

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

PROYECTO SERVICIO SOCIAL

Proyecto Genérico del Departamento de Sistemas Biológicos:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Etapas: Extracción de principios activos o sustancias auxiliares a partir de productos naturales.

TÍTULO DEL PROYECTO

“AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS ANTIINFLAMATORIOS DE
GYMNOSPERMA GLUTINOSUM Y LA EVALUACIÓN DE SU ACCIÓN
FARMACOLÓGICA”

Alumno:

Estrada Barajas Sofía Abigail

Matrícula:

2183068413

Asesor interno:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez



Asesor externo:

Dr. Ernesto Sánchez Mendoza



Fecha de inicio: 15 MAYO 2023

Fecha de término: 15 NOVIEMBRE 2023

Índice

1. Introducción	4
2. Marco teórico	5
2.1. Epidemiología de la inflamación	5
2.2 Inflamación.....	5
2.3 Tratamientos para enfermedades inflamatorias.....	5
2.4 <i>Gymnosperma glutinosum</i>	6
3. Justificación	7
4. Objetivo.....	7
4.1 Objetivos específicos.....	7
5. Hipótesis	8
6. Metodología	8
6.1 Preparación de extractos orgánicos	8
6.2 Separaciones bidirigidas del extracto	8
6.3 Aislamiento y caracterización del principio activo	8
6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en modelo <i>in vivo</i>	9
6.5 Toxicidad aguda	9
6.6 Ensayo antiulcerogástrico	9
6.7 Evaluación de viabilidad y citotoxicidad de los metabolitos en modelo <i>in vitro</i>	10
6.8 Ensayo DPPH antioxidante	10
6.9 Ensayo ABTS antioxidante	10
6.10 Ensayo de Óxido nítrico	11
7. Resultados y Discusión	11
7.1 Preparación de extractos orgánicos	11
7.2 Evaluación biológica	11
7.2.1 Evaluación biológica de los extractos	11
7.2.2 Separaciones bidirigidas del extracto diclorometano	12
7.3 Evaluación biológica del compuesto F86	13
7.4 Caracterización de los principios activos	13
7.4.1 Punto de fusión	13
7.4.2 Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear	14
7.4.3 Espectro de Infrarrojo.....	17

7.4.4 Difracción de Rayos X	17
7.5 Evaluación de los metabolitos bioactivos como inhibidores de la inflamación en un modelo <i>in vitro</i>	20
7.5.1 Evaluación de viabilidad en macrófagos J774A.1	20
7.5.2 Evaluación de citotoxicidad de F86 en líneas celulares cancerígenas.....	21
7.6 Actividad antioxidante	22
7.6.1 Ensayo DPPH antioxidante	22
7.6.2 Ensayo ABTS antioxidante	22
7.7 Protección ulcerogástrica	23
7.8 Ensayo de Óxido Nítrico	24
7.9 Toxicidad Aguda	25
8. Conclusión	26
9. Bibliografías.....	26

1. Introducción

Las plantas, tanto en México como a nivel global, han desempeñado un papel fundamental como alternativas terapéuticas a lo largo de los años, formando parte de la medicina tradicional. Además, las plantas han emergido como una fuente de investigación invaluable para la generación de nuevos fármacos.

La administración prolongada de medicamentos de origen sintético puede tener efectos adversos para la salud de quienes los consumen. Este problema cobra especial relevancia en el tratamiento de diversas afecciones que demandan terapias a largo plazo, como es el caso de las enfermedades crónico-degenerativas, entre las que se incluye la artritis. Estas patologías, que involucran procesos inflamatorios, son comúnmente tratadas con el uso de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AIES y AINES). Sin embargo, el uso prolongado de estos agentes farmacológicos puede ocasionar fallos renales, hepáticos, daño gastrointestinal por úlceras, entre otros. Estas complicaciones subrayan la necesidad urgente de desarrollar y promover estrategias de tratamiento alternativas que minimicen los riesgos asociados con los AINES.

En este contexto, la búsqueda de compuestos con propiedades antiinflamatorias de origen natural adquiere una significativa importancia. La necesidad de encontrar alternativas terapéuticas, efectivas para enfermedades crónicas, que al mismo tiempo minimicen su toxicidad se convierte en un objetivo central de diversas investigaciones científicas. La presente investigación no solo representa una vía para la obtención de nuevos medicamentos, sino que también abre la posibilidad de mejorar sustancialmente la calidad de vida de las personas afectadas por condiciones crónicas de salud.

2. Marco teórico

2.1. Epidemiología de la inflamación

El aumento de enfermedades crónico-degenerativas inflamatorias, como la artritis, representan una preocupación significativa en México. En los últimos años, la prevalencia de estas condiciones ha incrementado notablemente debido a factores como el envejecimiento de la población, cambios en el estilo de vida y factores genéticos (García *et al*, 2021). Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), más del 7% de los adultos mexicanos reportaron tener algún tipo de artritis en 2020, y se espera que esta cifra siga aumentando (INEGI, 2020). Muchos pacientes que padecen artritis son tratados con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de manera crónica para manejar el dolor y la inflamación. Sin embargo, el uso prolongado de AINEs puede generar efectos adversos. En la actualidad se ha demostrado que el uso crónico de estos medicamentos está asociado con un riesgo elevado de complicaciones gastrointestinales, como úlceras y sangrado (López y Álvarez, 2019). Además, se ha observado que los AINEs pueden causar daño renal, lo que es especialmente preocupante para aquella población predispuesta a enfermedades renales crónicas. Según datos de la Secretaría de Salud (2022), aproximadamente el 15% de las hospitalizaciones por insuficiencia renal aguda en México están relacionadas con el uso de AINEs.

2.2 Inflamación

La inflamación es la respuesta inmune a un estímulo, sea una lesión biológica, química y/o física, que conlleva interacciones celulares, produciendo citocinas proinflamatorias. La inflamación puede ser aguda, caracterizada por ser de corta duración o crónica que, por su larga duración, presenta un mayor riesgo para la salud (Rodríguez *et al*, 2020).

Cada vez que el sistema inmunológico se ve desafiado por algún estímulo externo es activada la inmunidad innata como primera línea de defensa, promoviendo la activación de distintas células y la liberación secuencial o en cascada de mediadores químicos de tipo proinflamatorio, como las interleucinas, entre ellas la IL-1 β , IL-6 y la citocina TNF- α , que son secretadas por distintas células del sistema inmune innato como los neutrófilos, monocitos y macrófagos (Zhu *et al*, 2018; Villagómez *et al*, 2019). El óxido nítrico (NO) también es uno de los principales mediadores de la inflamación que estimula la activación de los macrófagos (Chang *et al*, 2019).

2.3 Tratamientos para enfermedades inflamatorias

En la actualidad, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos AINEs y esteroideos AIES, representan el mayor porcentaje de los medicamentos prescritos para el tratamiento de problemas inflamatorios debido a sus propiedades antipiréticas, antiinflamatorias y analgésicas, así como su eficacia para combatir padecimientos como dismenorrea, artritis reumatoide y otras

complicaciones musculoesqueléticas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el uso prolongado de estos medicamentos provoca diversos efectos adversos que van desde daño hepático, renal gastrointestinal, pulmonar hasta daños cerebrales (Bindu *et al*, 2020). Un ejemplo es el ibuprofeno, uno de los fármacos más populares que ofrece el mercado el cual es relativamente seguro al administrarse en dosis bajas, pero al aumentarlas, se incrementa el riesgo de efectos gastrointestinales, provocando lesiones al nivel de la mucosa gástrica llegando a causar reflujo, y acidez estomacal (Maldonado *et al*, 2024). Sin embargo, se continúa en la búsqueda de productos naturales que podrían sustituir a este tipo de fármacos debido a sus propiedades terapéuticas que presentan menor riesgo de efectos adversos. Las plantas que contienen compuestos activos hoy en día son ampliamente utilizadas a nivel mundial como principal tratamiento terapéutico. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de dos tercios de la población mundial recurren al uso de plantas medicinales que han sido utilizadas desde hace años como tratamiento contra muchas enfermedades o dolencias, lo cual es conocido como medicina tradicional (Orantes *et al*, 2018).

En México se encuentra una gran diversidad de especies de plantas, donde alrededor de 3,000 exhiben propiedades medicinales y en la actualidad, alrededor del 80% de su población sigue utilizando la medicina tradicional (Rodríguez *et al*, 2020). Por ejemplo, *Cnidioscolus chayamansa* conocida como “chaya” en el sur del país se utiliza para tratamiento de padecimientos renales y diabetes, de igual forma, a través de distintos estudios científicos, ésta ha demostrado que posee propiedades antiinflamatorias (Molina *et al*, 2024).

2.4 *Gymnosperma glutinosum*

La familia Asteraceae cuenta con alrededor de 3021 especies. *Gymnosperma glutinosum* conocida comúnmente como “tatalencho”, “escobilla” o “tezozotla”, forma parte de esta familia y es utilizada en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos como las úlceras, el reumatismo, diarrea y dolores de cabeza (Canales *et al*, 2007; Morado *et al*, 2014).

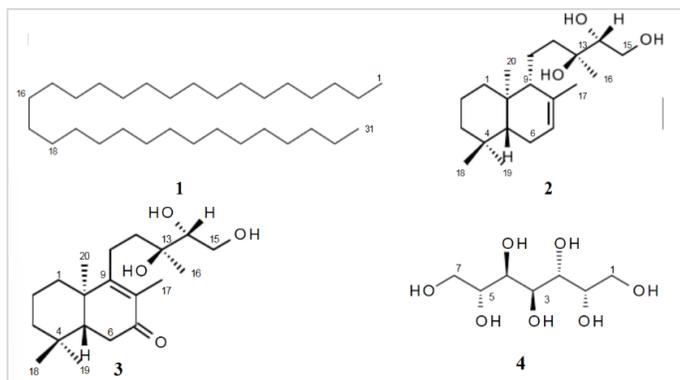


Figura 1. Estructura de los compuestos aislados de *G. glutinosum*.

Hasta ahora, se han aislado y caracterizado varios compuestos de *G. glutinosum*, incluyendo flavonoides, alquenos, aceites esenciales y diterpenos (véase Figura 1). Estos compuestos, han sido estudiados por sus diversas actividades farmacológicas, como la actividad antibacteriana, antiprotozoaria y citotóxica, entre otras. Sin embargo, a pesar de estos estudios, la actividad antiinflamatoria de estos compuestos no ha sido estudiada. (González *et al*, 2017).

3. Justificación

Las enfermedades crónico-degenerativas como lo son la artritis provocan inflamación crónica, lo que implica un grave deterioro en la salud de quien las padece. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los esteroideos (AIES) juegan un rol importante para el tratamiento de estos padecimientos, desafortunadamente, es bien sabido que su uso por tiempo prolongado presenta diversos efectos adversos como problemas gastrointestinales e insuficiencia renal. Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevas opciones de fármacos, particularmente para el tratamiento prolongado. Esta demostrado científicamente que una fuente importante para la obtención de compuestos con diversas actividades biológicas son las plantas, por ello, son consideradas como alternativa potencial para la obtención de candidatos terapéuticos que puedan usarse en el tratamiento de diferentes problemas de salud.

4. Objetivo

Aislar y determinar la estructura del o los compuestos activos de *Gymnosperma glutinosum* y evaluar su actividad antiinflamatoria por modelo *in vivo* e *in vitro*.

4.1 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de diclorometano y metanólico de *Gymnosperma glutinosum*.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los dos extractos.
- Realizar una separación biodirigida del extracto activo a fracciones y/o compuestos con base en su actividad antiinflamatoria
- Aislar y purificar el compuesto con la actividad antiinflamatoria.
- Determinar la estructura del compuesto activo por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro* del compuesto activo
- Determinar la actividad gastro-protectora del compuesto activo.
- Evaluar la actividad antioxidante del principio activo.

5. Hipótesis

Gymnosperma glutinosum, utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar problemas inflamatorios, contiene un compuesto responsable de esta actividad. Este componente puede ser aislado, purificado e identificado, permitiendo proponer un posible mecanismo de acción.

6. Metodología

6.1 Preparación de extractos orgánicos

Gymnosperma glutinosum se colectó en el estado de San Luís Potosí, se secó a la sombra a temperatura ambiente y posteriormente se molió. La planta seca y molida se extrajo por maceración con hexano durante 3 días, para quitar los ácidos grasos presentes en la planta. Después, la planta se sometió a una maceración con metanol o con diclorometano durante 3 días. Finalmente, la mezcla se filtró al vacío y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rota-evaporador y se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto con respecto al peso seco de la planta.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{EX(100)}{C_{pp}}$$

Fórmula 1. Para determinar el % de rendimiento de la planta, donde EX= Peso del extracto obtenido en la maceración, Cpp=Peso de planta con la que se hizo la maceración.

6.2 Separaciones biodirigidas del extracto

El extracto con mayor actividad antiinflamatoria fue separado por medio de cromatografía en columna abierta utilizando silica gel 60 como fase estacionaria y hexano como fase móvil al cual se le aumentó la polaridad con acetato de etilo, colectando fracciones de 150 ml las cuales fueron sometidas a cromatografía en capa fina para juntar aquellas que presentaran similitud. A las fracciones se les eliminó el disolvente al vacío en un evaporador rotativo, hasta obtener un volumen de 30 mL

6.3 Aislamiento y caracterización del principio activo

El metabolito bioactivo de la fracción activa se filtró y lavó con hexano para eliminar posibles impurezas. Posteriormente, su estructura molecular fue elucidada utilizando métodos espectroscópicos como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (FT-IR) y Espectrometría de Masa (EM).

6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en modelo *in vivo*

Se determinó la actividad antiinflamatoria en grupos de ocho ratones macho CD1 por medio del modelo de edema auricular de ratón inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA). Después de 30 minutos de la aplicación de TPA (2.0 µg/oreja), en la oreja derecha de los ratones se le administró al grupo del compuesto de prueba (extracto, fracción, compuesto); al grupo positivo el fármaco de referencia (indometacina). Después de 6 horas se sacrificaron los ratones, se les horadaron ambas orejas en círculos de 6 mm y con la diferencia de pesos se determinó el porcentaje de inhibición del edema utilizando la fórmula 2 (Campos *et al*, 2022).

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{x(Ct - C0)\text{Control} - (Ct - C0)\text{Tratado}}{(Ct - C0)\text{Control}} \times 100$$

Fórmula 2. Donde Ct= Peso de oreja tratada horadada (derecha), C0=Peso de oreja horadada sin tratamiento (izquierda), Control= grupo control negativo (administrado únicamente con TPA) y Tratado= grupo tratado con indometacina o con compuesto de prueba.

6.5 Toxicidad aguda

Se emplearon lotes de 5 ratones macho de la cepa CD1, distribuidos según los grupos predefinidos. Un grupo de control negativo, y tres grupos de ensayo según las dosis administradas (grupos 1, 2 y 3; con concentraciones de 5000 mg/kg, 2500 mg/kg y 1250 mg/kg respectivamente) vía oral por sonda intragástrica (Silverio *et al*, 2016). Posteriormente, los ratones se mantuvieron en observación por las siguientes 72 horas y se sacrificaron por dislocación cervical para realizar una necropsia completa donde se analizaron diferentes órganos como hígado, estómago, riñones, bazo e intestinos, a los cuales se extendieron en cajas Petri con PBS (buffer fosfato salino) para identificar las características morfológicas o daños observables con respecto al grupo control (Campos *et al*, 2021).

6.6 Ensayo antiulcerogástrico

Grupos de ocho ratones macho CD1 se les retiró el alimento 24 h antes del ensayo. Al grupo 1 se le administró dosis de 40 mg/kg de pantoprazol como control positivo, a los otros grupos 50 mg/kg, 100 mg/kg o 200 mg/kg del compuesto obtenido, con ayuda de una cánula esofágica. Después de 40 minutos, se les indujeron las úlceras con 0.1 mL de etanol al 96% vía oral. Finalmente, los ratones fueron sacrificados 30 minutos después para extraer sus estómagos y analizar la presencia de úlceras con ayuda del Software de procesamiento digital de imagen “ImageJ” que permitió medir el área dañada, y el porcentaje de daño ulcerogástrico se determinó con la fórmula 3 (Castro *et al*, 2015).

$$\text{Daño ulcerogástrico (\%)} = \frac{AGT \times 100}{AGE}$$

Fórmula 3. Donde AGT= Área total obtenida de daño en grupo tratado, AGE= Área total obtenida de daño del grupo negativo (administrado únicamente con Etanol)

6.7 Evaluación de viabilidad y citotoxicidad de los metabolitos en modelo *in vitro*.

Por medio de un ensayo *in vitro* de bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), se evaluó la viabilidad celular con el compuesto de interés utilizando una línea celular de macrófagos J447A.1, así como también se evaluó la citotoxicidad con cuatro líneas celulares cancerígenas (HCT15, HeLa, SK-LU-1 y MCF-7). En cajas de 96 pozos, fueron sembradas 5,000 células/pozo, 24 h después de la siembra, se aplicaron las concentraciones del tratamiento: 1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL. Después del tiempo de exposición del compuesto prueba (24 h para viabilidad y 48 h en el caso de citotoxicidad), se revelaron las placas utilizando 10 µL de MTT (5mg/mL) por pozo durante 4 h, posteriormente se retiró el medio y se disolvieron los cristales de formazán con 100 µL de DMSO por pozo. Finalmente, se midió la absorbancia de cada pozo a 540 nm, para calcular la CI₅₀ mediante las siguientes fórmulas 4 y 5 (Campos *et al*, 2022).

$$\% Viabilidad = \frac{ABS_p * 100}{ABS_b}$$

Formula 4. ABS_p = Absorbancia del grupo problema y ABS_b = Absorbancia del grupo basal

$$\% Citotoxicidad = \% Viabilidad - 100$$

Formula 5. Para citotoxicidad

6.8 Ensayo DPPH antioxidante

La actividad antioxidante del compuesto se determinó por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Se utilizaron 100 µL de una mezcla de DPPH en metanol (0.208 mM) y 100 µL de compuesto de prueba disuelto en diclorometano a diferentes concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) y se incubaron en la oscuridad durante 20 min, posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Para los cálculos, se hizo una curva de calibración utilizando Trolox (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL) (Palacios *et al*, 2014).

6.9 Ensayo ABTS antioxidante

Una solución de ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) 7mM y persulfato de potasio 2.45 mM como agente oxidante se preparó mezclando volúmenes iguales de ambos reactivos y se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente por 12 horas. Posteriormente en una placa de 96 pozos se colocaron 180 µL de solución de ABTS⁺ y se adicionaron 10 µL de compuesto de prueba disuelto en diclorometano a diferentes concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL). Se preparó una curva de calibración de Trolox a concentraciones de 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL (Thaipong *et al*, 2006), posteriormente se adicionaron 20 µL de Trolox en cada pozo con 180 µL de solución de ABTS⁺. Finalmente, la placa se dejó reposar por 10 minutos y se tomó la absorbancia a 734 nm (Anees *et al*, 2023).

6.10 Ensayo de Óxido nítrico

Se sembraron macrófagos J774A.1 en tres placas de 6 pozos cada una. Después de 24 horas, se administraron 50 μL del tratamiento correspondiente a cada grupo: grupo basal, grupo negativo, grupo de referencia y grupo de prueba. Como tratamiento de referencia, se utilizaron 50 μL de indometacina a una concentración de 17.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o dexametasona a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que, para el grupo de prueba, se administraron 50 μL del compuesto F86 a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 h después del tratamiento se estimularon los grupos con 50 μL de LPS a una concentración de (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a excepción del grupo basal. Posteriormente, a las 24 h, 100 μL de sobrenadante se mezclaron con 100 μL de reactivo de Griess y se tomó la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de reducción de producción de NO se determinó con ayuda de una curva de nitritos, preparada con 5 mg de NaNO_2 en 1 mL de medio DMEM, para obtener concentraciones de 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093 y 0.046 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tomando como 100% la cantidad de NO producida en el grupo negativo (Rojas *et al*, 2022).

7. Resultados y Discusión

7.1 Preparación de extractos orgánicos

En la Tabla 1., se presenta el peso de *G. glutinosum* utilizada para las maceraciones, así como el peso del extracto de diclorometano (disolvente elegido) y su porcentaje de rendimiento obtenido.

Tabla 1. Peso en g de *G. glutinosum* para maceración, extracto obtenido y porcentaje de rendimiento

Planta macerada	344 g
Extracto diclorometano obtenido	18.1773 g
%Rendimiento	5.28%

7.2 Evaluación biológica

7.2.1 Evaluación biológica de los extractos

La actividad antiinflamatoria de los extractos metanólico y de diclorometano de *G. glutinosum* se evaluó utilizando el modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA. Los resultados, que se presentan en la Tabla 2., muestran el porcentaje de inhibición de la inflamación para ambos extractos.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la inflamación de los extractos evaluados, así como de indometacina.

Tratamiento	% inhibición de inflamación ± EE
Extracto metanólico	41.96 ± 6.5
Extracto diclorometano	52.83 ± 5.28
Indometacina	49.74 ± 4.25

Media ± EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p > 0.05$), Resultados de ANOVA.

7.2.2 Separaciones biodirigidas del extracto diclorometano

Se llevó a cabo una separación biodirigida del extracto de diclorometano para la obtención de F86 por medio de una cromatografía en columna abierta donde se obtuvieron 17 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo con sus similitudes observadas a través de una cromatografía en capa fina, obteniendo un total de ocho fracciones. La Tabla 3., presenta las fracciones agrupadas con sus polaridades.

Tabla 3. Fracciones que se juntaron de acuerdo con su similitud en cromatografía de capa fina.

Fracción	Polaridad
1, 2, 3, 4	15:85 – 25:75 Ac:Hex
5 y 6	30:70 Ac:Hex
7	40:60 Ac:Hex
8	50:50 Ac:Hex
9	100 % Ac
10, 11, 12	100 % Ac
13, 14, 15	5:95 – 10:90 – 20:80 MeOH:Ac
16, 17, 18	30:70 – 40:60 – 50:50 MeOH:Ac

Las fracciones 5, 6 y 7 precipitaron sólidos cristalinos con diferentes grados de pureza, pues estos presentaron colores distintos, sin embargo, estos fueron decantados y lavados con hexano que dieron como resultado cristales blancos en forma de aguja, los cuales se utilizaron para su posterior caracterización.

7.3 Evaluación biológica del compuesto F86

Debido a que ambos extractos no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo control, para continuar con el estudio, se eligió el extracto de diclorometano al ser el que presentó una mayor actividad biológica. La actividad antiinflamatoria de F86 se determinó en el edema auricular de ratón inducido por TPA. En la Tabla 4., se observa que la dosis mayor de F86 (2µg), la inhibición del edema fue mayor que la obtenida a dosis de 1 mg/oreja, sin embargo, la disminución del edema a dosis de 2 mg/oreja fue menor que la obtenida con indometacina.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del edema auricular en ratón inducido con TPA.

Tratamiento		% inhibición de inflamación ± EE
F86	Dosis (2 µg/oreja)	41.99 ± 3.57
F86	Dosis (1 µg/oreja)	36.07 ± 0.84*
Indometacina		50.27 ± 4.46

Media ± EE de un experimento, n=7. *Existen diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p > 0.05$), Resultados de ANOVA.

Una de las metodologías más utilizadas para evaluar la actividad antiinflamatoria es el edema auricular en ratón inducido por TPA. El TPA es un éster de forbol conocido por su capacidad de inducir la inflamación, cuando este se administra por vía tópica en las orejas de los ratones, resulta en una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por edema, irritación y enrojecimiento. Esto se debe a la activación de la proteína quinasa C (PKC), una enzima crucial para la señalización celular, que actúa como precursor de la fosfolipasa A2 la cual a su vez libera ácido araquidónico de las membranas celulares, desencadenando la formación de lipooxigenasa y ciclooxigenasa 2 (COX-2), las cuales provocan la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-6 causando así una inflamación aguda (Griner y Kazanietz, 2007) (Gómez *et al*, 2011) (Caudillo *et al*, 2023).

7.4 Caracterización de los principios activos

7.4.1 Punto de fusión

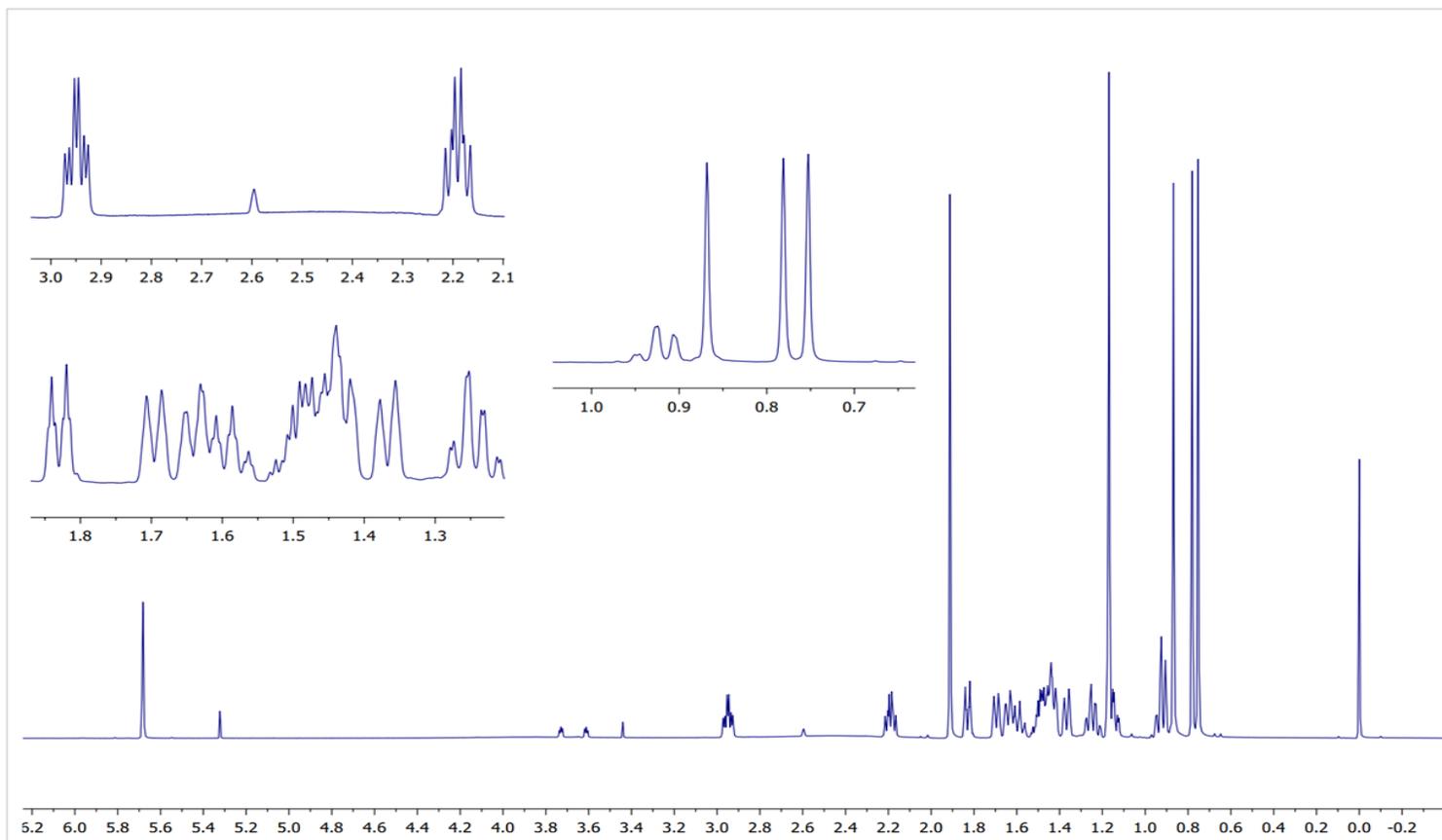
El punto de fusión obtenido de F86 fue de 190°C, al ser un punto definido y no presentarse un rango de temperatura, indica que el compuesto F86 es un compuesto puro y no una mezcla de varios componentes.

7.4.2 Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear

La estructura se determinó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC. Además, se realizó un análisis con espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Características del análisis por RMN: El análisis se realizó en un equipo Agilent DD2 600MHz con una sonda OneNMR. La muestra se disolvió en CDCl_3 a una temperatura de 25°C .

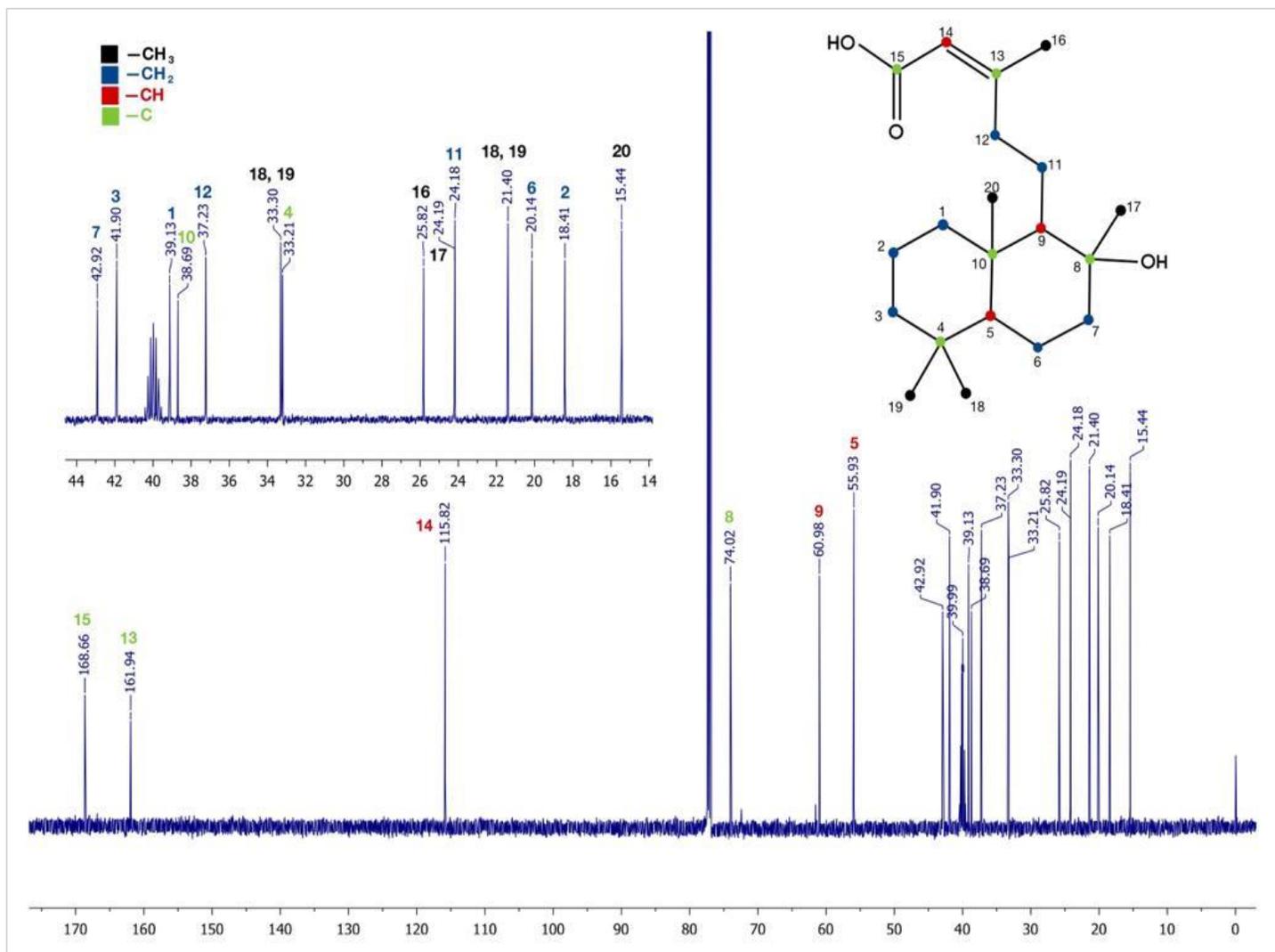
Figura 2. Espectro ^1H de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto F86.



7.4.2.1 Estructura de F86

Los análisis espectroscópicos y la espectrometría de masas, revelaron la presencia de un ácido diterpénico, identificado como 5-(2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-2-enoico, denominado F86 (Figura 7).

Figura 3. Espectro ^{13}C de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto F86



Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C -RMN (Figura 2 y 3) se reportaron en relación con el TMS, y todos los datos se presentan en la Tabla 5. El espectro de RMN- ^1H mostró una señal a $\delta = 5.68$ ppm, característica de un protón olefínico. El espectro de ^{13}C -RMN mostró veinte señales y el espectro gHSQC permitió identificar cinco carbonos cuaternarios, tres carbonos de CH, siete

carbonos de CH₂ y cinco carbonos de CH₃. La señal a $\delta = 168.7$ ppm confirmó la presencia de un ácido carboxílico α, β insaturado, mientras que las señales a 162.03 y 115.86 ppm correspondieron a carbonos de alqueno. Las correlaciones entre protones y carbonos se asignaron mediante el análisis de los espectros de gCOSY y gHSQC de RMN, y la posición estructural del carbono cuaternario se confirmó mediante las correlaciones de gHMBC de RMN.

Tabla 5. Asignación de señales de espectros de RMN

Posición	¹³ C	¹ H		Carbono
15	168.7			-C
13	162.03			-C
14	115.86	5.68		-CH
8	74.06			-C
9	61.02	1.17		-CH
5	55.97	0.92		-CH
7	42.96	1.83	1.44	-CH ₂
3	41.94	1.36	1.15	-CH ₂
1	39.17	1.7	0.92	-CH ₂
10	38.73			-C
12	37.27	2.95	2.19	-CH ₂
18/19	33.34	0.87		-CH ₃
4	33.25			-C
16	25.85	1.91		-CH ₃
11	24.23	1.48		-CH ₂
17	24.21	1.17		-CH ₃
18/19	21.44	0.78		-CH ₃
6	20.18	1.64	1.25	-CH ₂
2	18.45	1.6	1.43	-CH ₂
20	15.48	0.75		-CH ₃

7.4.3 Espectro de Infrarrojo

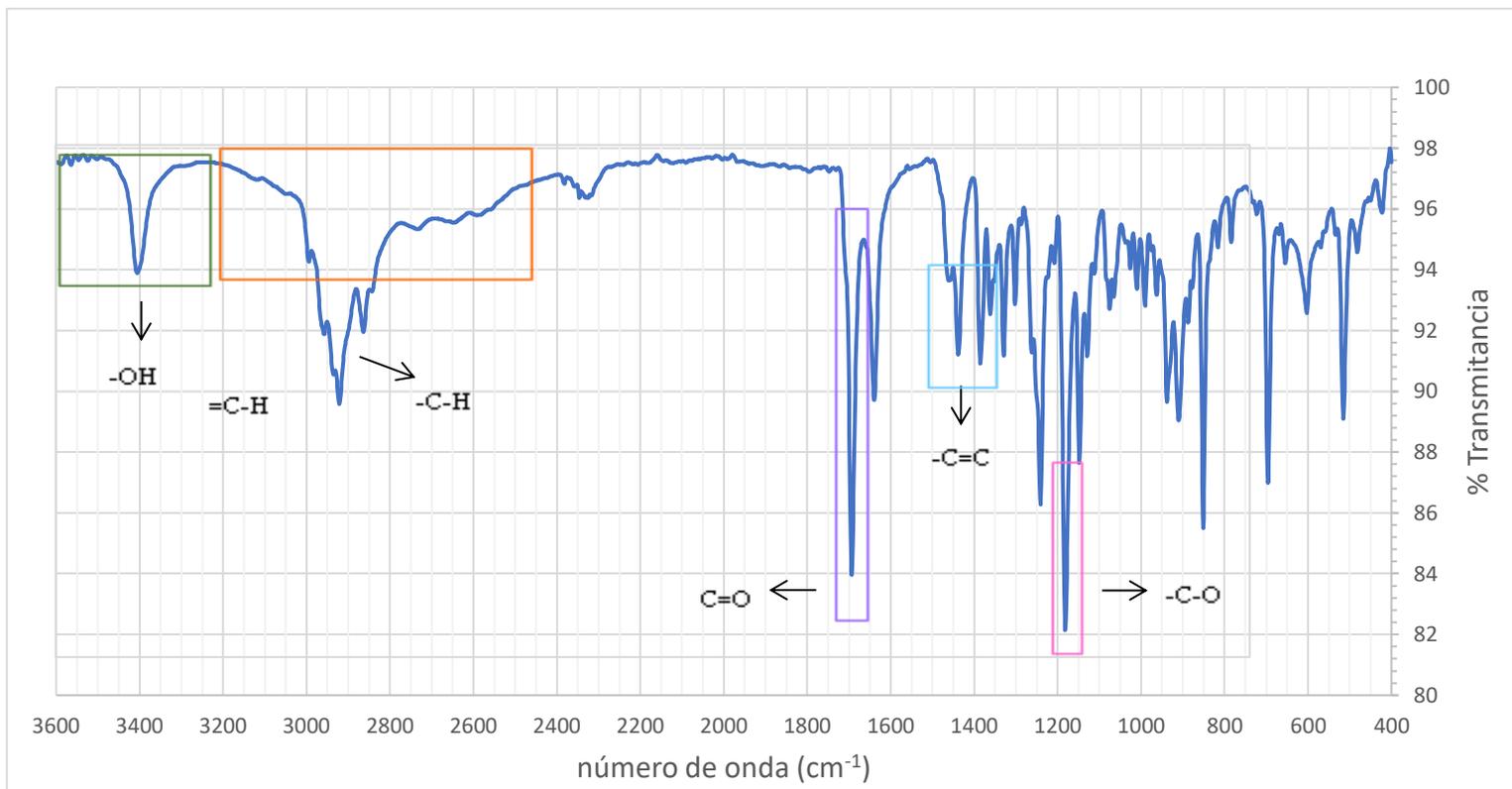


Figura 4. Espectro de infrarrojo del compuesto F86

En la Figura 4., se muestra el espectro de IR, así como los grupos funcionales asignados a cada señal, de igual forma, en la Tabla 6., se colocan los rangos de los principales grupos funcionales obtenidos del espectro infrarrojo del compuesto F86 que se muestra en la Figura 4., los cuales comprueban la estructura obtenida en los demás experimentos complementarios.

Tabla 6. Señales identificadas en el espectro de infrarrojo del compuesto F86

Tipo de Vibración	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	
 -OH	3400	Hidroxilo
 -COOH	3300 - 2700	Ácido
 -C=O	1700	Carbonilo
 -C=C	1650	Alqueno
 -C-O	1190	Alcohol

7.4.4 Difracción de Rayos X

Un cristal de F86 fue colocado en una fibra plástica, para realizar los análisis de difracción, en un difractómetro Oxford Diffraction Gemini "Atlas", equipado con un detector de área de dispositivo de carga acoplada, tubo de rayos X sellado ($\lambda\text{MoK}\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$) y un monocromador de grafito.

Los paquetes de software CrysAlis PRO y CrysAlis RED se utilizaron para la recopilación e integración de datos.

Se realizó la corrección de los datos recopilados para la absorción utilizando una corrección numérica analítica con un modelo de cristal multifacético. La solución y el refinamiento de la estructura se llevaron a cabo utilizando el software Olex2 y el programa Mercury 4.0 (Figura 5 y 6). El refinamiento por mínimos cuadrados de matriz completa se realizó minimizando $(F_o - F_c)^2$. Todos los átomos no hidrógeno se refinaron anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua (H–O) se localizaron mediante un mapa de diferencias y se refinaron isotrópicamente con $U_{iso}(H) = 1.5$ para H–O. Los átomos de hidrógeno unidos a átomos de carbono se colocaron en posiciones idealizadas geoméricamente y se refinaron como adheridos a sus átomos parentales, con C–H = 0.95 y 0.98 Å y $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C)$ y $1.5U_{eq}(C)$ para grupos olefínicos y metílicos, respectivamente. La figura 7 muestra la estructura obtenida del compuesto, que corresponde a un diterpeno.

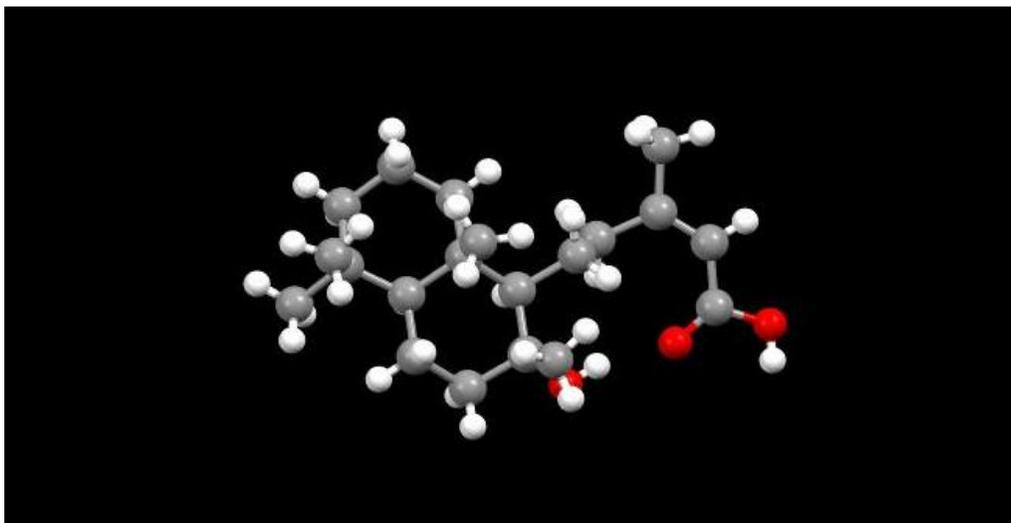


Figura 5. Difracción de Rayos X del compuesto F86

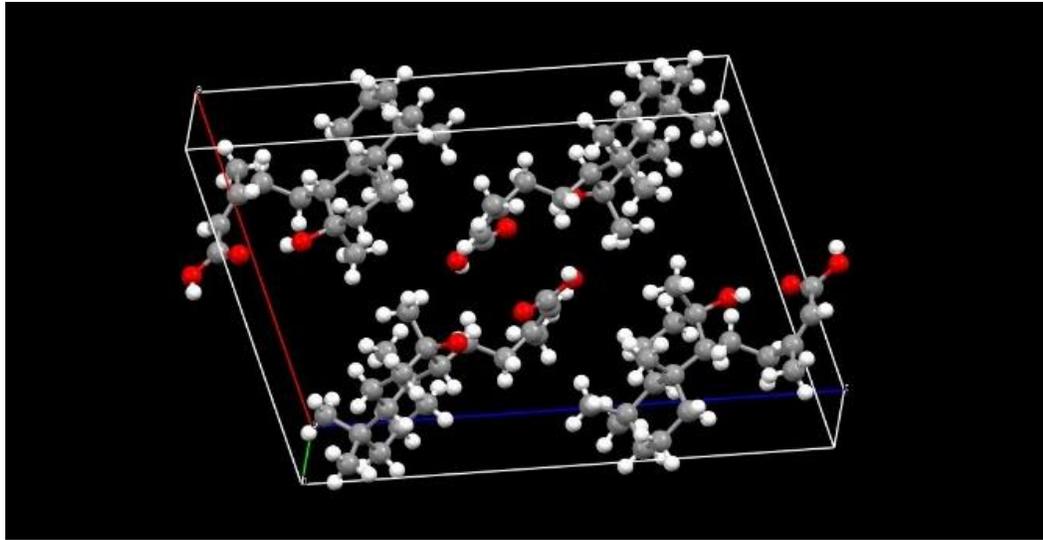


Figura 6. Difracción de Rayos X del compuesto F86

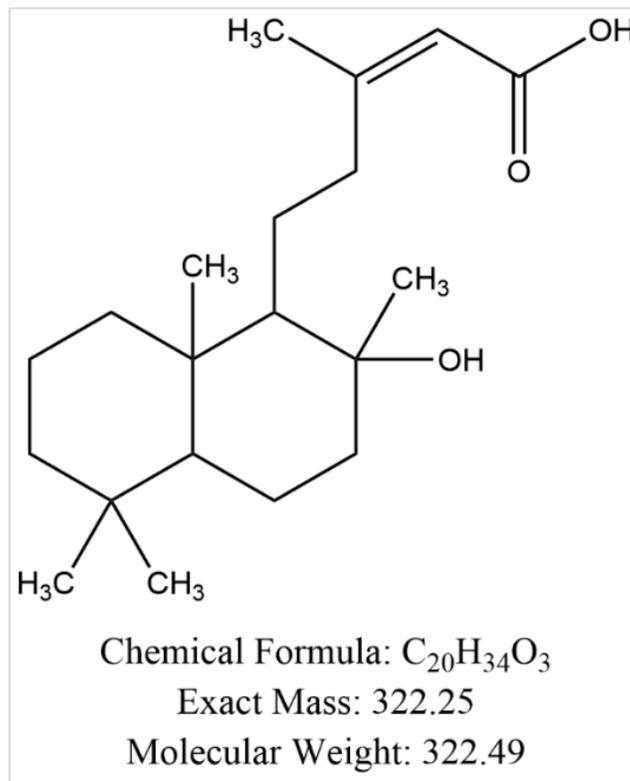


Figura 7. Estructura química del compuesto F86

Los diterpenos tienen 20 átomos de carbono, y derivan del precursor 2E, 6E, 10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP). Exhiben una notable diversidad estructural y pueden dividirse en dos categorías principales: compuestos acíclicos y compuestos ciclados. Entre los diterpenos ciclados, se encuentran los bicíclicos, que incluyen labdanos que constituyen un grupo de

sustancias que ha atraído el interés en los últimos años por sus estructuras químicas y sus diversas actividades farmacológicas como la inhibición de inflamación (Bustos, 2011).

7.5 Evaluación de los metabolitos bioactivos como inhibidores de la inflamación en un modelo *in vitro*

7.5.1 Evaluación de viabilidad en macrófagos J774A.1

En la Tabla 7., y gráfica 1 se presentan lo porcentajes de viabilidad de los macrófagos J774A.1 tratados con el F86 a las concentraciones utilizadas (1 a 100 μ g/mL), donde el 100% de viabilidad fue tomado del grupo control, es decir, aquel grupo de células que no recibió ningún tratamiento.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad de macrófagos tratados a distintas concentraciones de F86 con el IC_{50} calculado.

Concentraciones (μ g/mL)	% Viabilidad
0	100
1	92.93303
5	83.78534
10	81.92017
25	73.32915
50	74.27446
75	71.23994
100	57.03303
CI_{50}	125.8 μ g/mL

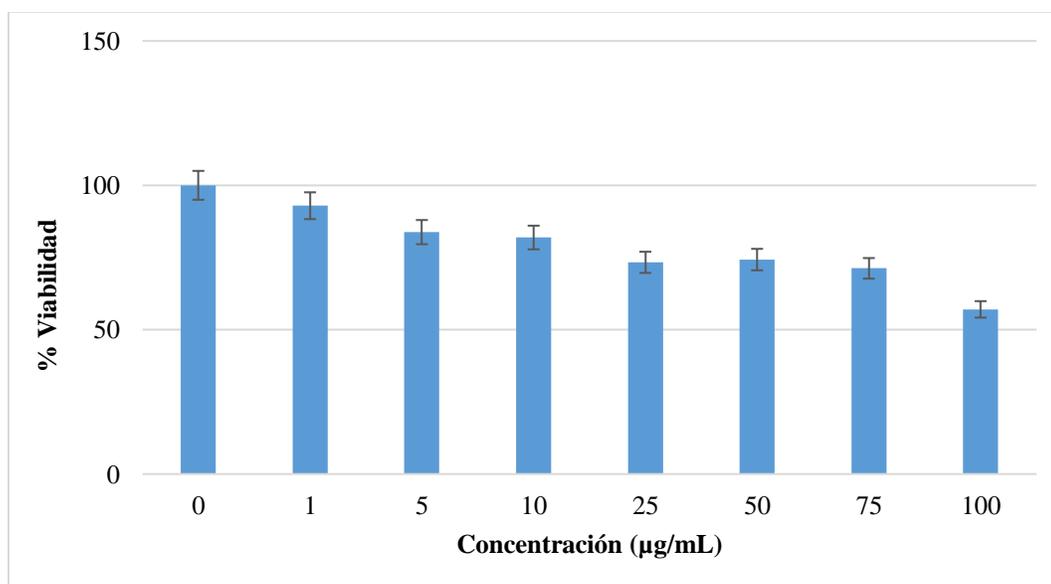


Gráfico 1. Porcentaje de viabilidad de macrófagos tratados a diferentes concentraciones de F86.

La CI_{50} obtenida en el ensayo fue de 125.8 $\mu\text{g/ml}$, por lo que para los siguientes estudios se usó 50 $\mu\text{g/ml}$ de F86, ya que a esa concentración la viabilidad de los macrófagos es mayor del 60 %.

Los ensayos de viabilidad celular permiten determinar la concentración de compuesto a utilizar a partir de la CI_{50} , para así conocer si un compuesto es citotóxico y hasta qué grado afecta la viabilidad celular, lo cual es crucial para el desarrollo de fármacos y estudios de toxicología.

Existen diversos métodos para determinar el valor de la IC_{50} , siendo los ensayos colorimétricos los más comúnmente utilizados por su eficacia y fiabilidad. Entre ellos, destaca el ensayo de MTT, que se basa en la reducción de este compuesto por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales activas en células viables, resultando en la formación de cristales de formazán, lo que provoca un aumento en la absorbancia obtenida al revelar el ensayo por medio de un espectrofotómetro (Del Barrio y Álvarez, 2022).

7.5.2 Evaluación de citotoxicidad de F86 en líneas celulares cancerígenas

Se utilizaron cuatro líneas celulares (HCT15, HeLa, SKLU-1 y MCF-7) para evaluar la actividad citotóxica de F86 a diferentes concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. En la Tabla 8., se presenta la CI_{50} calculada en cada una de las líneas celulares cancerígenas, donde se muestra que el compuesto no tiene actividad citotóxica en estas cuatro líneas celulares cancerígenas, pues de acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, se define que un compuesto puro exhibe actividad citotóxica *in vitro* si su CI_{50} sobre las células tumorales, tras una incubación de 48 a 72 horas, es igual o menor a 4 $\mu\text{g/mL}$ (Arroyo *et al*, 2014; Somaida *et al*, 2020).

Tabla 8. Evaluación del compuesto F86 como inhibidor de la inflamación en modelo *in vitro* donde se muestra la IC_{50} calculada para cada línea celular.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Líneas celulares cancerígenas			
	HCT15	HeLa	SKLU-1	MCF-7
CI_{50}	142.68 $\mu\text{g/mL}$	137.36 $\mu\text{g/mL}$	130.46 $\mu\text{g/mL}$	419.37 $\mu\text{g/mL}$

7.6 Actividad antioxidante

7.6.1 Ensayo DPPH antioxidante

En la Tabla 9., se muestra el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, donde se puede observar que la CI_{50} es muy alta (690.760 $\mu\text{g/mL}$), lo que indica que F86 no presenta actividad antioxidante ante este radical libre.

Tabla 9. Evaluación del compuesto F86 como inhibidor del radical libre DPPH a distintas concentraciones, así como la IC_{50} calculada.

Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibición de Radical Libre DPPH
200	15.663
100	8.354
50	5.651
25	4.853
12.5	2.027
6.25	1.290
3.125	-0.430
CI_{50}	690.760 $\mu\text{g/mL}$

7.6.2 Ensayo ABTS antioxidante

En la Tabla 10., se muestra el porcentaje de presencia del radical libre ABTS, donde se puede observar que F86 no presenta actividad antioxidante ante este radical libre obtenido, véase en Tabla 11. ($CI_{50} = 1113.5 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 10. Evaluación del compuesto F86 como inhibidor del radical catiónico ABTS a distintas concentraciones, así como la CI_{50} calculada.

Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	% Presencia de Radical catiónico ABTS
200	98.471
100	106.53
50	108.91
25	95.412
12.5	95.076
6.25	96.718
3.125	97.389
CI_{50}	1113.5 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 11. CI_{50} de compuesto F86 en ensayos antioxidantes comparados con la CI_{50} de la referencia TROLOX

	CI_{50}	
	DPPH	ABTS
	690.76 $\mu\text{g/mL}$	1113.5 $\mu\text{g/mL}$
TROLOX	11.63 $\mu\text{g/mL}$	8.72 $\mu\text{g/mL}$

7.7 Protección ulcerogástrica

En la Tabla 12., se presentan los porcentajes de daño ulcerogástrico registrados de acuerdo con el grupo de estudio del ensayo, donde se observa que F86 presentó protección ulcerogástrica. En la gráfica 2 se observa el porcentaje de daño de cada grupo.

Tabla 12. Porcentaje de daño ulcerogástrico registrado por grupo.

Tratamiento		Área promedio (cm)	% Daño ulcerogástrico
Etanol		0.2693	100
Pantoprazol	40 mg/kg	0.0354	13.1623
	50 mg/kg	0.0434	16.1223
F86	100 mg/kg	0.0426	15.8452
	200 mg/kg	0.0172	6.4004*
Basal		0	0

Media \pm EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo PANTOPRAZOL ($p>0.05$), Resultados de ANOVA.

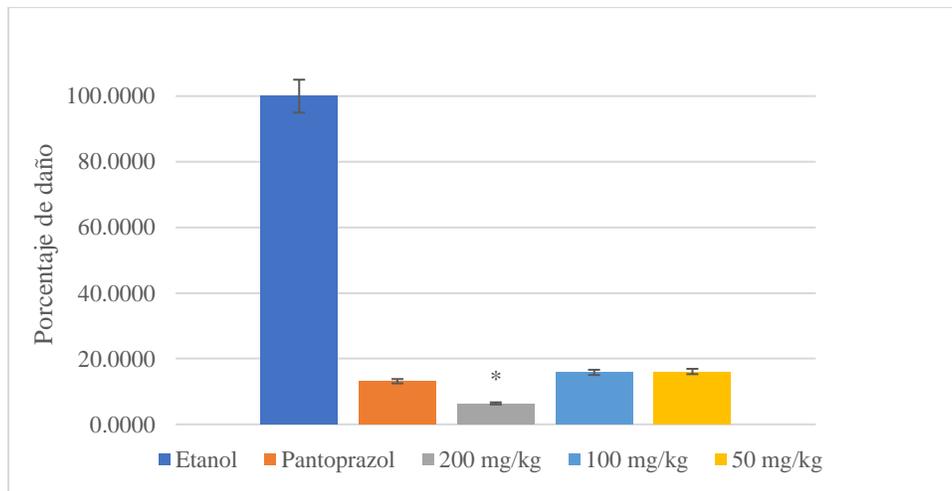


Gráfico 2. Porcentaje de daño ulcerogástrico presentado en cada grupo.

Media \pm EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Pantoprazol ($p>0.05$), Resultados de ANOVA.

En la actualidad, la gastritis es uno de los padecimientos más comunes, que es producida debido a una inflamación presente en la mucosa gastrointestinal que puede resultar por muchos factores, como el consumo excesivo en alcohol (Llontop *et al*, 2021). El etanol causa daño directo al tejido gástrico al generar radicales libres, aumentando el estrés oxidativo y a su vez la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α necrosando el tejido (Arrascue y Troncoso, 2023). El principal tratamiento para este padecimiento es la administración de inhibidores de la bomba de protones H⁺/K⁺ ATPasa que se encargan de regular la secreción de ácido gástrico como el pantoprazol, omeprazol y esomeprazol (Abed *et al*, 2020). Este mecanismo de acción por que

actúa el compuesto F86, demostrando una alta protección ulcerogástrica, ya que el grupo tratado con F86 presentó menor daño que el grupo tratado con Pantoprazol.

7.8 Ensayo de Óxido Nítrico

En la Tabla 13., se presentan los porcentajes de producción de Óxido Nítrico en macrófagos estimulados con LPS y tratados con F86, así como con dexametasona como control positivo. El 100% de producción de NO se tomó del grupo estimulado con LPS que no recibió ningún tratamiento, ya que este fue el grupo de referencia para comparar el efecto de los tratamientos.

Los resultados muestran que las células tratadas con F86 produjeron menos óxido nítrico en comparación con el grupo tratado con el fármaco de referencia (dexametasona), alcanzando niveles similares a los del grupo basal, que estaba en condiciones normales sin estimulación. Esto indica que, *in vitro*, F86 tiene una capacidad antiinflamatoria, ya que redujo la producción de óxido nítrico en un 78.05%.

Tabla 13. Porcentajes de Óxido nítrico (NO) producidos por macrófagos estimulados con LPS y tratados con F86.

Grupos	Concentraciones de NO ($\mu\text{g/mL}$)				Promedio	% Producción de Óxido Nítrico
LPS	6.563	7.159	6.325	6.464	6.628 \pm 0.183	100 \pm 2.769 ⁺⁺
Dexametasona	2.675	3.111	2.675	3.052	2.878 \pm 0.118	43.422 \pm 1.781*
F86	2.020	1.206	1.722	0.869	1.454 \pm 0.257	21.943 \pm 3.884 ^{*++}
BASAL	0.690	0.452	0.948	0.968	0.765 \pm 0.121	11.540 \pm 1.838 ^{*++}

Media \pm EE de un experimento, n=8. Existen diferencias estadísticamente significativas respecto a (*) LPS y (++) Dexametasona ($p > 0.05$), Resultados de ANOVA.

El óxido nítrico (NO) se encuentra presente en diversos procesos biológicos, incluida la inflamación, donde desempeña un papel crucial, su producción puede servir como indicador del avance de este proceso. La liberación de NO provoca una señalización que activa quimiocinas y citosinas, lo que genera especies reactivas de nitrógeno que causan daño en los tejidos. Por consiguiente, los inhibidores de NO son herramientas valiosas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Campos *et al*, 2021).

Uno de los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* es por medio de la determinación de NO, la cual de manera indirecta determina la expresión de nitritos por la enzima iNOS (Óxido Nítrico Sintasa inducible) (Bautista, 2012). La isoforma iNOS cataliza la producción de óxido nítrico (NO), el cual en grandes cantidades puede resultar tóxico a nivel celular ya que actúa como molécula proinflamatoria al activar las enzimas COX, incrementando así la producción de prostaglandinas y otros mediadores proinflamatorios (Gómez *et al*, 2011; Nouredine, 2018). Por lo tanto, se especula que la actividad antiinflamatoria de F86

obtenido de *G. glutinosum* posiblemente se debe a la reducción de la expresión de iNOS y por lo tanto a la disminución de la IL-1 (interleucina 1) y el TNF- α (Factor de necrosis tumoral α).

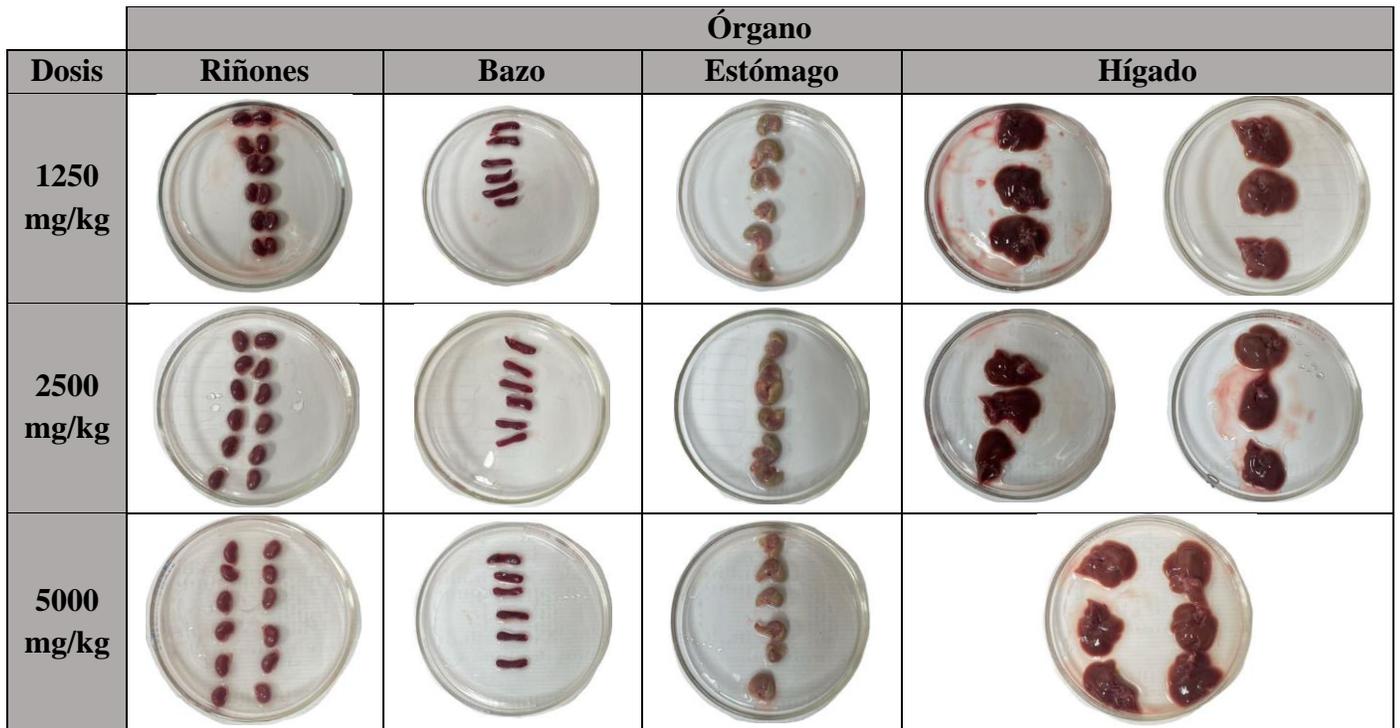
7.9 Toxicidad Aguda

En la Tabla 14., se presentan los daños que se observaron en los órganos de los ratones de acuerdo con la dosis administrada de F86, mientras que en la Figura 8., se muestran los daños observados en cada grupo.

Tabla 14. Daños observados en órganos de acuerdo con la dosis administrada.

Órgano	Dosis (mg/kg)			
	Control	1250	2500	5000
Daño observado				
Vejiga	x	x	x	✓*
Estómago	x	x	x	x
Hígado	x	x	x	x
Intestino	x	x	x	x
Riñón	x	x	x	x
Bazo	x	x	x	x

Donde ✓ = daño observado y x = sin daño observado. * De una n = 5, el daño registrado en vejiga solo fue observado en 1 de los ratones.



El primer órgano de cada grupo corresponde al control

Figura 8. Órganos de acuerdo con la dosis de F86 administrada.

8. Conclusión

En conclusión, se puede determinar que la planta *Gymnosperma glutinosum* posee actividad antiinflamatoria, así como actividad antiulcerogástrica las cuales se le atribuyen al compuesto aislado F86, el cual se aisló, purificó y elucidó su estructura que corresponde a un nuevo labdano.

9. Bibliografías

1. Abed, M. N., Alassaf, F. A., Jasim, M. H. M., Alfahad, M., y Qazzaz, M. E. (2020). Comparison of antioxidant effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole. *Pharmacology*, *105*(11–12), 645–651. <https://doi.org/10.1159/000506232>
2. Alonso-Castro, A. J., González-Chávez, M. M., Zapata-Morales, J. R., Verdinez-Portales, A. K., Sánchez-Recillas, A., Ortiz-Andrade, R., Martínez, R. (2017). Antinociceptive Activity of Ent-Dihydrotucumanoic Acid Isolated from *Gymnosperma glutinosum* Spreng Less. *Drug Development Research*, *78*(7), 340–348. doi:10.1002/ddr.21397
3. Anees Ali Jafri, S., Mehmood Khalid, Z., Rizwan Khan, M., Ashraf, S., Ahmad, N., Mahmoud Karami, A., Rafique, E., Ouladsmame, M., Mohammad Saad Al Suliman, N., y Aslam, S. (2023). Evaluation of some essential traditional medicinal plants for their potential free scavenging and antioxidant properties. *Journal of King Saud University. Science*, *35*(3), 102562. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102562>
4. Arrascue Navarro, B. R., y Troncoso-Corzo, L. V. (2023). Efecto regenerador gástrico del consumo de *Petroselinum sativum* L. (perejil) en ratas con gastritis inducida por etanol. *Revista de Gastroenterología Del Peru*: *43*(2), <https://doi.org/10.47892/rgp.2023.432.1497>
5. Bautista, F. (2012). *Elucidación estructural y evaluación de la actividad biológica de diterpenos tipo neo-clerodano aislados de Salvia herbacea, S. shannoni y S. microphylla* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio de Tesis DGBSDI.
6. Bindu, S., Mazumder, S., y Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, *180*, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
7. Bustos Brito, C. (2011). *Estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de Salvia thymoides Benth* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/320623>
8. Campos-Xolalpa, N., Alonso-Castro, Á. J., Ortiz-Sanchez, E., Zapata-Morales, J. R., González-Chávez, M. M., y Pérez, S. (2021). Anti-inflammatory and antitumor activities of the chloroform extract and anti-inflammatory effect of the three diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora* Benth. *BMC Complement Med Ther* *21*, 17 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03179-w>

9. Campos, N., Esquivel, A., Martínez, R., Pérez, S., Pérez, J., y Sánchez, E. (2022). Anti-inflammatory activity of piquerol isolated from *Piqueria trinervia* Cav. *Pharmaceuticals*, *15*(7), 771. <https://doi.org/10.3390/ph15070771>
10. Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L.B., Duran, A., Ríos, V., Sigrist, S., Hernández, H.L.H., García, A.M., Ángeles, O., Fernández M.A y Ávila. G. (2007) Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study, *Journal of Ethnopharmacology* *110* (2), 343-347.
11. Castro, A., Pérez, J., Sánchez, E., Pérez, C. y Pérez, S. (2015). Effects of Kramecyne on LPS Induced Chronic Inflammation and Gastric Ulcers. *Drug Development Research* *76* (15), 185-193, DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.21254>
12. Caudillo-Gaona, M. Y., Caudillo-Gámez, K. L., Caudillo-Gámez, K. L., Vargas-Roa, M. A., Torres-Rico, D., Carranza-Alvarez, C., Alonso-Castro, Ángel J. (2023). Evaluación in vivo del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae). *JÓVENES EN LA CIENCIA*, *21*, 1–7. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4037>
13. Chang, S. N., Khan, I., Dey, D. K., Cho, K.-H., Hwang, B. S., Bae, K. B., Kang, S. C., y Park, J. G. (2019). Decursinol angelate ameliorates 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) -induced NF- κ B activation on mice ears by inhibiting exaggerated inflammatory cell infiltration, oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *132*(110699), 110699. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110699>
14. Del Barrio, G., y Álvarez, M. (2022). Metodología de pesquisa primaria de actividad antidengue a partir de productos naturales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *73*(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602022000300016&lng=es&tlng=pt.
15. García-González, A., Martínez-Vázquez, L., y Torres-Soto, M. (2021). Prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas en México: Un análisis del envejecimiento poblacional y sus implicaciones. *Revista de Salud Pública de México*, *63*(2), 132-140. <https://doi.org/10.21149/12123>
16. Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N., y Domingo Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *10*(3), 182–217. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85618379003>
17. González, M., Arana, V., Zapata, J., Ávila, A., Alonso, A., Isiordia, M. y Martínez, R. (2017) Pharmacological evaluation of 2-angeloyl *ent*-dihydrocucumanoic acid, *Pharmaceutical Biology*, *55* (1), 873-879, DOI: 10.1080/13880209.2016.1277766
18. Griner, E. M., y Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *7*(4), 281-294. DOI: 10.1055/s-0042-119651
19. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/>

20. Kulkarni, N. M., Muley, M. M., Jaji, M. S., Vijaykanth, G., Raghul, J., Reddy, N. K., Vishwakarma, S. L., Rajesh, N. B., Mookkan, J., Krishnan, U. M., y Narayanan, S. (2015). Topical atorvastatin ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced skin inflammation by reducing cutaneous cytokine levels and NF- κ B activation. *Archives of pharmacal research*, 38(6), 1238–1247. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0496-0>
21. López-Soto, P. J., & Gómez-Álvarez, M. (2019). Complicaciones gastrointestinales y renales asociadas al uso de AINEs: Una revisión crítica. *Gaceta Médica de México*, 155(1), 58-64. <https://doi.org/10.24875/GMM.19000009>
22. Llontop, L. F. G., del Rocío Chotón Calvo, M., y Ruíz, J. C. (2021). El extracto de *Illicium verum* L. “anís estrella” reduce las lesiones gástricas provocadas por etanol: un estudio en ratas. *Manglar (Tumbes)*, 18(4), 357–362. <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/285/406>
23. Maldonado, C., Paniagua, N., Bussmann, R., Zenteno, F. y Fuentes, A. (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*. 55 (1).
24. Maldonado, D. A., Segovia, L. C., Fuel, E. D., Naranjo, A. E., Zurita, G. C., Melo, L. O., y Rivadeneira, K. E. (2024). Efectos adversos de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos: artículo de revisión: Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: review article. *LATAM Revista Latinoamericana De Ciencias Sociales Y Humanidades*, 5(1), 1735 – 1749. <https://doi.org/10.56712/latam.v5i1.1706>
25. Molina Equihua, V., Delgado Martínez, D. L., Gómez Galicia, D. S., Solís Marrufo, R. A., Herrera España, Á. D., & Cauich Kumul, R. G. (2024). *Cnidocolus chayamansa* (chaya): una planta medicinal con propiedades terapéuticas y antiinflamatorias. *Desde El Herbario CICY*, 16, 30–34. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
26. Morado, R., Quintanilla, R., Gómez, R. y Blaschek, W. (2014). Isolation and identification of ent-labdan diterpenes from the Mexican plant *Gymnosperma glutinosum* (Asteraceae) and cytotoxicity evaluation against murine lymphoma L5178Y-R. *Molecules* 17 DOI: 10.1055/s-0034-1394816.
27. Nouredine, B. (2018). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Paeonia mascula* extract. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 6(2), 81-88.
28. Orantes-García, C., Moreno-Moreno, R. A., Caballero-Roque, A., y Farrera-Sarmiento, O. (2018). Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 17(5), 503–521. <http://www.blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/134>
29. Palacios, J.F., Arroyo O., García, G., Linares, E., Bye, R., y Romero, I. (2014). Evidence of the anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. *Journal of ethnopharmacology*, 151 (2), 990-8.
30. Quintanilla-Licea, R., Morado-Castillo, R., Gomez-Flores, R., Laatsch, H., Verde-Star, M. J., Hernández-Martínez, H., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., y Rodríguez-Padilla, C. (2012). Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from

- Gymnosperma glutinosum* leaves. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(9), 11229–11241. <https://doi.org/10.3390/molecules170911229>
31. Rodríguez, J. R. G., Rojas, M. F. H., Velasco, Y. M., y Rivas, C. S. (2020). Compuestos activos en plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *RD-ICUAP*, 175–200. <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/268>
 32. Rodríguez, M., Aguilar, D. y León, J. (2020). Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales - Anti-inflammatory activity of medicinal plants. *REDEL*, 16 2664-3065.
 33. Rojas, S., Pérez, S., Sánchez, E., Martínez, R., Campos, N., Valladares, M., y Salinas, D. (2022). Anti-Inflammatory Activity of 3, 5-Diprenyl-4-hydroxyacetophenone Isolated from *Ageratina pazcuarensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 15012. <https://doi.org/10.3390/ijms232315012>.
 34. Secretaría de Salud. (2022). *Informe Anual sobre el Impacto del Uso de Antiinflamatorios No Esteroides en la Salud Pública*. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud>
 35. Silvero-Isidre, A., Morínigo-Guayuán, S., Mongelós-Cardozo, M., González-Ayala, A., y Figueredo-Thiel, S. (2016). Toxicidad aguda de las hojas de *Xanthium spinosum* en ratones BALB/C. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 33(1), 113. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1888>
 36. Somaida, A., Tariq, I., Ambreen, G., Abdelsalam, A. M., Ayoub, A. M., Wojcik, M., Dzoyem, J. P., y Bakowsky, U. (2020). Potent cytotoxicity of four Cameroonian plant extracts on different cancer cell lines. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(11), 357. <https://doi.org/10.3390/ph13110357>
 37. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 19(6-7), 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
 38. Villagómez-Rodríguez, A., Pérez-Ramos, J., Esquivel-Campos, A. L., Pérez-González, C., Soto-Peredo, C. A., y Pérez-Gutiérrez, S. (2019). Anti-inflammatory activity of *Jefea gnaphalioides* (a. gray), *Asteraceae*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2654-x>
 39. Zamora, Z., Molina, V., Mena, L. y Nodal, C. (2017). Efecto anti-inflamatorio de la terapia combinada del D-002 y Lyprinol en un modelo de inflamación crónica. *CENIC Ciencias Biológicas*. 48 (1) 6-11.
 40. Zhu, F., Du, B., y Xu, B. (2018). Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1260–1270. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>