



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
INMUNOFARMACOLOGÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE SERVICIO SOCIAL
**"ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO
TRAQUEORRELAJANTE DE DIFERENTES EXTRACTOS
ORGÁNICOS DE PLANTAS MEDICINALES"**

Presenta

Diego Vinicio Figueroa Castillo

Asesor externo

Dra. Angélica Flores Flores

Asesor interno

Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por brindarme las instalaciones para poder realizar el presente proyecto de investigación.

A la Dra. Blanca Bazán Perkins por darme la oportunidad y la confianza de estar en su laboratorio en el INER desarrollando este proyecto, pero sobre todo por su calidez humana.

A la Dra. Angelica Flores Flores del INER, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por las revisiones, los comentarios y la dirección del presente proyecto, gracias por su apoyo y enseñanzas brindadas. Pero sobre todo le agradezco por siempre mostrar un continuo interés en formarnos como profesionales y como personas.

Al Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha de la UAM-X, por su orientación y asesoramiento externo que ayudó a enriquecer este proyecto de investigación.

Al M.F Josué Martínez Miranda por las revisiones, por sus consejos y apoyo en la cromatografía en columna abierta y por el repaso de las técnicas espectroscópicas.

A la M.F Marlen Miuler Mulero Navarrete por sus consejos y enseñanzas que han sido pilares en este proyecto, por su paciencia, apoyo y conocimientos compartidos durante la parte experimental y gracias por su amistad.

Al Q.F.B Giovanni Daniel Pecina Jiménez por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto, por su paciencia infinita y por ayudarme en la parte experimental, pero sobre todo por su amistad.

A todos los compañeros del laboratorio de inmunofarmacología los cuales formaron un agradable ambiente de trabajo al mostrar su apoyo y amabilidad.

A mis padres y a mi hermana por siempre apoyarme, por darme fortaleza y guiarme por el camino correcto. Por estar conmigo en los momentos difíciles y darme un ejemplo de vida tan grande como lo son ustedes.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	Justificación	2
3	OBJETIVOS	3
3.1	General.....	3
3.2	Específicos.....	3
4	ANTECEDENTES	4
4.1	Asma.....	4
4.1.1	Fisiopatología	4
4.2	Plantas medicinales	5
4.3	<i>Taraxacum officinale</i>	6
4.3.1	Composición fitoquímica reportada	7
4.3.2	Actividades farmacológicas	7
4.4	<i>Laurus nobilis</i>	8
4.4.1	Composición fitoquímica reportada	8
4.4.2	Actividades farmacológicas	9
4.5	<i>Marrubium vulgare</i>	10
4.5.1	Composición fitoquímica reportada	10
4.5.2	Actividades farmacológicas	11
4.6	<i>Ficus carica</i>	11
4.6.1	Composición fitoquímica reportada	12
4.6.2	Actividades farmacológicas	12
4.7	Prueba de capacidad antioxidante usando DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo).....	13
5	METODOLOGÍA.....	14
5.1	Obtención de hojas de las diferentes plantas medicinales.....	14
5.2	Obtención de extractos orgánicos.....	14
5.3	Evaluación del efecto traqueorrelajante en un modelo <i>ex vivo</i> en anillos de tráquea aislada de rata	14
5.3.1	Obtención del tejido (tráquea).....	15
5.3.2	Sistema de registro.....	15

5.3.3	Determinación del efecto traqueorrelajante de los diferentes extractos	15
5.4	Pruebas fitoquímicas cualitativas.....	16
5.5	Prueba de antioxidantes mediante técnica DPPH	17
5.6	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta.....	18
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1	Obtención de los extractos orgánicos y sus rendimientos.	20
6.2	Determinación del efecto traqueorrelajante.	21
6.3	Identificación cualitativa de metabolitos secundarios.	25
6.4	Capacidad antioxidante de los extractos orgánicos.....	34
6.5	Cromatografía en columna abierta.....	47
7	CONCLUSIONES.....	54
8	BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución temporal de los estudios <i>ex vivo</i> del efecto relajante y mecanismo de acción (Flores-Flores et al., 2023).	16
Figura 2. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de <i>Taraxacum officinale</i> . Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett $*p < 0.05$	21
Figura 3. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de <i>Laurus nobilis</i> . Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett $*p < 0.05$	22
Figura 4. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de <i>Marrubium vulgare</i> . Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett $*p < 0.05$	23
Figura 5. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de <i>Ficus carica</i> . Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett $*p < 0.05$	24
Figura 6. Cromatografía en capa fina de los extractos de hoja de <i>Taraxacum officinale</i> . a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.....	28
Figura 7. Cromatografía en capa fina de los extractos de <i>Laurus nobilis</i> . a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.	28
Figura 8. Cromatografía en capa fina de los extractos de <i>Marrubium vulgare</i> . a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.	30
Figura 9. Cromatografía en capa fina de los extractos de <i>Ficus carica</i> . a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.	31

Figura 10. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Taraxacum officinale</i> evaluados por el ensayo DPPH. <i>Resultados mostrados como el promedio \pm EE.</i> ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$	38
Figura 11. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Laurus nobilis</i> evaluados por el ensayo DPPH. <i>Resultados mostrados como el promedio \pm EE.</i> ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$	39
Figura 12. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Marrubium vulgare</i> evaluados por el ensayo DPPH. <i>Resultados mostrados como el promedio \pm EE.</i> ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$	40
Figura 13. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Ficus carica</i> evaluados por el ensayo DPPH. <i>Resultados mostrados como el promedio \pm EE.</i> ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$	41
Figura 14. Gráfico cuantil-cuantil normal de los extractos de hoja de <i>Taraxacum officinale</i> evaluados por el ensayo DPPH.	43
Figura 15. Gráfico cuantil-cuantil normal de los extractos de <i>Laurus nobilis</i> evaluados por el ensayo DPPH.	44
Figura 16. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Marrubium vulgare</i> evaluados por el ensayo DPPH.	45
Figura 17. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Ficus carica</i> evaluados por el ensayo DPPH.	46
Figura 18. Resumen del fraccionamiento primario de EDHHi.	48
Figura 19. Cromatografía en capa fina de las fracciones 1-11 del extracto diclorometánico de <i>Ficus carica</i> . a) Cromatoplaça revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo.	49

Figura 20. Cromatografía en capa fina de las fracciones 12-22 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaca revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo. 50

Figura 21. Cromatografía en capa fina de las fracciones 23-31 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaca revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo. 51

Figura 22. Cromatografía en capa fina de las fracciones finales 1-7 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaca revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo. 52

Figura 23. Cromatografía en capa fina de las fracciones finales 3-5 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaca revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo. 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Rendimientos de los extractos orgánicos.....	20
Tabla 2.	Tamizaje fitoquímico de los extractos orgánicos de <i>Taraxacum officinale</i> y <i>Laurus nobilis</i>	32
Tabla 3.	Tamizaje fitoquímico de los extractos orgánicos de <i>Marrubium vulgare</i> y <i>Ficus carica</i>	33
Tabla 4.	Actividad antioxidante de los extractos orgánicos por triplicado.	36
Tabla 5.	Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta.	47

ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

μL: Microlitro

CaCl₂: Cloruro de calcio

CAT: Catalasa

CO₂: Dióxido de carbono

COVID-19: Enfermedad por coronavirus 2019

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

DPPH-H: 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

EDHDL: Extracto diclorometánico de hoja de diente de león

EDHHi: Extracto diclorometánico de hoja de higo

EDHL: Extracto diclorometánico de hoja de laurel

EDHS: Extracto diclorometánico de hierba de sapo

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHHDL: Extracto hexánico de hoja de diente de león

EHHHi: Extracto hexánico de hoja de higo

EHL: Extracto hexánico de hoja de laurel

EHHS: Extracto hexánico de hierba de sapo

EMHDL: Extracto metanólico de hoja de diente de león

EMHHi: Extracto metanólico hoja de higo

EMHL: Extracto metanólico de hoja de laurel

EMHS: Extracto metanólico de hierba de sapo

ERA: Especies reactivas de azufre

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

GINA: Iniciativa Global para el Asma

GPX: Glutación peroxidasa

GST: Glutación-S-transferasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HNO₂: Ácido nitroso

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

KCl: Cloruro de potasio

KH₂PO₄: Fosfato monopotásico

KMnO₄: Permanganato de potasio

MgSO₄: Sulfato de magnesio

mm: Milímetro

NaCl: Cloruro de sodio

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

nm: Nanómetro

NO·: Óxido nítrico

O₂: Oxígeno

$O_2^{\cdot-}$: Anión superóxido

O_3 : Ozono

$OH\cdot$: Radical hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

SOD: Superóxido dismutasa

Teo: Teofilina

UV-VIS: Espectroscopia ultravioleta-visible

$\mu\text{g/mL}$: microgramo por mililitro

μM : micromol

1 INTRODUCCIÓN.

El asma representa la enfermedad respiratoria crónica más frecuente a nivel mundial que se caracteriza por la presencia de episodios recurrentes de ataques de tos, sibilancias, disnea y sensación de opresión torácica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay 300 millones de personas que padecen asma y en el año 2019 se calculó que esta enfermedad provocó la muerte de 455,000 personas, lo que representa un gran problema de salud pública. En México se ha reportado un 8% de prevalencia promedio en la población, es decir que aproximadamente 8.5 millones de mexicanos padece de asma y no fue hasta antes de la pandemia de COVID-19 que se posicionaba como la primera causa de atención en el Servicio de Urgencias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Instituto Nacional de Salud Pública, 2022; Organización Mundial de la Salud, 2023; Secretaría de Salud, 2022).

A lo largo de la historia el ser humano ha utilizado plantas o remedios herbolarios para tratar muchas enfermedades, así como para mejorar la salud, este potencial medicinal es atribuido a la presencia de distintos fitoconstituyentes secundarios en las distintas partes de las plantas. En la actualidad siguen siendo una fuente importante de nuevos compuestos activos con potenciales efectos terapéuticos y en el desarrollo de muchos fármacos útiles para las necesidades de atención primaria de salud (Abdel-Aty et al., 2019; Manik Sharma et al., 2017; Rashid et al., 2017; Ullah & Alqahtani, 2022).

2 JUSTIFICACIÓN

El asma es una enfermedad respiratoria crónica que padecen muchos mexicanos hoy en día y cada vez su prevalencia va aumentando alrededor del mundo. Es una enfermedad que no tiene cura y que si no es tratada adecuadamente puede ocasionar la muerte, lo que la hace un gran problema de salud pública. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias el asma fue la primera causa de atención en el servicio de urgencias hasta antes de la pandemia por la enfermedad por coronavirus 2019. Las plantas medicinales han sido utilizadas desde hace mucho tiempo como tratamiento médico de distintas afecciones y enfermedades, debido a las propiedades biológicas que presentan sus metabolitos secundarios. A pesar de los avances de la medicina moderna, la gente utiliza tradicionalmente los productos naturales como una alternativa potencial terapéutica para distintos padecimientos, incluidos trastornos respiratorios como el asma. Es por este motivo que en el presente proyecto se pretende trabajar con extractos orgánicos de distintas plantas medicinales y evaluar tanto su efecto traqueorrelajante como antioxidante; determinar de manera cualitativa su composición química mediante un análisis fitoquímico preliminar y fraccionar por cromatografía en columna abierta el extracto más activo, para en un futuro conocer los constituyentes biológicamente activos que confieren su actividad antiinflamatoria.

3 OBJETIVOS

3.1 General.

Evaluar el efecto traqueorrelajante de cuatro diferentes extractos orgánicos en un modelo *ex vivo* de tráquea de rata.

3.2 Específicos.

1. Recolectar y procesar las hojas de las diferentes plantas medicinales.
2. Obtener los extractos orgánicos usando disolventes de diferente polaridad.
3. Evaluar el efecto traqueorrelajante de las diferentes plantas en anillo de tráquea de rata.
4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos vegetales con mayor actividad traqueorrelajante.
5. Realizar un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto más activo.

4 ANTECEDENTES

4.1 Asma

El asma es considerada una patología crónica de las vías respiratorias ya que generalmente persiste a lo largo del tiempo requiriendo un tratamiento continuo. De acuerdo con la OMS y el informe de GINA (Iniciativa Global para el Asma), esta enfermedad afecta mundialmente a más de 300 millones de personas y se estima que ésta cifra aumentará a 400 millones de personas para el siguiente año, debido al incremento de la contaminación ambiental ocasionada principalmente por la actividad industrial. Esto representa un problema de salud pública pues tan solo en el año 2017 hubo 383,000 muertes por asma y en 2019 se calculó que esta enfermedad provocó 455,000 muertes en el mundo (Cuevas-Schacht et al., 2020; Franken Morales et al., 2021).

El panorama en nuestro país de igual manera es preocupante pues según cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el 7.8 % de la población vive con asma cuya incidencia va en aumento, pues tan solo en el año 2020 se ubicó dentro de las primeras 20 causas de enfermedad en México. (Comisión Ambiental de la Megalópolis, 2018; Instituto Nacional de Salud Pública, 2022). El servicio de urgencias del INER reporta que hay 8.5 millones de mexicanos que padecen esta enfermedad y que previo a la pandemia por COVID-19, el asma era la principal razón de consulta en los servicios; También mencionan que el INER atendió del año 2019 a febrero de 2020 a un total de 11,500 personas con asma, de las cuales 3,226 acudieron a urgencias, 7,976 a consulta externa y solo 348 personas fueron hospitalizadas y dadas de alta (Secretaría de Salud, 2022).

4.1.1 Fisiopatología

La GINA, 2023 define al asma como es una enfermedad heterogénea, generalmente caracterizada por una inflamación crónica de las vías respiratorias, provocando que haya un estrechamiento de los bronquios (diámetro interno disminuye) y esto a su vez ocasiona que el flujo de aire que entra y sale de los

pulmones se reduzca; También hay un aumento de la mucosidad y engrosamiento de la pared de las vías respiratorias, esto se asocia a los síntomas que provoca el asma (principalmente de predominio nocturno) como lo son dificultad para respirar, falta de aire, dolor u opresión en el pecho, sibilancias al exhalar, tos, respiración sibilante y disnea (Global Initiative for Asthma., 2019, 2023; Gobierno del estado de México, 2023).

La definición del asma ha ido evolucionado constantemente a un concepto más complejo ya que hay gran variedad de células y productos celulares que juegan un papel importante en la inflamación, pues se interrelacionan y producen un incremento en la reactividad de la vía aérea; es decir que es causada por mecanismos distintos (endotipos) con una variabilidad en la expresión clínica (fenotipos). Otra de las características fundamentales del asma es la hiperrespuesta de las vías aéreas ante estímulos tanto exógenos como endógenos, que pueden ocasionar uno o varios de los síntomas previamente mencionados (Larenas-Linnemann et al., 2017, 2021; Mazacón Mora et al., 2020).

4.2 Plantas medicinales

Las plantas han sido la raíz principal de la medicina tradicional desde la antigüedad ya que el hombre las ha utilizado como terapia para la salud y hoy en día aún tienen un papel importante en la atención primaria de la salud de la mayor parte de la población mundial, pese a los avances de la medicina moderna. Se estima que en el mundo hay entre 300.000 y 315.000 especies de plantas, de las cuales cerca de 10.000 especies vegetales se utilizan con fines medicinales, la mayor parte en sistemas de medicina tradicional. El 75% de la población mundial principalmente constituida por países en vías de desarrollo, consumen menos del 15% del mercado total de medicamentos, por lo que en los sectores más vulnerables de ésta población las plantas medicinales representan una única alternativa terapéutica (Rojas et al., 2009; Ullah & Alqahtani, 2022).

El potencial terapéutico que presentan las plantas medicinales se debe principalmente a los metabolitos secundarios que éstas producen. Pino y colaboradores (2017) mencionan que las plantas además de presentar un metabolismo primario poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, los cuales presentan numerosas propiedades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otros) y que a su vez se utilizan en diversos productos para usos farmacéuticos (Ali Esmail Al-Snafi et al., 2021; Khodja et al., 2023). La gente utiliza las plantas medicinales para el tratamiento médico de diversos desórdenes, entre ellos los respiratorios en los que está incluido el asma; ya que en estos desórdenes están involucrados diferentes mediadores inflamatorios (Saadat et al., 2022).

4.3 *Taraxacum officinale*

Comúnmente conocido como diente de león, es una planta herbácea que pertenece a la familia Asteraceae y que se encuentra en Europa, Asia y Norte América. Se caracteriza por tener hojas dentadas y flores de color amarillo dorado que florecen todo el año. Debido a que es una planta muy común por su fácil propagación, ha sido utilizada como objeto de estudio desde tiempos antiguos siendo una planta que tiene muchas propiedades medicinales, las cuales son proporcionadas por los fitoquímicos presentes en las diferentes partes de la planta. También se ocupa como ingrediente para la preparación de distintos platillos de comida, en especial las hojas debido a su alta concentración de ácidos grasos, vitaminas y minerales (Di Napoli & Zucchetti, 2021).

4.3.1 Composición fitoquímica reportada

Se han encontrado e identificado muchos fitoquímicos en las hojas, flores, tallos y raíces de la planta *Taraxacum officinale*, entre los más importantes se encuentran:

- Flavonoides como quercetina, crisoeriol, luteolin-7-glucósido) apigenina-7-glucósido, isorhamnetina 3-glucósido, luteolina-7-diglucósido, quercetina-7-glucósido y luteolina.
- Ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido chicórico.
- Polisacáridos como inulina.
- Lactonas sesquiterpénicas o principios amargos como ácido taraxínico, taraxacósido, 11 β ,13-dihidrolactucina, ixerina D, taraxacólida-O- β -glucopiranosido, lactucina y cichorina.
- Esteroles como taraxasterol, β -sitosterol, estigmasterol, ψ -taraxasterol, homotaraxasterol y campesterol.
- Triterpenos como α -amirina, β -amirina, lupeol, taraxol, taraxaserol y cicloartenol.
- Carotenoides como la luteína y la violaxantina.
- Cumarinas como esculina y escopoletina (Di Napoli & Zucchetti, 2021; Hu, 2018; Prajakta N. Dongare et al., 2021).

4.3.2 Actividades farmacológicas

Taraxacum officinale tiene varias propiedades medicinales que ayudan en la prevención y tratamiento de distintas condiciones de salud, estas propiedades incluyen actividad diurética, anticolitis, inmunoprotector, antiviral, antifúngico, antibacteriano, antiartrítico, antidiabético, antiobesidad, actividad antiinflamatoria, antirreumáticas, hepatoprotector, antioxidantes y anticancerígenas (Hu, 2018; Prajakta N. Dongare et al., 2021). En el año 2013 Liu y colaboradores demostraron el efecto de *Taraxacum officinale* en un modelo de ratón alérgico y se demostró que induce un efecto protector al disminuir las

células inflamatorias en tejido de pulmón y células caliciformes presentes en la hiperplasia de vías aéreas.

4.4 *Laurus nobilis*

La hoja de laurel es un arbusto o pequeño árbol de hoja perenne (es decir que sus hojas permanecen verdes y funcionales durante todo el año) perteneciente a la familia *Lauraceae*. Es originaria de las regiones mediterráneas, aunque es ampliamente cultivada en muchas partes del mundo debido a que sus hojas se utilizan comúnmente como ingrediente culinario en la preparación de distintos platillos y bebidas. A pesar de ser una planta aromática también es considerada una planta medicinal pues se han realizado estudios sobre su composición química y el potencial farmacológico que presenta contra numerosas enfermedades (Awada et al., 2023; Paparella et al., 2022).

4.4.1 Composición fitoquímica reportada

Se pueden encontrar muchos compuestos bioactivos en la planta *Laurus nobilis* donde los principales compuestos químicos que muestran propiedades bioactivas son (Awada et al., 2023; Khodja et al., 2023):

- Flavonoides como kaempferol, kaempferol-3-O- α -L-(3',4'-di-E-p-cumaroil)-ramnósido, kaempferol-3-O- α -L-(2'-E-p-cumaroil)-ramnósido, kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-ramnósido, kaempferol-3-O-(2',4"-di-E-p-cumaroil)-ramnósido, kaempferol-3-O-arabinósido, isoquercitrina, luteolina, quercetina-3-O-ramnósido, 3'-metoxiquercetina 3-O-glucopiranósido, izovitexina-2'-ramnósido y rutina. 2'-dihidroxi- α , β -dihidrocalcon- α -hexósido, apigenina-6,8-di-C-glucósido, isorhamnetina-3-O-hexósido, kaempferol-3-O-rutinósido, luteolina-6-C -glucósido, apigenina-8-C-glucósido y apigenina-6-C-glucósido.

- Ácidos fenólicos como ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido gálico, ácido vainílico, ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico y ácido 2-hidroxicinámico.
- Glucósidos fenólicos como 2-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-etil-O-β-D-glucósido, hexósido del ácido 3,4-dihidroxibenzoico, hexósido del ácido cumárico y 1-(2'-hidroxifenil)-1- hidroxifenilpropano-α-O-hexósido.
- Flavonoles como catequina y cinamtanino B1, hexósido de epicatequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, epigalocatequina y metileugenol.
- Terpenoides como 10-epigazaniolida, gazaniolida, espirafolida, reynosina, costunolida, santamarina, lauroxepina, deshidrocostus lactona, zaluzanina D y acetato de (1R,4S)-1-hidroperoxi-p-menth-2-en-8-ol.

4.4.2 Actividades farmacológicas

Desde hace varios años el laurel se ha utilizado en la medicina tradicional debido a la presencia de distintos componentes químicos, los cuales se han investigado que poseen diversas actividades biológicas y farmacológicas incluyendo propiedades antioxidantes, antibacteriano, antifúngico, antiviral, bactericida, antidiabético, actividad antihiperlipidémica, antiulceroso, neuroprotector, analgésico, antiinflamatorio, actividad hepatoprotectora, cicatrizante, antimutagénico, insecticida, actividad inmunoestimuladora, anticonvulsivas y anticolinérgico, lo que hace que esta planta sea de gran importancia clínica (Awada et al., 2023; Khodja et al., 2023; Paparella et al., 2022). En el año 2013 Taehun y colaboradores extrajeron un metabolito activo (magnoliada) y demostraron que tenía actividad sobre mediadores que interfieren en la hipersensibilidad tipo I.

4.5 *Marrubium vulgare*

El nombre científico de la hierba del sapo o también conocido como marrubio es *Marrubium vulgare* y es una hierba perenne o anual de la familia *Lamiaceae*. Se originó a lo largo y ancho del mar Mediterráneo y la región de Asia central, pero debido a que es considerada para uso medicinal por sus propiedades beneficiosas alternativas, ha aumentado últimamente el interés y la demanda por ésta, por lo que cada vez es más común su cultivo, habitando actualmente en la mayoría de los continentes. Además de ser utilizada como medicina tradicional también se ocupa en la industria alimentaria, por ejemplo, como complemento en ensaladas, en la preparación de infusiones, como sustituto del lúpulo, entre otras (Aćimović et al., 2020; Ullah & Alqahtani, 2022).

4.5.1 Composición fitoquímica reportada

Los usos medicinales de *Marrubium vulgare* se deben a la presencia de compuestos fitoquímicos como lo son (Aćimović et al., 2020; Amessis-Ouchemoukh et al., 2014):

- Monoterpenos como ácido marrúbico y glucósido sacranósido A (mirtenil 6-O- α -l-arabinopiranosil- β -d-glucopiranosido).
- Lactonas sesquiterpénicas como vulgarina
- Diterpenoides como marrubiina (la predominante) pre-marrubiina, 12(S)-hidroximarrubiina, 11-oxomarrubiina, 3-desoxo-15(S)-metoxivelutina, marrubenol, marruliba-acetal, cilenilo A, poliodonina y preleosibirina. Peregrinol, peregrinina, dihidroperegrinina, vulgarol, vulgarcósido A, desacetilvitexilactona, carnosol y deacetilforskolina.
- Fitoesteroles como β -sitosterol.
- Triterpenoides como lupeol y ácido oleanólico.
- Cumarinas como umbeliferona y esculina.
- Ácidos fenólicos como ácidos gálicos, gentísico, *p*-hidroxibenzoico, protocatequiico y siríngico.

- Ácidos cinámicos como ácidos transcinámico, cafeico, ferúlico, *o*-cumarínico, *p*-cumarínico y sinápico.
- Ésteres del ácido cinámico como ácidos clorogénicos, cafeoilmálicos y rosmarínico.
- Flavonoides como apigenina, luteolina, crisoeriol y diosmetina.
- Glucósidos feniletanoides como actósido, alysonósido, arenanósido, ballotetrósido y marrubósido.

4.5.2 Actividades farmacológicas

De acuerdo con numerosos estudios *Marrubium vulgare* es considerada como una prometedora planta medicinal pues podría utilizarse en varias aplicaciones médicas debido a que posee una amplia gama de actividades farmacológicas, entre ellas efectos antiinflamatorios y analgésicos, efectos antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianas, efectos antiparasitarios y molusquicidas, efectos antidiabéticos, hepatoprotectores, cardiovasculares, hipolipemiantes, efectos antiedematogénicos, gastroprotectores, antiespasmódicos, cicatrizante y antihipertensivo (Aćimović et al., 2020; Ali Esmail Al-Snafi et al., 2021).

4.6 *Ficus carica*

Ficus carica es un árbol originario del territorio de la India, pero se ha cultivado extensamente que ahora se puede encontrar en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Pertenece a la familia *Moraceae* y posee un alto valor económico, nutricional e histórico, además de que se ha utilizado en la formulación de medicamentos para prevenir y controlar distintas enfermedades. Los frutos que produce se les llaman higos se ocupan de igual manera en la medicina y en el área alimentaria (Abdel-Aty et al., 2019; Rashid et al., 2017).

4.6.1 Composición fitoquímica reportada

Se aislaron varios tipos de compuestos biológicamente activos de las diferentes partes de la planta como sus hojas y se encontraron (Badgujar et al., 2014; Li et al., 2021):

- Flavonoides como luteolina, quercetina, biocanina-A, luteolina-6C-hexosa-8C-pentosa, rutinósido de apigenina, rutinósido de kaempferol, rutinósido de quercetina, glucósido de quercetina, acetilglucósido de quercetina.
- Compuestos fenólicos como ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-rutinósido, ácido ferúlico, psoraleno y bergapteno.
- Triterpenoides como bauerenol, acetato de calotropenilo, acetato de lupeol, maslinato de metilo y ácido oleanólico.
- Ácidos orgánicos como ácidos oxálico, cítrico, málico, quínico, shikímico y fumárico.
- Cumarinas como murrayacarpina B, hexósido de esculetina, dihidroxicumarina, 7-hidroxicumarina (umbeliferona), felodenol A y prenil-7-hidroxicumarina.
- Ésteres como butanoato de metilo, hexanoato de metilo, acetato de hexilo, benzoato de etilo y salicilato de metilo.

4.6.2 Actividades farmacológicas

Ficus carica ha llamado la atención de investigadores de todo el mundo por las actividades farmacológicas que posee, como lo son actividades antidiabéticas, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, anticolinesterásicas, antimicrobianas, hepatoprotectoras y renoprotectoras. También por su actividad potenciadora de la memoria, actividad antipirética, antidiarreica, antivirales, actividad hipotrigliceridémica, antiplaquetaria y actividad hipocolesterolémica (Li et al., 2021; Rashid et al., 2017).

4.7 Prueba de capacidad antioxidante usando DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo)

La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) es un radical libre estable que se utiliza comúnmente en la evaluación de la capacidad antioxidante de distintos compuestos químicos, como lo pueden ser ingredientes farmacéuticos, comida o extractos de plantas. Esta técnica es ampliamente utilizada debido a que la medición de propiedades antioxidantes es rápida por el corto tiempo de reacción, la prueba es fácil de realizar por la simplicidad del procedimiento y es económica debido a los reactivos que se utilizan (Baliyan et al., 2022; Gulcin & Alwasel, 2023).

La prueba se basa en la medición espectroscópica UV-vis de la capacidad que tienen los antioxidantes en la eliminación de los radicales DPPH. Presenta un color violeta intenso, pero al entrar en contacto con la solución de una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, este color desaparece y cambia a un color amarillo; esto se debe a que el único electrón del átomo de nitrógeno en el radical DPPH se reduce a 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH-H) tomando un átomo de hidrógeno de los antioxidantes (los cuales son donadores de H). La medida espectrofotométrica de la desaparición del color violeta se realiza a la longitud de onda de $\lambda = 517 \text{ nm}$ y la absorción disminuye a medida que los pares de electrones se eliminan del radical DPPH. (Flieger & Flieger, 2020; Gulcin & Alwasel, 2023; Toche Tuesta et al., 2017).

5 METODOLOGÍA

5.1 Obtención de hojas de las diferentes plantas medicinales.

Se realizó la recolecta de las hojas de las diferentes plantas, el material se desinfectó con una solución de cloro al 1% y se secaron a temperatura ambiente a la sombra. Una vez que el material se secó, se trituró y pulverizó con ayuda de un molino eléctrico hasta obtener el material vegetal pulverizado. Posteriormente, con ayuda de una balanza se obtuvo el peso del material para después calcular los rendimientos de los extractos generados.

5.2 Obtención de extractos orgánicos

Se colocó el material vegetal pulverizado en un frasco ámbar de 1 L para someterlo a un proceso de macerado, con ayuda de una probeta se midió el disolvente utilizado en orden de polaridad creciente iniciando con hexano hasta cubrir todo el material vegetal. Se mantuvo en contacto con el disolvente correspondiente durante 72h. Después de este tiempo, se filtró el disolvente utilizado con papel filtro y se repitió este proceso por triplicado. Este procedimiento se replicó con diclorometano y metanol los cuales son disolventes de mediana polaridad y alta polaridad. Finalmente, los 3 filtrados se llevaron a sequedad mediante un rotaevaporador a presión reducida marca BUCHI®.

Se creó un acrónimo de cada extracto orgánico obtenido para poder clasificarlos por planta y disolvente con el cual se maceró; por ejemplo, el acrónimo del extracto hexánico/diclorometánico/metanólico de hoja de diente de león es EHHDL, EDHDL y EMHDL respectivamente.

5.3 Evaluación del efecto traqueorrelajante en un modelo *ex vivo* en anillos de tráquea aislada de rata

5.3.1 Obtención del tejido (tráquea)

Se ocuparon ratas Wistar (obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER) con un peso de entre 170 a 200 g las cuales se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital y posteriormente se realizó una disección superior con la finalidad de aislar la tráquea. Se removió el tejido conectivo adyacente, adipocitos y mucosidad teniendo cuidado en no perforar o dañar el tejido. Una vez limpia se cortaron de 3 a 4 anillos de aproximadamente 3 mm de longitud los cuales fueron colocados en una cámara de órgano aislado con 10 ml de solución Krebs 1X (NaCl, glucosa, NaHCO₃, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, EDTA y CaCl₂) constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂ y CO₂ 95:5 y mantenida una temperatura de 37°C y a un PH de 7.4.

5.3.2 Sistema de registro

Para determinar el efecto relajante de las muestras de prueba y controles se utilizó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. Para este tipo de sistema los anillos de la tráquea se ajustaron a la parte inferior de la cámara de incubación con un transductor de fuerza isométrico modelo Grass FT 03 el cual está conectado a un sistema Biopac 160®.

5.3.3 Determinación del efecto traqueorrelajante de los diferentes extractos

Los anillos se sometieron a una tensión basal de 2 g de fuerza y se dejaron estabilizar por 30 min. Transcurrido ese tiempo se sensibilizó el tejido durante 15 min con carbacol [1 µM] y después de la estimulación, el tejido se lavó con la solución Ringer-Krebs, para recuperar el valor basal de la tensión y pasado 20 min se volvió a repetir la sensibilización por duplicado. Posteriormente, el tejido sensibilizado se expuso a diferentes concentraciones de los extractos de forma acumulativa [3-1,000 µg/mL] en 1/2 de logaritmo (**Figura 1**) y finalmente se

hicieron curvas de concentración – respuesta con los diferentes extractos generados.

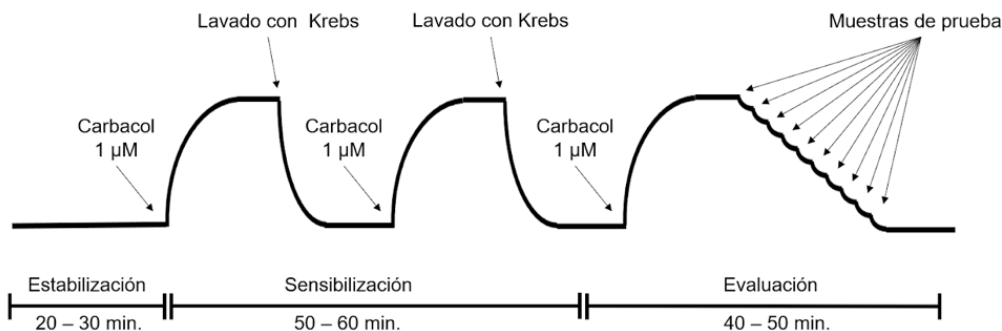


Figura 1. Evolución temporal de los estudios *ex vivo* del efecto relajante y mecanismo de acción (Flores-Flores et al., 2023).

5.4 Pruebas fitoquímicas cualitativas

Para identificar o aislar los metabolitos responsables de la relajación, se recurrió por un lado a la cromatografía en capa fina, en donde se eluyeron los diferentes extractos orgánicos por separado. Se buscó una fase móvil en la que se observara la mejor resolución de las muestras y posteriormente se revelaron en el UV de onda corta y de onda larga.

Por otro lado, se realizó un análisis fitoquímico cualitativo de los extractos orgánicos para observar los posibles metabolitos secundarios presentes, entre las pruebas realizadas:

- Prueba de NaOH (cumarinas): Se ocupó 1-2 mL de extracto en 3 mL de NaOH al 10 % (2 g NaOH en 20 mL H₂O) y se aciduló con H₂SO₄. Si se desarrolla una coloración amarilla que desaparece al acidular, es positiva.
- Prueba de saponinas: Se ocupó 1-2 mg de extracto, se depositó en 1 mL de cloroformo y se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico. La aparición de un color rojo indica que la prueba es positiva
- Prueba de Molish (azúcares): Se disolvió cada extracto en su respectivo disolvente. Se le añadieron 3 gotas de reactivo de Molisch (100 mg alfa

naftol en 10 mL de etanol 95%) y 2 mL de ácido sulfúrico. Es positiva la prueba si presenta un anillo colorido en la interfase.

- Prueba de fenoles: Se añadió 2 mL de etanol al extracto y 3 gotas de cloruro férrico al 2.5 %. La prueba será positiva cuando se forma un precipitado rojo, azul, violeta o verde y será negativa si se queda amarilla (color de la solución de cloruro férrico).
- Prueba de H₂SO₄ (flavonoides): Se ocupó una pequeña cantidad de extracto y se le añadió H₂SO₄ concentrado. Si hay coloración amarilla, será positivo para flavonoides y flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azulado será positivo a chalconas y rojo-púrpura para quinona.
- Prueba de Salkowski (Esteroles): Se ocupó 1-2 mg de extracto y se depositó 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Positiva si presenta coloración amarilla o roja.
- KMnO₄ (insaturaciones): Se ocupó 1-2 mg de muestra en 1 ml de MeOH y se añadió gota a gota de KMnO₄ al 2% (500 mg en 25 ml de H₂O Destilada). Positiva si hay decoloración o formación de precipitado café.
- Aromaticidad: Se ocupó 1 mg de extracto, se añadió 1ml de H₂SO₄ concentrado y se depositó 1 gota de formaldehído. Positivo si aparece color rojo-violeta.

5.5 Prueba de antioxidantes mediante técnica DPPH

Para determinar la capacidad antioxidante de los distintos extractos obtenidos se realizó una evaluación utilizando el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidracilo; del cual se pesó 2 mg y se aforó a 100 mL con metanol. Se utilizó como sustancia patrón el ácido ascórbico; se preparó una solución stock con una concentración de 2 mg/mL y a partir de ésta se elaboraron 3 soluciones con concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL utilizando metanol como disolvente. De igual manera para los extractos se pesó 10 mg de cada uno y se aforó a 5 mL y a partir de esta disolución se elaboraron otras 3 más con concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL utilizando metanol como disolvente.

Se utilizaron placas de Elisa para llevar a cabo la prueba, en el primer pozo se depositó 240 μL de DPPH (blanco); en el segundo se depositó 200 μL de DPPH y 40 μL de ácido ascórbico [6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y así sucesivamente en cada pozo hasta llegar a la concentración más alta (Se realizó por triplicado). Se ocupó el mismo procedimiento para depositar las muestras de los extractos. Se sometió a un periodo de incubación en la oscuridad durante 30 min y posteriormente en un espectrofotómetro UV-VIS se leyó la placa a una absorbancia de 517 nm.

5.6 Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta

El extracto con mayor actividad se fraccionó por cromatografía en columna abierta, utilizando como fase estacionaria gel de sílice con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm (Merck) y con fase móvil hexano, diclorometano y metanol. Se montó la columna a un soporte universal sujeta por pinzas y se colocó un tapón de algodón en la punta verificando que pudiera pasar disolvente a través de él. Se pesaron 15 g de sílice, se mezclaron con 52.5 mL de hexano, se dieron pequeños golpes para desgasificarlo y después se depositó en la columna. Se abrió la llave de la columna para que el disolvente bajara y facilitara la compactación de la sílice; posteriormente se pesó 1.0586 g del extracto diclorometánico de hoja de higo (EDHHi) y 1 g de sílice para mezclarlos, disolviéndolos en su respectivo disolvente y se colocó en la columna. Finalmente se puso un algodón encima del extracto y se llenó el reservorio para disolvente con hexano, se inició la elución con hexano y se fue aumentando gradualmente la polaridad con mezclas de los disolventes mencionados.

Se inició recolectando un volumen muerto de 10.36 mL (60 % del volumen de la columna) y después se recolectaron las fracciones en tubos de ensayo con volúmenes de 3.45 mL (volumen de la columna 17.27 mL / 5 platos teóricos), a cada fracción se le realizó cromatografía en capa fina y se revelaron con distintas técnicas de visualización (con luz UV de onda corta y larga, con vainillina y con

una cámara de yodo), de este modo se juntaron las fracciones que presentaron similitud cromatográfica.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de los extractos orgánicos y sus rendimientos.

De cada planta a evaluar se obtuvieron 3 tipos de extractos orgánicos disueltos en disolventes de distinta polaridad (hexano, diclorometano y metanol). En la **Tabla 1** se muestra el peso del material vegetal de cada planta después de haberlo triturado con ayuda de un molino eléctrico, el peso del extracto orgánico después del macerado y se calculó su rendimiento.

Tabla 1. Rendimientos de los extractos orgánicos

Planta	Peso inicial del material vegetal (g)	Disolvente	Extracto	Peso producto (g)	Rendimiento %
<i>Taraxacum officinale</i> (1)	40.97	Hexano	EHHDL (1)	0.6858	1.67
		Diclorometano	EDHDL (1)	2.2564	5.51
		Metanol	EMHDL (1)	*	*
<i>Taraxacum officinale</i> (2)	52	Hexano	EHHDL (2)	1.1	2.12
		Diclorometano	EDHDL (2)	0.6902	1.33
		Metanol	EMHDL (2)	3.8938	7.49
<i>Laurus nobilis</i>	140	Hexano	EHHL	3.4771	2.48
		Diclorometano	EDHL	3.4192	2.44
		Metanol	EMHL	20.928	14.95
<i>Marrubium vulgare</i>	56	Hexano	EHHS	0.9168	1.64
		Diclorometano	EDHS	1.1594	2.07
		Metanol	EMHS	4.2192	7.53
<i>Ficus carica</i> (1)	56	Hexano	EHHHi	N/A	N/A
		Diclorometano	EDHHi	1.0127	1.81
		Metanol	EMHHi	3.1691	5.66
<i>Ficus carica</i> (2)	70	Hexano	EHHHi (2)	1.508	2.15
		Diclorometano	EDHHi (2)	0.9702	1.39
		Metanol	EMHHi (2)	*	*

*: No se realizó maceración por falta de disolvente.

6.2 Determinación del efecto traqueorrelajante.

Se utilizó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado (sistema Biopac 160®), para evaluar el efecto relajante de los extractos orgánicos sobre anillos de tráquea de rata. Se hicieron curvas de concentración – respuesta para cada planta con sus respectivos extractos y se agregó teofilina como control positivo. La teofilina es un medicamento broncodilatador que ejerce un fuerte efecto relajante sobre la fibra muscular lisa, los bronquios y los vasos periféricos (Flores-Flores et al., 2023).

La **Figura 2** muestra el efecto relajante de los extractos orgánicos de *Taraxacum officinale* donde el EHHDL tuvo un porcentaje de relajación máximo de 19.35 %, EDHDL de 22.69 % y EMHDL de 7.52 ± 0.05 %. De los tres extractos orgánicos EDHDL fue el que presentó mayor relajación. Debido a que el efecto traqueorrelajante fue muy bajo en los 3 extractos, sólo se ocupó una n=3 para evitar el uso excesivo de animales de experimentación, reactivos y muestra.

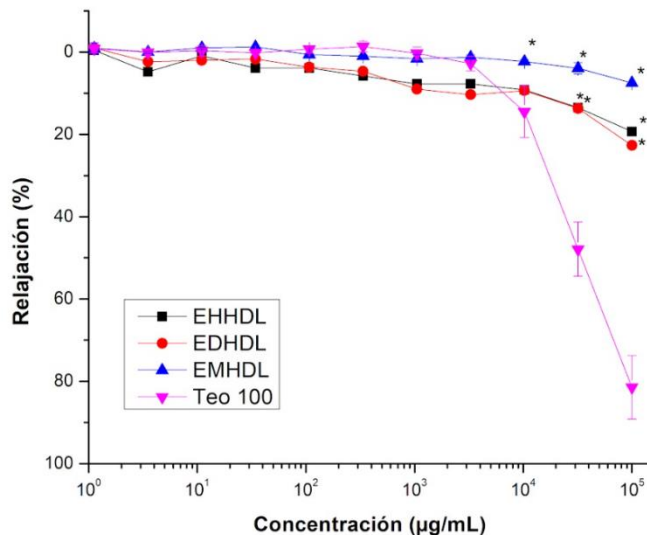


Figura 2. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de *Taraxacum officinale*. Resultados mostrados como el promedio ± EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

La **Figura 3** muestra el efecto relajante de los extractos orgánicos de *Laurus nobilis* donde el EHHL tuvo un porcentaje de relajación máximo de 49.75 ± 1.22 %, EDHL de 95.72 ± 3.70 % y EMHL de 17.67 ± 1.20 %. Se observó que de los tres extractos orgánicos EDHL fue el que presentó mayor relajación, incluso llegando a superar la teofilina. Se ocupó una n=3 para los tres extractos.

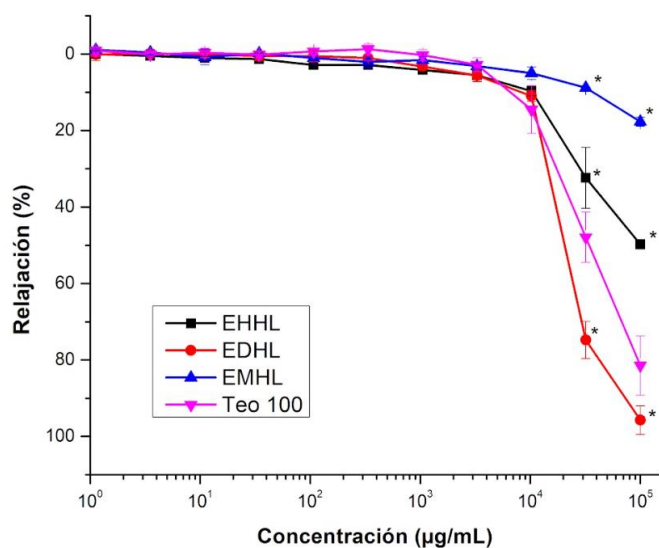


Figura 3. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de *Laurus nobilis*. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

La **Figura 4** muestra el efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de *Marrubium vulgare* donde el EHHS tuvo un porcentaje de relajación máximo de 63.49 ± 8.20 %, EDHS de 49.58 ± 5.47 % y EMHS de 17.7 ± 7.9 %. De los tres extractos orgánicos el que presentó mayor relajación fue EHHS. De menor a mayor polaridad el número de muestras fue n= 4, n=3 y n=3 respectivamente.

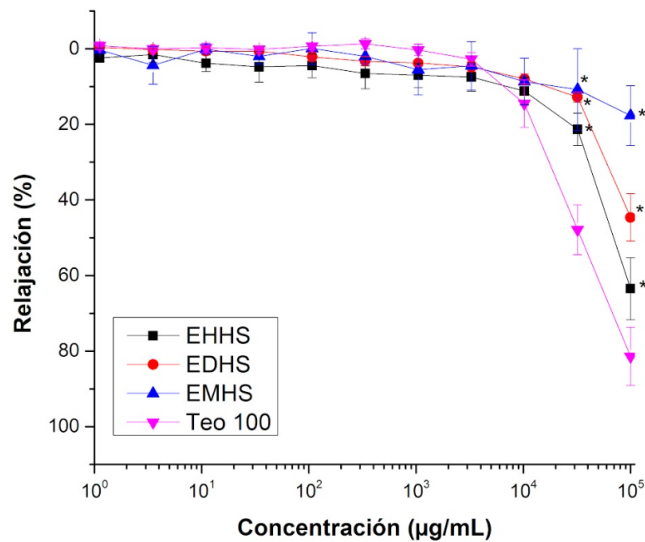


Figura 4. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de *Marrubium vulgare*. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

La **Figura 5** muestra el efecto relajante de los extractos orgánicos de *Ficus carica* donde el EHHHi tuvo un porcentaje de relajación máximo de 15.83 %, EDHHi de 103.55 ± 1.74 % y EMHHi de 62.12 %. Se observó que de los tres extractos orgánicos EDHHi fue el que presentó una mayor relajación, incluso llegó a sobrepasar por mucho la relajación de la teofilina. Se ocupó una $n=3$ para los tres extractos. De todos los extractos orgánicos evaluados EDHHi fue el que presentó el mayor efecto traqueorrelajante mayor al 100 %, por lo que se utilizó para su fraccionamiento por cromatografía en columna abierta.

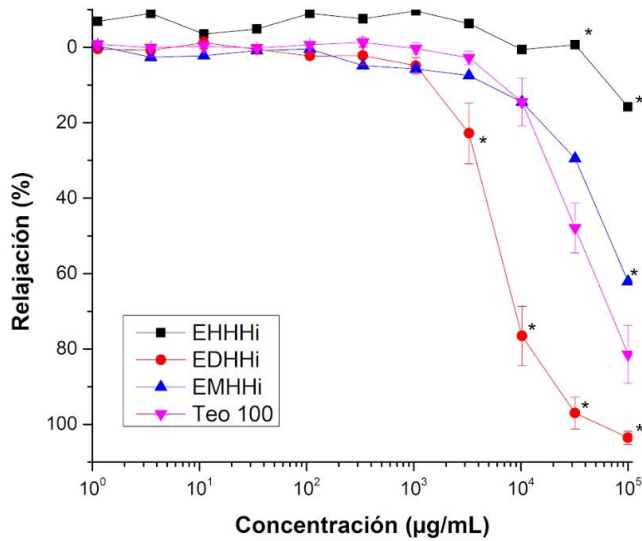


Figura 5. Efecto traqueorrelajante de los extractos orgánicos de *Ficus carica*. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

Para realizar las gráficas se utilizó el software OriginPro y en conjunto se ocupó el software estadístico GraphPad Prism versión 8.0.1 para calcular la parte estadística entre el control positivo y la actividad de los extractos.

6.3 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios.

Se realizó cromatografía en capa fina de todos los extractos orgánicos y se ocuparon dos métodos de visualización para identificar los posibles compuestos de las muestras. La cromatografía en capa fina es una técnica de separación muy utilizada para evaluar la composición de un compuesto debido a que es fácil de usar, los resultados se obtienen rápido y es económica por que no ocupa muchos reactivos. De manera general consiste en depositar un compuesto sobre una fase estacionaria, generalmente sílice o alúmina y de manera ascendente se desplazará una fase móvil (disolvente o mezcla de disolventes) que arrastrará consigo los componentes de la muestra. Debido a la diferente afinidad que tienen los componentes y la fase móvil, estos se separan a medida que avanzan por la fase estacionaria; de modo que los compuestos menos polares se desplazarán más lejos en la cromatoplaaca mientras que los más polares permanecerán más cerca del punto de aplicación (Sandtorv, 2018).

La primera técnica utilizada después de la elución de la cromatoplaaca fue la absorción ultravioleta con una lámpara UV de onda corta (254 nm), la cual se caracteriza por mostrar de color verde el fondo de la placa debido al material fluorescente que contiene la fase estacionaria y si hay un compuesto que absorba luz a esa longitud de onda se verá oscura porque evita que el material fluorescente reciba la luz UV. Es muy útil para detectar compuestos aromáticos y sistemas altamente conjugados ya que ambos absorben fuertemente los rayos UV. Además de ser rápida y fácil de utilizar, también es un método no destructivo que permite usar una técnica de visualización adicional en la misma cromatoplaaca (Nichols, 2017).

La segunda técnica que se ocupó fue el revelador de vainillina con el cual se pueden observar nucleófilos fuertes y débiles como alcoholes y aminas; además de otros grupos funcionales como aldehídos y cetonas. Los grupos funcionales que no funcionan con esta técnica son alquenos, compuestos aromáticos, ésteres y ácidos carboxílicos. La técnica consiste en saturar la cromatoplaaca en el revelador de vainillina (la cual contiene etanol y H₂SO₄) durante unos segundos

y después calentarla suavemente hasta desarrollar un fondo de rosa claro a rosa oscuro (Nichols, 2017).

En la **Figura 6** y **7** se muestra las cromatoplasmas de los extractos de hoja de *Taraxacum officinale* y *Laurus nobilis* respectivamente, para ambos se ocupó una proporción en la fase móvil de 50:45:5 hexano:diclorometano:metanol porque fue la que mostró una mejor resolución y separación de los componentes de los extractos orgánicos.

Tanto en la **Figura 6a** como la **Figura 7a** los extractos de hexano y diclorometano muestran manchas de color amarillo naranja cerca del frente de elución, lo que significa que posiblemente sea algún carotenoide o terpenoide, pues se caracterizan por ser poco polares debido a sus grupos funcionales; se observa una mancha gris casi a la mitad de la placa de los extractos orgánicos que posiblemente se trate de feofitina a un pigmento fotosintético; también se puede ver una mancha color verde oliva lo cual significa que quizás se trata de clorofila tipo a; seguido a esto se aprecian una serie de manchas verdes muy difuminadas y tal vez sea clorofila porque es más polar que los carotenoides pero menos polar que las xantofilas; las xantofilas son compuestos muy polares de color amarillo y esto concuerda con las manchas que están arriba del punto de aplicación (Chowdhury, s/f; Kakhiani, 2018; Plant Traveling Lab., 2010; Tarragó-Celada, 2019).

Los metabolitos secundarios de los extractos de plantas pueden tener una amplia gama de colores, los cuales generalmente se deben a la presencia de compuestos específicos, sin embargo, no siempre es así ya que sus espectros de absorción varían, como lo son los flavonoides, antocianinas, betalaínas, alcaloides, taninos, antraquinonas, entre otros. Por otro lado, algunos compuestos orgánicos suelen ser incoloros sobre el fondo blanco de la placa lo que dificulta su observación, por lo que se ocuparon técnicas de visualización para convertirlos en algo visible.

En la **Figura 6b** y **7b** se muestran las cromatoplasmas expuestas a luz UV de onda corta. De manera general se observó que la cromatoplasma de *Taraxacum officinale* permaneció casi igual que la **Figura 6a** sin embargo la cromatoplasma de *Laurus nobilis* en comparación con la **Figura 7a** mostró más manchas que absorbieron la luz UV en los 3 diferentes disolventes, lo que significa que hay una mayor cantidad de compuestos aromáticos y sistemas altamente conjugados; incluso se observó el recorrido de las manchas lo que nos indica que los compuestos que contiene son altamente polares al desplazarse lentamente por la fase estacionaria.

En la **Figura 6c** y **7c** se muestran las cromatoplasmas después de aplicarles revelador de vainillina. En ambos casos se observó cómo se marcó el recorrido de las manchas al igual que la **Figura 6b** y **7b** a excepción de los extractos metanólicos, lo que nos indica que hay compuestos aromáticos pues éstos absorben luz UV, pero la vainillina no los revela. En ambas placas se observó cerca del frente de elución manchas de color azul y verdes que corresponden a la coloración características de las antocianinas, en la mitad de las placas hay manchas verdes siendo clorofilas o derivados de las mismas. EDHL muestra una banda de color morada o purpura que posiblemente se trate de algún triterpeno pentacíclico o un flavonoide y también tiene una mancha rosada que corresponde a la coloración característica de los alcaloides. En las dos cromatoplasmas los extractos metanólicos muestran una mancha de color roja que quizá sea algún tipo de betalaína o betacianinas; sin embargo, también se observó que en estos mismos extractos metanólicos no hubo revelación de muchos compuestos, lo que significa que tal vez la mayoría de los compuestos se hayan concentrado en esa mancha, de manera que haya una mezcla de metabolitos como alcaloides y flavonoides.

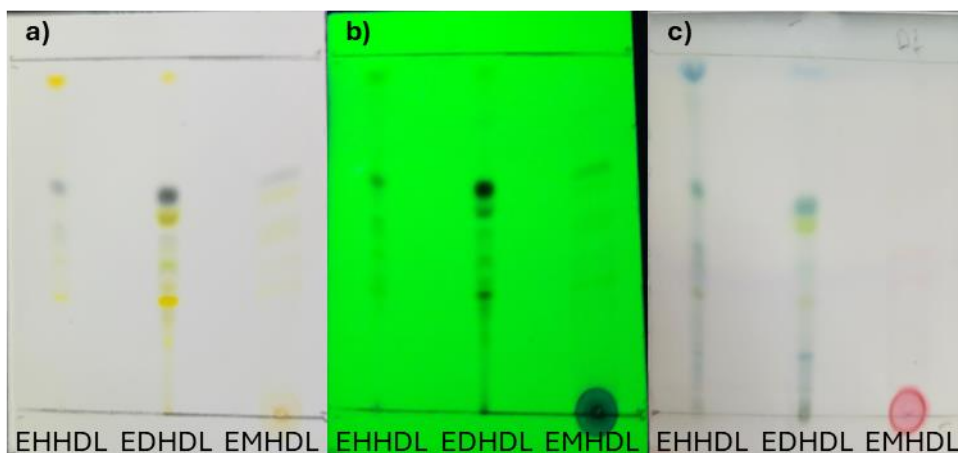


Figura 6. Cromatografía en capa fina de los extractos de hoja de *Taraxacum officinale*. a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.

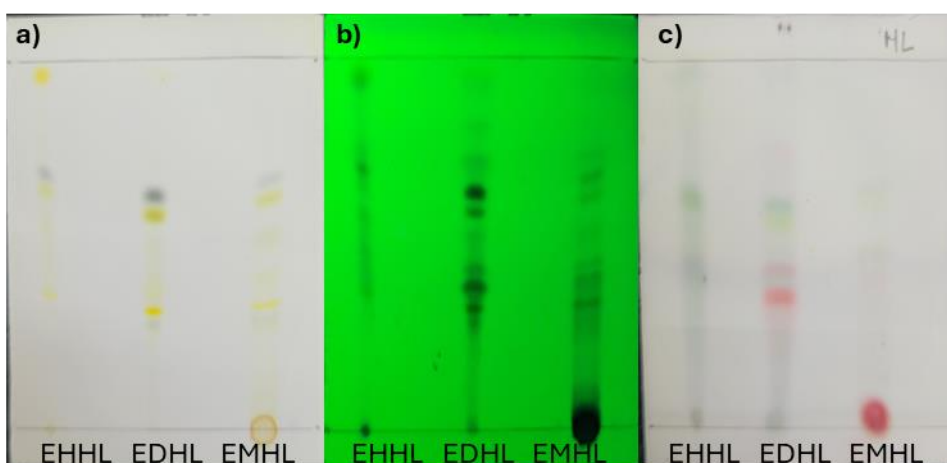


Figura 7. Cromatografía en capa fina de los extractos de *Laurus nobilis*. a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.

En la **Figura 8a** y **9a** se muestra las cromatoplaquetas de los extractos de *Marrubium vulgare* y *Ficus carica* respectivamente, para ambos se cambió la proporción de la fase móvil a 45:50:5 hexano:diclorometano:metanol ya que con la anterior proporción no había una adecuada separación de los componentes.

La **Figura 9a** a diferencia de la **Figura 8a** mostró manchas amarillo naranja cerca del frente de elución, tratándose de algún tipo de carotenoide o terpenoide por su baja polaridad al solo tener cadenas largas de carbono y dobles enlaces. A la mitad de ambas cromatoplasmas hubo presencia de manchas grises, tratándose de feofitina o algún otro pigmento fotosintético. Mientras EDHS mostró una mancha verde olivo, EDHHi mostró varias manchas de color verde claro o azulado y seguramente se traten de derivados de clorofila (clorofila tipo a y tipo b respectivamente). En la parte inferior de las dos cromatoplasmas se visualizaron manchas de color amarillo tratándose tal vez de xantofilas, compuestos altamente polares. EDHHi mostró una mancha amarilla-naranja de igual manera arriba del punto de aplicación, esta combinación quizá se deba a la existencia de compuestos como xantofilas, antraquinonas, taninos o algún flavonoide (Chowdhury, s/f; Kakhiani, 2018; Plant Traveling Lab., 2010; Tarragó-Celada, 2019).

En la **Figura 8b** y **9b** se muestran las cromatoplasmas expuestas a luz UV de onda corta. De manera general se observó que la cromatoplasma de *Ficus carica* permaneció casi igual que la **Figura 9a** sin embargo la cromatoplasma de *Marrubium vulgare* en comparación con la **Figura 8a** mostró más manchas que absorbieron la luz UV en los 3 diferentes disolventes, lo que significa que hay una mayor cantidad de compuestos con anillos aromáticos y sistemas altamente conjugados; incluso se observó el recorrido de las manchas lo que nos indica que los compuestos presentan una gran afinidad por la fase estacionaria y por lo tanto se quedan retenidos en la misma.

En la **Figura 8c** y **9c** se muestran las cromatoplasmas después de aplicarles revelador de vainillina. En ambos casos se observó cómo se marcó el recorrido de las manchas al igual que la **Figura 8b** y **9b**, lo que nos indica que hay compuestos aromáticos pues éstos absorben luz UV pero la vainillina no los revela. En ambas placas se observó cerca del frente de elución manchas de color azul y verdes que posiblemente sean antocianinas, en la mitad de las placas también hay manchas verdes tratándose tal vez de clorofilas o derivados de las

mismas. Hay algunas bandas de color café amarillo en los 3 diferentes disolventes y quizá se trate de alguna cumarina o compuesto fenólico. No se observó alguna banda de color morada o púrpura, ni alguna mancha rosada, lo que indica que posiblemente no hay presencia de algún triterpeno pentacíclico, de un flavonoide o de un alcaloide. También los extractos metanólicos no presentaron una mancha roja como las cromatoplasmas de hoja de *Taraxacum officinale* y *Laurus nobilis*, sin embargo, se observó que los compuestos separados fueron un poco más nítidos y visibles.

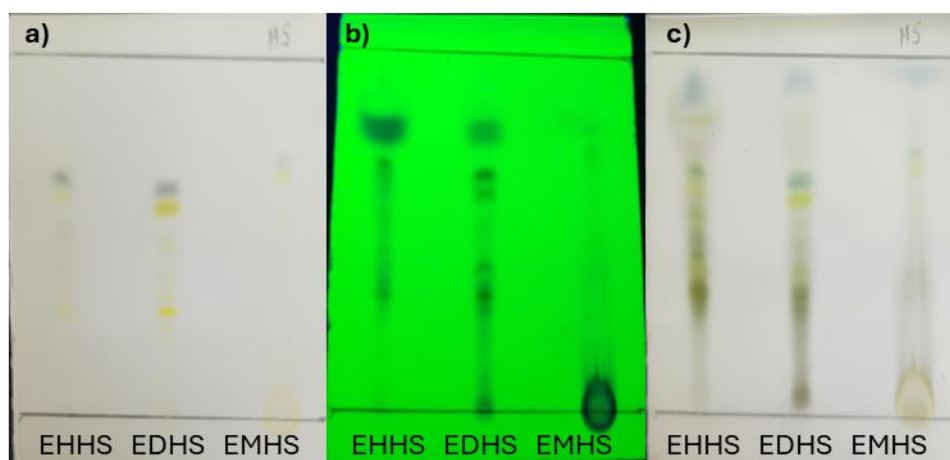


Figura 8. Cromatografía en capa fina de los extractos de *Marrubium vulgare*. a) Cromatoplasma después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.

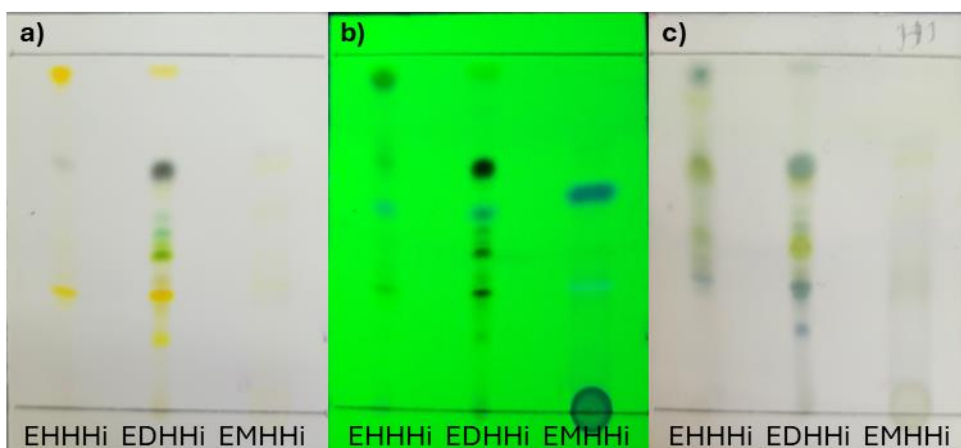


Figura 9. Cromatografía en capa fina de los extractos de *Ficus carica*. a) Cromatoplaqueta después de elución con fase móvil. b) Revelación con luz UV de onda corta. c) Revelación con vainillina.

La **Tabla 2** muestra los resultados obtenidos del análisis fitoquímico realizado a los extractos orgánicos de *Taraxacum officinale* y *Laurus nobilis*. De manera general se observó que ambas plantas dentro de su composición presentaron azúcares y fenoles. Ambas también presentaron positivo a insaturaciones y aromaticidad (a excepción de los extractos diclorometánicos) lo cual concuerda con las cromatoplaquetas reveladas con luz UV (**Figura 6b** y **7b**). También se observó que EDHDL y EDHL fueron los extractos que menos metabolitos secundarios presentaron, esto quizá se deba a que sus constituyentes sean más afines a disolventes polares y no polares.

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de los extractos orgánicos de *Taraxacum officinale* y *Laurus nobilis*.

Prueba	Metabolitos	EHDHDL	EDHDL	EMHDL	EHL	EDHL	EMHL
Prueba de NaOH	Cumarinas y lactonas	-	-	+	+	-	+
Prueba de saponinas	Saponinas	+	-	+	-	-	+
Prueba de Molisch	Azúcares	+	+	+	+	+	+
Prueba de cloruro férrico	Fenoles	+	+	+	+	+	+
Prueba de ácido sulfúrico	Flavonas y flavonoles	+	-	+	+	-	-
	Chalconas	-	-	-	-	-	-
	Quinonas	-	-	-	-	-	+
Prueba de Salkowski	Esteroles y triterpenos	+	-	+	+	-	+
Prueba de KMnO ₄	Insaturaciones	+	+	+	+	+	+
Prueba de aromaticidad	Aromaticidad	+	-	+	+	-	+

La **Tabla 3** muestra los resultados obtenidos del análisis fitoquímico realizado a los extractos orgánicos de *Marrubium vulgare* y *Ficus carica*. Los resultados sirven de complemento junto con la cromatografía en capa fina para determinar la posible presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios. Sin embargo, no se pudieron realizar las pruebas para los extractos orgánicos de *Marrubium vulgare* y EHHHi por falta de reactivos.

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de los extractos orgánicos de *Marrubium vulgare* y *Ficus carica*.

Prueba	Metabolitos	EHS	EDHS	EMHS	EHHi	EDHHi	EMHHi
Prueba de NaOH	Cumarinas y lactonas					-	-
Prueba de saponinas	Saponinas					-	-
Prueba de Molisch	Azúcares					+	+
Prueba de cloruro férrico	Fenoles					+	+
Prueba de ácido sulfúrico	Flavonas y flavonoles		-			+	-
	Chalconas		-			-	-
	Quinonas		+			-	+
Prueba de Salkowski	Esteroles y triterpenos		+			-	+
Prueba de KMnO ₄	Insaturaciones		+			+	+
Prueba de aromaticidad	Aromaticidad		+			+	+

6.4 Capacidad antioxidante de los extractos orgánicos.

Los radicales libres son moléculas o átomos que tienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa, esto los vuelve altamente reactivos siendo capaces de reaccionar con otras moléculas; se han clasificado en tres categorías principales: las especies reactivas de oxígeno (ERO), las especies reactivas de nitrógeno (ERN) y las especies reactivas de azufre (ERA) las cuales comprenden numerosas especies diferentes de oxígeno, nitrógeno y azufre respectivamente. Algunos ejemplos de estas especies reactivas son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3), ácido nitroso (HNO_2), entre otros (Baliyan et al., 2022; Gulcin & Alwasel, 2023).

Las ERO derivan tanto de fuentes endógenas como exógenas, en el primer caso su producción está compuestas de la respiración mitocondrial, NADPH y un sistema de xantina oxidasa; mientras que las ERO exógenas su producción está relacionada con factores ambientales, fuertes gases oxidantes como el ozono, las partículas originadas de la combustión incompleta de los hidrocarburos, el tabaquismo y la radiación ionizante. Además, las especies reactivas también se producen como parte del sistema de defensa de células en organismos vivos, en relación con el asma como ya se mencionó anteriormente se reclutan y activan múltiples células inflamatorias como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos; estas células inflamatorias y células epiteliales generan grandes cantidades de ERO como parte de sus mecanismos de destrucción contra organismos extraños. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad del cuerpo para neutralizarlas mediante sistemas antioxidantes puede causar daño celular y tisular, a esto se le conoce como estrés oxidativo; además este estrés oxidativo puede atacar los lípidos, las proteínas, los carbohidratos e incluso dañar el ADN, lo que en última instancia conduce a una mayor respuesta inflamatoria en el asma alérgica (K. Liu et al., 2022; Qu et al., 2017).

No obstante, el daño causado por el estrés oxidativo se puede reducir mediante el uso de antioxidantes, los cuales son sustancias químicas que minimizan el

daño oxidativo al tener la capacidad de proporcionar electrones y de esta manera neutralizar los radicales libres, previniendo daños mayores a los procesos biológicos. En el asma alérgica el sistema antioxidante está bien desarrollado, donde los pulmones tienen un sistema antioxidante completo dividido en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las principales enzimas que neutralizan las ERO son la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión-S-transferasa (GST) y la catalasa (CAT), mientras que los antioxidantes no enzimáticos incluyen vitaminas (vitaminas C y E) y minerales (selenio, zinc, manganeso). En esta última subcategoría también se encuentran los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas que incluyen una amplia gama de antioxidantes como lo son polifenoles, flavonoides, carotenoides, betacaroteno, alcaloides, terpenoides, emodina, criptotanshinona y catalpol, entre otros (Baliyan et al., 2022; Flieger & Flieger, 2020; K. Liu et al., 2022; Qu et al., 2017).

La **Tabla 4** muestra los resultados obtenidos del espectrofotómetro UV-VIS tras leer la placa de Elisa a una absorbancia de 517 nm. Hay tres absorbancias para cada diferente concentración ya que se hizo por triplicado y la actividad antioxidante se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de actividad antioxidante} = \left(\frac{Abs_c - Abs_m}{Abs_c} \right) \times 100$$

Donde abs_c es la absorbancia del control y abs_m es la absorbancia de la muestra (Baliyan et al., 2022). En la prueba se determinó la absorción inicial del blanco DPPH y la absorción resultante al añadir el posible antioxidante presente en los extractos orgánicos, de manera que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debido a la cesión de electrones de la especie antioxidante (Toche Tuesta et al., 2017).

Tabla 4. Actividad antioxidante de los extractos orgánicos por triplicado.

<i>Muestra</i>	<i>[C]</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>Absorbancia (517 nm)</i>			<i>Act. Antioxidante (%)</i>			<i>Promedio</i>	<i>DE</i>	<i>CV (%)</i>	<i>EE</i>
Ac. Ascórbico + DPPH	Blanco	0.166	0.192	0.189	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.067	0.066	0.060	59.64	65.63	68.25	64.51	4.42	6.84	2.55
	12.5	0.066	0.066	0.065	60.24	65.63	65.61	63.82	3.10	4.86	1.79
	6.25	0.099	0.095	0.088	40.36	50.52	53.44	48.11	6.86	14.27	3.96
EHHDL + DPPH	Blanco	0.572	0.591	0.603	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.481	0.493	0.499	15.91	16.58	17.25	16.58	0.67	4.04	0.39
	12.5	0.510	0.495	0.516	10.84	16.24	14.43	13.84	2.75	19.88	1.59
	6.25	0.365	0.517	0.531	36.19	12.52	11.94	20.22	13.84	68.43	7.99
EDHDL + DPPH	Blanco	0.563	0.607	0.600	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.482	0.513	0.509	14.39	15.49	15.17	15.01	0.57	3.76	0.33
	12.5	0.485	0.514	0.534	13.85	15.32	11.00	13.39	2.20	16.41	1.27
	6.25	0.498	0.496	0.538	11.55	18.29	10.33	13.39	4.29	32.01	2.47
EMHDL + DPPH	Blanco	0.524	0.543	0.553	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.414	0.447	0.437	20.99	17.68	20.98	19.88	1.91	9.60	1.10
	12.5	0.425	0.459	0.437	18.89	15.47	20.98	18.45	2.78	15.07	1.61
	6.25	0.451	0.452	0.439	13.93	16.76	20.61	17.10	3.35	19.62	1.94
EHHL + DPPH	Blanco	0.560	0.588	0.610	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.476	0.486	0.475	15.00	17.35	22.13	18.16	3.63	20.01	2.10
	12.5	0.449	0.502	0.547	19.82	14.63	10.33	14.93	4.75	31.85	2.74
	6.25	0.461	0.518	0.507	17.68	11.90	16.89	15.49	3.13	20.21	1.81
EDHL + DPPH	Blanco	0.555	0.625	0.593	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.443	0.473	0.512	20.18	24.32	13.66	19.39	5.37	27.72	3.10
	12.5	0.395	0.471	0.501	28.83	24.64	15.51	22.99	6.81	29.61	3.93
	6.25	0.462	0.503	0.496	16.76	19.52	16.36	17.54	1.72	9.82	0.99
EMHL + DPPH	Blanco	0.559	0.627	0.584	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.404	0.428	0.420	27.73	31.74	28.08	29.18	2.22	7.61	1.28
	12.5	0.422	0.413	0.428	24.51	34.13	26.71	28.45	5.04	17.72	2.91
	6.25	0.481	0.495	0.489	13.95	21.05	16.27	17.09	3.62	21.18	2.09
EHHS + DPPH	Blanco	0.181	0.194	0.196	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.178	0.165	0.172	1.66	14.95	12.24	9.62	7.02	73.04	4.06
	12.5	0.174	0.177	0.168	3.87	8.76	14.29	8.97	5.21	58.10	3.01
	6.25	0.176	0.172	0.175	2.76	11.34	10.71	8.27	4.78	57.81	2.76
EDHS + DPPH	Blanco	0.816	0.832	0.846	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.735	0.633	0.787	9.93	23.92	6.97	13.61	9.05	66.53	5.23
	12.5	0.767	0.758	0.763	6.00	8.89	9.81	8.24	1.99	24.12	1.15
	6.25	0.757	0.755	0.751	7.23	9.25	11.23	9.24	2.00	21.64	1.15
	Blanco	0.174	0.195	0.198	0	0	0	-----	-----	-----	-----

EMHS + DPPH	25	0.158	0.159	0.144	9.20	18.46	27.27	18.31	9.04	49.37	5.22
	12.5	0.170	0.169	0.174	2.30	13.33	12.12	9.25	6.05	65.41	3.49
	6.25	0.173	0.164	0.167	0.57	15.90	15.66	10.71	8.78	81.96	5.07
EHHHi + DPPH	Blanco	0.830	0.775	0.885	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.748	0.741	0.726	9.88	4.39	17.97	10.74	6.83	63.58	3.94
	12.5	0.735	0.748	0.763	11.45	3.48	13.79	9.57	5.40	56.42	3.12
	6.25	0.720	0.735	0.734	13.25	5.16	17.06	11.83	6.08	51.39	3.51
EDHHi + DPPH	Blanco	0.552	0.604	0.594	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.496	0.497	0.523	10.14	17.72	11.95	13.27	3.95	29.79	2.28
	12.5	0.493	0.512	0.530	10.69	15.23	10.77	12.23	2.60	21.25	1.50
	6.25	0.465	0.484	0.513	15.76	19.87	13.64	16.42	3.17	19.29	1.83
EMHHi + DPPH	Blanco	0.799	0.874	0.791	0	0	0	-----	-----	-----	-----
	25	0.714	0.739	0.717	10.64	15.45	9.36	11.81	3.21	27.18	1.85
	12.5	0.762	0.744	0.745	4.63	14.87	5.82	8.44	5.60	66.39	3.24
	6.25	0.732	0.719	0.751	8.39	17.73	5.06	10.39	6.57	63.25	3.79

La **Figura 10** muestra la actividad antioxidante que presentaron los extractos orgánicos de hoja de *Taraxacum officinale* en donde el EHHDL en sus concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL tuvo un porcentaje de 16.58 ± 0.39 %, 13.84 ± 1.59 % y 20.22 ± 7.99 % respectivamente. El EDHDL tuvo un porcentaje de 15.05 ± 0.33 %, 13.39 ± 1.27 % y 13.39 ± 2.47 % respectivamente. El EMHDL tuvo un porcentaje de 19.88 ± 1.10 %, 18.45 ± 1.61 % y 17.10 ± 1.94 % respectivamente.

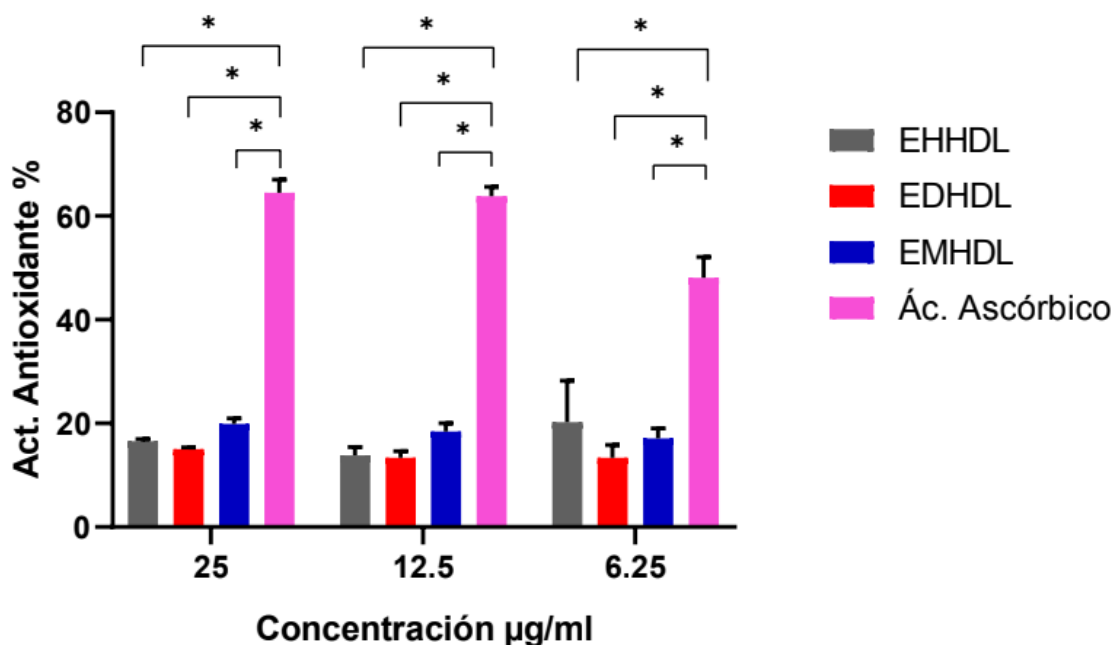


Figura 10. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de *Taraxacum officinale* evaluados por el ensayo DPPH. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

La **Figura 11** muestra la actividad antioxidante que presentaron los extractos orgánicos de *Laurus nobilis* en donde el EHHL en sus concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL tuvo un porcentaje de 18.16 ± 2.10 %, 14.93 ± 2.74 % y 15.49 ± 1.81 % respectivamente. El EDHL tuvo un porcentaje de 19.39 ± 3.10 %, 22.99 ± 3.93 % y 17.54 ± 0.99 % respectivamente. El EMHL tuvo un porcentaje de 29.18 ± 1.28 %, 28.45 ± 2.91 % y 17.09 ± 2.09 % respectivamente.

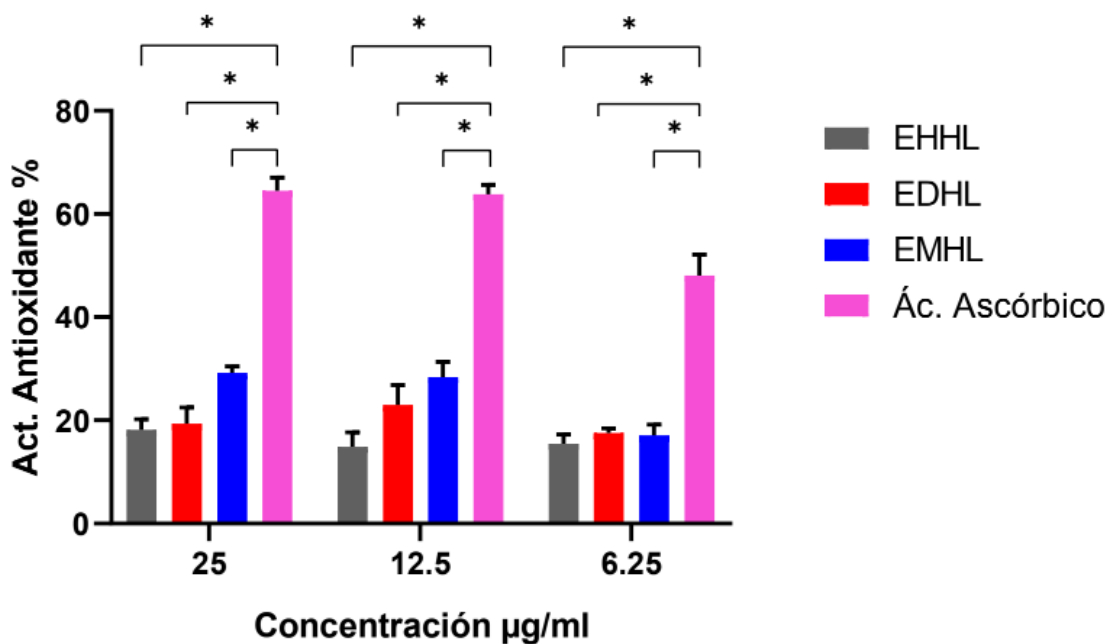


Figura 11. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de *Laurus nobilis* evaluados por el ensayo DPPH. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

La **Figura 12** muestra la actividad antioxidante que presentaron los extractos orgánicos de *Marrubium vulgare* en donde el EHHS en sus concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL tuvo un porcentaje de 9.62 ± 4.06 %, 8.97 ± 3.01 % y 8.27 ± 2.76 % respectivamente. El EDHS tuvo un porcentaje de 13.61 ± 5.23 %, 8.24 ± 1.15 % y 9.24 ± 1.15 % respectivamente. El EMHS tuvo un porcentaje de 18.31 ± 5.22 %, 9.25 ± 3.49 % y 10.71 ± 5.07 % respectivamente.

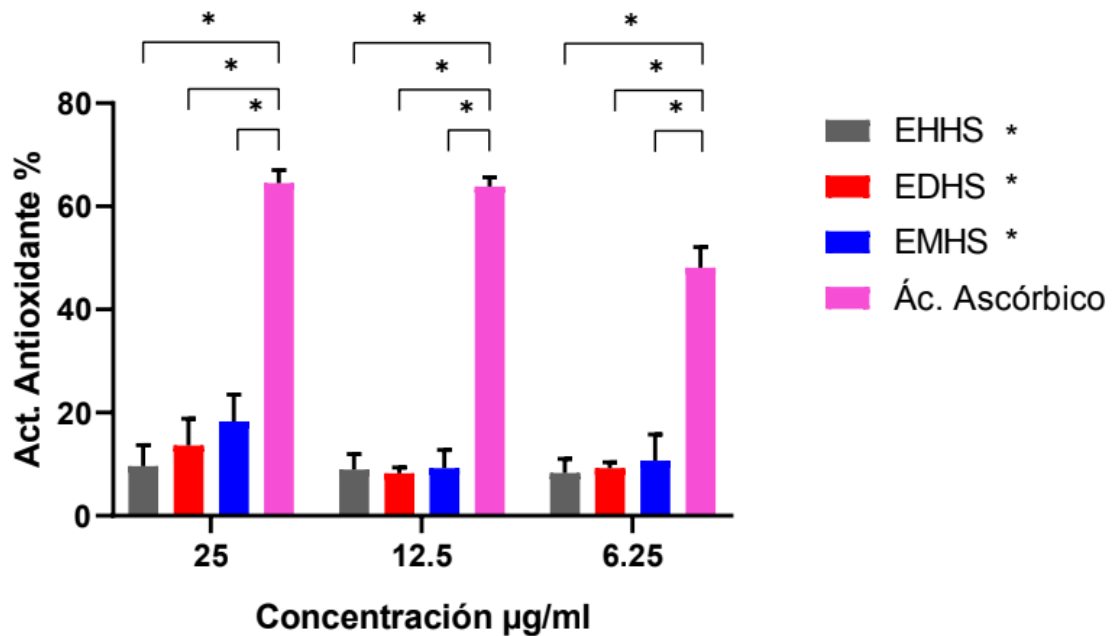


Figura 12. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de *Marrubium vulgare* evaluados por el ensayo DPPH. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

La **Figura 13** muestra la actividad antioxidante que presentaron los extractos orgánicos de *Ficus carica* en donde el EHHHi en sus concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL tuvo un porcentaje de 10.74 ± 3.94 %, 9.57 ± 3.12 % y 11.83 ± 3.51 % respectivamente. El EDHHi tuvo un porcentaje de 13.27 ± 2.28 %, 12.23 ± 1.50 % y 16.42 ± 1.83 % respectivamente. El EMHHi tuvo un porcentaje de 11.81 ± 1.85 %, 8.44 ± 3.24 % y 10.39 ± 3.79 % respectivamente.

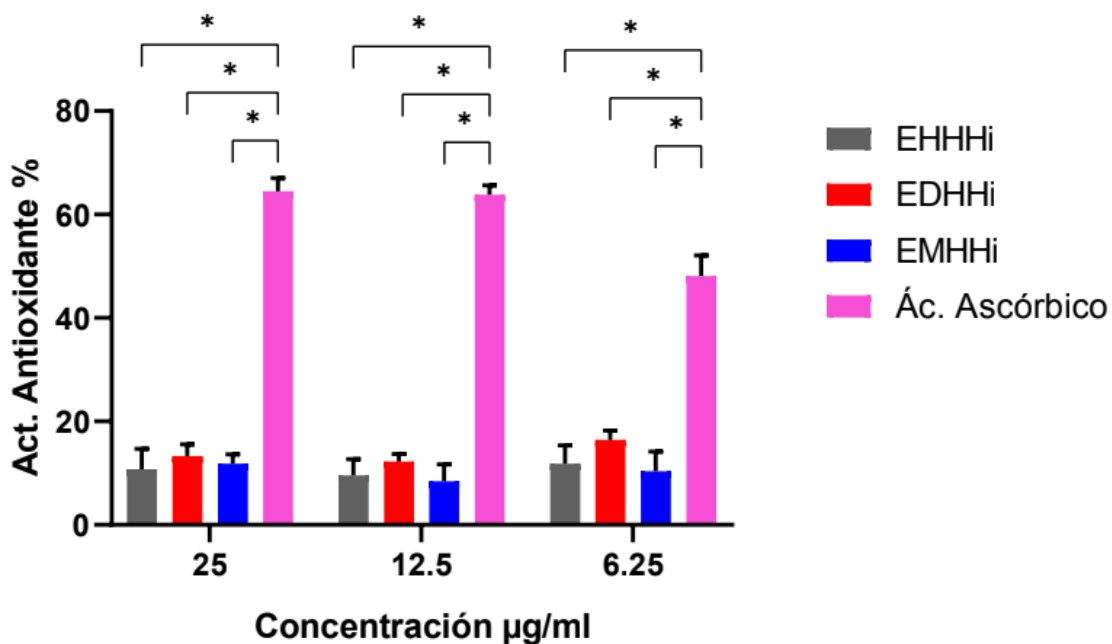


Figura 13. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de *Ficus carica* evaluados por el ensayo DPPH. Resultados mostrados como el promedio \pm EE. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett * $p < 0.05$.

Un gráfico QQ normal o cuantil-cuantil es un diagrama de dispersión que compara dos conjuntos de cuantiles entre sí, por un lado, cuantiles de las muestras observadas y por otro lado los cuantiles que se esperan observar si las muestras estuvieran distribuidas normalmente (representados como una línea recta); si los datos se encuentran en la línea o cerca de ella quiere decir que tienen una distribución aproximadamente normal. El eje Y muestra los percentiles de la muestra, mientras que el eje X muestra los valores de cuantiles teóricos (Ford, 2015; Kent State University, 2024).

Es una buena herramienta visual que ayuda a determinar la normalidad de un conjunto de datos sin embargo es algo subjetivo ya que no genera un resultado cuantitativo para comprobarlo, por lo que se recomienda realizar una prueba de hipótesis para complementar la normalidad de la muestra. Una de ellas es la prueba Shapiro-Wilk que se aplica a los datos de una muestra con la hipótesis

nula de que la muestra se ha generado a partir de una distribución normal. Un valor de p mayor que el nivel de significancia (normalmente elegido como 0.05) indica que se acepta dicha hipótesis nula por lo que la muestra se ha generado a partir de una distribución normal; mientras que si el valor de p es menor a 0.05 se rechaza la hipótesis nula y se dice que hay evidencia suficiente para concluir que los datos no se distribuyen normalmente. Esta herramienta estadística se ocupa para tamaños de muestra pequeños ya que es muy sensible cuando se trabaja con conjuntos de datos grandes (Kent State University, 2024; Malato, 2023).

Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism versión 8.0.1, por un lado, para realizar gráficos QQ normal de los datos obtenidos de la prueba de antioxidantes por el método de DPPH y visualizar si estos se distribuyen normalmente; por otro lado, se utilizó para realizar la prueba de hipótesis estadística Shapiro-Wilk para comprobar de manera cuantitativa si realmente el conjunto de datos presenta una distribución normal. A pesar de que el software puede realizar otras pruebas de hipótesis nula como por ejemplo la prueba de Anderson-Darling, la de D'Agostino-Pearson y la de Kolmogórov-Smirnov, no se ocuparon ya que para esas pruebas se necesita un tamaño de muestra grande.

La **Figura 14** muestra el gráfico QQ normal de los extractos orgánicos de hoja de *Taraxacum officinale* de la prueba de antioxidantes, se observó que los tres extractos presentaron una distribución normal incluida la sustancia patrón que es el ácido ascórbico, porque se encuentran sobre la línea recta. Para la prueba Shapiro-Wilk las muestras de EHHDL y EMHDL tuvieron un valor de p de 0.84 y 0.97 respectivamente, lo que nos indica que los datos se distribuyen de manera normal porque los valores de p son mayores que el nivel de significancia 0.05. El valor de p de la sustancia patrón fue de 0.07 por lo que de igual manera se distribuye normalmente a pesar de estar algo separada de la línea recta del gráfico QQ normal.

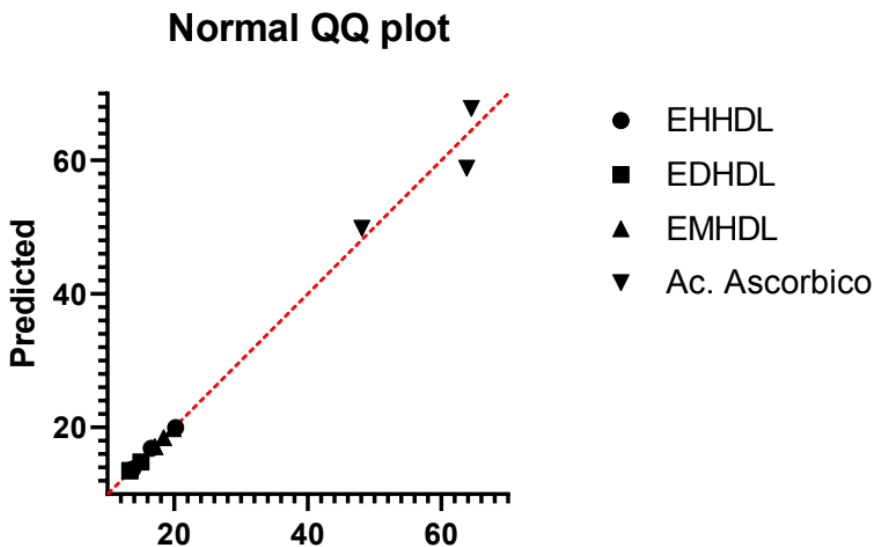


Figura 14. Gráfico cuantil-cuantil normal de los extractos de hoja de *Taraxacum officinale* evaluados por el ensayo DPPH.

La **Figura 15** muestra el gráfico QQ normal de los extractos orgánicos de *Laurus nobilis* de la prueba de antioxidantes, se observó que los tres extractos presentaron una distribución normal incluida la sustancia patrón porque se encuentran sobre la línea recta. Para la prueba Shapiro-Wilk las muestras de EHHL, EDHL y EMHL tuvieron un valor de p de 0.31, 0.65 y 0.10 respectivamente, lo que nos indica que los datos se distribuyen de manera normal porque los valores de p son mayores que el nivel de significancia 0.05. De los tres extractos EMHL fue el que tuvo un valor de p más bajo, es por eso que en el gráfico tiende a alejarse un poco de la línea recta.

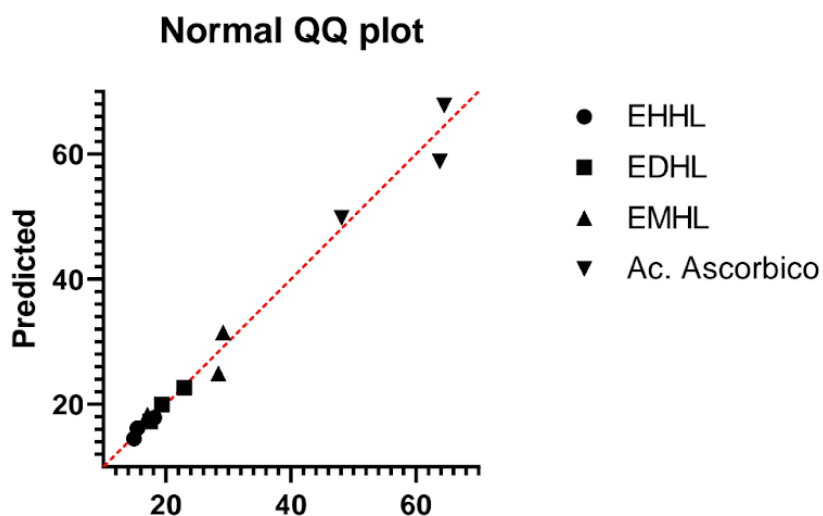


Figura 15. Gráfico cuantil-cuantil normal de los extractos de *Laurus nobilis* evaluados por el ensayo DPPH.

La **Figura 16** muestra el gráfico QQ normal de los extractos orgánicos de hierba de sapo de la prueba de antioxidantes, se observó que los tres extractos presentaron una distribución normal incluida la sustancia patrón porque se encuentran sobre la línea recta. Para la prueba Shapiro-Wilk las muestras de EHHS, EDHS y EMHS tuvieron un valor de p de 0.96, 0.34 y 0.29 respectivamente, lo que nos indica que los datos se distribuyen de manera normal porque los valores de p son mayores que el nivel de significancia 0.05.

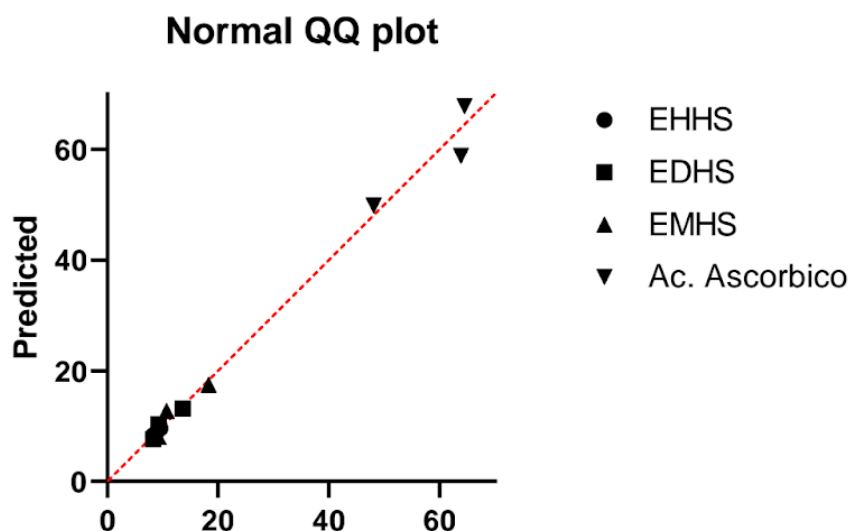


Figura 16. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de *Marrubium vulgare* evaluados por el ensayo DPPH.

La **Figura 17** muestra el gráfico QQ normal de los extractos orgánicos de *Ficus carica* de la prueba de antioxidantes, se observó que los tres extractos presentaron una distribución normal incluida la sustancia patrón porque se encuentran sobre la línea recta. Para la prueba Shapiro-Wilk las muestras de EHHHi, EDHHi y EMHHi tuvieron un valor de p de 0.96, 0.46 y 0.83 respectivamente, lo que nos indica que los datos se distribuyen de manera normal porque los valores de p son mayores que el nivel de significancia 0.05.

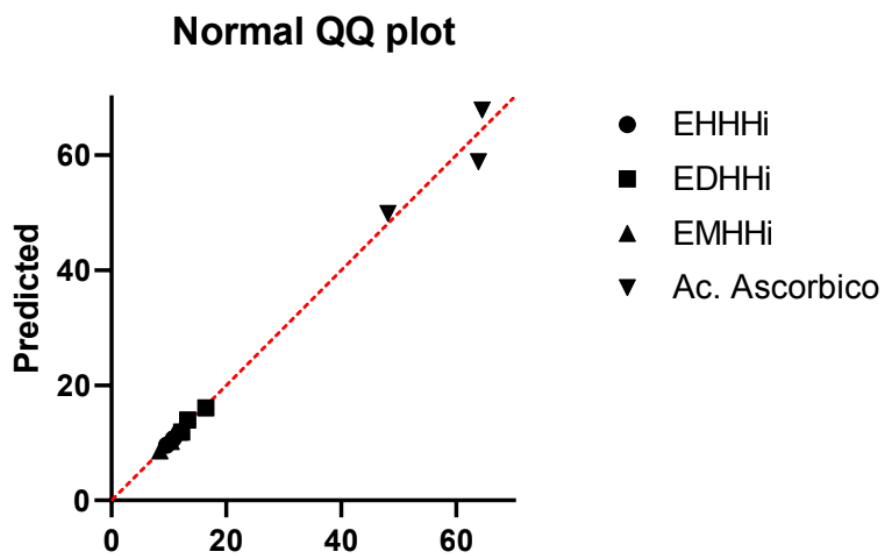


Figura 17. Porcentaje de la actividad antioxidante de los extractos de *Ficus carica* evaluados por el ensayo DPPH.

6.5 Cromatografía en columna abierta

Se ocupó EDHHi por ser el extracto orgánico con mayor actividad traqueorrelajante, debido a que no había cantidad suficiente de extracto se ocuparon muestras de dos diferentes colectas (0.7312 g y 0.3274 g) obteniendo así 1,0586 g de EDHHi total para su fraccionamiento. La elución de la columna inició con hexano como fase móvil y se fue aumentando la polaridad con mezclas de hexano, diclorometano y metanol (**Tabla 5**). El fraccionamiento primario generó un total de 408 fracciones y para disminuir este número se realizó cromatografía en capa fina, uniendo las distintas fracciones por similitud cromatográfica y de esta manera se generaron 5 fracciones finales de EDHHi como se puede observar en la **Figura 18**.

Tabla 5. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta.

Sistema de elución	Proporción	# Fracción	Clave
Hexano	100	1 – 48	F1
Hexano:diclorometano	90:10	47 – 60	F2
		61 – 67	F3
		68 – 84	F4
	80:20	85 – 92	F5
		93 – 108	F6
	60:40	109 – 126	F7
		127 – 132	F8
		133 – 137	F9
	50:50	138 – 149	F10
		150 – 154	F11
		155 – 157	F12
		158 – 170	F13
		171 – 176	F14
		177 – 188	F15
	45:55	189 – 199	F16
		200 – 211	F17
	Hexano:diclorometano:metanol	45:54:1	212 – 238
239 – 244			F19
245 – 251			F20
Hexano:diclorometano:metanol	45:53:2	252 -258	F21
		259 – 265	F22
		266 – 273	F23
		274 – 291	F24
		292 – 295	F25
Hexano:diclorometano:metanol	45:52:3	296 – 317	F26

Hexano:diclorometano:metanol	45:51:4	318 – 358	F27
Hexano:diclorometano:metanol	45:50:5	359 – 386	F28
		387 – 408	F29
		N/A	F31
Metanol	100	N/A	F30

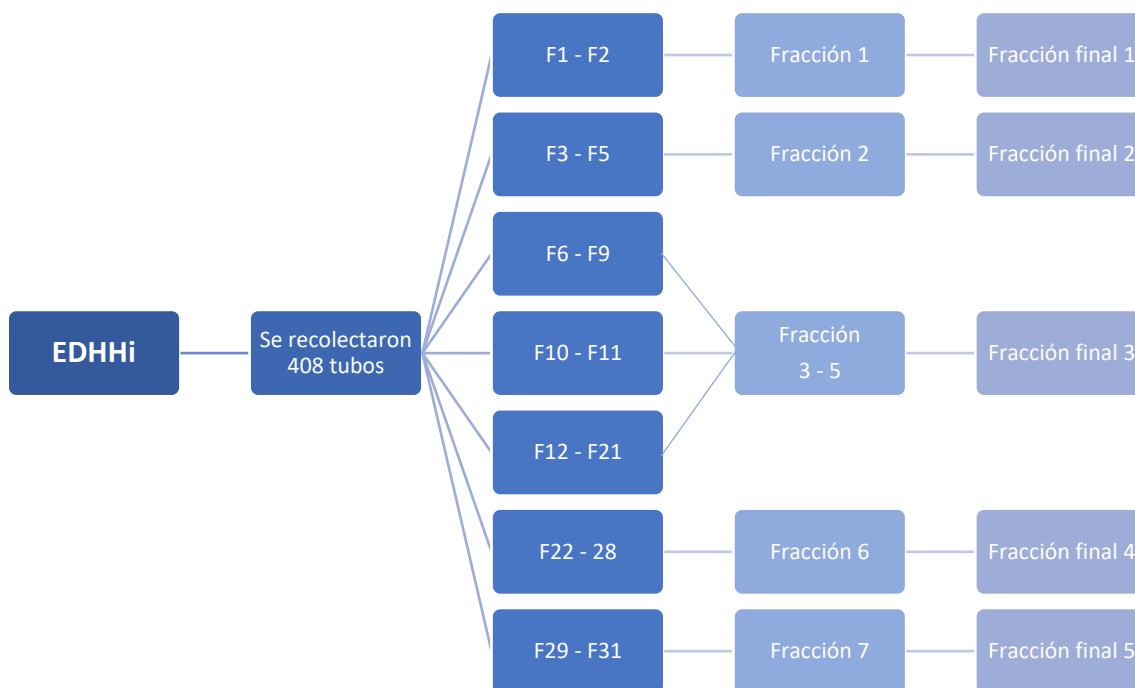


Figura 18. Resumen del fraccionamiento primario de EDHHi.

En las **Figuras 19, 20 y 21** se muestran las cromatografías en capa fina realizadas a las fracciones que se juntaron de los 408 tubos. En la **Figura 19** se plaqueo de la fracción 1 a la fracción 11 usando como fase móvil una proporción 50:50 hexano:diclororometano porque como fueron las primeras fracciones en salir tenían una polaridad baja. Se observó que tanto F1 como F2 se veían igual después de revelar la cromatoplaa a) por lo que se juntaron; de igual manera de la fracción 3 a la 5 se juntaron porque presentaron las mismas manchas en la cromatoplaa b); también se juntaron F6 a F9 porque al revelar con UV y yodo presentaron un mismo recorrido de sus componentes y finalmente se juntó F10 y F11 ya que en las tres placas se ven casi iguales.

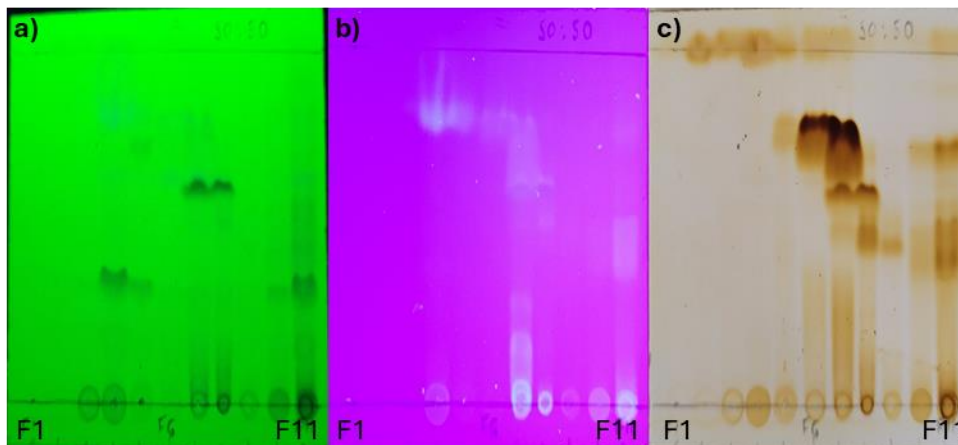


Figura 19. Cromatografía en capa fina de las fracciones 1-11 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaqueta revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo.

La **Figura 20** muestra una cromatoplaqueta revelada en donde se colocaron las muestras de la fracción 12 a la fracción 22 y como fase móvil se utilizó una proporción 45:54:1 hexano:diclorometano:metanol porque las fracciones tenían una mayor polaridad. En este caso la cromatoplaqueta b) no proporcionó mucha información en cuanto al contenido metabólico, sin embargo en la placa a) y c) si se aprecian los componentes de las fracciones. Se junto de la fracción 12 a la 21 ya que de manera general se observó que esas fracciones tienen mucha similitud, sobre todo al verlas en la placa a).

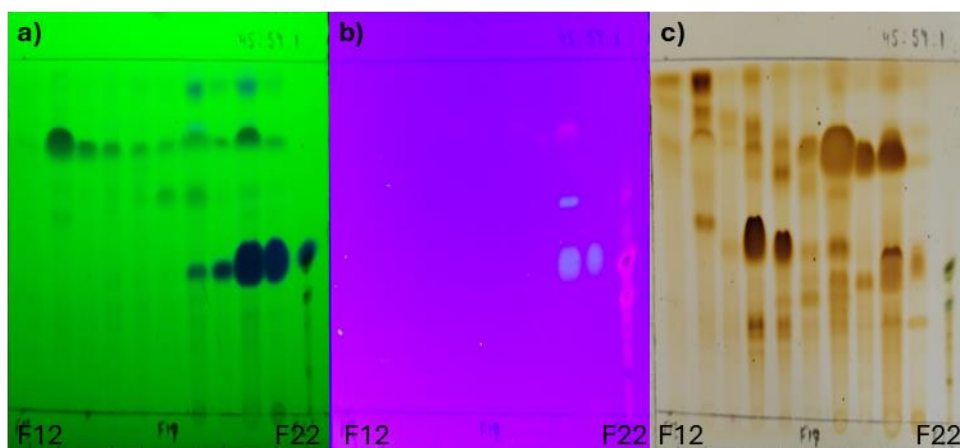


Figura 20. Cromatografía en capa fina de las fracciones 12-22 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaqa revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo.

La **Figura 21** muestra cómo se plaquearon las últimas fracciones de la F23 a la F31, se volvió a utilizar la misma proporción de fase móvil 45:54:1 hexano:diclorometano:metanol porque hubo una buena separación de las muestras. En las tres cromatoplaqas se observó que de F22 a F28 tuvieron manchas que se visualizaron a la misma altura, además de observarse una característica banda color verde a la mitad de la placa, es por eso que se decidió juntar estas fracciones; finalmente se juntaron F29 a F31 por que se veían igual.

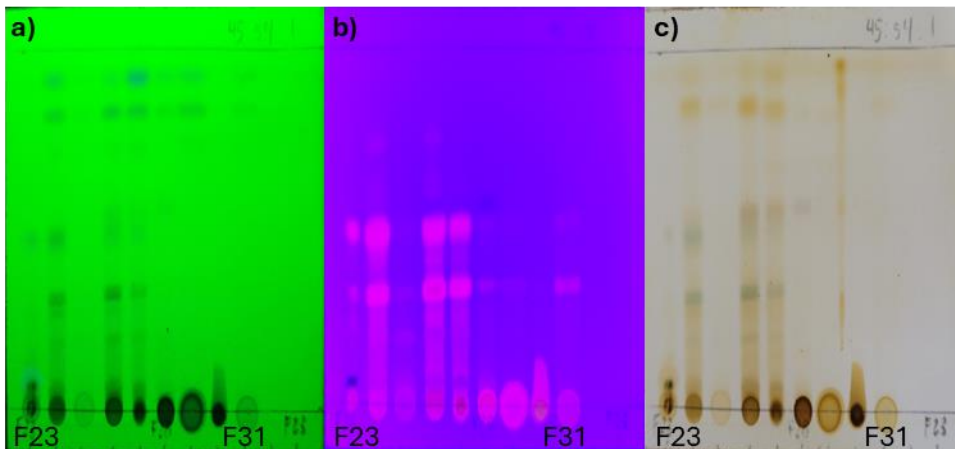


Figura 21. Cromatografía en capa fina de las fracciones 23-31 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaqueta revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo.

Después de separar las fracciones por similitud cromatográfica se redujo el número de fracciones obtenidas, pasando de 31 fracciones a 7 fracciones. Para comprobar que esas 7 fracciones eran distintas se volvió a realizar una cromatografía en capa fina (**Figura 22**). Al tener que realizar una cromatografía en placa fina que considera todas las fracciones reunidas, se buscó una proporción de fase móvil la cual sirviera para eluir y separar todas las fracciones en una sola cromatoplaqueta; la fase móvil que se ocupó fue 45:54:1 hexano:diclorometano:metanol ya que fue esa fase la que proporcionó una mejor resolución al momento de eluir la mayoría de las fracciones (**Figura 20 y 21**).

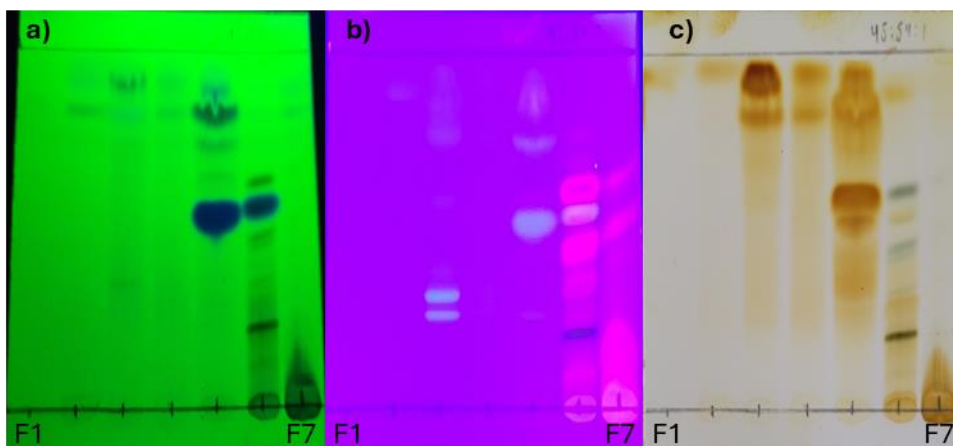


Figura 22. Cromatografía en capa fina de las fracciones finales 1-7 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaqueta revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo.

La **Figura 22** mostró que las 7 fracciones eran distintas, sin embargo, de la fracción 3 a la fracción 5 se veían casi idénticas ya que presentaron manchas que se desplazaron a la misma altura. Para comprobar si estas tres fracciones eran iguales o diferentes se volvió a realizar otra cromatografía en capa fina (**Figura 23**) solo que esta vez se buscó una fase móvil de menor polaridad para evitar que los compuestos no llegaran cerca del frente de elución y obtener una mejor resolución. La fase móvil que se ocupó fue 60:39:1 hexano:diclorometano:metanol. De manera general se observó que en las tres cromatoplaquetas presentaban una resolución similar de sus componentes, por lo que se decidió juntar las tres fracciones. De esta manera el número de fracciones finales fue de 5 (**Figura 18**).

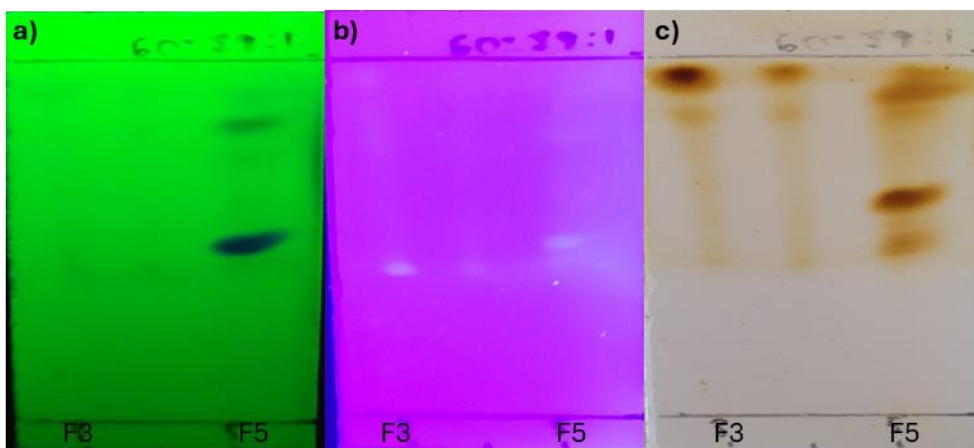


Figura 23. Cromatografía en capa fina de las fracciones finales 3-5 del extracto diclorometánico de *Ficus carica*. a) Cromatoplaqa revelada con luz UV de onda corta. b) Revelación con luz UV de onda larga. c) Revelación con yodo.

7 CONCLUSIONES

- Los extractos orgánicos que presentaron un mayor efecto traqueorrelajante fueron los diclorometánicos de hoja de *Ficus carica* (103.55 ± 1.74 %) seguido de *Laurus nobilis* (95.72 ± 3.70 %), mientras que para la mayoría de los demás extractos su actividad fue menor al 50%.
- El tamizaje fitoquímico y la cromatografía en capa fina realizado a los extractos orgánicos de todas las plantas indicó que casi todos ellos contienen anillos aromáticos en sus estructuras químicas e insaturaciones causadas por enlaces dobles o triples; además en su mayoría contienen metabolitos secundarios como fenoles, glicósidos, esteroides, triterpenos, flavonoides, cumarinas entre otros.
- La capacidad antioxidante de todos los extractos orgánicos fue muy baja (menor al 30%), sin embargo, esto no es del todo malo ya que ayudarían al sistema antioxidante de los pulmones a disminuir la producción de especies reactivas y a su vez mitigar un posible estrés oxidativo al cuerpo; por lo tanto, mitigaría el asma aguda al disminuir la hiperreactividad y la inflamación de las vías respiratorias.
- El fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto diclorometánico de *Ficus carica* permitió obtener un total de 408 fracciones iniciales de las cuales por similitud cromatográfica se redujeron y concentraron a un total de 5 fracciones finales.

8 BIBLIOGRAFÍA.

- Abdel-Aty, A. M., Hamed, M. B., Salama, W. H., Ali, M. M., Fahmy, A. S., & Mohamed, S. A. (2019). Ficus carica, Ficus sycomorus and Euphorbia tirucalli latex extracts: Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101199>
- Ácimović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiproviski, B., Sikora, V., & Zeremski, T. (2020). Marrubium vulgare L.: A phytochemical and pharmacological overview. En *Molecules* (Vol. 25, Número 12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122898>
- Ali Esmail Al-Snafi, Hussein Ali Al-Saedy, Tayseer Ali Talab, Wajdi Jabbar Majid, Gaber El-Saber Batiha, & Jafari-Sales Abolfazl. (2021). The bioactive ingredients and therapeutic effects of Marrubium vulgare - A review. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive*, 1(2). <https://doi.org/10.30574/ijbpsa.2021.1.2.0301>
- Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I. M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., & Segura-Carretero, A. (2014). Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of marrubium vulgare (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.049>
- Awada, F., Hamade, K., Kassir, M., Hammoud, Z., Mesnard, F., Rammal, H., & Fliniaux, O. (2023). Laurus nobilis Leaves and Fruits: A Review of Metabolite Composition and Interest in Human Health. En *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 13, Número 7). <https://doi.org/10.3390/app13074606>
- Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H., & Mahajan, R. T. (2014). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Ficus carica: A review. En *Pharmaceutical Biology* (Vol. 52, Número 11). <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.892515>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of Ficus religiosa. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Chowdhury, A. (s/f). *Experiment 2. Identification of Leaf Pigments by Thin Layer Chromatography*.
- Comisión Ambiental de la Megalópolis. (2018, septiembre 14). *Asma y calidad del aire en las ciudades*. Gobierno de México . <https://www.gob.mx/comisionambiental/articulos/asma-y-calidad-del-aire-en-las-ciudades?idiom=es>
- Cuevas-Schacht, F., Gómez-Vera, J., López-Estrada, E. del C., Magdaleno-Maldonado, G., Maldonado-Hernández, J. G., Moncayo-Coello, C. V., Rojo-

- Gutiérrez, M. I., Ochoa-Vázquez, D., Pech-Alonso, B., Llópiz-Avilés, M. T., Boy-Ojeda, A. E., & Lezama-Armenta, A. A. (2020). Recomendaciones de los Expertos para la Concientización del Asma en México. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, *79*(2). <https://doi.org/10.35366/94638>
- Di Napoli, A., & Zucchetti, P. (2021). A comprehensive review of the benefits of *Taraxacum officinale* on human health. *Bulletin of the National Research Centre*, *45*(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00567-1>
- Flieger, J., & Flieger, M. (2020). The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD Method on Tracking the Antioxidant Activity of Pure Antioxidants and Goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) Hydroalcoholic Extracts. *Molecules*, *25*(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25246005>
- Flores-Flores, A., Estrada-Soto, S., Millán-Pacheco, C., Bazán-Perkins, B., Hernández-Pando, R., Ibarra-Barajas, M., & Villalobos-Molina, R. (2023). Ex Vivo and In Silico Approaches of Tracheal Relaxation through Calcium Channel Blockade of 6-Aminoflavone and Its Toxicological Studies in Murine Models. *Biomedicines*, *11*(7), 1870. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071870>
- Ford, C. (2015, agosto 26). *Understanding QQ Plots*. University of Virginia Library. <https://library.virginia.edu/data/articles/understanding-q-q-plots>
- Franken Morales, S. S., Garcia Orrego, A. M., & Pabón Bonilla, D. (2021). Actualización del asma. *Revista Médica Sinergia*, *6*(10), e717. <https://doi.org/10.31434/rms.v6i10.717>
- Global Initiative for Asthma. (2019). *Guía de bolsillo para el manejo y la prevención del asma*. www.ginasthma.org.
- Global Initiative for Asthma. (2023). Definition, description, and diagnosis of asthma. En *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. (pp. 22–32).
- Gobierno del estado de México. (2023). *Panorama del Asma en el Estado de México*.
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. En *Processes* (Vol. 11, Número 8). <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Hu, C. (2018). *Taraxacum*: Phytochemistry and health benefits. *Chinese Herbal Medicines*, *10*(4). <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.08.003>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2022, mayo 2). *3 de mayo, Día Mundial del Asma*. Gobierno de México. <https://www.insp.mx/avisos/3-de-mayo-dia-mundial-del-asma>
- Kakhiani, K. , R. M. (2018). *Separation of leaf pigments by thin-layer chromatography*. www.eu-chemlab.eu

- Kent State University. (2024, mayo 10). *SPSS TUTORIALS: DESCRIPTIVE STATS FOR ONE NUMERIC VARIABLE (EXPLORE)*. Kent State University Library.
[https://libguides.library.kent.edu/SPSS/Explore#:~:text=A%20Normal%20Q%2DQ%20\(or%20Quantile,or%20close%20to%20the%20line.](https://libguides.library.kent.edu/SPSS/Explore#:~:text=A%20Normal%20Q%2DQ%20(or%20Quantile,or%20close%20to%20the%20line.)
- Khodja, Y. K., Bachir-Bey, M., Belmouhoub, M., Ladjouzi, R., Dahmoune, F., & Khettal, B. (2023). The botanical study, phytochemical composition, and biological activities of *Laurus nobilis* L. leaves: A review. En *International Journal of Secondary Metabolite* (Vol. 10, Número 2).
<https://doi.org/10.21448/ijsm.1171836>
- Larenas-Linnemann, D., Salas-Hernández, J., Del Río-Navarro, B. E., Luna-Pech, J. A., Navarrete-Rodríguez, E. M., Gochicoa, L., Cano-Salas, M. del C., García-Ramírez, U. N., López-Estrada, E. del C., Ortega-Martell, J. A., Aguilar-Aranda, A., Caretta-Barradas, S., Bedolla-Barajas, M., Camargo, R., Cuevas-Schacht, F. J., Fernández-Vega, M., García-Bolaños, C., Garrido-Galindo, C., Jiménez-Chobillón, A., ... Vázquez-García, J. (2021). MIA 2021, Manejo Integral del Asma. Lineamientos para México. *Revista Alergia México*, 68(5). <https://doi.org/10.29262/ram.v68i5.880>
- Larenas-Linnemann, D., Salas-Hernández, J., Vázquez-García, J. C., Ortiz-Aldana, I., Fernández-Vega, M., Río-Navarro, B. E. Del, Cano-Salas, M. del C., Luna-Pech, J. A., Ortega-Martell, J. A., Romero-Lombard, J., López-Estrada, E. del C., Villaverde-Rosas, J., Mayorga-Butrón, J. L., Vargas-Becerra, M. H., Bedolla-Barajas, M., Rodríguez-Pérez, N., Aguilar-Aranda, A., Jiménez-González, C. A., García-Bolaños, C., ... Castro-Martínez, R. (2017). Guía mexicana del asma: GUIMA 2017. En *Revista Alergia Mexico* (Vol. 64). <https://doi.org/10.29262/ram.v64i0.272>
- Li, Z., Yang, Y., Liu, M., Zhang, C., Shao, J., Hou, X., Tian, J., & Cui, Q. (2021). A comprehensive review on phytochemistry, bioactivities, toxicity studies, and clinical studies on *Ficus carica* Linn. leaves. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 137). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111393>
- Liu, J., Xiong, H., Cheng, Y., Cui, C., Zhang, X., Zhang, X., & Xu, L. (2013). Effects of taraxasterol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(3), 787–793.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.006>
- Liu, K., Hua, S., & Song, L. (2022). PM2.5 Exposure and Asthma Development: The Key Role of Oxidative Stress. En *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2022). <https://doi.org/10.1155/2022/3618806>
- Malato, G. (2023, mayo 2). *An Introduction to the Shapiro-Wilk Test for Normality*. Built In. <https://builtin.com/data-science/shapiro-wilk-test>

- Manik Sharma, Abid R, & Mehak Sajgotra. (2017). Phytochemical Screening and Thin Layer Chromatography of Ficus carica Leaves Extract. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/5/i1/147022>
- Mazacón Mora, M. C., Hurtado Astudillo, J. R., & Espín Mancilla, I. P. (2020). TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN PACIENTES CON ENFERMEDADES RESPIRATORIAS CRÓNICAS. *Universidad Ciencia y Tecnología*, 24(106). <https://doi.org/10.47460/uct.v24i106.404>
- Nichols, L. (2017). 2.3F: Viewing TLC plates. En *Organic Chemistry Lab Techniques* (2a ed., pp. 81–154). <https://espanol.libretexts.org/@go/page/74060>
- Organización Mundial de la Salud. (2023, mayo 4). *Asma*. OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
- Paparella, A., Nawade, B., Shaltiel-Harpaz, L., & Ibdah, M. (2022). A Review of the Botany, Volatile Composition, Biochemical and Molecular Aspects, and Traditional Uses of Laurus nobilis. En *Plants* (Vol. 11, Número 9). <https://doi.org/10.3390/plants11091209>
- Pino, N., Álvarez, R., & Prado, G. (2017). DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA A ESPECIES CON USO ETNOMEDICINAL COMO ESTRATEGIA PEDAGÓGICA EN EL AULA DE CLASE. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 29, 30–37.
- Plant Traveling Lab. (2010). *Plant Pigment Chromatography*.
- Prajakta N. Dongare, Tejashri B. Kadu, Ashish L. Pohane, Sachin J. Dighade, & Priyadarshani G. Patil. (2021). Review on Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological activity of Taraxacum officinale (Dandelion plant). *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 12(2). <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.12.2.0570>
- Qu, J., Li, Y., Zhong, W., Gao, P., & Hu, C. (2017). Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma. En *Journal of Thoracic Disease* (Vol. 9, Número 1). <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.01.05>
- Rashid, A., Khan, A. A., Dar, S., Nabi, N. G., & Teli, A. R. (2017). Phytochemical and therapeutic properties of Ficus carica Linn. : An overview. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 2.
- Rojas, L. C., Uribe, Y. H., Sierra Martínez, N., & Niño, D. R. (2009, diciembre). ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE HOJAS, TALLOS Y SEMILLAS DE CUPATÁ (STRYCHNOS SCHULTESIANA KRUKOFF). *Revista Colombia Forestal*, 161–170.
- Saadat, S., Beigoli, S., Khazdair, M. R., Amin, F., & Boskabady, M. H. (2022). Experimental and Clinical Studies on the Effects of Natural Products on

Noxious Agents-Induced Lung Disorders, a Review. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.867914>

Sandtorv, A. (2018). 2.04 TLC-ANALYSIS. En *How to be a Successful Organic Chemist* (pp. 17–19). Portland State University Library.

Secretaría de Salud. (2022, julio 8). 331. *En México, 8.5 millones de personas viven con asma: INER*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/331-en-mexico-8-5-millones-de-personas-viven-con-asma-iner?idiom=es>

Tarragó-Celada, J. , F. J. (2019). Colour, chlorophyll and chromatography. *science in school the european journal for science teachers*, 47, 41–45.

Toche Tuesta, A., Curay Carhuamaca, V. L., Diaz Barrientos, R., Fernández Rebaza, G. A., & Bonilla Rivera, P. E. (2017). Estructura química de compuestos fenólicos del extracto etanólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panisara”. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2(3). <https://doi.org/10.26722/rpmi.2017.23.66>

Ullah, R., & Alqahtani, A. S. (2022). GC-MS Analysis, Heavy Metals, Biological, and Toxicological Evaluation of *Reseda muricata* and *Marrubium vulgare* Methanol Extracts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2284328>