enfría la solución, se acidula y se extrae con benceno. Si la fase de benceno se decolora y la alcalina se vuelve roja, indica la presencia de quinonas. Además, si hay derivados de antrona, la fase alcalina puede mostrar una coloración amarillenta con fluorescencia verde. Las quinonas son dicetonas insaturadas, que, por reducción, se convierten en polifenoles los que fácilmente las regeneran por oxidación (Domínguez, 1988).

Para las pruebas descritas anteriormente se siguió el diagrama metodológico mostrado a continuación:

# Perfil Fitoquímico preliminar

(Dominguez, 1988) (Harborne 1998)

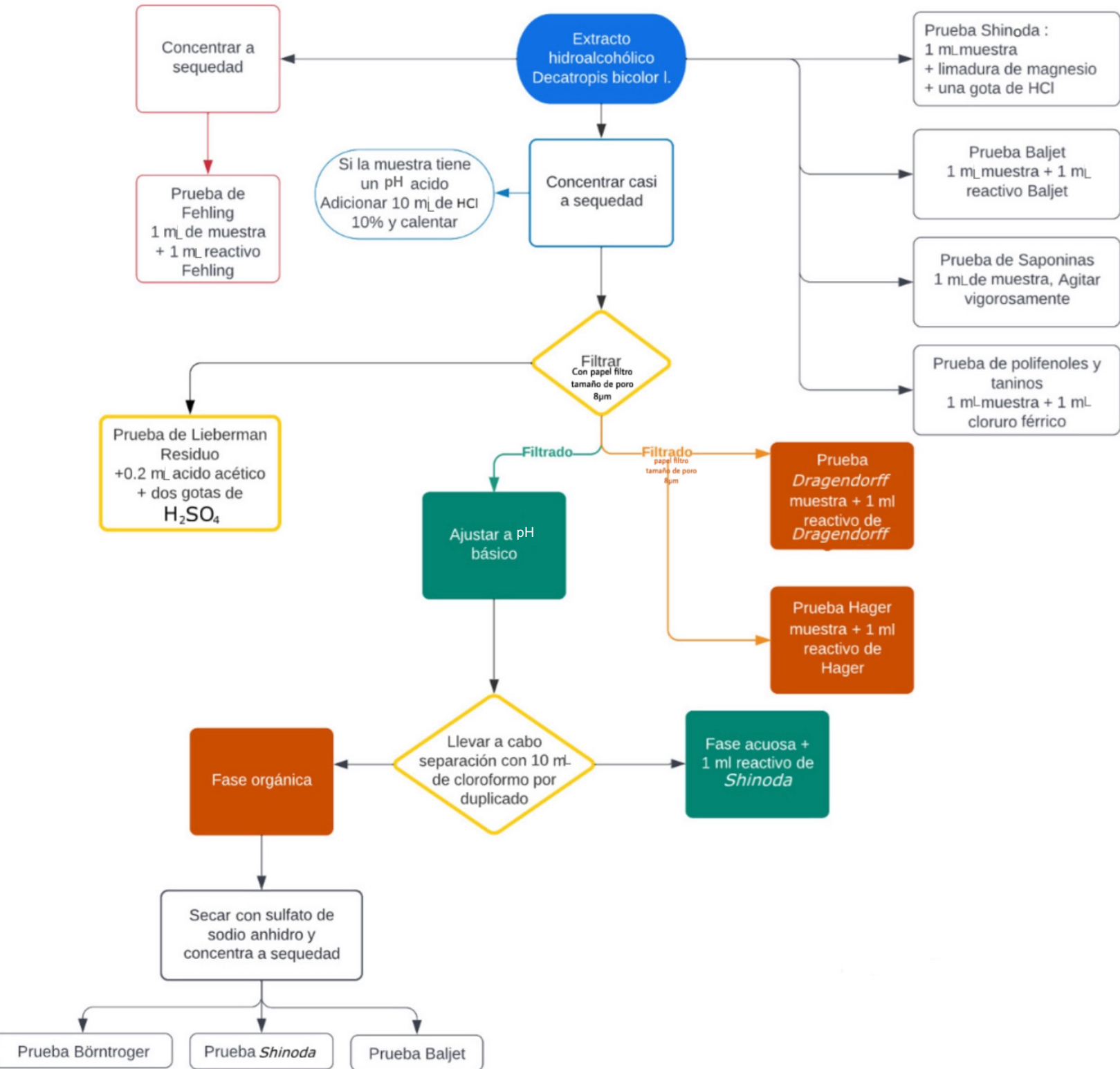


Figura 15 Diagrama metodológico del perfil fitoquímico preliminar

## 6.4.2 Cuantitativo

### 6.4.2.1 Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se emplea el método de Folin Ciocalteu el cual fue desarrollado por Otto Folin y Vintilă Ciocalteu en la década de 1920. Estos científicos crearon este método para cuantificar compuestos fenólicos en muestras biológicas y alimentos. El método se popularizó debido a su simplicidad y sensibilidad, lo que lo convirtió en una técnica estándar para la cuantificación de fenoles totales (Cong-Cong, Bing, & Yi-Qiong, 2017). El fundamento de este método se basa en la capacidad de los fenoles en la muestra de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu, que es una solución alcalina de fosfomolibdato de sodio y fosfotungstato de sodio, a un estado oxidado. Esta reacción conduce a la formación de un complejo azul intenso que se desarrolla en el rango de longitud de onda de 725 nm a 760 nm, cuya intensidad se correlaciona directamente con la concentración de fenoles presentes. Dicha intensidad se cuantifica espectrofotométricamente mediante un espectrofotómetro UV-Vis. Para determinar la cantidad de fenoles en la muestra, se utiliza una curva de calibración previamente construida utilizando estándares de fenoles conocidos.

El procedimiento de cuantificación implica los siguientes pasos: Se prepara un tubo cónico de 1.5 mL y se añaden 100  $\mu$ L de la muestra. Posteriormente, se agrega 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1:10, se agita y se deja reposar durante 3 minutos. A continuación, se añade 1 mL de carbonato de sodio 0.7 M, se agita y se incuba durante 2 horas en la oscuridad. Finalmente, se realizan lecturas de absorbancia a 760 nm por triplicado. La concentración de fenoles totales fue calculada con la curva de calibración usando ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 25 a 150 mg/mL como estándar. Los resultados son expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 0.1 gramos de extracto (Cong-Cong, Bing, & Yi-Qiong, 2017).



## 6.5 Técnicas de separación cromatográficas

La cromatografía en placa se basa en la separación de compuestos en una mezcla en función de sus interacciones con una fase estacionaria y una fase móvil (Coskun, 2016). En este método, se probaron diferentes mezclas de disolventes con variadas polaridades, siguiendo un diseño experimental que incluyó: acetato de etilo-etanol (50:50), metanol-cloroformo, acetato de etilo-agua-ácido fórmico, acetato de etilo-agua-ácido acético y cloroformo-ácido acético (50:50). El fundamento radica en que los compuestos se separan en función de sus afinidades por la fase estacionaria (sílice gel 60) y la fase móvil (disolventes de las mezclas). Tras medir los tiempos de elución y evaluar las marcas, se eligió la combinación de cloroformo y ácido acético (50:50) como la mezcla óptima debido a su capacidad para lograr una separación eficiente de los compuestos en la muestra según sus polaridades.

Tras la selección del disolvente óptimo, se procedió a la preparación de una columna de cromatografía rellena con sílice gel de poro 60. Esta columna se cargó con 100 mL del disolvente seleccionado, asegurando una compactación adecuada de la sílice. La cromatografía en columna se basa en el principio de separación de componentes en una muestra debido a sus interacciones con una fase estacionaria (en este caso, la sílice) y una fase móvil (el disolvente). Posteriormente, se introdujeron 150 mL del extracto hidroalcohólico en la columna y se permitió que la sílice se saturara completamente. Una vez alcanzada la saturación, se inició la elución de las fracciones, con un volumen de 5 mL recogido cada 4 minutos, lo que garantizó un seguimiento preciso de la separación. Cada fracción resultante se sometió a cromatografía en placa, y aquellas que presentaron un  $R_f$  similar se agruparon, consolidando así las fracciones que compartían componentes similares. De esta manera, se obtuvieron un total de 10 fracciones, permitiendo la separación eficiente para el siguiente proceso.

Luego de identificar las 10 fracciones, se procedió a realizar otra cromatografía en placa, la cual fue revelada mediante el método de ninhidrina, la cual es un agente de revelación ampliamente empleado en cromatografía en placa para la detección de aminoácidos y aminas, durante la reacción, los grupos amino de los aminoácidos reaccionan con la ninhidrina, desencadenando la liberación de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  y un aldehído, mientras que al mismo tiempo se forma un complejo de ninhidrina que genera el característico color púrpura.

El procedimiento específico consistió en sumergir la placa eluida previamente en una mezcla de 0.3 gramos de ninhidrina en 100 mL de n-butanol con 3 mL de ácido acético glacial. luego, se sometió la placa a un calentamiento a 60°C durante aproximadamente 30 minutos (WALDI, 1965).

## **6.6 Evaluación del efecto antiproliferativo**

El siguiente trabajo experimental se llevó a cabo en el LICAM (Laboratorio de Investigación Integral Cardio Metabólica)

### **6.6.1 Cultivo Celular**

Como modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo se utilizaron las células 4T1 las cuales tienen su origen en un tumor de mama de un ratón hembra de la cepa BALB/c, y su historia se remonta a las investigaciones realizadas en la década de 1970 por el Dr. Fred Miller en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Pulaski Beth A., 2001). Estas células se han convertido en un modelo celular fundamental para el estudio del cáncer de mama, en particular, para el cáncer de mama triple negativo. Además, estas células carecen de los tres receptores clave, lo que las clasifica como un modelo representativo de cáncer de mama triple negativo (Pulaski Beth A., 2001).

Este modelo celular, que se cultiva a 37 °C con un 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), presenta un tiempo promedio de duplicación de 14 horas. El medio base utilizado es RPMI-1640, con suero bovino fetal en una concentración final del 10 % y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina). Es importante destacar que no se debe permitir que las células alcancen un 100% de confluencia y se recomienda la subcultivación al 80 % de la confluencia.

Así mismo, se utilizó la línea celular C2C12 como modelo no cancerígeno; ésta se originó a partir de un músculo de ratón y se ha utilizado principalmente para estudios relacionados con la biología muscular, la diferenciación celular y la regeneración muscular. Las células C2C12 se cultivan en su respectivo medio (DMEM high glucose) suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), se mantienen a una temperatura de 37 °C con un 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Su tiempo de duplicación es relativamente rápido, alrededor de 12 a 24 horas, lo que facilita su mantenimiento y expansión en el laboratorio (T Katagiri, 1994). Tomando en cuenta las necesidades experimentales, las dos líneas celulares se

derivaron de un grupo de cultivos primarios y se mantuvieron en cultivos secundarios en placas de cultivo con una superficie de 75 cm<sup>2</sup>. Se colocaron ambas líneas celulares en una incubadora, manteniendo una atmósfera específica con un 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y una temperatura constante de 37 grados Celsius.

Se sembraron al alrededor de 5,000 células en los pocillos de las placas de 96 pocillos, con la única excepción de las dos columnas ubicadas en las orillas de la placa. Esta precaución se tomó para proteger a las células, ya que se considera que las células ubicadas en los extremos de la placa están más expuestas y pueden experimentar condiciones menos favorables para su crecimiento (T Katagiri, 1994). En estas áreas, se sembraron un total de 64 pocillos, las placas se incubaron durante 24 horas con el objetivo de permitir que las células se adhirieran a la superficie de los pocillos.

### **6.6.2 Estimulación celular**

Una vez que el extracto estuvo completamente seco, se procedió a pesar 0.1 g y disolverlo en 20 mL de agua para así lograr una concentración de 5000 µg/mL. En este punto, se midió el pH de la solución con ayuda de un potenciómetro, para evaluar su posible influencia en las células. Luego, se llevó a cabo un primer ensayo que abarcó un amplio rango de concentraciones (1 µg/mL-1000 µg/mL) con el objetivo de comprender el comportamiento del extracto completo. Para ello, se realizó una dilución en serie, tomando el volumen necesario de la solución y completándolo con medio de cultivo suplementado hasta alcanzar un volumen total de 1000 µL, esta dilución se realizó de manera secuencial, abarcando desde 1000 µg/mL hasta 10 µg/mL, con intervalos de medio logaritmo.

Tras el periodo de adherencia celular en las cajas de 96 pozos, se procedió a retirar el medio de cultivo y a estimular cada pocillo con 150 µL de cada una de las concentraciones. En cada concentración del extracto, se estimularon 4 pozos, acompañados de 4 pozos de control, esto para ambas líneas celulares, los pozos se mantuvieron incubando durante 5 días. Luego de un análisis inicial de los resultados, se determinó un rango de concentraciones donde se observaron efectos en las células. Este rango de concentraciones variaba desde 50 µg/mL hasta 300 µg/mL. En este intervalo, se realizó un segundo ensayo utilizando el extracto completo, repitiendo el procedimiento por triplicado para garantizar la obtención de datos estadísticamente significativos.

Se optó por llevar a cabo ensayos a los días 1, 3 y 5 post-estimulación celular. Basándonos en la capacidad del extracto total para lograr una disminución del 50% de la viabilidad celular al tercer día, se estableció este límite como referencia para los futuros ensayos de las fracciones.

Posteriormente, se examinaron las 10 fracciones, las cuales presentaban distintas cantidades, con el objetivo de alcanzar una concentración uniforme de 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en cada una, se ajustaron a diversos volúmenes con agua, se realizaron estimulaciones en un total de 4 pozos por concentración siguiendo el rango de 50 a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , además de 4 pozos de control, para cada línea celular. Estos pozos se mantuvieron en incubación durante 3 días, este procedimiento se repitió para cada una de las 10 fracciones, y cada ensayo se llevó a cabo al menos por duplicado para asegurar la obtención de un modelo estadístico altamente confiable y reproducible.

### **6.6.3 Ensayos de viabilidad celular**

- **MTT**

En el marco de nuestro experimento, tras un período de estimulación de tres días, procedimos a retirar el medio de cultivo de los pozos, realizando un enjuague con 200  $\mu\text{L}$  de HBSS (solución de sal equilibrada de Hanks, por sus siglas en inglés) en cada uno, permitiendo que actuara durante aproximadamente 2 minutos. Luego, se retiró el líquido con precaución para asegurarnos de que los pozos estuvieran lo más secos posible. Acto seguido, añadimos 100  $\mu\text{L}$  de una solución de MTT (1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) en HBSS a cada pozo y se incubó durante 15 minutos (Fig.17). Posteriormente, retiramos nuevamente el contenido de los pozos y agregamos 100  $\mu\text{L}$  de una solución reveladora (compuesta por 30  $\text{mL}$  de isopropanol y 14  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico concentrado) en cada uno. Esta mezcla se mantuvo en el oscilador durante 3 minutos o hasta homogenizar la solución. Finalmente, determinamos la densidad óptica de la solución resultante utilizando un espectrofotómetro UV, con una longitud de onda de 590 nm

- Análisis estadístico de viabilidad celular

Para llevar a cabo este análisis, se utilizó el software GraphPad Prism 9, que permite representar gráficamente los datos normalizados en un diagrama de concentración frente al %MTT o %CV. La regresión lineal del logaritmo de la concentración con la respuesta biológica, es decir,  $\log(\text{inhibidor})$  vs. respuesta normalizada, es una técnica fundamental en este contexto, ya que proporciona el valor del  $IC_{50}$ , que indica la concentración del compuesto en la muestra que inhibe el 50% de la respuesta biológica. Adicionalmente, se aplicó un análisis estadístico para evaluar las diferencias entre los grupos mediante una prueba de ANOVA de una vía. Para complementar esta evaluación, se realizó una prueba de Tukey, que identifica específicamente cuáles grupos difieren entre sí en caso de que se encuentren diferencias significativas en la prueba ANOVA. El nivel de significancia establecido fue  $p < 0.05$ , estas herramientas analíticas y estadísticas no solo permiten visualizar los resultados de manera gráfica, sino que también brindan una evaluación cuantitativa y estadísticamente fundamentada de los efectos de los inhibidores o compuestos analizados en el estudio.

## 6.7 Caracterización por HPLC de las fracciones con mayor efecto antiproliferativo.

Para caracterizar las fracciones con mejor comportamiento en el ensayo celular, se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), una técnica altamente eficaz en la separación, identificación y cuantificación de compuestos en una muestra. El principio fundamental de la HPLC se basa en la interacción de los componentes de la muestra con una fase estacionaria y una fase móvil bajo alta presión. Los compuestos en la muestra se separan debido a sus diferencias en afinidad por estas fases, lo que resulta en la elución secuencial de los compuestos en diferentes momentos y la creación de un perfil de separación (Coskun, 2016).

En el marco de este procedimiento, las fracciones previamente seleccionadas debido a su comportamiento prometedor en el ensayo celular fueron analizadas mediante un equipo HPLC Agilent 1260 Series infinity II, ubicado en el Instituto de Química de la UNAM. Durante el análisis, se utilizó metanol y agua como disolvente de la muestra, y se controló un flujo de 0.2 mL/min. Además, se estableció un rango de masas de 100-1000 m/z y se empleó un detector Bruker 6000 ESI/ TI junto con una columna Luna de 100 x 2 mm y un diámetro de partícula de 3  $\mu$ m, con ionización positiva. Esta elección de condiciones de análisis permitió la separación eficaz de los componentes en las fracciones y la obtención de un perfil cromatográfico.

Para llevar a cabo el análisis de los cromatogramas, se empleó el software Openchrom, que se encuentra vinculado a una base de datos conocida como MassBank. MassBank es una biblioteca espectral de masas de código abierto que se utiliza para la identificación de moléculas químicas. Una vez que se identifican los picos de interés en los cromatogramas, se estableció una conexión con la base de datos, la cual realiza una búsqueda de similitud considerando los valores de masa sobre carga (m/z) y la intensidad respectiva. Tras el procesamiento de esta búsqueda, se generan resultados que incluyen compuestos químicos con similitud en términos de valores de m/z e intensidades. Cada uno de estos compuestos recibe una calificación denominada "HIT" y un puntaje que proporciona información sobre su significancia de la similitud encontrada.

Una vez que se identificó la molécula con mayor similitud, se copió su estructura química en nomenclatura SMILES (del inglés; Simplified Molecular Input Line Entry Specification). A continuación, esta información se introdujo en otra herramienta en línea denominada CFM.ID (Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification). La función principal de

CFM.ID es asignar los picos correspondientes a las fragmentaciones de iones en un espectro MS/MS particular de una molécula dada. Para llevar a cabo este proceso, se proporciona una estructura química en formato SMILES o InChI, así como una lista de picos espectrales derivados del experimento de MS/MS.

Una vez que se envían los datos, CFM.ID realiza un cálculo exhaustivo de los fragmentos factibles, identificando los fragmentos más probables para cada pico del espectro utilizando un modelo SE-CFM previamente entrenado. Como resultado, se obtiene una anotación detallada de los espectros experimentales proporcionados, en la cual cada pico se asocia con una lista de identificadores correspondientes a los fragmentos que poseen la masa adecuada. Estos identificadores se presentan en orden de probabilidad, desde el más probable hasta el menos probable.

Este enfoque asegura que la molécula identificada corresponda al espectro obtenido a partir de las fracciones analizadas, proporcionando un método riguroso de verificación y validación de los compuestos químicos detectados en el análisis.

## 7.Resultados y discusión

### 7.1 Obtención del extracto

Después de completar el proceso de extracción mediante el aparato Soxhlet, se obtuvo un volumen total de 200 mL de extracto hidroalcohólico (Fig. 16) con las siguientes características:

*Tabla 2 Características del extracto hidroalcohólico*

Prueba	Resultado
Color	Verde
Olor	Dulce
pH	5.9

La medición del pH mediante potenciómetro es esencial para comprender las características ácidas o alcalinas del extracto resultante, lo que puede ser relevante para su posterior análisis o aplicación en investigaciones posteriores. En este caso, un pH de 5.9 indica una ligera acidez en el extracto hidroalcohólico obtenido



*Figura 16 Extracto hidroalcohólico obtenido.*



## 7.2 Diseño Experimental

En el diseño experimental, se evaluaron los efectos de dos factores: tiempo y disolvente (mezcla de etanol y agua) sobre la concentración de polifenoles.

Los resultados se presentaron en la Tabla 3 como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 0.1 gramos de extracto (mgAG/0.1g). Esta tabla proporciona los datos que se utilizaron en el análisis estadístico que se describe a continuación, los valores representan el promedio de las repeticiones por triplicado realizadas para cada tratamiento.

*Tabla 3 Concentraciones de fenoles totales para cada tratamiento.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Proporción disolvente (EtOH: H2O)</b>	<b>Concentración mg/mL</b>
<b>1</b>	30	160 mL: 40 mL	0.4301
<b>2</b>	30	120 mL: 80 mL	0.3706
<b>3</b>	30	40 mL: 160 mL	0.2229
<b>4</b>	60	160 mL: 40 mL	0.3937
<b>5</b>	60	120 mL: 80 mL	0.2632
<b>6</b>	60	40 mL: 160 mL	0.3200
<b>7</b>	90	160 mL: 40 mL	0.4146
<b>8</b>	90	120 mL: 80 mL	0.3817
<b>9</b>	90	40 mL: 160 mL	0.1460

Inicialmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con las hipótesis que se explican en la tabla 4, para investigar la influencia de estos factores en la variable de respuesta “Con” (concentración de polifenoles). La tabla 5 de ANOVA proporciona un resumen de los resultados, donde: El valor  $F$  es la prueba estadística que compara la variabilidad entre grupos con la variabilidad dentro de grupos y el valor  $P$  (probabilidad) que demuestra la probabilidad asociada con el valor  $F$  observado, se considera que hay interacción entre factores si este valor de  $Pr(F)$  es mayor a 0.05.

Tabla 4 Hipótesis planteadas para el análisis de varianza

Hipótesis nula	<i>no hay efecto de la interacción, ninguna media es diferente</i>
Hipótesis alterna	<i>Por lo menos una media es diferente por lo tanto existe una interacción</i>

Tabla 5 Análisis de Varianza (ANOVA) para Influencia de factores en la concentración de polifenoles.

	DF	Sum sq	Media sq	Valor F	P
<b>Tiempo</b>	2	0.0033	0.0016	0.171	0.8437
<b>Disolvente</b>	2	0.1527	0.0763	7.877	0.0034
<b>Tiempo: Disolvente</b>	4	0.069	0.0174	1.805	0.1718
<b>Residuales</b>	18	0.1744	0.0096		

En este contexto, se cumple la hipótesis alterna que establece que “por lo menos una media es diferente, por lo tanto, existe una interacción” ya que el valor  $p$  asociado al factor “Disolvente” en la tabla ANOVA es menor que el nivel de significancia ( $0.0034 < 0.05$ ), lo que indica que hay al

menos una diferencia significativa entre las medias de los grupos definidos por el factor "Disolvente. Los resultados revelaron hallazgos significativos, ya que el factor "Disolvente" demostró un efecto estadísticamente significativo en la concentración de Polifenoles. En cambio, el factor "tiempo" y la interacción entre ambos factores no mostraron efectos significativos.

En el análisis estadístico, se utilizaron varios gráficos y pruebas para evaluar la calidad del modelo de regresión y la distribución de los residuos. Estos gráficos nos ayudan a entender si el modelo se ajusta adecuadamente a los datos y si se cumplen las suposiciones estadísticas necesarias para realizar inferencias válidas.

El gráfico cuantil-cuantil (Fig. 17) nos permitió comparar la distribución de los residuos con una distribución normal. Debido a que los puntos en el gráfico se ajustan a una línea diagonal, podemos concluir que los residuos se distribuyen normalmente

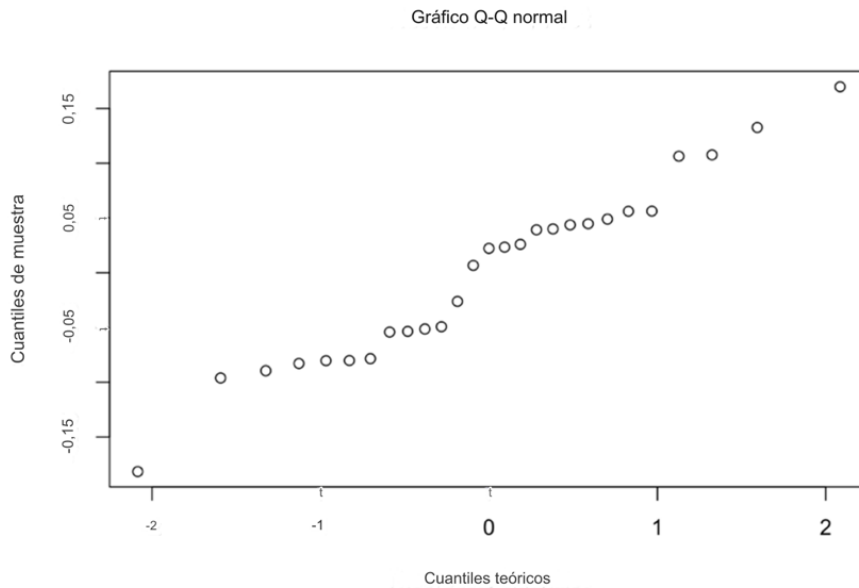


Figura 17. Gráfico cuantil-cuantil: normalidad de los residuos en el análisis de regresión.

La distribución de los residuos en términos de su densidad de probabilidad nos muestra cómo están distribuidos los residuos y nos ayuda a detectar cualquier patrón o tendencia en ellos. La distribución uniforme alrededor de cero y con forma de campana como se observa en la figura 18 indica que los residuos siguen una distribución normal.

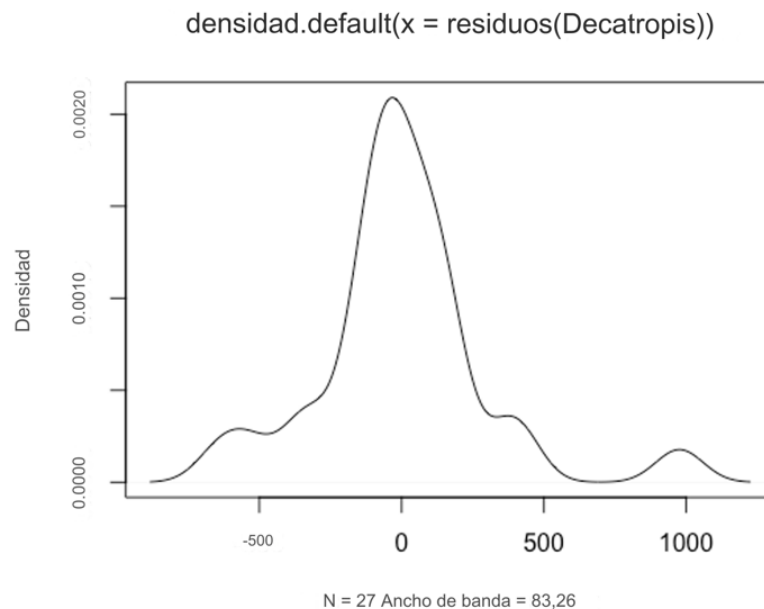


Figura 18. Distribución de los residuos en términos de su densidad de probabilidad.

Para validar los supuestos del ANOVA, se llevaron a cabo pruebas adicionales. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk arrojó un valor de  $W$  de 0.96664. El valor  $W$  es una medida de cuán bien se ajustan los datos a una distribución normal, y cuanto más cercano esté a 1, mayor es la probabilidad de que los datos sean normalmente distribuidos. Además, el valor  $p$  de la prueba fue de 0.5159. Un valor  $p$  alto (generalmente mayor que 0.05) indica que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula, que en este caso sería que los datos son normales, esto y la exploración gráfica de los residuos no indicaron ninguna violación importante de la suposición de normalidad de los residuos.

El gráfico de dispersión entre los valores del modelo y los residuos nos permite identificar si hay una relación entre los valores predichos por el modelo y los residuos. Si los puntos están

dispersos aleatoriamente alrededor de una línea horizontal, indica que no hay una relación clara entre los valores predichos y los residuos. En la Figura 19 podemos observar que la mayoría de los puntos se encuentran alrededor de la línea horizontal de valor 0. Esto indica que el modelo "Decatropis" tiene un buen ajuste general, ya que la mayoría de los valores predichos son cercanos a los valores reales.

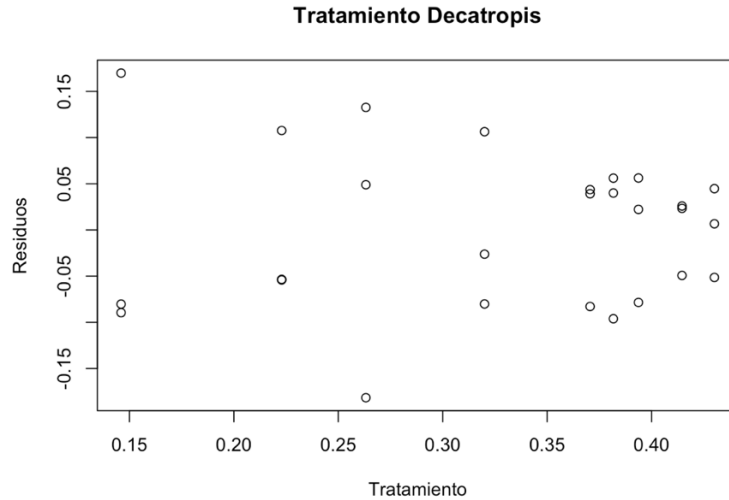


Figura 19. Gráfico de dispersión que relaciona los valores del modelo estadístico "Decatropis" con los residuos.

La prueba de Levene ( $p = 0.9632$ ) indica que no hay evidencia significativa de diferencias en las varianzas entre los grupos, sugiriendo similitud en la variabilidad. Esto respalda la suposición de homogeneidad de varianza entre los grupos.

En el gráfico 20, se observa que la constante de Leverage de los residuales aumenta a medida que aumentan los niveles del factor. Esto indica que los puntos de datos con valores altos del factor tienen una mayor influencia en la estimación del modelo que los puntos de datos con valores bajos del factor.

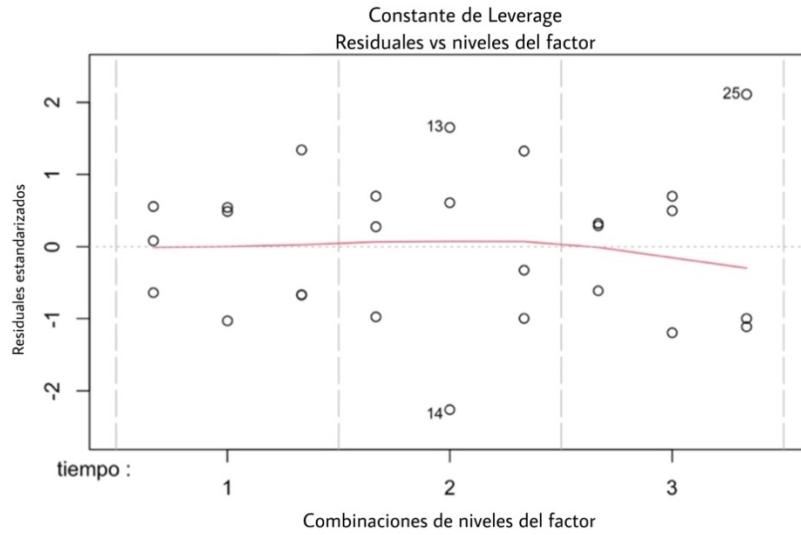


Figura 20. Gráfico de Leverage-Residuos vs Combinaciones de Niveles del Factor.

El gráfico de Scale-Location nos permite verificar si la varianza de los residuos es constante a lo largo de los valores de la variable predictora. Una dispersión aleatoria alrededor de una línea horizontal sugiere homogeneidad en la varianza de los residuos como se observa en la figura 21.

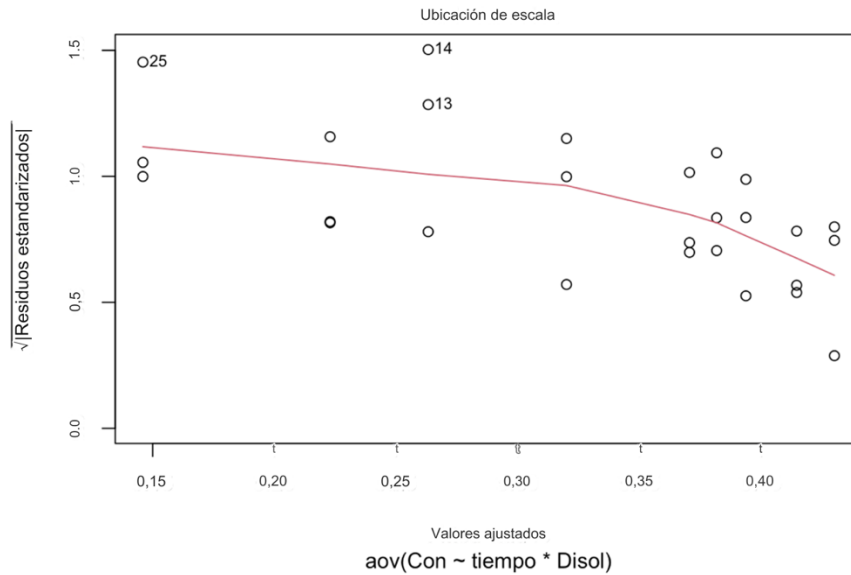


Figura 21. Gráfico de Scale-Location, evalúa la homogeneidad de los datos.

A continuación, se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey para los factores “tiempo” y “disolvente” por separado, así como en conjunto. Esta tabla de Comparación de medias mediante la prueba de Tukey para los factores en conjunto resume las estadísticas clave para cada nivel del factor analizado. “Factor” representa la variable bajo estudio, “Concentración” muestra las concentraciones evaluadas, “SD” indica la desviación estándar de las concentraciones, “r” representa el número de observaciones, “Min” y “Max” son los valores mínimo y máximo de concentración, y “Q50” que representan los cuartiles que dividen los datos en partes iguales. Estos datos permiten una comparación detallada de las concentraciones en cada nivel del factor.

*Tabla 6 Tabla de comparación de concentraciones por nivel de factor utilizando la prueba de Tukey.*

<b>Factor</b>	<b>Concentración</b>	<b>SD</b>	<b>r</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Q50</b>
1:1	0.4300	0.0484	3	0.3786	0.4748	0.4367
1:2	0.3705	0.0717	3	0.2876	0.4142	0.4097
1:3	0.2228	0.0932	3	0.1687	0.3305	0.1693
2:1	0.3937	0.070	3	0.3152	0.4499	0.4159
2:2	0.2632	0.1627	3	0.0816	0.3958	0.3121
2:3	0.3200	0.0959	3	0.2398	0.4263	0.2938
3:1	0.4145	0.0426	3	0.3653	0.4405	0.4379
3:2	0.3817	0.0836	3	0.2856	0.4378	0.4217
3:3	0.1460	0.1471	3	0.0565	0.3158	0.0657

Los resultados de estas comparaciones indican que hay diferencias significativas en la concentración de Polifenoles entre los niveles de "disolvente". Los grupos "a", "ab", y "b" se formaron para indicar estas diferencias significativas en función de la concentración de Polifenoles.

*Tabla 7 Comparación de concentraciones entre grupos.*

<b>Factor</b>	<b>Concentración</b>	<b>Grupos</b>
1:1	0.4300	a
3:1	0.4145	ab
2:1	0.3937	ab
3:2	0.3817	ab
1:2	0.3705	ab
2:3	0.3201	ab
2:2	0.2632	ab
1:3	0.2228	ab
3:3	0.1460	b

Las estadísticas descriptivas mostraron que la concentración de polifenoles variaba entre 0.0565 mg/mL y 0.4748 mg/mL, con una media de aproximadamente 0.327 mg/mL  $\pm$  0.124.

Basándonos en este análisis estadístico, la condición de extracción óptima se determinó como la mezcla de disolventes 80:20 (etanol:agua) con un tiempo de extracción de 30 minutos.

En resumen, los resultados sugieren que el factor "Disolvente" influye significativamente en la concentración de Polifenoles, mientras que el factor "tiempo" y la interacción entre ambos factores no mostraron efectos significativos. Los análisis de supuestos respaldan la validez de los resultados y proporcionan información adicional sobre la distribución de la concentración de polifenoles en el estudio.



## 7.3 Caracterización

### 7.3.1 Cualitativo

#### 7.3.1.1 Perfil fitoquímico preliminar

El análisis del perfil fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de la *Decatropis b. L.* determina la presencia de diversos compuestos bioactivos:

- **Alcaloides:** Se ha constatado la presencia de alcaloides en la muestra a través de dos pruebas, la prueba de *Dragendorff* y la prueba de *Hager*. Este hallazgo encuentra respaldo en la investigación de Dominguez Xorge A. (1970) donde se reportó la presencia de eskimianina y dictamina en el extracto metanólico de *D. bicolor L.* Estos alcaloides han sido previamente asociados con diversas propiedades biológicas, incluyendo actividades antiinflamatorias, analgésicas y antimicrobianas (Domínguez, 1988).
- **Lactonas sesquiterpénicas:** Se identificaron en la muestra a través de la prueba de *Baljet*, ya que las lactonas sesquiterpénicas tienen anillos insaturados que reaccionan con ácido pícrico e hidróxido de sodio, lo que resultó en una coloración anaranjada o roja oscura.
- **Fitoesteroles:** Se evidenció la presencia de fitoesteroles en la muestra mediante la Prueba de Lieberman. Este resultado encuentra respaldo en la investigación llevada a cabo por Cárdenas y su equipo en 2005, donde se identificó inequívocamente la presencia de diversos fitoesteroles en la *Decatropis bicolor L.*, entre los que se encuentran el beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol (Cárdenas, Gutiérrez, & Miguel, 2005).
- **Quinonas:** En un estudio publicado en 1970, Domínguez et al. identificaron la presencia de varias quinonas en *D. bicolor L.* En esta investigación se detectaron quinonas en la muestra utilizando la Prueba de *Börtrager*.
- **Flavonoides y terpenoides:** Las Pruebas de *Shinoda* en fase acuosa y orgánica indicaron la presencia de flavonoides y terpenoides, respectivamente. Esto lo confirma Guzmán, (2021) que identificó la presencia de la rutina, un glucósido flavonoide de tipo polifenólico.





Compuestos No Detectados:


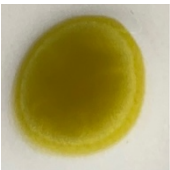





**Saponinas y carbohidratos reductores:** Las pruebas de saponinas demostró resultados negativos.

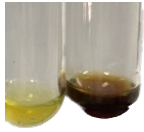
En resumen, los resultados del perfil fitoquímico preliminar sugieren que la muestra contiene una amplia variedad de compuestos bioactivos con potencial para diversas aplicaciones biológicas.

Los resultados en la siguiente tabla se expresan como ligeramente positivo (+), medianamente positivo (++) , positivo (+++), o negativo (-) para cada prueba.

Tabla 8 Resultados del perfil fitoquímico preliminar.

<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>	<i>imagen</i>
<b>Baljet</b>	+++ Lactonas sesquiterpénicas	
<b>Shinoda</b>	++	
<b>Saponinas</b>	-	No hay formación de espuma
<b>Cloruro Férrico</b>	+	
<b>Fehling</b>	++	

<b>Dragendorff</b>	+++ Alcaloides (Opalencia, precipitado marrón)	
<b>Hager</b>	+ Formación de cristales	
<b>Shinoda Fase acuosa</b>	+++	
<b>Shinoda Fase orgánica</b>	++	
<b>Baljet F.O</b>	-	
<b>Börtrager F. O</b>	-	
<b>Lieberman</b>	++ Coloración verde - fitoesteroles	

<b>Börtrager residuo</b>	+ Rosado/rojo Quinonas	
--------------------------	------------------------------	---

### 7.3.2 Cuantitativo

#### 7.3.2.1 Cuantificación Polifenoles

Una vez seleccionada la mejor condición de extracción, que consistió en la mezcla de disolventes 80:20 (etanol-agua) con un tiempo de extracción de 30 minutos, se procedió a cuantificar los fenoles totales en 0.1g de la muestra seca y disuelta en 20 mL de agua (Tabla 9). Esto se realizó mediante la construcción de una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar en un rango de 25-150 mg/ $\mu$ L. La ecuación resultante fue  $y=0.0892x-0.0293$ , y demostró una alta correlación entre las concentraciones de ácido gálico y las respuestas obtenidas, como se refleja en el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 1 (Fig. 22). La representación de los datos se realizó en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 0.1 gramos de extracto (mgAG/0.1g). Este enfoque cuantitativo garantizó la precisión y la reproducibilidad en la determinación de los fenoles totales en las muestras analizadas.

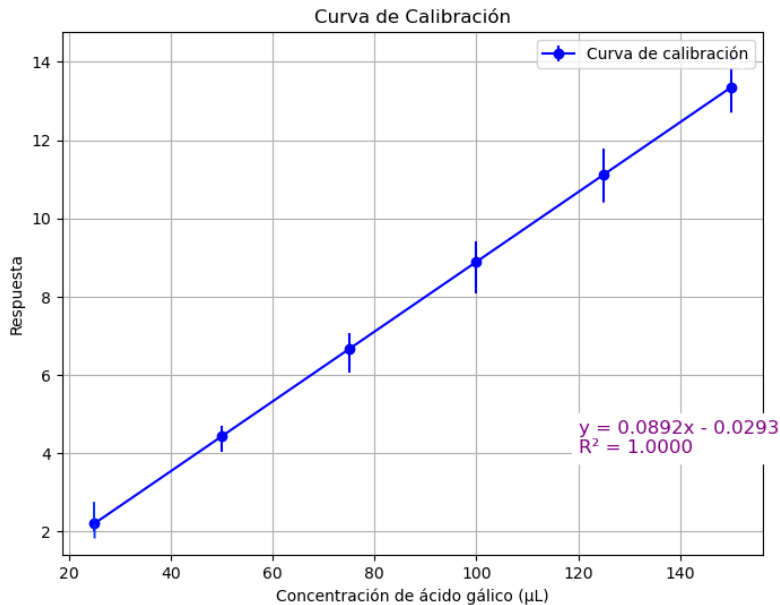


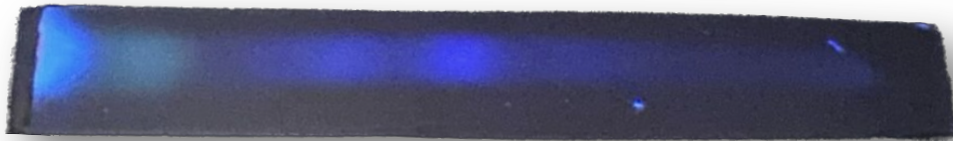
Figura 22 Curva de calibración de ácido gálico.

Tabla 9 Concentraciones de fenoles totales en la mejor condición (mg/mL).

No. De experimento	1	2	3	Promedio	SD
Concentración	0.547	0.572	0.566	0.561	0.0659

#### 7.4 Técnicas de separación cromatográficas

La elección de una mezcla de solventes en cromatografía en placa de sílice gel 60 se basó en la comprensión de la polaridad de los compuestos presentes en la muestra y en la interacción deseada entre estos compuestos y el solvente. En el caso de la mezcla de cloroformo y ácido acético en una proporción de 50:50, esta elección se justifica por varios factores fundamentales. Primero, la polaridad de los solventes es un factor crítico en cromatografía, ya que influye en la capacidad de los compuestos para moverse a través de la fase estacionaria y, por lo tanto, afecta la separación (Coskun, 2016). El cloroformo es un solvente no polar, mientras que el ácido acético es polar debido a la presencia de grupos funcionales como el grupo carboxilo (-COOH). Al mezclarlos en una proporción equilibrada, se crea un solvente con una polaridad intermedia que puede interactuar selectivamente con una amplia variedad de compuestos en la muestra, facilitando su separación en la cromatografía. Además, durante el proceso de selección del solvente, se probaron otras combinaciones que no se eligieron, como acetato etílico-etanol, metanol-cloroformo, ácido fórmico-H<sub>2</sub>O-etil acetato y acetato de etilo-H<sub>2</sub>O-ácido acético, debido a que podrían no haber proporcionado la polaridad adecuada para una separación eficiente de los componentes en cuestión. La elección de la mezcla de cloroformo y ácido acético se basó en el hecho de que esta combinación logró la mejor separación en comparación con las demás combinaciones probadas (Fig. 23).



*Figura 23 Separación del extracto hidroalcohólico mediante cromatografía en placa de sílice con mezcla de cloroformo-ácido acético 50:50. visualización bajo luz UV*

En cuanto a la cromatografía en columna (Fig.24), una vez que se alcanzó la saturación, se procedió a eluir las fracciones, recogiendo un volumen de 5 mL cada 4 minutos, este intervalo facilitó la identificación de fracciones con marcas en la misma ubicación, lo que es esencial para agrupar y consolidar las fracciones que comparten componentes similares. Posteriormente, cada fracción obtenida fue sometida a cromatografía en placa. Aquellas que exhibieron una marca en la misma ubicación fueron agrupadas, consolidando así las fracciones que compartían componentes similares. De esta manera, se logró obtener un total de 10 fracciones, asegurando una separación eficiente. Después de completar la separación, se procedió a cuantificar los fenoles totales en cada fracción, los valores resultantes se presentan en la Tabla 10.



*Figura 24 Cromatografía en columna (sílica gel 60) del extracto hidroalcohólico de *D. bicolor* L. usando como fase móvil cloroformo-ácido acético 50:50.*

Tabla 10. Concentraciones de fenoles totales en fracciones (mg/mL)

Fracción	Concentraciones mg/mL
1	0.087
2	0.163
3	0.638
4	0.057
5	0.438
6	0.625
7	0.636
8	0.464
9	0.244
10	0.173

Una vez que se identificadas las 10 fracciones, se procedió a realizar una cromatografía en placa utilizando la mezcla de solventes previamente seleccionada (Fig. 25).

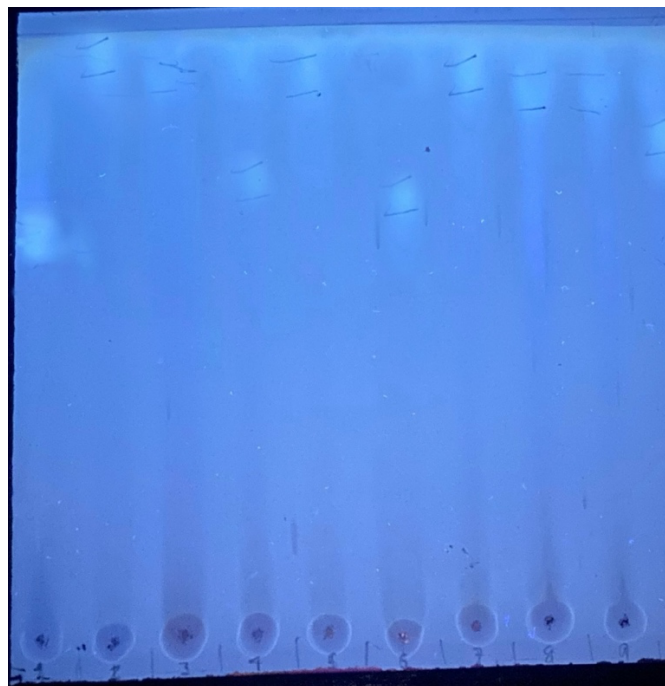


Figura 25 Cromatografía en placa de las 10 fracciones

## 7.5 Evaluación del efecto antiproliferativo

### 7.5.1 Extracto completo

Los resultados preliminares de los ensayos de viabilidad utilizando el extracto hidroalcohólico completo seco disuelto en agua abarcaron un amplio rango de concentraciones en él, desde 1 hasta 1000  $\mu\text{g/mL}$ . En estos ensayos, se destacó que, a la máxima concentración evaluada (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), se registró una viabilidad del 10%. Por otro lado, en el intervalo de concentraciones más bajo, que abarcó desde 1 hasta 30  $\mu\text{g/mL}$ , no se observó algún efecto destacable (Fig. 26).

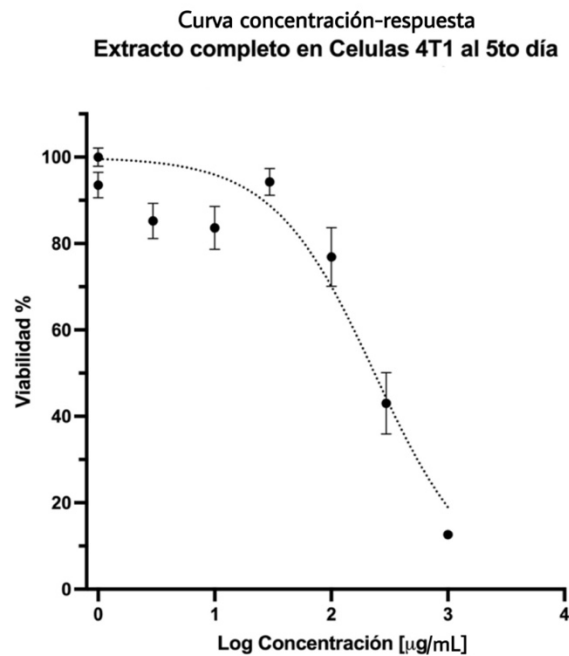


Figura 26. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT del extracto completo en células 4T1 al 5to día, por duplicado

Con base en estas observaciones, se tomó la decisión de restringir el rango de concentraciones de interés a un intervalo más específico, comprendido entre 50 y 350  $\mu\text{g/mL}$ . Esta selección se fundamentó en el punto donde comenzó a manifestarse un efecto en la viabilidad celular, lo cual permitiría un análisis más enfocado y detallado de los resultados.

Una vez establecido el nuevo intervalo de concentraciones, se llevaron a cabo las pruebas preliminares de estimulación utilizando el extracto completo disuelto en agua, en concentraciones



que oscilaron entre 50 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . Estos ensayos se realizaron a tres intervalos de tiempo distintos: 1, 3 y 5 días después de la estimulación celular.

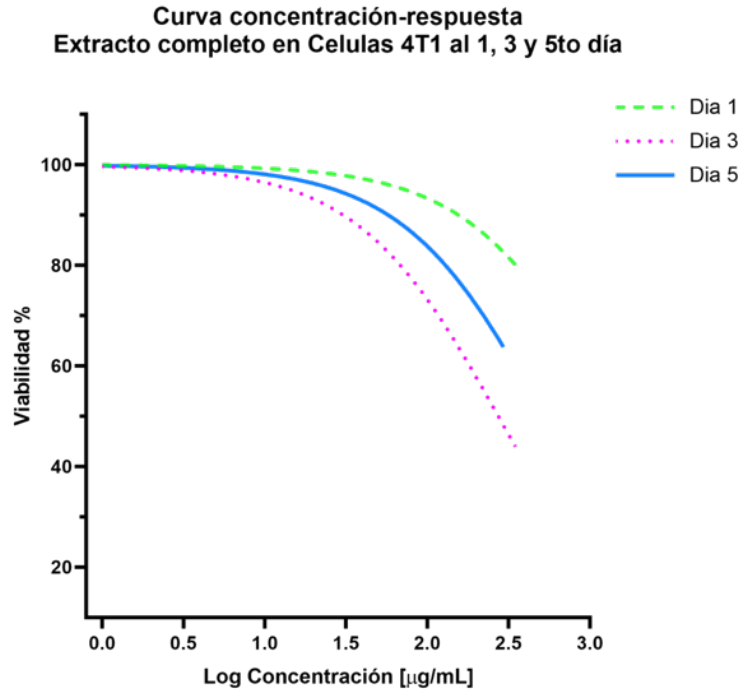
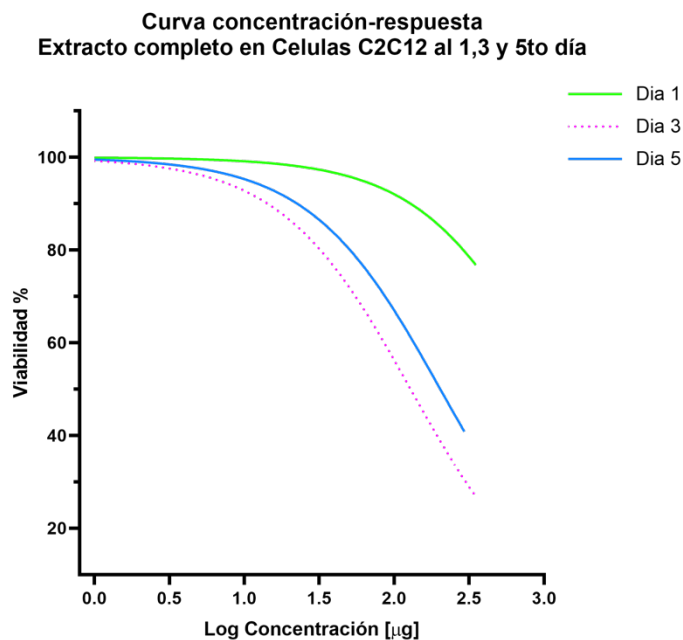


Figura 27. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al 1, 3 y 5to día del extracto completo en células 4T1

Los resultados observados en la figura 27 revelan que, en el caso de las células 4T1, al tercer día de estimulación, se logra una viabilidad celular del 50% en la concentración más alta del extracto, en comparación con el primer día, donde la viabilidad apenas alcanza el 80%.



*Figura 28. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al 1, 3 y 5to día del extracto completo en células C2C12*

Por otro lado, en las células no tumorales C2C12, se observa una viabilidad del 30% en la concentración más alta al tercer día, en contraste con el primer día, donde se registra un porcentaje de viabilidad del 80% (Figura 28). Estos hallazgos sugieren una respuesta diferencial en la viabilidad celular en función de la concentración y el tiempo de estimulación.

De acuerdo con la capacidad del extracto total en obtener un efecto de más del 50 % en la viabilidad al tercer día se decidió establecer como límite para los ensayos futuros de las fracciones.

### 7.6.2 Fracciones del extracto hidroalcohólico

Cada una de las 10 fracciones fue evaluada en ambas líneas celulares en un rango de concentraciones de 50-350  $\mu\text{g/mL}$ , y su viabilidad se analizó mediante el ensayo MTT después de 3 días de estimulación. En la figura 29, se observa una representación de la curva concentración-respuesta, donde el logaritmo de la concentración en microgramos se relaciona con la viabilidad en porcentaje en células 4T1.

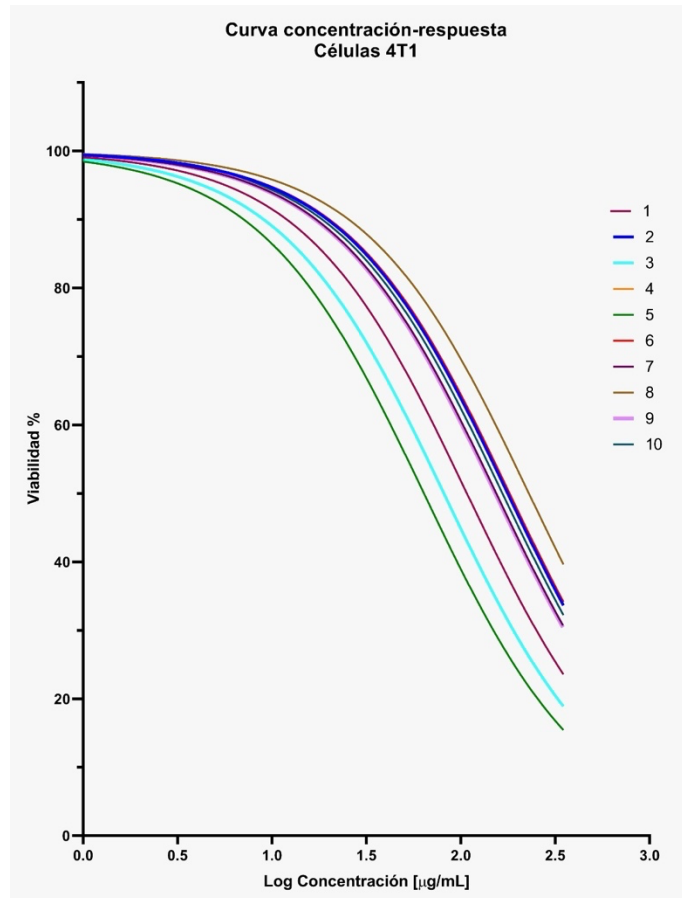


Figura 29. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día para las 10 fracciones en células 4T1

Los resultados revelaron que la fracción 3 (en color cian) y la 5 (color verde) mostraron el menor porcentaje de viabilidad en las células tumorales, alrededor del 10%, en la concentración máxima probada. Le siguieron las fracciones 1, 9 y 2, con porcentajes de viabilidad en el rango de 20-30%. Por otro lado, las fracciones 8 y 4 exhibieron una menor actividad antiproliferativa, con porcentajes de viabilidad del 80% y 60%, respectivamente.

También se comparó el efecto en las células no tumorales C2C12 (figura 30) donde se observó que las fracciones 2 y 4 tenían un mayor porcentaje de viabilidad, alrededor del 50%. La fracción 2 (azul) destacó, ya que presenta un buen efecto antiproliferativo en las células tumorales y no afectó significativamente a las no tumorales. Otra fracción con un buen porcentaje de viabilidad fue la fracción 9, que se mantuvo en un 40%. Sin embargo, la fracción 3, que tuvo el mejor rendimiento en 4T1, pareció afectar a las células C2C12 de la misma manera, reduciendo su viabilidad al 20%.

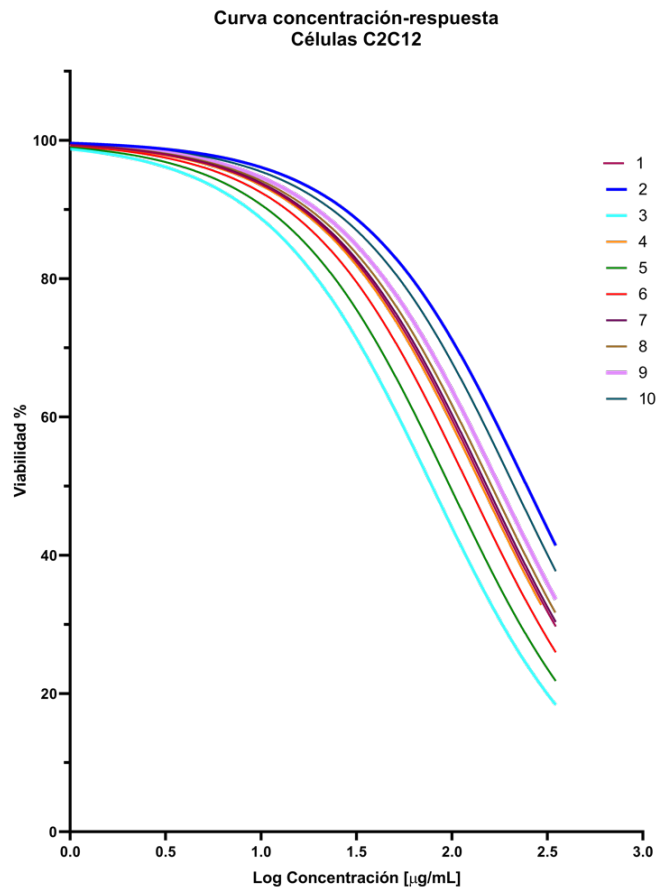


Figura 30. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día para las 10 fracciones en células C2C12

Siguiendo este análisis, se evaluaron por separado las fracciones con un mejor comportamiento, representando ambas líneas celulares en una curva concentración-respuesta. De esta manera, se analizó el efecto antiproliferativo en las células 4T1 y el posible efecto citotóxico en las C2C12.

En la figura 31, se compara el efecto de la fracción 2, donde observamos que, en la concentración más alta, la viabilidad de las células 4T1 se reduce al 20%, mientras que en las células C2C12 la viabilidad es del 40%. Esto indica que la fracción 2 muestra un comportamiento "ideal", ya que ejerce un efecto más pronunciado en las células tumorales que en las células no tumorales.

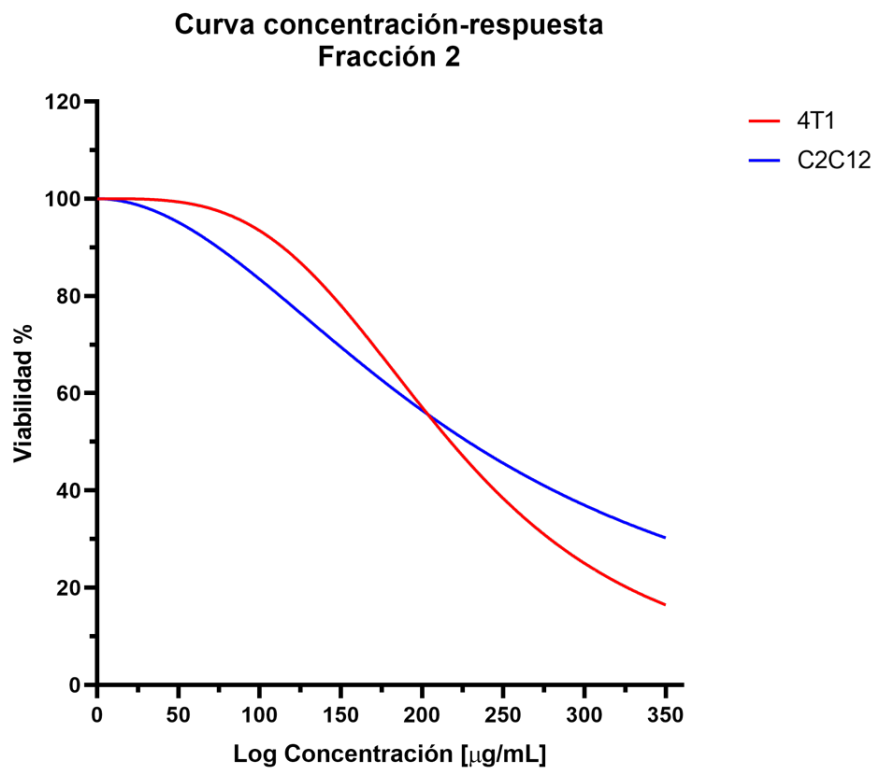


Figura 31. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día de la fracción 2 en células 4T1 y C2C12

La figura 32 muestra los resultados de la fracción 9, donde, en las células 4T1, la viabilidad se reduce significativamente al 20% en la concentración más alta. Esto sugiere que la fracción 9 tiene un efecto inhibitor en la proliferación de las células tumorales 4T1. En cambio, en las células C2C12, se observa un comportamiento interesante. La viabilidad se mantiene al menos un 10% por encima de las 4T1 hasta la última concentración, donde se estabiliza en un 30%. Esto podría indicar que la fracción 9 tiene un efecto menos pronunciado en las células no tumorales C2C12 en comparación con las células tumorales 4T1.

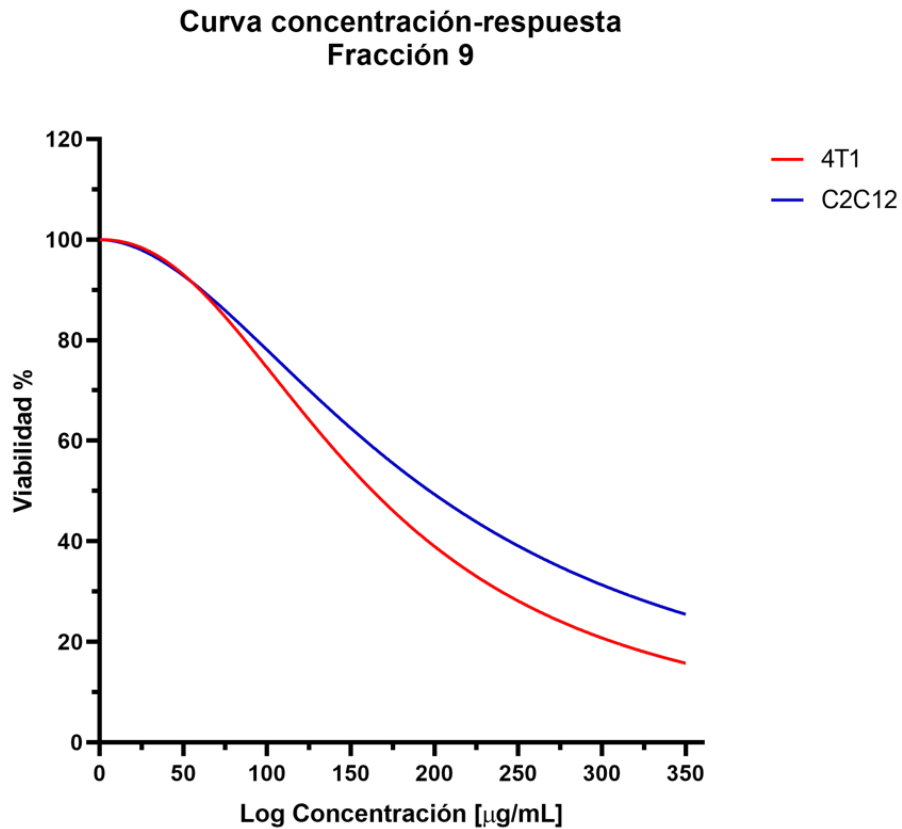


Figura 32. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día de la fracción 9 en células 4T1 y C2C12

Finalmente, en la figura 33, observamos el comportamiento de la fracción 3, que muestra una similitud notable entre ambas líneas celulares, ambas alcanzando un 10% de viabilidad.

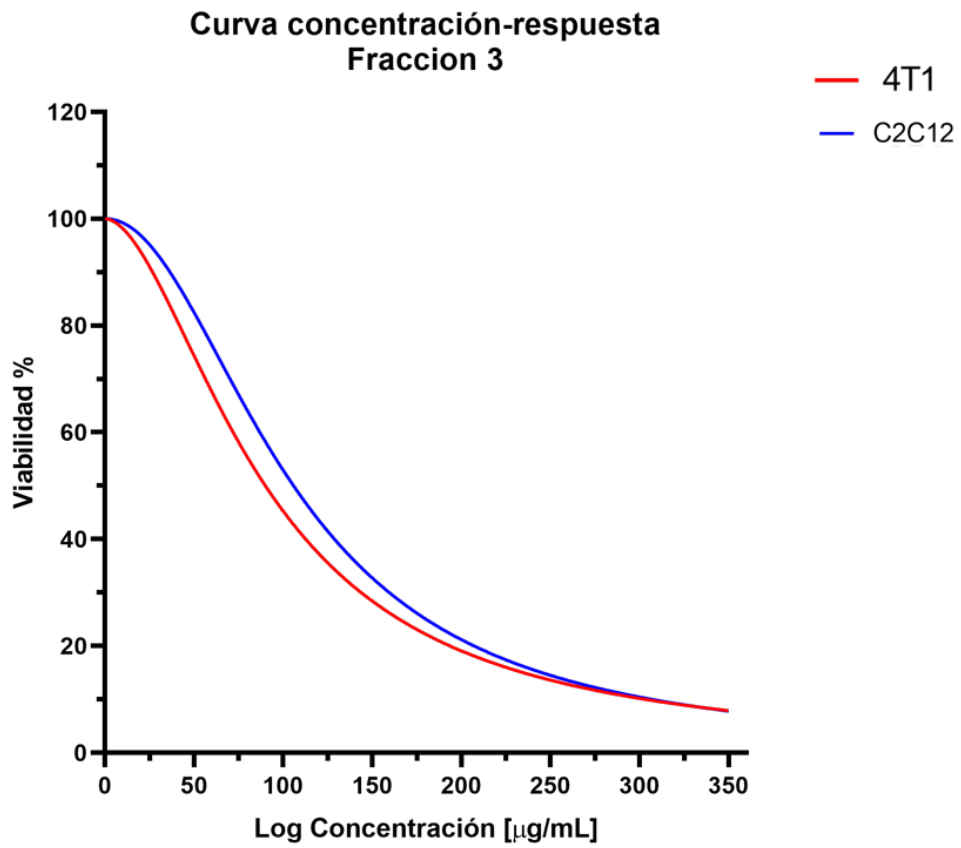


Figura 33. Curva concentración-respuesta del ensayo MTT al tercer día de la fracción 3 en células 4T1 y C2C12

### 7.5.3 Análisis de los valores IC<sub>50</sub>

Los valores IC<sub>50</sub> proporcionan información crucial sobre la concentración necesaria para inhibir el crecimiento celular. En este análisis, se comparan los IC<sub>50</sub> valores de las fracciones 2, 9 y 3 en las líneas celulares 4T1 y C2C12.

Tabla 11. Comparación de IC<sub>50</sub> de las fracciones 2, 3 y 9.

		4T1	C2C12
<b>Fracción 2</b>	IC <sub>50</sub>	240 µg/mL	147 µg/mL
<b>Fracción 9</b>	IC <sub>50</sub>	121.8 µg/mL	177.2 µg/mL
<b>Fracción 3</b>	IC <sub>50</sub>	62.6 µg/mL	78.71 µg/mL

La fracción 2 exhibe un IC<sub>50</sub> más alto en 4T1 (240 µg/mL) en comparación con las células C2C12 (147 µg/mL). Un IC<sub>50</sub> más alto en las células 4T1 sugiere que se necesita una concentración mayor de esta fracción para inhibir el crecimiento de células tumorales. Sin embargo, un IC<sub>50</sub> más bajo en las células C2C12 indica una mayor eficacia selectiva contra las células no tumorales.

La fracción 9 presenta un IC<sub>50</sub> más bajo en 4T1 (121.8 µg/mL) en comparación con las células C2C12 (177.2 µg/mL). Este resultado sugiere que la fracción 9 tiene un efecto más potente en las células 4T1, lo que es beneficioso para su aplicabilidad en el tratamiento de células tumorales. Sin embargo, se requiere una evaluación más profunda para comprender la diferencia de respuesta entre las dos líneas celulares.

En el caso de la fracción 3, se observa un IC<sub>50</sub> más bajo en 4T1 (62.6 µg/mL) y un valor ligeramente más alto en C2C12 (78.71 µg/mL). Estos valores indican una potente capacidad de inhibición del crecimiento en ambas líneas celulares, lo que destaca su promisorio potencial. Sin embargo, se requieren análisis adicionales para establecer su eficacia.

En un análisis comparativo con los resultados de Estanislao Gómez, (2016) en células MDA-MB-231, donde se observó un IC<sub>50</sub> de 128.20 µg/mL para extractos etanólicos, es evidente que las



fracciones 2 y 9 destacan por su mayor eficacia en las líneas celulares 4T1 y C2C12. Esto plantea la posibilidad de que estas fracciones sean particularmente específicas en su efecto citotóxico.

De manera interesante, la fracción 3 exhibe valores de  $IC_{50}$  significativamente bajos en ambas líneas celulares, lo que sugiere un potente impacto en la inhibición del crecimiento celular. En especial, los valores  $IC_{50}$  más bajos en las células 4T1 indican una considerable potencia en su capacidad de frenar el crecimiento celular.

Es fundamental tener en cuenta que la variabilidad en los valores  $IC_{50}$  podría deberse a diferencias en las líneas celulares empleadas y las condiciones de prueba como lo son la sensibilidad y la precisión de las técnicas analíticas utilizadas para medir la respuesta celular o determinar las concentraciones de compuestos. No obstante, estos resultados se presentan como prometedores y generan un horizonte de posibilidades para futuras investigaciones. La evaluación más profunda de estas fracciones podría revelar su sólido potencial en el tratamiento del cáncer de mama, proporcionando una vía para abordar eficazmente esta enfermedad.

## 7.6 Caracterización por HPLC de las fracciones con mayor efecto antiproliferativo.

Después de realizar el ensayo de viabilidad celular, se optó por identificar, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), las fracciones que presentaron el comportamiento más prometedor. Siguiendo el método previamente mencionado, la molécula con mayor similitud identificada se introdujo en CFM.ID para asignar picos espectrales asegurando una verificación rigurosa de los compuestos químicos detectados en el análisis. Las tablas de comparación entre los iones  $m/z$  e intensidades están adjuntas en los anexos, y a continuación se presentan los resultados obtenidos:

- **Fracción 2**

Figura 34. Cromatograma de la fracción 2 con picos enumerados según su tiempo de retención.

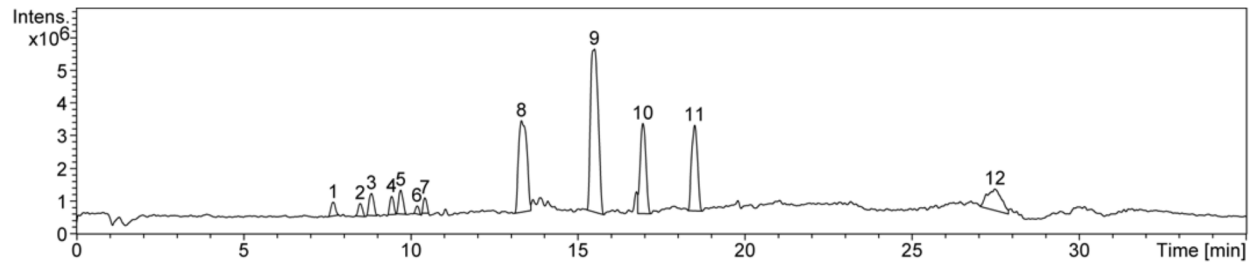
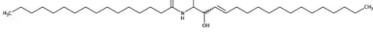
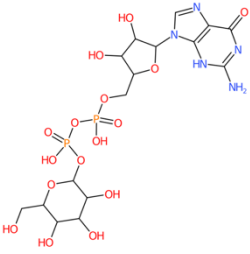
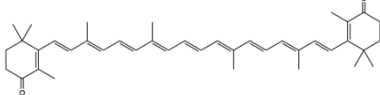
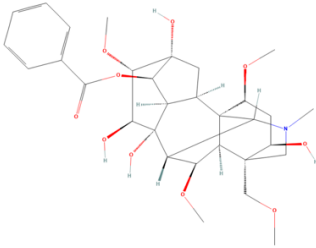
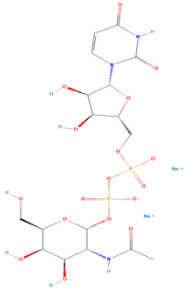
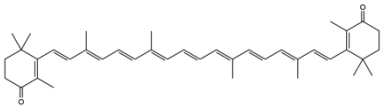
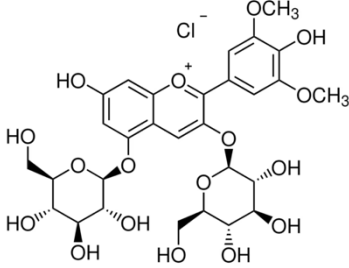
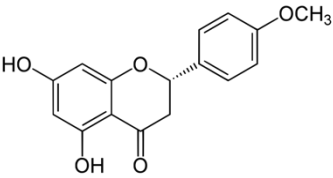
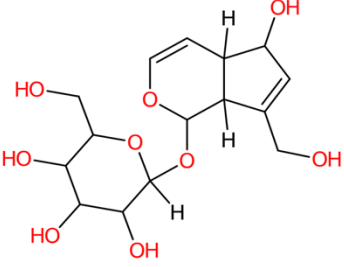
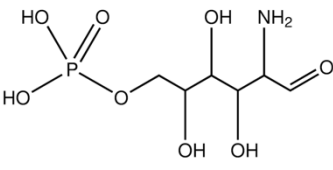
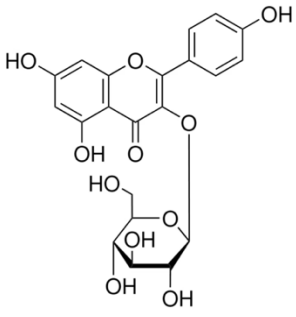
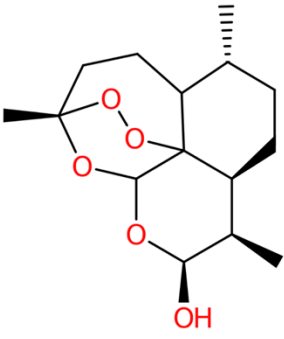


Tabla 12. Moléculas asociadas con cada pico en el cromatograma de la fracción 2.

<p>1.</p>  <p>Estructura de Palmitoil-D-eritro- esfingosina (ceramida)</p>	<p>2.</p>  <p>Estructura de guanosina-5'- difosfoglucosa e (producto del metabolismo primario)</p>	<p>3.</p>  <p>Estructura de Cantaxantina (terpeno)</p>
---	---	---

<p>4.</p>  <p>Estructura de Benzoilmesaconina (alcaloide)</p>	<p>5.</p>  <p>Estructura de uridina-5'-difosfo-N-acetilgalactosamina (sustrato)</p>	<p>6.</p>  <p>Estructura de Cantaxantina</p>
<p>7.</p>  <p>Estructura de Cloruro de malvina (antocianina)</p>	<p>8.</p>  <p>Estructura de Isosakuranetina (Flavonoide)</p>	<p>9.</p>  <p>Estructura de Acubina (glucósido iridoide)</p>
<p>10.</p>  <p>Estructura de glucosamina-6-fosfato (metabolito)</p>	<p>11.</p>  <p>Estructura de Kaempferol-3-glucósido (Flavonoide)</p>	<p>12.</p>  <p>Estructura de Dihidroartemisina (compuesto sesquiterpenoide)</p>

La fracción 2 del extracto hidroalcohólico revela una diversidad de compuestos que abarcan lípidos, antioxidantes, alcaloides y flavonoides. Al examinar los resultados del análisis fitoquímico, se destaca la coincidencia en la presencia de alcaloides, sesquiterpenoides y flavonoides, como se detalla en la tabla 12. Estos hallazgos ofrecen un respaldo sólido a la presencia de estos componentes en la fracción 2 y su potencial relevancia en las propiedades bioactivas analizadas que, en conjunto, podrían estar desencadenando el efecto antiproliferativo observado en las células tumorales 4T1.

Con respecto a los lípidos presentes, cabe destacar un hallazgo relevante. Las ceramidas, en particular, emergen como elementos clave en la señalización y la proliferación celular. Según lo reportado, las ceramidas han sido vinculadas a la regulación de estos procesos (A Haimovitz-Friedman, 1997). Asimismo, al explorar los antioxidantes presentes en esta fracción, la cantaxantina y las antocianinas se perfilan como componentes de alta importancia, ya que, según la literatura, estos antioxidantes desempeñan un papel crucial al proteger a las células de los efectos perjudiciales del estrés oxidativo, un factor crítico en la supervivencia y proliferación celular (M G Hertog, 1993).

Un componente de particular interés en esta fracción es la benzoilmesaconina (BMA) (Tabla 12), un alcaloide que se ha asociado con actividades biológicas y que se considera un agente terapéutico potencial para enfermedades relacionadas con la inflamación. En investigaciones previas, se ha demostrado que el efecto antiinflamatorio de la BMA se debe a la supresión de las vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK (Changkai Zhou 1, 2022).

La relevancia de la fracción 2 se amplía al contemplar la presencia de la dihidroartemisinina (DHA), un compuesto con efectos anticancerígenos documentados en varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de mama, pulmón, próstata, ovario y sistema digestivo. La DHA exhibe múltiples propiedades antiproliferativas, como la inhibición de la proliferación celular, la inducción de apoptosis y la supresión de la metástasis y la angiogénesis tumoral. Además, estimula la función inmunológica y desencadena procesos como la autofagia y el estrés en el retículo endoplasmático (Xiaoshuo Dai, 2021).

Además, los flavonoides, representados por el kaemperferol-3-glucósido (Tabla 12) también conocido como astragalina, han demostrado su impacto en la regulación del movimiento celular, la migración y la angiogénesis. Estos efectos se respaldan en un análisis farmacológico

computacional y se confirman mediante experimentos *in vitro* que corroboran la actividad antimetastásica y antiangiogénica (Shasha Tian, 2022).

En consecuencia, la conjunción de estos compuestos en la fracción 2 podría estar generando un efecto múltiple que resulta en una mayor reducción de la viabilidad en las células tumorales en comparación con las células no tumorales como se observa a continuación en la Figura 31, respaldando la hipótesis de un potencial efecto antiproliferativo en células tumorales.

- **Fracción 9**

Figura 35 Cromatograma de la fracción 9 con picos enumerados según su tiempo de retención.

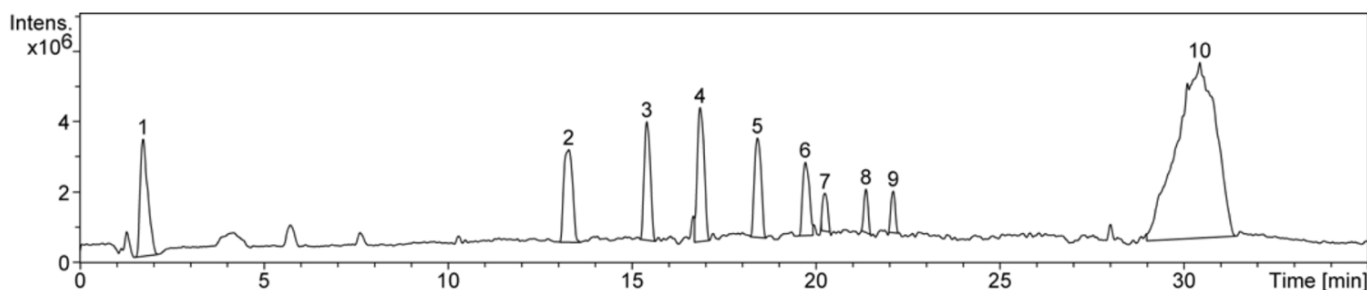
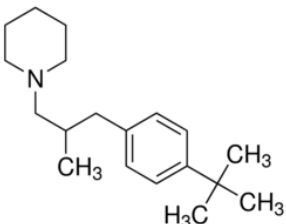
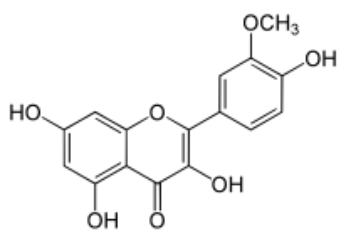
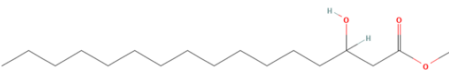
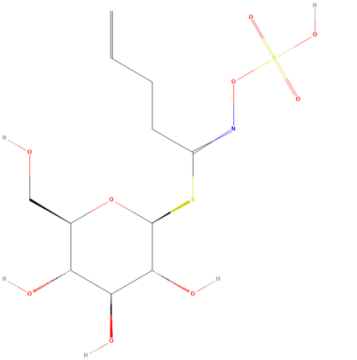
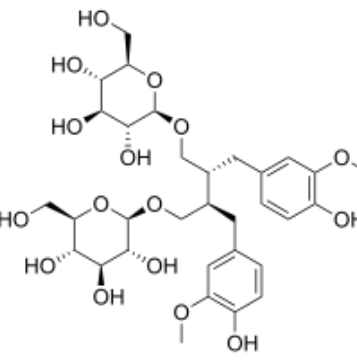
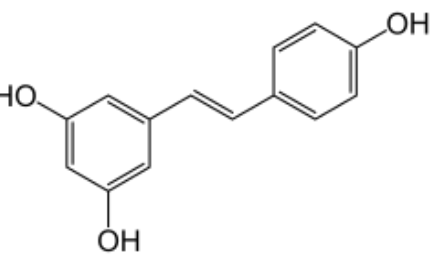
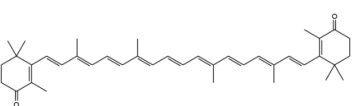
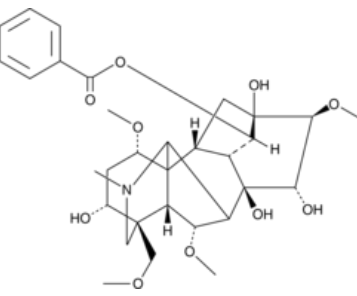
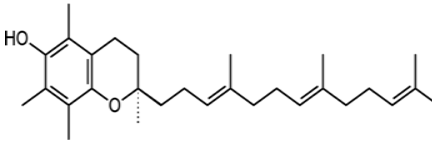


Tabla 13 . Moléculas asociadas con cada pico en el cromatograma de la fracción 9.

<p style="text-align: center;">1.</p>  <p style="text-align: center;">Estructura de Fenpropidina (Fungicida)</p>	<p style="text-align: center;">2.</p>  <p style="text-align: center;">Estructura de Isoharmentina (flavonoide)</p>	<p style="text-align: center;">3.</p>  <p style="text-align: center;">Estructura de Metil 3- Acetoxihexadecanoato (Éster metílico de ácidos grasos.)</p>
---	---	--

<p>4.</p>  <p>Estructura de Glucosinato de butenilo (alquil-glucosinato)</p>	<p>5.</p>  <p>Estructura de Diglucósido de seco-isolariresinol (lignano)</p>	<p>6.</p>  <p>Estructura de Resveratrol (Polifenol)</p>
<p>7.</p>  <p>Estructura de cantaxantina</p>	<p>8 y 9.</p>  <p>Estructura de Benzoilmesaconina (Alcaloide)</p>	<p>10.</p>  <p>Estructura de Alpha-tocotrienol (Isómero de vitamina E)</p>

El análisis de resultados de la fracción 9 del extracto hidroalcohólico, que contiene una variedad de compuestos, incluyendo ésteres metílicos de ácidos grasos, alquil-glucosinolatos, lignanos, polifenoles, flavonoides y alcaloides, estos últimos tres revelan una interesante coincidencia con los hallazgos del perfil fitoquímico preliminar (Tabla 8). Esta concordancia proporciona valiosa

información sobre la presencia de estos componentes en la fracción 9 y su posible influencia en las células tumorales y no tumorales.

Los resultados indican que la fracción 9 tiene un comportamiento *in vitro* particular observado en la figura 32 en la siguiente sección, donde en las células 4T1, la viabilidad se reduce significativamente al 20% en la concentración más alta; en cambio en las células C2C12 la viabilidad se mantiene al menos un 10% por encima de las 4T1 hasta la última concentración donde se mantienen en un 25%. Esto podría indicar que la fracción 9 tiene un efecto menos pronunciado en las células no tumorales C2C12 en comparación con las células tumorales 4T1.

Para comprender cómo esta fracción ejerce este efecto en las células, es necesario considerar la naturaleza de los compuestos presentes en la fracción 9. Por ejemplo, el resveratrol (Tabla 13), conocido por su eficacia en distintos subtipos de cáncer de mama, suprime el crecimiento de células 4T1 de manera dependiente de la dosis y el tiempo. El resveratrol ha demostrado en estudios *in vitro*, potencial quimiopreventivo y quimioterapéutico al influir en múltiples vías de señalización celular que provocan la detención del ciclo celular, la supresión de la proliferación celular, la inducción de la apoptosis y la diferenciación, además de reducir la inflamación y la adhesión e invasión de células tumorales (Dona Sinha a, 2016).

Por otro lado, los flavonoides, como la isorhamnetina (IH) (Tabla 13), también contribuyen al efecto de la fracción 9. La IH ha demostrado una variedad de actividades antitumorales, como la inhibición de la migración, la proliferación celular y la inducción de la apoptosis a través de diversas vías de señalización. Además, se ha constatado que la IH induce la autofagia en células de cáncer de mama humano y su efectividad se ve potenciada por la cloroquina en células de cáncer de mama triple negativo (Jinjiao Hu, 2019) .

Adicionalmente, se encuentran presentes los tocotrienoles, miembros de la familia de la vitamina E, estos han demostrado potentes efectos antiproliferativos y apoptóticos en asociación con la fragmentación del ADN, en células MDA-MB-231 triple negativas y células MCF-7 dependientes de estrógenos (R Loganathan 1, 2013).

El comportamiento observado, donde la viabilidad de las células no tumorales C2C12 es relativamente mayor en comparación con las células tumorales 4T1, sugiere un efecto potencialmente en células cancerosas de la fracción 9, esto atribuido a sus componentes.

• **Fracción 3**

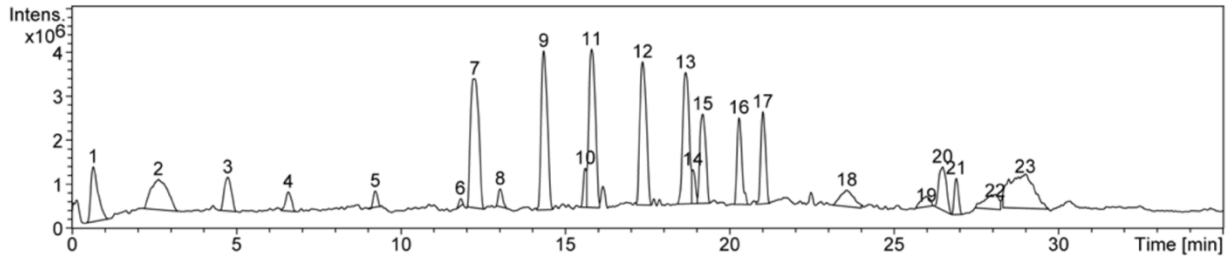
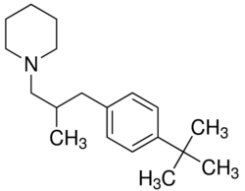
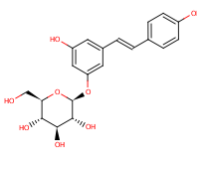
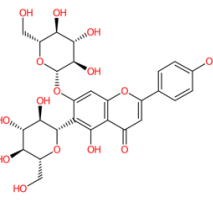
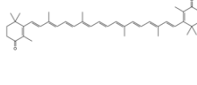
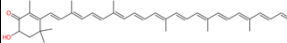
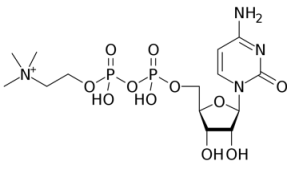
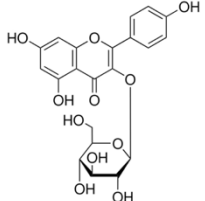
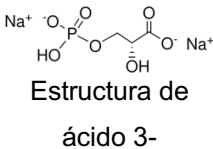
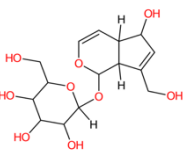
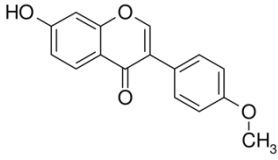
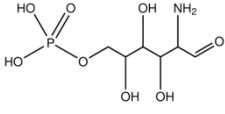
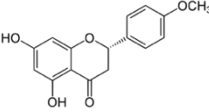
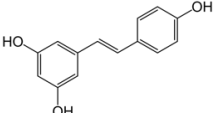
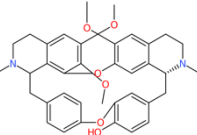
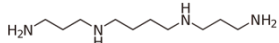
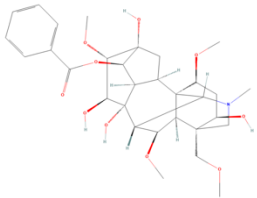
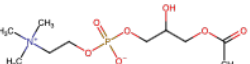
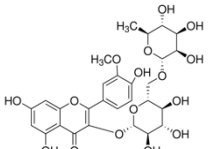
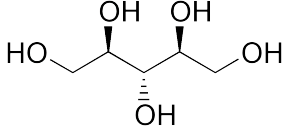
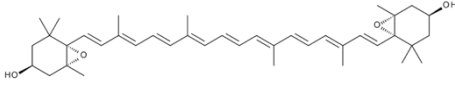
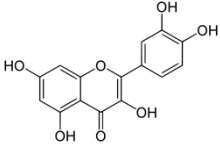
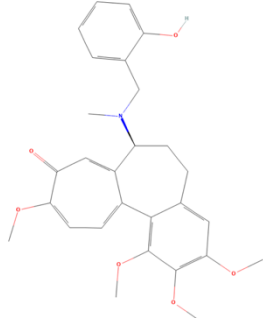


Figura 36 Cromatograma de la fracción 3 con picos enumerados según su tiempo de retención.

Tabla 14. Moléculas asociadas con cada pico en el cromatograma de la fracción 3.

<p>1.</p>  <p>Estructura de Fenpropidina</p>	<p>2.</p>  <p>Estructura de Resveratrol glicosilado (Glucósido estilbenoide)</p>	<p>3.</p>  <p>Estructura de Saponarina (glucósido de flavona)</p>	<p>4.</p>  <p>Estructura de Cantaxantina</p>	<p>5.</p>  <p>Estructura de 3-Hidroxi-4-cetoyotuleno (Carotenoide)</p>
<p>6.</p>  <p>Estructura de Citidina 5'-difosfo-colina (nucleotido)</p>	<p>7.</p>  <p>Estructura Kaempferol-3-glucósido</p>	<p>8.</p>  <p>Estructura de ácido 3-fosfoglicérico (intermediario de glucolisis)</p>	<p>9.</p>  <p>Estructura de Acubina</p>	<p>10.</p>  <p>Estructura de Formononetina (isoflavona)</p>



<p>11.</p>  <p>Estructura de glucosamina-6-fosfato</p>	<p>12.</p>  <p>Estructura de Isosakuranetina</p>	<p>13.</p>  <p>Estructura de Resveratrol (estilbeno)</p>	<p>14.</p>  <p>Estructura de Oxycanthine (alcaloide)</p>	<p>15.</p>  <p>Estructura de Spermine (poliamina)</p>
<p>16 y 17.</p>  <p>Estructura de Benzoilmesaconina (alcaloide)</p>	<p>18.</p>  <p>Estructura de Lisofosfatidilcolina (fosfolípido)</p>	<p>19.</p>  <p>Estructura de Narcisósido (flavonoide)</p>	<p>20.</p>  <p>Estructura de Ribitol (polialcohol)</p>	
<p>21.</p>  <p>Estructura de Violaxantina (Carotenoide)</p>	<p>22.</p>  <p>Estructura de Quercetina (Flavonoide)</p>	<p>23.</p>  <p>Estructura de Speciosina (alcaloide)</p>		

El análisis de resultados de la fracción 3 del extracto hidroalcohólico, que contiene una diversidad de compuestos, muchos de los cuales tienen su presencia respaldada en los hallazgos del perfil fitoquímico preliminar (ver Tabla 8). Entre estos compuestos se incluyen glucósidos estilbenoides, glicósidos de flavona, ceto-carotenoides, carotenoides, flavonoides, metabolitos, alcaloides, poliaminas, polifenoles, fosfolípidos, polialcoholes y otros, revela un comportamiento celular interesante. Esta fracción muestra una similitud notable en su efecto entre ambas líneas celulares, es decir, tanto en las células tumorales 4T1 como en las células no tumorales C2C12, ambas alcanzan un nivel de viabilidad del 10% (Fig. 33).

Para entender esta observación, es necesario considerar los componentes presentes en la fracción 3. Por ejemplo, el narcisósido (Tabla 14), evaluado en aplicaciones biológicas, mostró propiedades antioxidantes y actividades citotóxicas contra líneas celulares de leucemia mieloide aguda (Tingting Liu, 2020). Asimismo, varios alcaloides de origen vegetal exhiben efectos citotóxicos en células cancerosas, lo que podría contribuir a la citotoxicidad observada, estos son conocidos por su capacidad para actuar sobre los puntos de control del ciclo celular y provocar la detención del ciclo celular (Zeina Habli, 2017). Además, los carotenoides aparecen con frecuencia en esta fracción, estos antioxidantes tienen el potencial de reducir la inflamación que promueve el crecimiento tumoral, respaldado por datos epidemiológicos y preclínicos que sugieren que los carotenoides protegen contra el cáncer. Un estudio *in vitro* ha demostrado que una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -caroteno es suficiente para reducir la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, además, este estudio observó una reducción en la actividad de la proteína proinflamatoria y de supervivencia, NF- $\kappa\text{B}$  (L. Rowles III a, 2020).

Por otro lado, se sabe que varios polifenoles, como el resveratrol, la quercetina y el kaempferol, tienen propiedades anticancerígenas contra tumores de mama triple negativo (TNBC), interfiriendo con diversas vías de señalización y mediando la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis en células MDA-MB-231. El resveratrol, por ejemplo, inhibe el ribonucleótido reductasa y causa muerte celular no apoptótica en células tratadas. La quercetina reduce la viabilidad celular e induce la apoptosis a través de vías de caspasas intrínsecas y extrínsecas, esto fue acompañado por un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, reducción del potencial de membrana mitocondrial, activación de caspasa 3, 8 y 9, y regulación negativa de

Bcl-2. Además, la quercetina suprime la formación de colonias, la invasión y la migración de células mediante la inhibición de la enzima estromalisina. Por otro lado, el tratamiento con kaempferol suprime la proliferación y provoca la detención del ciclo celular en la fase G2/M, causando daño en el ADN y apoptosis mediada por mitocondrias (Reyhaneh Farghadani, 2023).

Dicho esto, la fracción 3 exhibe un comportamiento menos selectivo en su efecto antiproliferativo, afectando de manera similar a las células tumorales y no tumorales. Aunque su potencial anticancerígeno es evidente, su falta de selectividad en este contexto podría requerir un análisis más detenido y ajustes para optimizar su aplicación terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Finalmente, tras analizar las fracciones 2, 9 y 3 del extracto hidroalcohólico con relación a su efecto en células tumorales 4T1 y células no tumorales C2C12, podemos concluir lo siguiente:

La fracción 2 se destacó al demostrar que, en la concentración más alta, la viabilidad de las células 4T1 se redujo al 20%, mientras que en las células C2C12, la viabilidad se mantuvo en el 40%. Este comportamiento sugiere un efecto inhibitor más pronunciado en las células tumorales que en las no tumorales. Entre los componentes presentes en esta fracción se encuentran lípidos, antioxidantes, alcaloides y flavonoides. Estos compuestos han demostrado propiedades que influyen en la señalización celular, la inducción de apoptosis, la protección contra el estrés oxidativo y la regulación de la proliferación celular. Dicho esto, la fracción 2 presenta un comportamiento antiproliferativo ideal, respaldado por investigaciones previas.

La fracción 9 también ofreció un comportamiento destacado en las células 4T1, donde la viabilidad se encontró en un 20% en la concentración más alta, mientras que en las células C2C12 se mantuvo al menos un 10% por encima de las 4T1 hasta la última concentración, que se estabilizó en un 25%. A pesar de no alcanzar la misma especificidad que la fracción 2, este efecto sugiere un impacto significativo en las células tumorales. Los componentes presentes en esta fracción, como el resveratrol, isorhamnetina (IH) y los tocotrienoles, han sido relacionados con procesos que involucran la proliferación celular, la apoptosis y la regulación de vías de señalización. Por lo tanto, la fracción 9 también ofrece un potencial antiproliferativo, respaldado por la literatura científica.

En cuanto a la fracción 3, su comportamiento *in vitro* mostró una similitud notable entre ambas líneas celulares, ambas alcanzando un 10% de viabilidad. Aunque sugiere propiedades antiproliferativas, carece de la especificidad observada en las fracciones 2 y 9. Los componentes

presentes, como el narcisósido, alcaloides de origen vegetal y carotenoides, han sido relacionados con la regulación del ciclo celular y efectos citotóxicos. Varios polifenoles, como el resveratrol, la quercetina y el kaempferol, han demostrado propiedades anticancerígenas contra tumores de mama triple negativo (TNBC) en investigaciones previas.

Basándonos en el comportamiento observado en las células 4T1 y C2C12, la fracción 2 se posiciona como la más efectiva, seguida por la fracción 9, y finalmente la fracción 3.

## 8. Conclusiones

- Esta investigación respalda de manera concluyente que el extracto hidroalcohólico de *Decatropis bicolor L.* exhibe un efecto antiproliferativo en un modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo, con valores de IC50 de 240 µg/mL, 121.8 µg/mL y 62.6 µg/mL para las fracciones 2, 9 y 3, respectivamente.
- Este diseño de experimentos permitió identificar la mezcla de disolventes 80:20 (etanol-agua) con un tiempo de extracción de 30 minutos como las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles de *Decatropis bicolor L.* Este hallazgo respalda la eficacia de este método de extracción.
- El análisis fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico reveló una amplia variedad de compuestos bioactivos, incluyendo alcaloides, sesquiterpenoides, fitoesteroles, quinonas, flavonoides y terpenoides, los cuales respaldaron el análisis en HPLC/MS.
- La fracción 2 exhibe un comportamiento ideal al reducir la viabilidad de las células 4T1 en un 20%, mientras que en las células C2C12, la viabilidad se mantiene en un 40%. Por otro lado, la fracción 9 demuestra un efecto inhibitorio considerable en las células tumorales 4T1, con una reducción de la viabilidad al 20%. En contraste, se observa un comportamiento interesante en las células no tumorales C2C12, donde la viabilidad permanece al menos un 10% por encima de las 4T1 y se estabiliza en un 25%. Finalmente, la fracción 3 presenta una similitud notable en ambas líneas celulares, manteniendo un 10% de viabilidad en ambas.

## 9. Perspectivas

Este estudio ha proporcionado una base sólida para la investigación adicional en el desarrollo de tratamientos potenciales contra el cáncer de mama. Si bien nuestros hallazgos demuestran una clara eficacia de las fracciones 2, 9 y 3 en un modelo *in vitro*, es importante reconocer que el proceso de trasladar estos resultados al ámbito clínico es un desafío complejo y multifacético que requerirá investigaciones interdisciplinarias adicionales para avanzar en el desarrollo de nuevos fármacos.

Este estudio ha abierto nuevas perspectivas para futuras investigaciones en diversas direcciones. En primer lugar, la identificación de compuestos específicos, como la dihidroartemisinina, resveratrol, kaempferol, resveratrol, isorhamnetina y tocotrienoles, que muestran efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama, resalta la necesidad de investigar a fondo los mecanismos celulares subyacentes, los posibles efectos secundarios y la viabilidad de la modificación sintética de algunos de estos compuestos, incluyendo enfoques de química computacional. Además, las condiciones óptimas de extracción de polifenoles de *Decatropis bicolor* L. identificadas a través de nuestro diseño de experimentos brindan oportunidades para explorar aún más este método de extracción y su aplicabilidad en otros contextos.

En última instancia, nuestros resultados subrayan la necesidad de futuras investigaciones que exploren las aplicaciones clínicas de estas fracciones o de los metabolitos secundarios que las componen en su mayoría, así como sus posibles implicaciones terapéuticas. Además, este estudio podría servir como punto de partida para investigaciones *in vivo* o *in silico* orientadas al desarrollo de nuevos fármacos y la evaluación de posibles dianas terapéuticas, con el objetivo de evaluar la eficacia y seguridad de estos compuestos. Al profundizar en la comprensión de los efectos de estas fracciones en diversos entornos y sistemas biológicos, podríamos avanzar en la búsqueda de terapias más efectivas para el cáncer de mama triple negativo, brindando esperanza a aquellos que luchan contra esta enfermedad.

## Referencias

- A Haimovitz-Friedman, R. N. (1997). *Ceramide signaling in apoptosis. British medical bulletin*, 539–553.
- Abdullahi R. Abubakar, A. M. (2020). *Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. J Pharm Bioallied Sci.*, 1-10.
- Almaguer, V. R. (2019). *The antitumor activity in lymphoma I5178y in mice, acute toxicity and phytochemical of Decatropis bicolor zucc. (Radlk). PharmacologyOnline*, 224-235.
- Birt Diane F., S. H. (2001). *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacology & Therapeutics*, 157-177.
- C. C. Estanislao Gómez, A. A. (2016). *Decatropis bicolor (Zucc.) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16:266.
- Cárdenas, O., Gutiérrez, P., & Miguel, S. Z. (2005). *Actividad antifúngica de seis plantas sobre Aspergillus flavus Link. Revista Mexicana de ciencias farmaceuticas*, 21-26.
- Changkai Zhou 1, J. G. (2022). *Anti-inflammatory Mechanism of Action of Benzoilmesaconina in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine*.
- Chemistry, R. S. (2015). *Natural Product Extraction Principles and Applications. United Kingdom: Royal Society of Chemistry*.
- Cong-Cong, X., Bing, W., & Yi-Qiong, P. (2017). *Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. ScienceDirect*, 0721-0731.
- Coskun, O. (2016). *Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanbul.* , 156-160.
- Dian Anriani A.Makuasa, P. N. (2020). *Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (Annona muricata L.) Using UV-Vis Sepctrofotometry Methods. indonesia: AHMAR Institute*.
- Dominguez Xorge A., Butrille D., Wapinsky J. (1970). *Les alcaloides principaux de decatropis bicolor\*. Phytochemistry*, 2554-2555.

- Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Mexico: Limusa.
- Dona Sinha a, N. S. (2016). *Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms*. *Seminars in Cancer Biology*, Pages 209-232.
- Engebraaten Olav, H. K.-L.-D. (2013). *Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets*. *The American journal of pathology*, 1064-1074.
- Feoktistova Maria, P. G. (2016). *Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 343-346.
- García-Arguez Aída N., T. O. (1999). *Anti-Inflammatory Activity of Coumarins from Decatropis bicolor on TPA Ear Mice Model*. *Planta Medicinal*, 279-281.
- Gonçalves Homero, J. M. (2018). *Survival Study of Triple-Negative and Non–Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort*. *Clin Med Insights Oncol*.
- Gray Janet M., S. R. (2017). *State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment*. *Environ Health.*, 16: 94.
- Guzmán, E. N. (2021). *Caracterización química de Decatropis bicolor (Zucc.) Radlk y su actividad antifúngica en contra de Botrytis cinerea Pers. y Colletotrichum sp.* Hidalgo. México: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE FRANCISCO I. MADERO.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods An Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London: Chapman and Hall.
- Jai Malik, S. C. (2022). Chapter 2 - *Extraction of herbal biomolecules*. En A. K. Subhash C. Mandal, *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications* (págs. 21-46). India: Aademic Press.
- Jaimez Ordaz Judith, E. C.-L.-S. (2021). *Comparative Evaluation of Four Extraction Methods of Antioxidant Compounds from Decatropis bicolor in Aqueous Medium Applying Response Surface Design*. *Molecules*, 26.
- Jinjiao Hu, Y. Z. (2019). *ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine*. *J Exp Clin Cancer Res.*, 38: 225.



- Kaur, P., Nagaraja, G. M., & Zheng, H. (2012). *A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. BMC Cancer*, 120.
- L. Rowles III a, J. W. (2020). *Carotenoids and their role in cancer prevention. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Leen Othman, A. S.-M. (2019). *Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. Frontiers in microbiology*, 10-911.
- Martinez, Y. L., & Medrano, R. (24 de Octubre de 2022). *Epidemiología del cáncer de mama*. Obtenido de Gobierno de Mexico: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
- M G Hertog, E. J. (1993). *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. the Zutphen Elderly Study. Lancet*, 1007-1011.
- Mahshid Ghasemi, T. T. (2021). *The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int J Mol Sci*.
- N Nerdy, B. R.-M. (2022). *Comparison of flavonoid content and antioxidant activity in calyces of two roselle varieties (Hibiscus sabdariffa L.). IOP Publishing*, 956.
- N. Lynn Henry, P. D. (2020). *Cancer of the Breast. Abeloff's Clinical Oncology*, 1560-1601.
- Nidhi Agarwal, C. M. (2012). *Natural Herbs as Anticancer Drugs . Pharmtech*, 1142-1153.
- OMS. (2 de febrero de 2023). *Organizacion mundial de la salud*. Obtenido de Marco de aplicación de la iniciativa mundial contra el cáncer de mama: evaluación, fortalecimiento y expansión de los servicios de detección precoz y tratamiento del cáncer de mama: resumen ejecutivo: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240067134>
- Ortega, N. C. (2005). *Actividad antifúngica de seis plantas sobre Aspergillus flavus Link. Redalyc-UASLP*, 21-26.
- Ortiz, V. (19 de Noviembre de 2021). *Decatropis Bicolor*. Obtenido de Enciclovida: <https://enciclovida.mx/especies/170918>
- Pathol, A. R. (2022). *Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. PubMed*, 181-204.

- Pulaski Beth A., S. O.-R. (2001). *Mouse 4T1 Breast Tumor Model*. *Current Protocols in Immunology*, 20.2.1-20.2.16.
- R Loganathan 1, K. R. (2013). *Tocotrienols promote apoptosis in human breast cancer cells by inducing poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and inhibiting nuclear factor kappa-B activity*. *Cell Prolif*, 203–213. .
- Redfern James, M. K. (2014). *Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties*. *J Microbiol Biol Educ.*, 45-46.
- Reyhaneh Farghadani, R. N. (2023). *The anticancer mechanism of action of selected polyphenols in triple-negative breast cancer (TNBC)*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.
- Rice-Evans Catherine A., N. J. (1995). *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *ELSEVIER*, 933-956.
- Risanti Dhaniaputri, H. S. (2021). *Introduction to Plant Metabolism, Secondary Metabolites Biosynthetic Pathway, and In-Silico Molecular Docking for Determination of Plant Medicinal Compounds: An Overview*. *Advances in Biological Sciences Research*, 373-383.
- Rondón María, M. S. (2018). *Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador*. *Journal of King Saud University*, 500-505.
- Sánchez-González, G.-S. S.-N. (2008). *Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de nicolás flores, hidalgo, méxico*. *Chapingo Serie Horticuultura*, 271-279.
- Senem Kamiloglu, G. S. (2020). *Guidelines for cell viability assays*. *Food Frontiers*, 332-249.
- Shasha Tian, Y. W. (2022). *Mixed computational-experimental study to reveal the anti-metastasis and anti-angiogenesis effects of Astragaln in human breast cancer*. *Comput Biol Med* . .
- Simpson Peter T, J. S.-F. (2005). *Molecular evolution of breast cancer*. *The Journal of pathology*, 248-254.
- Sumya Pathak, A. V. (2019). *Secondary Metabolite Pathways in Medicinal Plants: Approaches in Reconstruction and Analysis*. *En S. K. Sudhir P. Singh, Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges* (págs. 978-981). Singapore: Springer.

- T Katagiri, A. Y.-S. (1994). *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. J Cell Biol.*, 1755–1766. .
- T. Maria, A.-M. J.-M.-Z.-S. (2021). *Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo. Mexican Journal Of Oncology*, 101-110.
- Tingting Liu, L. C. (2020). *Molecular docking studies, anti-Alzheimer's disease, antidiabetic, and anti-acute myeloid leukemia potentials of Narcisósido. The Journal of Metabolic Diseases* .
- Tolosa, A. (15 de Enero de 2022). *El Blog de Genotipia*. Obtenido de Genética en cáncer: <https://genotipia.com/genetica-en-cancer/>
- Valenzuela Alfonso, A. M. (2004). *Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la proteccion de la salud cardiovascular. Revista chilena de nutrición*, 161-169.
- Villavicencio, M. A. (1998). *Lista florística del estado de Hidalgo: recopilacion bibliografica*. Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Biológicas.
- Vinay Kumar, A. K. (2015). *Robbins Y Cotran Patología Estructural Y Funcional - 9ª Edición*. USA: Elsevier.
- WALDI, H. R. (1965). *Thin-Layer Chromatography*. Berlin, New York: SPRINGER-VERLAG.
- Wink, M. (2015). *Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. Medicines (Basel)*, 251-286.
- Won, K.-A., & Spruck, C. (2020). *Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives . International journal of oncology*, 1245-1261.
- Xiaoshuo Dai, X. Z. (2021). *Dihidroartemisinina: A Potential Natural Anticancer Drug. Int J Biol Sci.*, 603–622.
- Zeina Habli, G. T.-M. (2017). *Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. Molecules.* , 250.

## Anexos

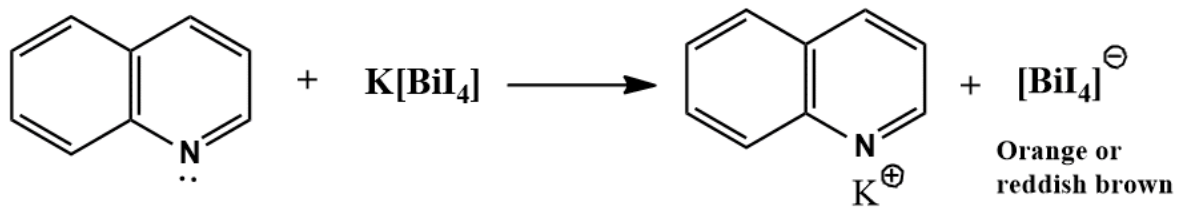
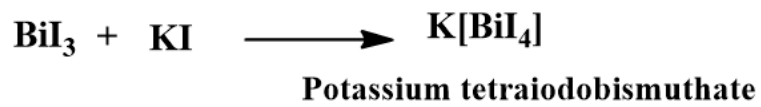
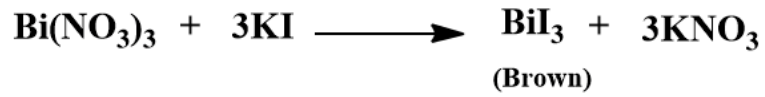


Fig. 1 Reacción de Dragendorff para la detección de alcaloides (Chemistry, 2015).

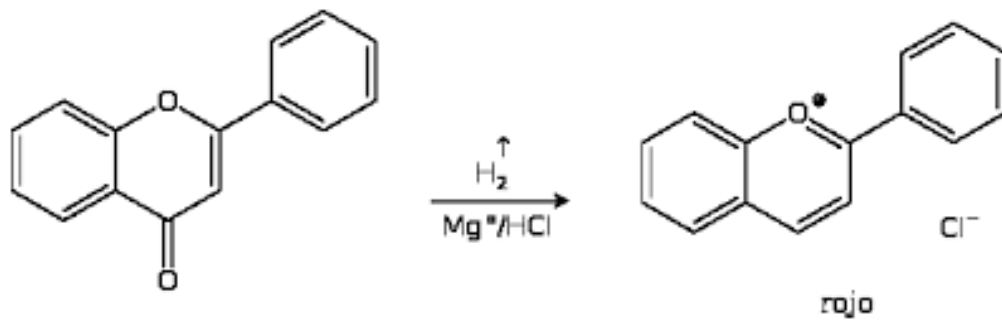


Fig. 2 Reacción de Shinoda (Domínguez, 1988).

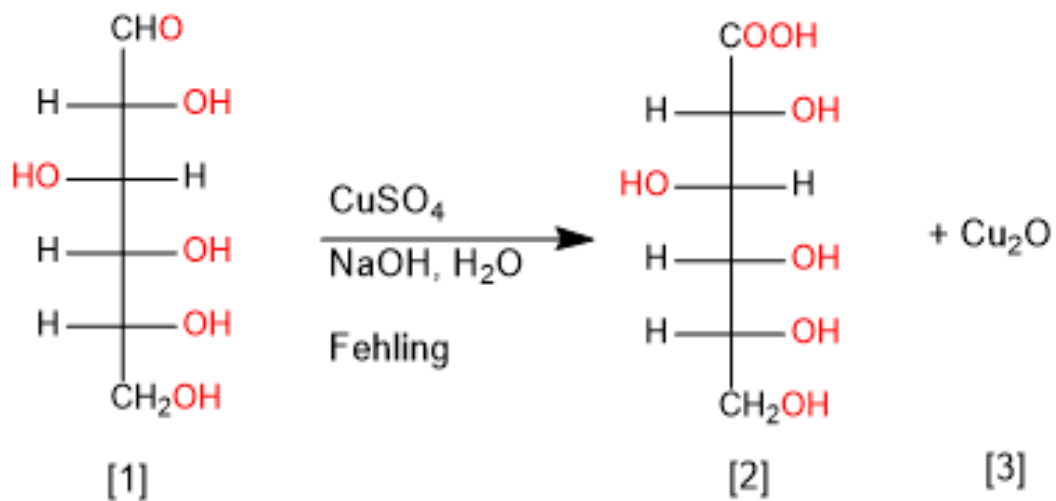


Fig. 3 Reacción de Fehling (Cong-Cong, Bing, & Yi-Qiong, 2017).

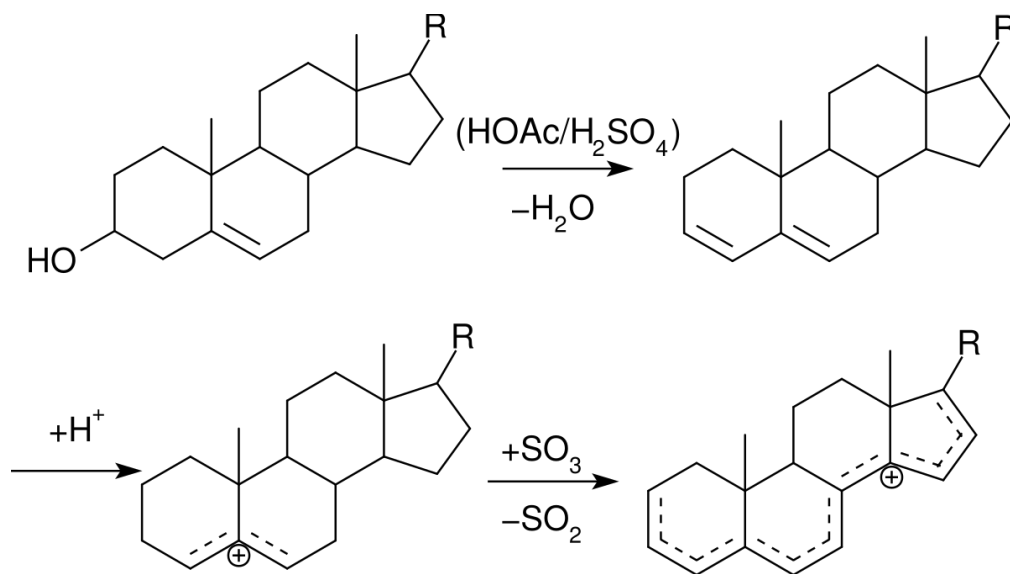


Fig. 4 Reacción de Lieberman (Domínguez, 1988).

## Fracción 2

Tabla 1 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 1 vs. Palmitoil-D-eritro-esfingosina

Original	Comp. 1	Palmitoil-D-eritro-esfingosina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	Intensidad
279.4	12.9590997	279.4	<b>12.96</b>
292.4	15.8577008	292.4	<b>15.86</b>
371.3	70.6958497	371.3	<b>70.7</b>
372.2	13.7790758	372.2	<b>13.78</b>
373.3	7.39253387	373.3	<b>7.39</b>
391.4	19.0738616	391.4	<b>19.07</b>
413.4	7.52987263	413.4	<b>7.53</b>
520.4	100	520.4	<b>100</b>
521.3	24.6172479	521.3	<b>24.62</b>
565.1	24.4208013	565.1	<b>24.42</b>

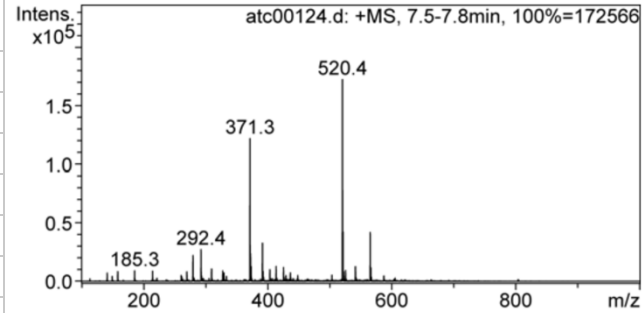


Fig. 5. Cromatograma del compuesto 1 de la fracción 2

Tabla 2 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 2 vs. guanosina-5'-difosfoglucona

Original	Comp. 2	guanosina-5'-difosfoglucona	
ion m/z	intensidad	ion m/z	Intensidad
279.4	9.16706871	279.4	<b>9.17</b>
292.4	10.7554389	292.4	<b>10.76</b>
371.3	463.985848	371.3	<b>46.4</b>
372.2	10.1933196	372.2	<b>10.19</b>
391.4	13.3786619	391.4	<b>13.38</b>
608.4	100	608.4	<b>100</b>
609.2	28.7077242	609.2	<b>28.71</b>
610.3	6.24950913	610.3	<b>6.25</b>
613.3	5.51722074	613.3	<b>5.52</b>
629.3	5.34144161	629.3	<b>5.34</b>

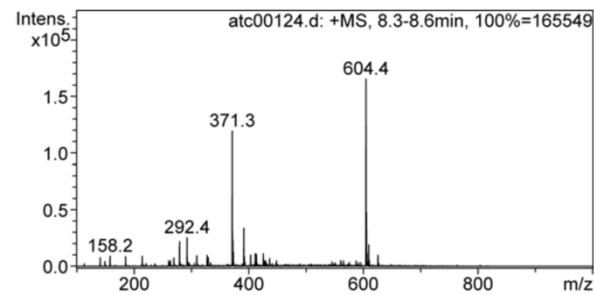


Fig. 6 Cromatograma del compuesto 2 de la fracción 2

Tabla 3 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 3 vs. Cantaxantina

Original		Comp. 3		Cantaxantina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	9.54160242	279.4	9.54	279.4	9.54
292.4	11.2095229	292.4	11.21	292.4	11.21
371.3	50.8597293	371.3	50.86	371.3	50.86
372.2	10.3674579	372.2	10.37	372.2	10.37
391.4	13.8570817	391.4	13.86	391.4	13.86
413.4	5.7344378	413.4	5.73	413.4	5.73
564.4	100	564.4	100	564.4	100
565.2	27.2432554	565.2	27.24	565.2	27.24
575.2	8.27310172	575.2	8.27	575.2	8.27
585.2	6.24815564	585.2	6.25	585.2	6.25

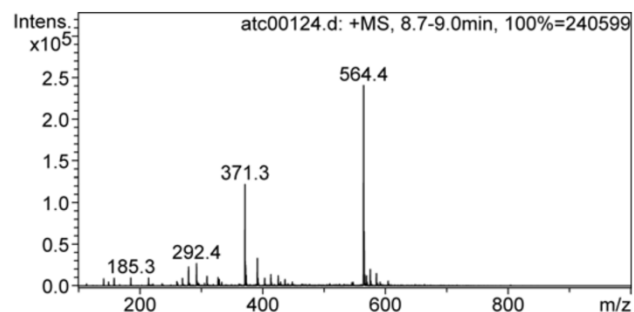


Fig. 7 Cromatograma del compuesto 3 de la fracción 2

Tabla 4 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 4 vs. Benzoilmesaconina

Original		Comp. 4		Benzoilmesaconina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	11.2788523	279.4	11.28	279.4	11.28
292.4	14.1545796	292.4	14.15	292.4	14.15
371.3	59.6914528	371.3	59.69	371.3	59.69
372.2	12.5452186	372.2	12.55	372.2	12.55
373.3	6.96994971	373.3	6.97	373.3	6.97
391.4	17.1887261	391.4	17.19	391.4	17.19
648.4	100	648.4	100	648.4	100
649.2	29.6850864	649.2	29.69	649.2	29.69
650.3	7.68456326	650.3	7.68	650.3	7.68
653.3	8.99880075	653.3	9	653.3	9

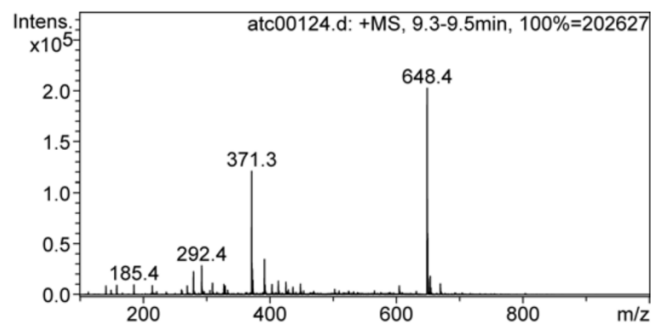


Fig. 8 Cromatograma del compuesto 4 de la fracción 2

Tabla 5 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 5 vs uridina-5'-difosfo-N-acetilgalactosamina

Original	Comp. 5	uridina-5'-difosfo-N-acetilgalactosaminadisodium salt	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	91.6706871	279.4	<b>9.17</b>
292.4	10.7554389	292.4	<b>10.76</b>
371.3	46.3985848	371.3	<b>46.4</b>
372.2	10.1933196	372.2	<b>10.19</b>
391.4	13.3786619	391.4	<b>13.38</b>
608.4	100	608.4	<b>100</b>
609.2	28.7077242	609.2	<b>28.71</b>
610.3	6.24950913	610.3	<b>6.25</b>
613.3	5.51722074	613.3	<b>5.52</b>
629.3	5.34144161	629.3	<b>5.34</b>

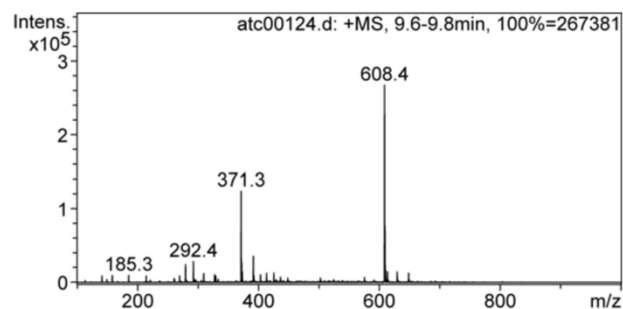


Fig. 9 Cromatograma del compuesto 5 de la fracción 2

Tabla 6 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 6 vs. Cantaxantina

Original	Comp. 6	Cantaxantina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	13.1713491	279.4	<b>13.17</b>
292.4	17.2675669	292.4	<b>17.27</b>
371.3	72.014614	371.3	<b>72.01</b>
372.2	13.8948613	372.2	<b>13.89</b>
391.4	17.0282385	391.4	<b>17.03</b>
565.2	14.3956269	565.2	<b>14.4</b>
692.4	100	692.4	<b>100</b>
693.3	33.435771	693.3	<b>33.44</b>
694.3	8.51356654	694.3	<b>8.51</b>
697.3	8.99885587	697.3	<b>9</b>

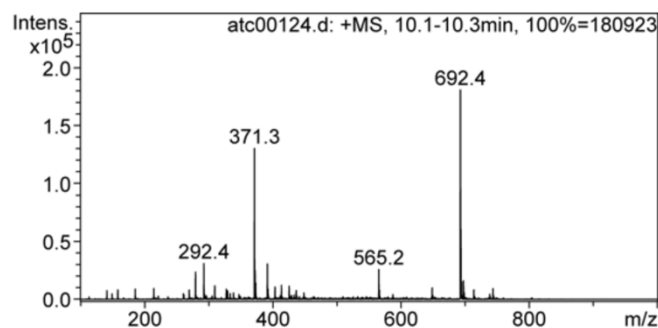


Fig. 10 Cromatograma del compuesto 6 de la fracción 2



Tabla 7 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 7 vs Cloruro de malvina

Original		Comp. 7		Cloruro de malvina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	10.2417002	279.4	10.24		
292.4	13.2594567	292.4	13.26		
371.3	57.4771898	371.3	57.48		
372.2	11.569044	372.2	11.57		
391.4	13.6635682	391.4	13.66		
565.2	10.1429274	565.2	10.14		
652.4	100	652.4	100		
653.3	30.9384316	653.3	30.94		
654.3	7.88784103	654.3	7.89		
692.3	8.2058082	692.3	8.21		

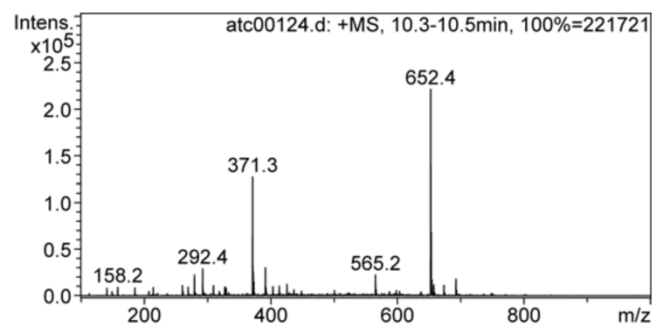


Fig. 11 Cromatograma del compuesto 7 de la fracción 2

Tabla 8 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 8 vs Isosakuranetina

Original		Comp. 8		Isosakuranetin	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.3	37.1566541	203.3	37.16		
269.4	34.5926478	269.4	34.59		
287.3	100	287.3	100		
305.2	43.3145928	305.2	43.31		
322.3	23.6393455	322.3	23.64		
327.2	57.7614252	327.2	57.76		
476.2	41.9195032	476.2	41.92		
476.5	21.9653809	476.5	21.97		
631.2	78.9670013	631.2	78.97		
632	26.1799485	632	26.18		

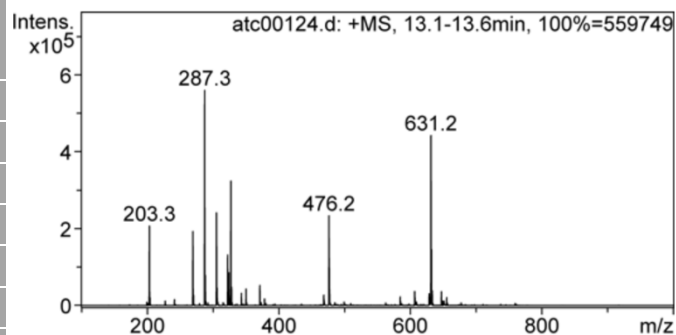


Fig. 12 Cromatograma del compuesto 8 de la fracción 2

Tabla 9 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 9 vs Acubina

Original	Comp. 9	Acubina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
269.3	47.0876564	69.3	<b>47.09</b>
329.3	100	329.3	<b>100</b>
330.1	15.7275211	330.1	<b>15.73</b>
347.2	20.8892323	347.2	<b>20.89</b>
369.2	27.0988256	369.2	<b>27.1</b>
392.2	9.59604917	392.2	<b>9.6</b>
539.2	24.39097	539.2	<b>24.39</b>
539.5	14.1593929	539.5	<b>14.16</b>
715.2	58.4329909	715.2	<b>58.43</b>
716	22.8833331	716	<b>22.88</b>

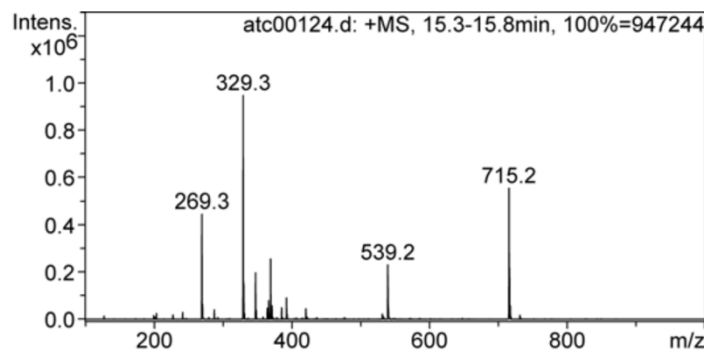


Fig. 12 Cromatograma del compuesto 9 de la fracción 2

Tabla 10 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 10 vs glucosamina-6-fosfato

Original	Comp. 10	glucosamina-6-fosfato	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
260.3	100	260.3	<b>100</b>
261	13.08344	261	<b>13.08</b>
269.3	6.76019505	269.3	<b>6.76</b>
282.2	5.20508141	282.2	<b>5.21</b>
292.3	3.20647979	292.3	<b>3.21</b>
371.2	19.6901759	371.2	<b>19.69</b>
372.2	3.99284462	372.2	<b>3.99</b>
391.4	3.37464927	391.4	<b>3.37</b>
541.2	21.3330064	541.2	<b>21.33</b>
542.1	6.33087254	542.1	<b>6.33</b>

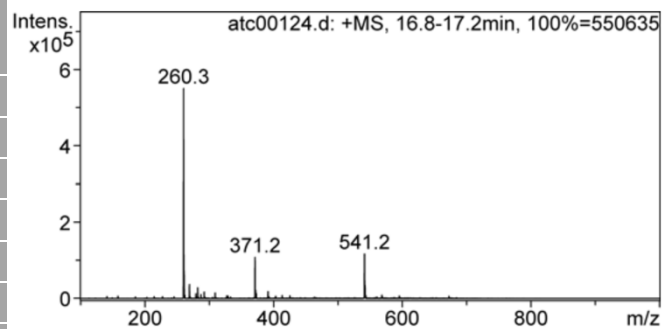


Fig. 13 Cromatograma del compuesto 10 de la fracción 2

Tabla 11 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 11 vs Kaempferol-3-glucósido

Original		Comp. 11		Kaempferol-3-glucósido	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
		121.0285		34	
127	0.2	127.0394		21	
145	44	145.0505		20	
153.3	30	153.0183		59	
165	6	165.0183		32	
213	23	213.0548		19	
258.1	21	258.0531		15	
287.3	1000	287.0532		999	
288	101.47	288.0579		37	
449	135.53	449.1084		17	

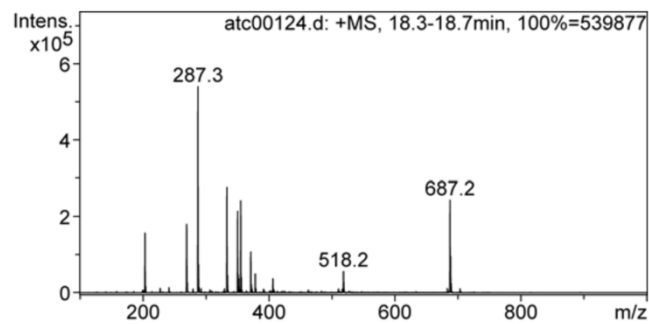


Fig. 14 Cromatograma del compuesto 11 de la fracción 2

Tabla 12 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 12 vs Dihidroartemisinina

Original		Comp. 12		Dihidroartemisinina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
371.5	350.907332	371.5		35.09	
391.6	208.839174	391.6		20.88	
413.6	225.356952	413.6		22.54	
425.6	461.657886	425.6		46.17	
447.6	338.491427	447.6		33.85	
642.6	396.273956	642.6		39.63	
647.5	264.585613	647.5		26.46	
670.6	1000	670.6		100	
671.5	446.438116	671.5		44.64	
675.5	468.135196	675.5		46.81	

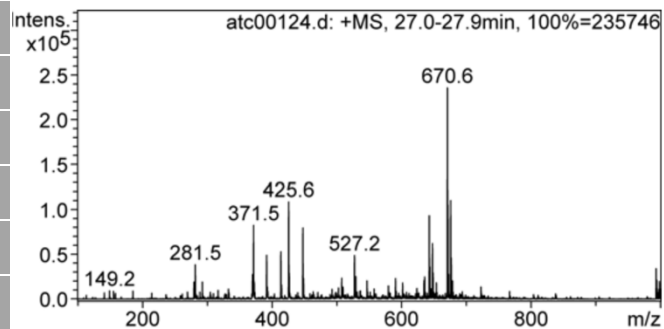


Fig. 15 Cromatograma del compuesto 12 de la fracción 2

## Fracción 9

Tabla 13 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 1 vs Fenpropidina

Original		Comp. 1		Fenpropidina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
218.2	5.22	218.19033	12.33		
258.2	1.82	258.22163	9.13		
133.1	5.24	133.10118	15.72		
147.1	0.21	147.11683	10.05		
149.1	5.66	149.13248	7.63		
274.3	93.35	274.25293	100		
272.1	2.88	272.23728	8.56		
126.2	0.52	126.12773	6.36		
131	0.08	131.08553	6.57		

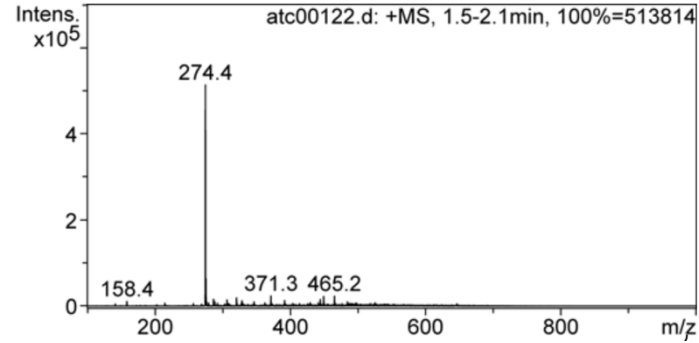


Fig. 16 Cromatograma del compuesto 1 de la fracción 9

Tabla 14 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 2 vs Isoharmentina

Original		Comp. 2		Isoharmentina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.3	34.52	203.3	35.7		
287.3	100	287.3	100		
305.2	44.36	305.2	43.41		
322.3	21.11	322.3	23.9		
327.2	59.92	327.2	54.37		
350.2	22.13	350.2	21.17		
427.2	17.99	476.2	14.13		
631.2	83.64	631.2	73.48		
632	30.4	632	2.69		

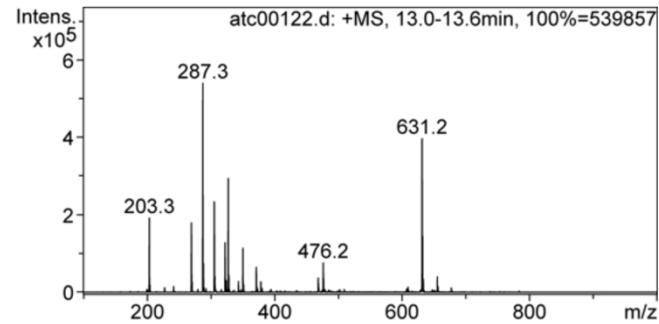


Fig. 17 Cromatograma del compuesto 2 de la fracción 9

Tabla 155 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 3 vs Metil 3-acetoxihexadecanoato

Original		Comp. 3		METIL 3-ACETOXIHEXADECANOATO	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
269.4	40.44	269.4	41.02		
329.3	100	329.3	100		
330.1	14.06	330.1	14.76		
347.2	20.56	347.2	20.44		
369.2	25.69	369.2	27.36		
371.2	9.88	371.2	12.31		
392.2	20.56	392.2	23.14		
420.3	5.4	420.3	6.4		
715.2	37.9	715.2	38.49		

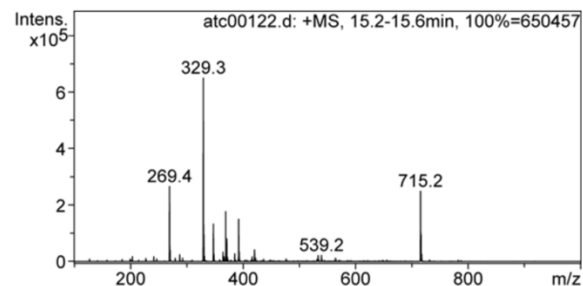


Fig. 18 Cromatograma del compuesto 3 de la fracción 9

Tabla 16 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 4 vs Glucosinato de butenilo

Original		Comp. 4		Glucosinato de butenilo	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	11.2789	279.4	11.28		
292.4	14.1546	292.4	14.15		
371.3	59.6915	371.3	59.69		
372.2	12.5452	372.2	12.55		
373.3	6.9699	373.3	6.97		
391.4	17.1887	391.4	17.19		
648.4	100.0000	648.4	100		
649.2	29.6851	649.2	29.69		
650.3	7.6846	650.3	7.68		
653.3	8.9988	653.3	9		

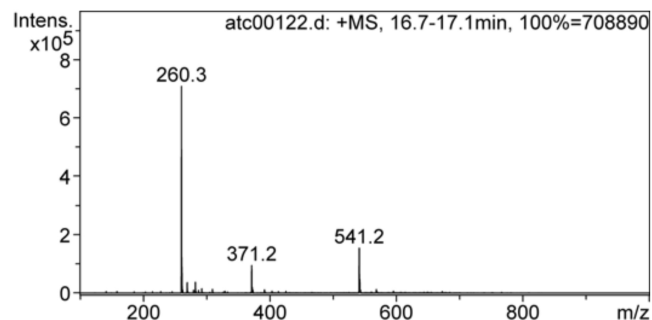


Fig. 19 Cromatograma del compuesto 4 de la fracción 9

Tabla 17 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 5 vs Diglucósido de seco-isolariresinol

Original	Comp. 5	Diglucósido de seco-isolariresinol	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
123.1	0.4	123.07	43
687.2	61.41	687.2	100
294.9	5.9	294.9	39
332.6	38.52	332.6	32
525.2	18.6	525.2	186
353.1	29.8	353.1	61
686.2	1.03	686.2	2.19
363.1	0.13	363.1	8
345.2	24	345.16	90

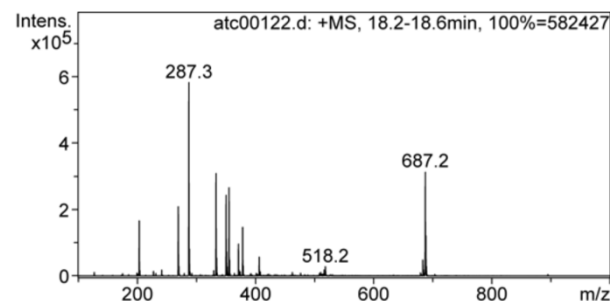


Fig. 20. Cromatograma del compuesto 5 de la fracción 9

Tabla 18 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 6 vs Resveratrol

Original	Comp. 6	Resveratrol	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
229.3	100	229.3	100
230.2	13.3	230.2	13.3
251.3	30.17	251.3	30.17
371.3	28.94	371.3	28.94
476.3	22.83	476.3	22.83
476.7	13.04	476.7	13.04
479.3	64.74	479.3	64.74
480.1	22.27	480.1	22.27
590.2	10.06	590.2	10.06
613.1	16.7	613.1	16.7

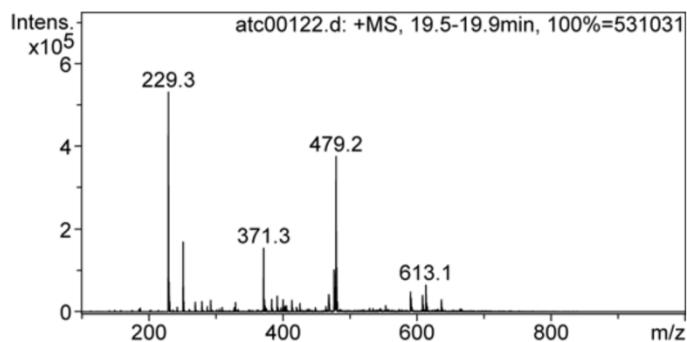


Fig. 21 Cromatograma del compuesto 6 de la fracción 9

Tabla 19 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 7 vs Cantaxantina

Original	Comp. 7	Cantaxantina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.2	100	203.2	100
204.1	10.0753041	204.1	10.08
271.3	45.0195771	271.3	45.02
272.3	8.07315396	272.3	8.07
293.3	24.4367091	293.3	24.44
371.3	35.4820529	371.3	35.48
372.2	7.83852699	372.2	7.84
560.3	6.15566817	560.3	6.16
563.2	54.8448607	563.2	54.84
564.1	19.6739058	564.1	19.67

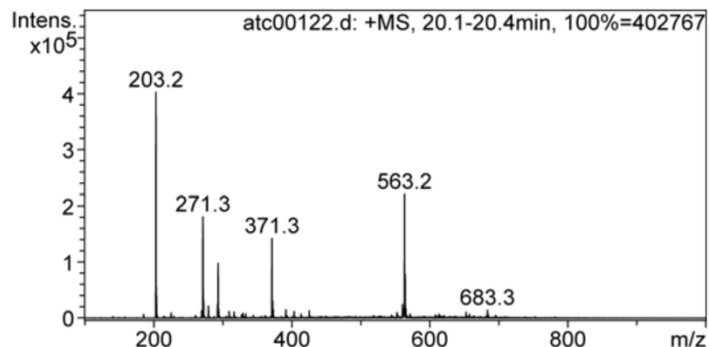


Fig. 22 Cromatograma del compuesto 7 de la fracción 9

Tabla 20 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 8 vs Benzoilmesaconina

Original	Comp. 8	Benzoilmesaconina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
292.4	9.17266778	292.4	9.17
371.3	38.2567964	371.3	38.26
573.3	10.614302	573.3	10.61
590.3	100	590.3	100
591.1	38.1369566	591.1	38.14
595.2	40.9977893	595.2	41
596.2	14.0472464	596.2	14.05
618.2	38.3085081	618.2	38.31
619.2	14.0622948	619.2	14.06
646.2	9.34777612	646.2	9.35

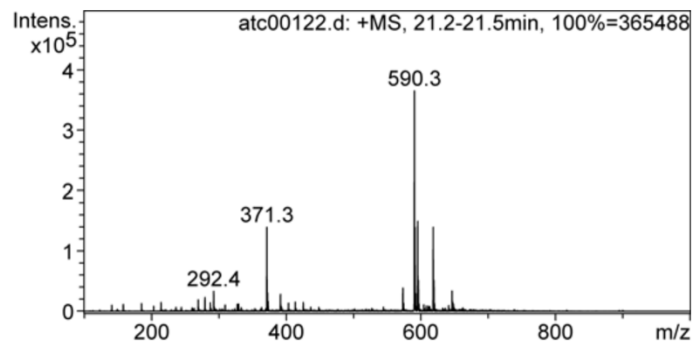


Fig. 23 Cromatograma del compuesto 8 de la fracción 9

Se decidió omitir la tabla del compuesto 9 debido a su similitud con el compuesto 8

Tabla 21 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 10 vs Alpha-tocotrienol

Original	Comp. 10	alpha-tocotrienol	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
281.5	20.6090893	281.5	20.61
369.7	22.2156719	369.7	22.22
371.4	13.7890535	371.4	13.79
425.5	100	425.5	100
426.3	23.7912928	426.3	23.79
447.5	59.545011	447.5	59.55
448.4	16.7052831	448.4	16.71
470.5	10.6771137	470.5	10.68
498.5	6.887329	498.5	6.89
527.1	6.08518018	527.1	6.09

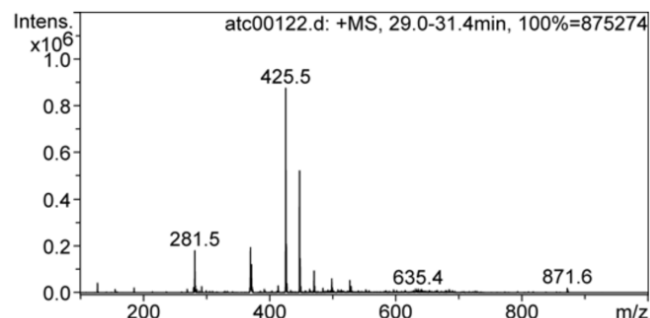


Fig. 25 Cromatograma del compuesto 10 de la fracción 9

### Fracción 3

Tabla 22 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 1 vs Fenpropidina

Original	Comp. 1	Fenpropidina	intensidad
ion m/z	intensidad	ion m/z	
274.5	1000	274.5	1000
275.3	127.739	275.3	127.738719
371.4	146.802	371.4	146.801972
391.5	90.513	391.5	90.5131436
413.4	61.026	413.4	61.025624
444.3	40.188	444.3	40.1881453
449.2	74.324	449.2	74.3240256
487.1	38.547	487.1	38.546572
489.1	35.308	489.1	35.307643
493.1	42.338	493.1	42.3382194

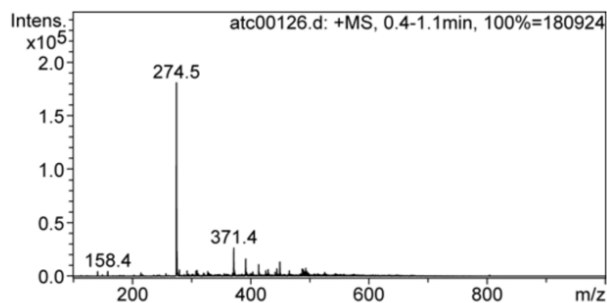


Fig. 26 Cromatograma del compuesto 1 de la fracción 3



Tabla 23 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 2 vs Resveratrol glicosilado

Original	Comp. 2	Resveratrol glicosilado	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.5	68.62607812	279.5	68.557452
349.5	273.6693065	349.5	273.395637
371.4	385.2592927	371.4	384.874033
372.3	75.44615768	372.3	75.3707115
384.4	233.8224082	384.4	233.588586
389.3	1000	389.3	999
390.1	139.53416	390.1	139.394626
391.3	140.6232982	391.3	140.482675
405.2	182.2802404	405.2	182.09796
583.2	146.0897346	583.2	145.943645

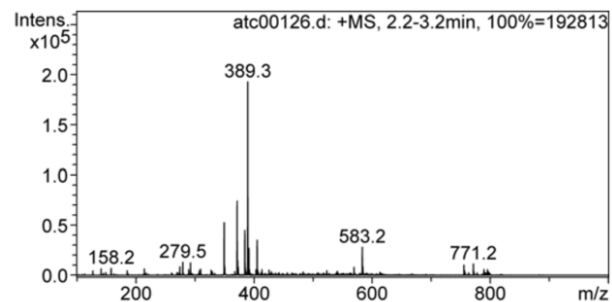


Fig. 27 Cromatograma del compuesto 2 de la fracción 3

Tabla 24 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 3 vs Saponarina

Original	Comp. 3	saponarina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
297.3	1.52	297.35	4
337	1	337.06	16
415	0.93	415.098	35
416	0.1667	416.097	7
433.1	20.27	433.106	37
475.11	1.23	475.11	12
595.2	1000	595.17	999
596	297.4823911	596.16	310
597.1	78.14649773	597.17	86
617.1	87.66967164	617.132	26

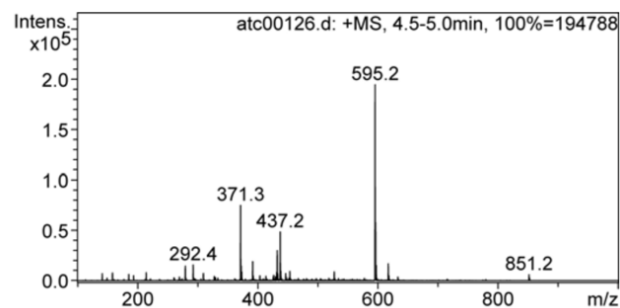


Fig. 28 Cromatograma del compuesto 3 de la fracción 3

Tabla 25 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 4 vs Cantaxantina

Original		Comp. 4		Cantaxantina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
279.4	103.6170072	279.4	103.6		
292.4	109.3938793	292.4	109.4		
371.3	551.3696777	371.3	551.4		
372.2	105.9313628	372.2	105.9		
373.3	62.39142065	373.3	62.4		
391.4	129.3273942	391.4	129.3		
565.2	1000	565.2	1000		
566	275.4744429	566	275.5		
567.1	71.61878656	567.1	71.6		
587.1	61.38152002	587.1	61.4		

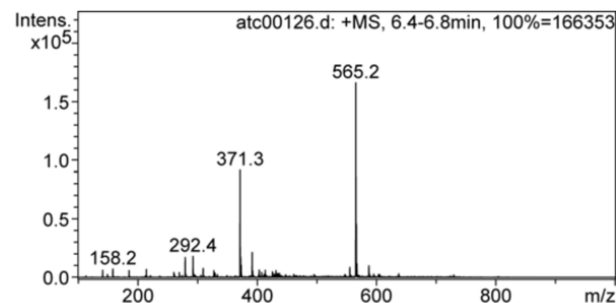


Fig. 29 Cromatograma del compuesto 4 de la fracción 3

Tabla 26 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 5 vs 3-Hidroxi-4-cetoyotuleno

Original		Comp. 5		3-Hidroxi-4-cetoyotuleno	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
260.4	8.768736801	260.4	8.77		
279.4	9.041740355	279.4	9.04		
292.4	99.35154502	292.4	9.94		
371.3	491.2461439	371.3	49.12		
372.3	93.4793931	372.3	9.35		
391.5	110.7467248	391.5	11.07		
565.2	1000	565.2	100		
566.1	285.1713856	566.1	28.52		
587.2	97.58303143	587.2	9.76		
637.2	83.53221957	637.2	8.35		

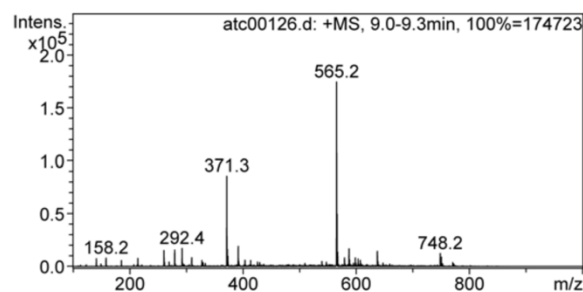


Fig. 30 Cromatograma del compuesto 5 de la fracción 3

Tabla 27 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 6 vs Citidina 5'-difosfo-colina

Original		Comp. 6		Citidina 5'-difosfo-colina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
292.5	115.9746637	292.5	115.858689		
305.4	192.1870006	305.4	191.994814		
371.4	640.4538455	371.4	639.813392		
372.3	134.3304181	372.3	134.196088		
484.3	570.6627539	484.3	570.092091		
485.3	139.9163204	485.3	139.776404		
489.2	1000	489.2	999		
490.1	223.1963855	490.1	222.973189		
607.2	342.5269489	607.2	342.184422		
609.2	164.8603888	609.2	164.695528		

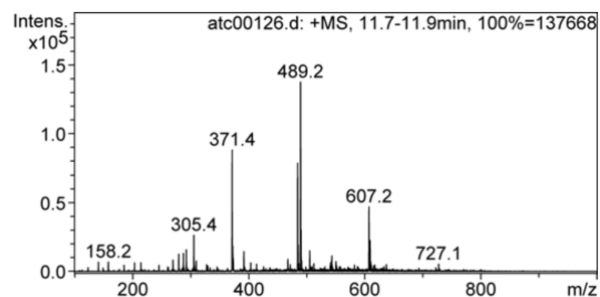


Fig. 31 Cromatograma del compuesto 6 de la fracción 3

Tabla 16 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 7 vs Kaempferol-3-glucósido

Original		Comp. 7		Kaempferol-3-glucósido	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.3	352.8810349	203.3	352.9		
269.4	326.7641338	269.4	326.8		
287.3	1000	287.3	1000		
288.1	138.3856121	288.1	138.4		
305.2	425.1638215	305.2	425.2		
322.2	225.2797176	322.2	225.3		
327.2	506.9458912	327.2	506.9		
476.2	176.0833752	476.2	176.1		
631.2	680.1703779	631.2	680.2		
632	240.8049006	632	240.8		

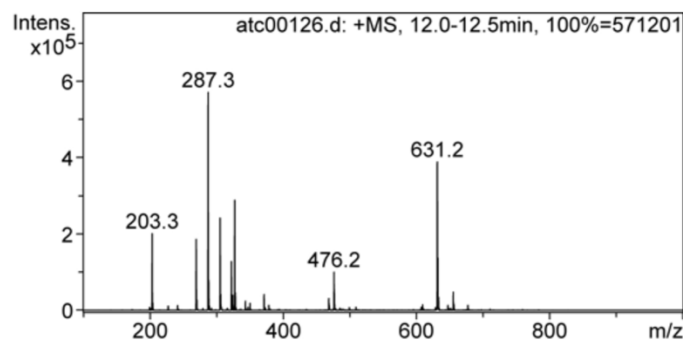


Fig. 32 Cromatograma del compuesto 7 de la fracción 3

Tabla 28 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 8 vs l ácido D(-)-3-fosfoglicérico

Original		Comp. 8		ácido D-3-fosfoglicérico	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
187.3	1000	187.3	1000	187.3	1000
188.2	102.32376	188.2	102.3	188.2	102.3
209.3	133.4630276	209.3	133.5	209.3	133.5
279.4	113.9330853	279.4	113.9	279.4	113.9
292.5	105.2039843	292.5	105.2	292.5	105.2
371.4	619.4250921	371.4	619.4	371.4	619.4
372.3	130.2606729	372.3	130.3	372.3	130.3
391.5	166.5350775	391.5	166.5	391.5	166.5
392.2	289.6015058	392.2	289.6	392.2	289.6
531.2	106.9662268	531.2	107	531.2	107

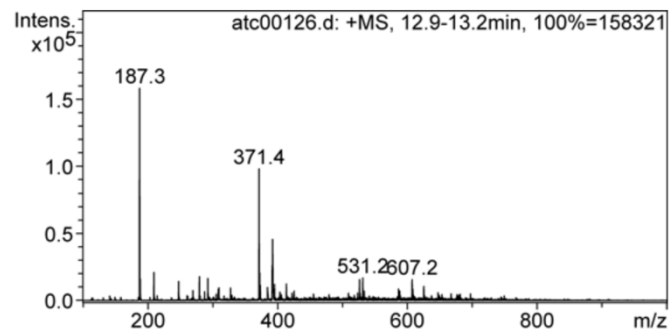


Fig. 32 Cromatograma del compuesto 8 de la fracción 3

Tabla 29 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 9 vs Acubina

Original		Comp. 9		Acubina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
269.4	426.2812559	269.4	426.3	269.4	426.3
270.3	64.9957875	270.3	65	270.3	65
329.3	1000	329.3	1000	329.3	1000
330	139.3428501	330	139.3	330	139.3
347.2	202.2726949	347.2	202.3	347.2	202.3
369.2	275.4816713	369.2	275.5	369.2	275.5
371.2	90.59008189	371.2	90.6	371.2	90.6
392.2	50.07421271	392.2	50.1	392.2	50.1
715.2	392.4927407	715.2	392.5	715.2	392.5
716	155.7075814	716	155.7	716	155.7

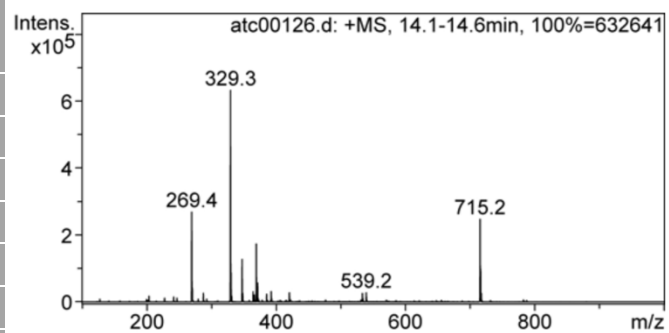


Fig. 33 Cromatograma del compuesto 9 de la fracción 3

Tabla 30 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 10 vs Formononetina

Original		Comp. 10		Formononetina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.4	137.3999887	203.4	137.4	203.4	137.4
269.3	1000	269.3	1000	269.3	1000
270.2	147.5080938	270.2	147.5	270.2	147.5
279.4	64.56027321	279.4	64.6	279.4	64.6
287.3	333.4302161	287.3	333.4	287.3	333.4
309.3	263.5736834	309.3	263.6	309.3	263.6
371.2	314.0011787	371.2	314	371.2	314
372.2	64.68541349	372.2	64.7	372.2	64.7
595.2	300.7120886	595.2	300.7	595.2	300.7
596.1	111.237597	596.1	111.2	596.1	111.2

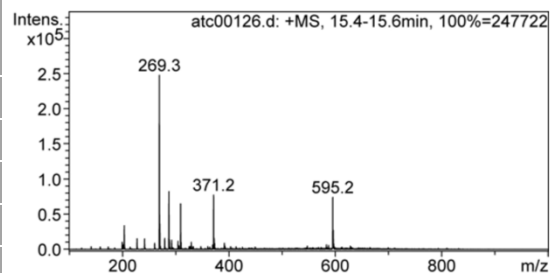


Fig. 34 Cromatograma del compuesto 10 de la fracción 3

Tabla 31 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 11 vs glucosamina-6-fosfato

Original		Comp. 11		glucosamina-6-fosfato	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
260.2	1000	260.2	100	260.2	100
260.9	130.2136143	260.9	130.02	260.9	130.02
269.3	47.82259875	269.3	47.8	269.3	47.8
282.2	57.295592	282.2	57.3	282.2	57.3
371.2	89.32271817	371.2	89.3	371.2	89.3
372.2	18.47405295	372.2	18.5	372.2	18.5
541.2	263.5033772	541.2	263.5	541.2	263.5
542.1	77.1268114	542.1	77.1	542.1	77.1
543.1	17.83908782	543.1	17.8	543.1	17.8
568.1	19.10043747	568.1	19.1	568.1	19.1

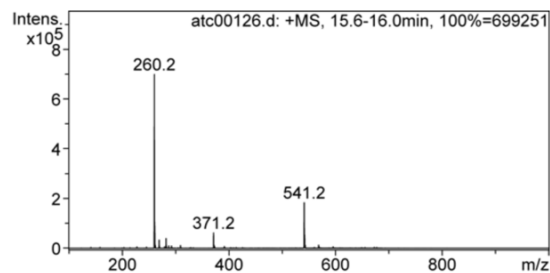


Fig. 35 Cromatograma del compuesto 11 de la fracción 3

Tabla 32 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 12 vs isosakuranetin

Original		Comp. 12		Isosakuranetin	
m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.3	281.5033396	203.3	281.5		
269.4	334.8514858	269.4	334.9		
287.3	1000	287.3	1000		
288.1	134.9262205	288.1	134.9		
333.3	515.1111469	333.3	515.1		
350.3	422.9663292	350.3	423		
351.2	119.11297	351.2	119.1		
355.2	454.4956416	355.2	454.5		
687.2	530.7735875	687.2	530.8		
688.1	205.7280932	688.1	205.7		

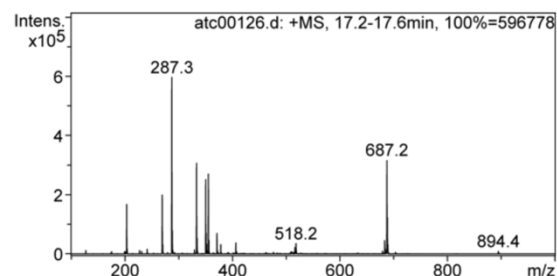


Fig. 36 Cromatograma del compuesto 12 de la fracción 3

Tabla 33 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 13 vs Resveratrol

Comp.13		Resveratrol	
m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
229.3	1000	229.3	1000
230.2	134.4734199	230.2	134.5
251.2	336.444658	251.2	336.4
371.3	164.2727394	371.3	164.3
476.3	244.7721938	476.3	244.8
476.7	145.6481647	476.7	145.6
479.2	753.8225053	479.2	753.8
480.1	213.5502239	480.1	213.6
590.2	108.4475936	590.2	108.4
613.1	144.6471046	613.1	144.6

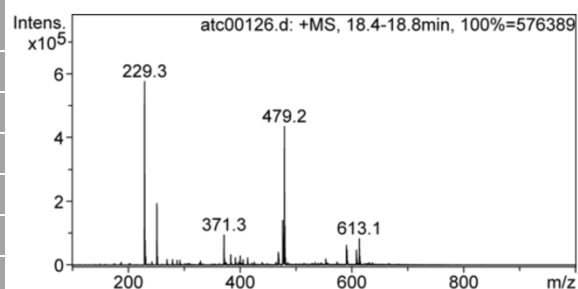


Fig. 37 Cromatograma del compuesto 13 de la fracción 3

Tabla 34 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 14 vs Oxycanthine

Comp. 14		Oxycanthine	
m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
229.3	303.413406	229.3	303.4
269.4	155.1221727	269.4	155.1
329.4	189.342909	329.4	189.3
371.3	448.5471355	371.3	448.5
397.3	136.4701998	397.3	136.5
591.2	193.6230807	591.2	193.6
608.2	1000	608.2	1000
609.1	359.0019812	609.1	359
613.2	992.2486379	613.2	992.2
614.1	362.5061912	614.1	362.5

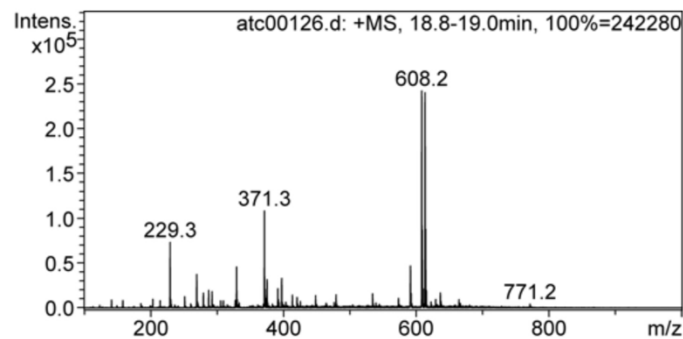


Fig. 38 Cromatograma del compuesto 14 de la fracción 3

Tabla 35 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 15 vs Spermine

Comp. 15		Spermine	
m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
203.2	1000	203.2	100
204	110.2466701	204	110.2
271.3	404.9114861	271.3	404.9
272.2	60.76452302	272.2	60.8
293.2	215.7510897	293.2	215.8
371.3	188.1904368	371.3	188.2
560.3	82.99648542	560.3	83
560.7	55.07463413	560.7	55.1
563.2	562.7247344	563.2	562.7
564.1	197.8819165	564.1	197.9

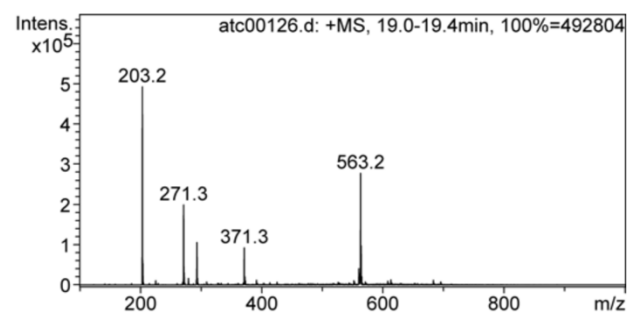


Fig. 39 Cromatograma del compuesto 15 de la fracción 3

Tabla 36 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 16 vs Benzoilmesaconina

Original	Comp. 16	Benzoilmesaconina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
244.4	56.54793442	244.4	56.4913865
371.4	234.656393	371.4	234.421737
573.3	109.7705586	573.3	109.660788
590.3	1000	590.3	999
591.1	369.1170015	591.1	368.747884
592.2	92.88918492	592.2	92.7962957
595.1	407.2420109	595.1	406.834769
596.1	145.5794567	596.1	145.433877
618.2	81.75267564	618.2	81.6709229
646.2	64.0134829	646.2	63.9494694

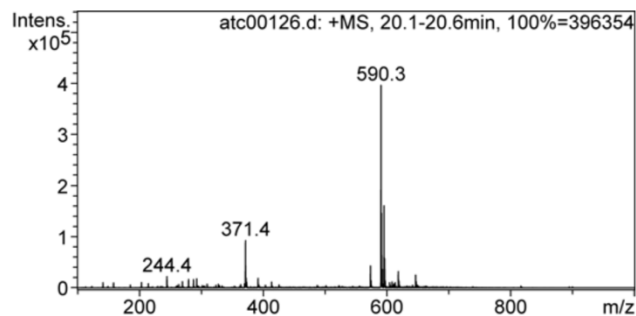


Fig. 40 Cromatograma del compuesto 16 de la fracción 3

Tabla 37 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 17 vs Benzoilmesaconina

Comp 17		Benzoilmesaconina	
m/z	intensidad relativa	ion m/z	intensidad
371.4	217.6282798	371.4	217.410652
391.5	44.32523423	391.5	44.280909
573.3	124.310211	573.3	124.185901
590.3	1000	590.3	999
591.1	351.8099112	591.1	351.458101
592.2	84.605064	592.2	84.5204589
595.2	489.3559255	595.2	488.86657
596.1	171.4522957	596.1	171.280843
618.2	87.37892634	618.2	87.2915474
646.2	67.54784686	646.2	67.480299

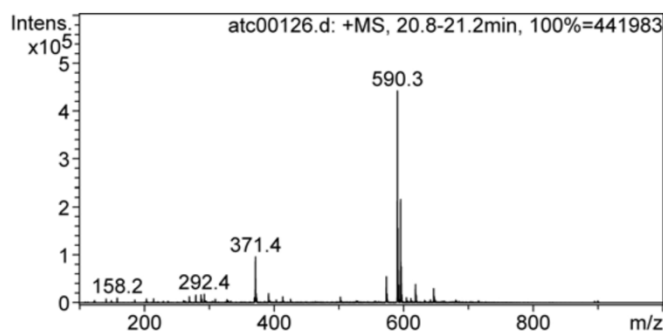


Fig. 41 Cromatograma del compuesto 17 de la fracción 3



Tabla 38 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 18 vs Lisofosfatidilcolina

Original		Comp. 18		Lisofosfatidilcolina	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
288.7	349.6709668	288.7	349.321296		
304.7	248.3936267	304.7	248.145233		
369.8	259.3614005	369.8	259.102039		
371.4	734.6363002	371.4	733.901664		
372.4	149.5284915	372.4	149.378963		
391.5	141.7910974	391.5	141.649306		
413.5	126.005967	413.5	125.879961		
527.2	125.9636476	527.2	125.837684		
530.4	1000	530.4	999		
531.3	381.347026	531.3	380.965679		

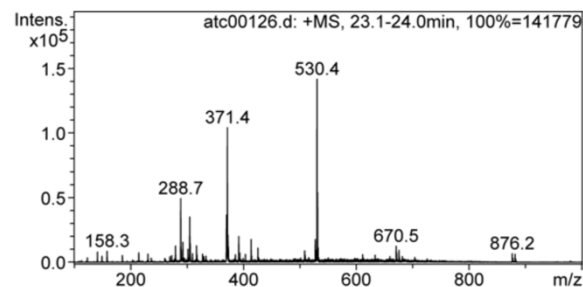


Fig. 42 Cromatograma del compuesto 18 de la fracción 3

Tabla 39 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 19 vs Narcisósido

Original		Comp. 19		Narcisósido	
ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
243	96.6	243.031	117		
255.1	86	255.0	83		
270.99	299	271.02	223		
271.99	53	272.03	54		
285	31.71	285.04	52		
299	187	299.02	324		
315.2	274	315.05	323		
316	279	316.05	117		
670.6	1000	670.68	999		

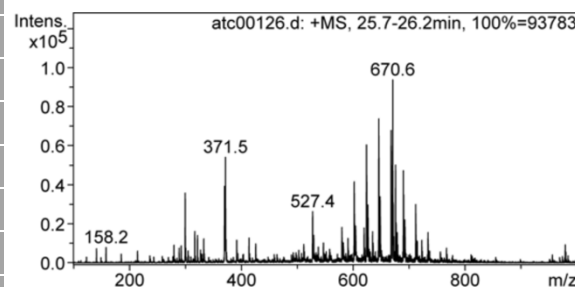


Fig. 43 Cromatograma del compuesto 19 de la fracción 3

Tabla 40 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 20 vs Ribitol

Comp. 20		Ribitol	
m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
149.2	153.7911338	149.2	153.8
369.8	243.8039885	369.8	243.8
371.5	238.4370295	371.5	238.4
391.6	889.6347167	391.6	889.6
392.5	213.2728446	392.5	213.3
413.5	1000	413.5	1000
414.4	239.4624038	414.4	239.5
527.2	210.3017601	527.2	210.3
670.5	202.6489669	670.5	202.6
675.5	155.8118713	675.5	15.58

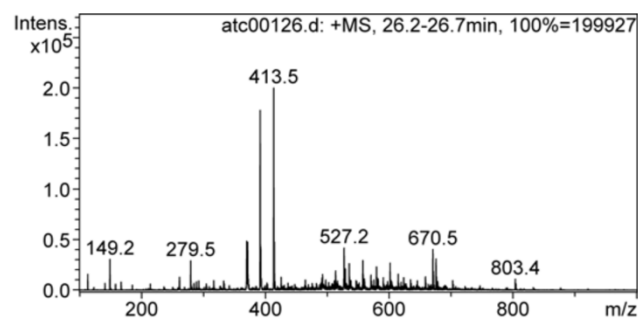


Fig. 44 Cromatograma del compuesto 20 de la fracción 3

Tabla 41 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 21 vs Violaxantina

Original	Comp. 21	Violaxantina	
ion m/Z	intensidad	ion m/z	intensidad
508	170	508	160
509	74	509	57
518	18	518	17
520	146	520	330
521.1	184	521	131
522.1	30	522	34
549.1	18	549	14
550	8.5	550	12
551	12.4	551	12
600.5	1000	600	999

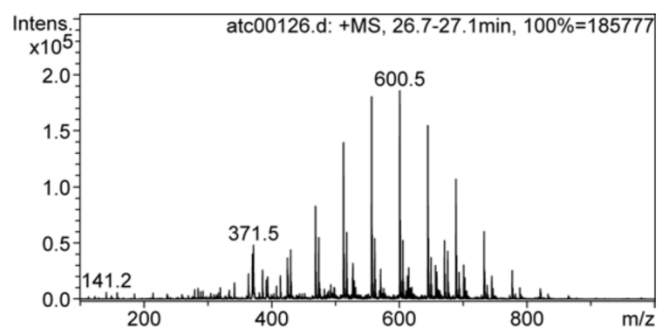


Fig. 45 Cromatograma del compuesto 21 de la fracción 3

Tabla 42 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 22 vs Quercetina

Comp. 22		Quercetina	
m/z	intensidad	ion m/z	Intensidad
370	807.545206	370	806.737661
370.9	222.7215279	370.9	222.498806
371.6	340.4098896	371.6	340.06948
527.4	368.9666851	527.4	368.597718
610.3	416.060203	610.3	415.644143
611.3	254.7229817	611.3	254.468259
670.6	1000	670.6	999
671.6	409.0717596	671.6	408.662688
675.6	811.65071	675.6	810.83906
676.5	342.4006873	676.5	342.058287

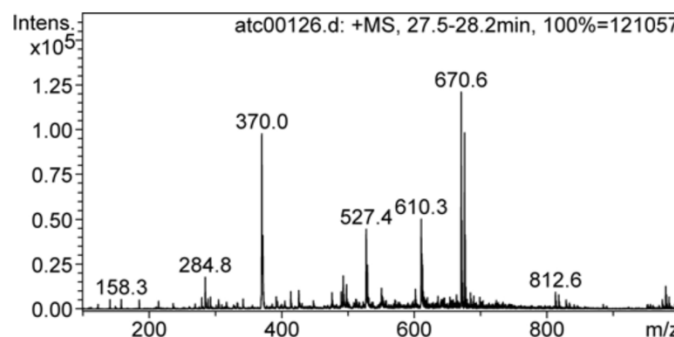


Fig. 46 Cromatograma del compuesto 22 de la fracción 3

Tabla 43 Comparación de Iones m/z e Intensidades: Compuesto 23 vs Speciosine

Comp. 23		Speciosine	
m/z	intensidad	ion m/z	intensidad
369.8	1000	369.8	999
370.7	232.4557432	370.7	232.223287
371.4	298.2750034	371.4	297.976728
492.6	163.7954453	492.6	163.63165
497.5	144.4911034	497.5	144.346612
527.2	313.6799928	527.2	313.366313
529.2	160.4337393	529.2	160.273306
610.2	346.1198895	610.2	345.77377
611.2	208.6747861	611.2	208.466111
612.2	156.9814823	612.2	156.824501

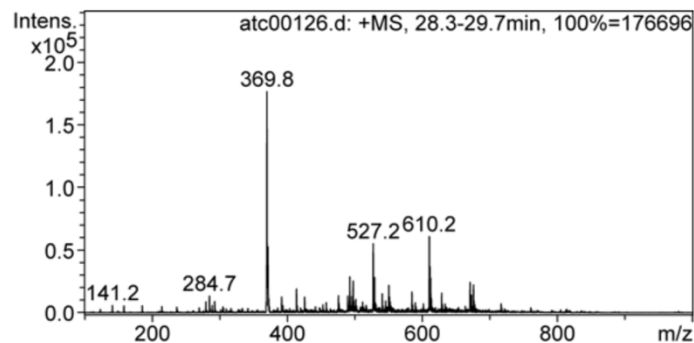


Fig. 47 Cromatograma del compuesto 23 de la fracción 3