



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

Escuela de Química

Tesis

“EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Emilia fosbergii*”

Autor:

María Pilar De Jesús Bernal Roper

Asesores:

Dra. Lilia Chérigo-Departamento de Química Orgánica-UP

Dr. Sergio Martínez-INDICASAT-AIP

Trabajo de Grado presentado para optar al título de Licenciada en Química

Ciudad de Panamá, República de Panamá

2025

Dedicatoria

A Dios,

Por ser mi guía en cada paso de este camino. Gracias por darme la fuerza, la paciencia y la fe necesarias para superar los desafíos. Todo lo que he logrado es gracias a tu gracia infinita y tu amor incondicional.

A mi mamá,

Por ser mi inspiración constante y la persona que siempre ha creído en mí. Gracias por tu amor infinito, por apoyarme en cada paso y por enseñarme el verdadero significado de la perseverancia. Gracias por todos los sacrificios que has hecho para darme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas. Por tu amor incondicional, que me dio el coraje para enfrentar los momentos más difíciles, y por tus palabras de aliento, que siempre llegaron en el momento justo. Cada logro mío es un reflejo de tu amor y apoyo. Sin ti, este momento no sería posible.

A mis hermanotas,

Mate, por ser como una segunda mamá para mí. Gracias por tu amor incondicional, tus cuidados y tu apoyo constante. Siempre has estado a mi lado, aconsejándome con sabiduría y enseñándome el valor del esfuerzo y la responsabilidad. Eres mi ejemplo de fortaleza y dedicación.

Luz, por ser mi consejera, mi apoyo y mi amiga incondicional. Tus consejos sabios y tu cariño han sido una guía en mi vida. Gracias por siempre creer en mí y por ser una hermana en quien siempre puedo confiar.

A mis hermanotes

Luis y Gabriel, por sus bromas y sus palabras constantes que siempre logran arrancarme una sonrisa. Su apoyo ha sido una gran motivación en mi vida. Porque al final, la familia es lo que más importa, y siempre los valoro por ser parte de la mía

A mis tías Celia y Theresa,

Por su cariño incondicional y su apoyo constante a lo largo de mi vida. Gracias por estar siempre presentes, por sus palabras de aliento y por brindarme su amor como si fuera su propia hija.

Agradecimientos

Este trabajo llego a feliz término gracias a las siguientes instituciones y personas a las que deseo expresar mi más sincero reconocimiento:

A la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) por el apoyo y financiamiento parcial de esta investigación a través de los fondos otorgados por el Sistema Nacional de Investigación a la Dra. Lilia Chérigo y al Dr. Sergio Martínez.

Al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT AIP), en particular al laboratorio QUIBIPRONAT, lugar donde se realizó gran parte del trabajo experimental.

A la **Dra. Lilia Chérigo** por el tiempo dedicado a mi formación académica y apoyo a lo largo de este estudio y al **Dr. Sergio Martínez** por su asesoría, por su constante interés y apoyo brindado durante la realización de esta investigación.

A **Dayreth**, por ser una de mis primeras amistades, por ser mi increíble equipo en los trabajos en grupo, por tu paciencia cada vez que me volvía muy perfeccionista, por siempre aceptarme como soy y por hacer lo peores momentos más agradables.

A **Carlos**, por ser un gran amigo y niñera, por siempre responder a mis dudas, por las largas charlas y los momentos de aprendizaje mutuo. Aprecio profundamente tu compañía y el tiempo que dedicaste para escucharme, aconsejarme y brindarme tu ayuda desinteresada

A **Medin**, por siempre estar ahí, por tus bromas y tus risas que alegraban un día malo, por siempre dispuesto a ayudar y a compartir conocimiento.

A **Tiffany**, por tu energía y entusiasmo, que siempre lograron contagiarme y motivarme en los momentos difíciles.

A **Isaac**, por aguantarme en esta travesía universitaria, por las risas, los desvelos y los momentos de caos. Gracias por estar ahí con tu buena vibra y tus ocurrencias.

A **Maricarmen**, aunque te conocí en los últimos capítulos de esta travesía universitaria, tus palabras de ánimo siempre llegaron en el momento justo. Gracias por ser una gran ayuda y, simplemente, un rayito de sol.

A **Dereck**, por convertirte en un gran apoyo en todo este proceso de tesis. Gracias por las noches de desvelo, por acompañarme en la escritura de esta tesis, por las conversaciones y las palabras de ánimo.

A los profesores de la Escuela de Química de la Universidad de Panamá por su dedicación y compromiso con mi formación académica.

Al Mgtr. **Juan Fernández** por el tiempo dedicado a mi formación en INDICASAT.

Al Lic. **Emmanuel Santos** y la Lic. **Maravi Marrone** por su asistencias y comentarios durante mi estadía en el laboratorio.

A los miembros del Jurado Evaluador por sus acertados comentarios y observaciones que permitieron la corrección de este manuscrito de tesis.

A **Hannah**, mi mejor amiga y mi hermana, por su apoyo emocional y amistad inquebrantable, que siempre me han impulsado a dar lo mejor de mí.

A mis amigas de la escuela, **Claudia** y **Gabriela**, por los recuerdos compartidos, por ser un pilar constante en mi vida y por siempre estar ahí cuando quiero quejarme de algo.

A todos ustedes, gracias por estar a mi lado en este viaje. Este logro no sería posible sin su presencia en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-------------------------------|
| Dedicatoria | II |
| Agradecimientos | III |
| Resumen | X |
| Abstract | XI |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | ¡Error! Marcador no definido. |
| JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN | 3 |
| CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 1.1. HISTORIA DE LOS PRODUCTOS NATURALES | 4 |
| 1.2. GENERALIDADES DE LA FAMILIA <i>Asteraceae</i> | 6 |
| 1.3. ANTECEDENTES BOTÁNICOS, ETNOMÉDICOS Y QUÍMICOS DEL GÉNERO <i>Emilia</i> | 10 |
| 1.3.1. Generalidades de la especie <i>Emilia fosbergii</i> | 15 |
| 1.3.1.1. Clasificación taxonómica y morfología | 15 |
| 1.3.1.2. Nombres vernáculos y distribución | 17 |
| 1.3.1.3. Antecedentes fitoquímicos de <i>E. fosbergii</i> | 20 |
| 1.3.1.4. Antecedentes farmacológicos de la especie <i>E. fosbergii</i> | 23 |
| 1.4. LA CROMATOGRAFÍA Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES | 25 |
| 1.4.1. Cromatografía en capa fina, TLC | 26 |
| 1.4.2. Cromatografía de Gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) | 30 |
| 1.5. ENFOQUE AUTOMATIZADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS: INTEGRACIÓN DE GNPS Y MZMINE EN REDES MOLECULARES | 35 |
| CAPÍTULO II. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS | 39 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 39 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 39 |
| 2.3. HIPÓTESIS | 40 |
| CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO | 41 |
| 3.1. ESQUEMA DE TRABAJO | 41 |
| 3.2. MATERIALES Y REACTIVOS | 42 |
| 3.3. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN | 43 |
| 3.4. PROCEDIMIENTO | 45 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.1. Recolección y secado de la planta..... | 45 |
| 3.4.2. Preparación del extracto orgánico de <i>E. fosbergii</i> | 47 |
| 3.4.3. Análisis de las fracciones por TLC y CG-EM | 48 |
| 3.4.4. Fraccionamiento primario de la fracción de hexano con el Sistema de cromatografía Flash | 49 |
| 3.4.5. Ensayo de fitotoxicidad de las fracciones de <i>E. fosbergii</i> | 52 |
| 3.4.6. Ensayo de citotoxicidad del extracto crudo de <i>E. fosbergii</i> | 54 |
| 3.4.7. Ensayo espectrofotométrico de actividad antioxidante por DPPH | 57 |
| 3.4.8. Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa | 61 |
| 3.4.9. Fraccionamiento secundario..... | 65 |
| CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 69 |
| 4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE HEXANO, DICLOROMETANO Y METANOL | 69 |
| 4.2. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES..... | 70 |
| 4.3. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES POR TLC Y CG | 70 |
| 4.4. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DE LA FRACCIÓN DE HEXANO CON EL SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA FLASH | 87 |
| 4.5. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES..... | 89 |
| 4.6. ENSAYO DE FITOTOXICIDAD | 96 |
| 4.7. BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD | 100 |
| 4.8. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE..... | 104 |
| 4.9. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA α -GLUCOSIDASA | 109 |
| 4.10. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO Y ENSAYOS | 114 |
| 4.11. REDES MOLECULARES | 118 |
| CONCLUSIONES..... | 121 |
| RECOMENDACIONES..... | 123 |
| REFERENCIAS..... | 124 |

Lista de tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>E. fosbergii</i> | 16 |
| Tabla 2. Nombres vernáculos de <i>E. fosbergii</i> | 18 |
| Tabla 3 Distribución global de la especie <i>E. fosbergii</i> Nicolson..... | 19 |
| Tabla 4. Revisión Bibliográfica de los Compuestos Identificados en <i>E. fosbergii</i> | 22 |
| Tabla 6. Sistemas de elución utilizados para la fracción de hexano | 51 |
| Tabla 7. Masa de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol..... | 70 |
| Tabla 8. Resultados del Análisis de TLC de las fracciones de Hexano, Diclorometano y Metanol con Reveladores Específicos | 76 |
| Tabla 9. Compuestos de Mayor Abundancia Identificados de la fracción de hexano..... | 78 |
| Tabla 10. Compuestos de Mayor Abundancia Identificados de la fracción de diclorometano..... | 83 |
| Tabla 11. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F06-f15,16 | 89 |
| Tabla 12. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F11-f22 | 90 |
| Tabla 13. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F12 | 91 |
| Tabla 14. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F13 | 92 |
| Tabla 15. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F14 | 93 |
| Tabla 16. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F15 | 94 |
| Tabla 17. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F16 | 95 |
| Tabla 18. Porcentaje de inhibición del crecimiento en semillas de rábano tratadas con fracciones de metanol, hexano y diclorometano a diferentes concentraciones..... | 97 |
| Tabla 19. Porcentaje de inhibición del crecimiento en semillas de tomate tratadas con fracciones de metanol, hexano y diclorometano a diferentes concentraciones..... | 97 |
| Tabla 20. Resultados del bioensayo de citotoxicidad de las fracciones de <i>E. fosbergii</i> | 101 |
| Tabla 21. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Secundario del EF-A-F16 | 114 |

Lista de cromatogramas/ espectros

| | |
|---|----|
| Cromatograma 1. Cromatograma por CG-EM de la fracción de hexano de <i>E. fosbergii</i> | 77 |
| Cromatograma 2. Estructuras de algunos compuestos abundantes de la fracción de hexano y sus correspondientes tiempos de retención..... | 80 |
| Cromatograma 3. Cromatograma por CG-EM de la fracción de diclorometano de <i>E. fosbergii</i> | 82 |
| Cromatograma 4. Estructuras de algunos compuestos volátiles abundantes de la fracción de diclorometano y sus correspondientes tiempos de retención | 84 |
| Espectro 1. Espectro de masas del Estigmasterol..... | 80 |
| Espectro 2. Espectro de masas del γ -Sitosterol..... | 85 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Productos naturales: Clasificación y función..... | 5 |
| Figura 2. Distribución global de la familia <i>Emilia</i> | 11 |
| Figura 3. Estructura de un alcaloide pirrolizidínico (R_1 y R_2 corresponden a diferentes ácidos néricos) y grupos de APs, según la base de necina..... | 14 |
| Figura 4. Alcaloides de pirrolizidina aislados de <i>E. sonchifolia</i> (L.) DC. de Taiwán | 15 |
| Figura 5. Inflorescencias de <i>E. fosbergii</i> | 16 |
| Figura 6. Los principales compuestos identificados en el extracto metanólico de hoja de <i>E. fosbergii</i> | 20 |
| Figura 7. Representación esquemática de la cámara de desarrollo ascendente para TLC..... | 27 |
| Figura 8. Unidad CG-EM..... | 30 |
| Figura 9. Principio de funcionamiento de la CG-EM | 31 |
| Figura 10. Espectro de masas..... | 34 |
| Figura 11. Descripción general del GNPS. | 36 |
| Figura 12. Esquema del trabajo de investigación..... | 41 |
| Figura 13. Placas de TLC Sigma-Aldrich..... | 42 |
| Figura 14. Reactivo 2,2-Difenil-1-Picrihidrazilo (DPPH) de Sigma-Aldrich..... | 43 |
| Figura 15. Evaporador rotatorio Buchi R300 | 44 |
| Figura 16. Espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan..... | 44 |
| Figura 17. Cromatógrafo de gases Agilent 5977 GC/MSD con muestreador automático | 45 |
| Figura 18. <i>Emilia fosbergii</i> , espécimen en sitio de colecta..... | 46 |
| Figura 19. La planta seca fue triturada y almacenada antes de la maceración | 47 |
| Figura 20. Material vegetal preparado para la maceración | 48 |
| Figura 21. Preparación de la columna y cabezal | 49 |
| Figura 22. Obtención de fracciones primarias | 50 |
| Figura 23. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas | 51 |
| Figura 24. Ensayo de fitotoxicidad con semillas de tomate | 53 |
| Figura 25. Esquema del ensayo de fitotoxicidad..... | 54 |
| Figura 26. Cultivo e incubación de <i>Artemia salina</i> | 55 |
| Figura 27. Ensayo de citotoxicidad con <i>A. salina</i> | 56 |
| Figura 28. Mecanismos de reacción de DPPH por un antioxidante (AH)..... | 57 |
| Figura 29. Preparación de triplicados de las fracciones en los tubos de ensayo..... | 58 |
| Figura 30. Acción de la enzima α -glucosidasa sobre el pNPG..... | 61 |
| Figura 31. Diseño de la placa de 96 pocillos..... | 63 |
| Figura 32. Preparación de la curva de hexano | 64 |
| Figura 33. Procedimiento del fraccionamiento secundario..... | 66 |
| Figura 34. TLC de las fracciones obtenidas a 365 nm | 67 |
| Figura 35. Partes aéreas de <i>E. fosbergii</i> | 69 |
| Figura 36. TLC (fase normal) de la fracción de hexano..... | 71 |
| Figura 37. Placas de la fracción de hexano expuestas a luz UV y reveladores | 72 |
| Figura 38. TLC (fase normal) de la fracción de diclorometano | 73 |
| Figura 39. Placas de la fracción de diclorometano expuestas a luz UV y reveladores | 73 |
| Figura 40. TLC (fase normal) de la fracción de metanol | 74 |
| Figura 41. Placas de la fracción de diclorometano expuestas a luz UV y reveladores | 75 |

| | |
|--|-----|
| Figura 42. Fragmentos registrados en el espectro de masas para el estigmasterol | 81 |
| Figura 43. Fragmentos registrados en el espectro de masas para el γ -sitosterol..... | 86 |
| Figura 44. Fracciones primarias obtenidas..... | 87 |
| Figura 45. Esquema del Fraccionamiento Primario de la Fracción de Hexano..... | 88 |
| Figura 46. Visualización de las artemias en el estereomicroscopio | 101 |
| Figura 47. Resultados de la fracción de metanol frente al DPPH | 108 |
| Figura 48. Esquema del Fraccionamiento Secundario de la EF-A-F16..... | 115 |
| Figura 49. Redes moleculares filtradas por la abundancia relativa de iones en las fracciones de hexano y diclorometano..... | 120 |

Resumen

Emilia fosbergii, una maleza originaria de África que está ampliamente distribuida en América Latina representa un desafío significativo para los cultivos de café en Panamá debido a su alta capacidad de propagación y agresividad. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial biotecnológico de extractos orgánicos de *E. fosbergii* recolectada en los cultivos de café del corregimiento de Santa Clara, provincia de Chiriquí, Panamá. La planta fue procesada mediante maceración con hexano, diclorometano y metanol, obteniéndose 3 fracciones que fueron evaluadas para determinar su actividad citotóxica frente a nauplios de *Artemia salina*, su actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH, su actividad fitotóxica en semillas de *Raphanus sativus* y *Solanum lycopersicum*, y su capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. Adicionalmente, se realizó un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de las fracciones apolares, utilizando la base de datos NIST20 para identificar los compuestos presentes. Los resultados mostraron que la fracción de diclorometano presentó la mayor actividad citotóxica ($DL_{50} = 158.5 \mu\text{g/mL}$), mientras que el extracto metanólico mostró una actividad antioxidante moderada, que es atribuida a compuestos fenólicos y flavonoides. En cuanto a la actividad hipoglucemiante, la fracción hexánica destacó por su capacidad para inhibir a la enzima α -glucosidasa, identificándose en esta fracción compuestos como escualeno, campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol, los cuales han sido reportados previamente como inhibidores de esta enzima. Por otro lado, no se observó actividad fitotóxica significativa en ninguno de los extractos, lo que sugiere que *E. fosbergii* no tiene efectos alelopáticos negativos sobre las semillas evaluadas. Finalmente, el análisis de redes moleculares generado con GNPS permitió agrupar los compuestos según sus similitudes químicas y patrones de fragmentación, revelando familias de compuestos relacionados. Se identificaron nodos que representan posibles compuestos no reportados, lo que resalta la necesidad de futuros estudios para el aislamiento y la caracterización estructural de estos compuestos. En conclusión, los extractos apolares de *E. fosbergii* representan una fuente prometedora de compuestos bioactivos, especialmente con potencial hipoglucemiante, que podrían ser de interés para aplicaciones terapéuticas y farmacológicas.

Palabras clave: maleza, actividad citotóxica, actividad fitotóxica, actividad antioxidante, actividad hipoglucemiante.

Abstract

Emilia fosbergii, a weed native to Africa and widely distributed in Latin America, represents a significant challenge for coffee crops in Panama due to its high aggressive growth and propagation ability. This study aimed to evaluate the biotechnological potential of organic extracts from *E. fosbergii* collected in coffee plantations in the Santa Clara district, Chiriquí province, Panama. The plant material was processed through maceration using hexane, dichloromethane, and methanol, yielding three fractions. These fractions were evaluated for their cytotoxic activity against *Artemia salina* nauplii, antioxidant activity using the DPPH assay, phytotoxic activity on *Raphanus sativus* and *Solanum lycopersicum* seeds, and inhibitory capacity against the α -glucosidase enzyme. Additionally, Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of the nonpolar fractions was conducted using the NIST20 database to identify the present compounds. Results showed that the dichloromethane fraction exhibited the highest cytotoxic activity ($LD_{50} = 158.5 \mu\text{g/mL}$), whereas the methanolic extract demonstrated a moderate antioxidant activity, which is attributed to phenolic and flavonoid compounds. Regarding hypoglycemic activity, the hexane fraction stood out for its ability to inhibit the α -glucosidase enzyme, with compounds such as squalene, campesterol, stigmasterol, and γ -sitosterol identified. These compounds have previously been reported as potential inhibitors of this enzyme. On the other hand, no significant phytotoxic activity was observed in any of the extracts, suggesting that *E. fosbergii* does not exhibit negative allelopathic effects on the evaluated seeds. Finally, a molecular network analysis generated with GNPS grouped the compounds based on their chemical similarities and fragmentation patterns, revealing families of related compounds. Nodes representing potentially unreported compounds were identified, highlighting the need for future studies focused on isolating and structurally characterizing these compounds. In conclusion, the nonpolar extracts of *E. fosbergii* represent a promising source of bioactive compounds, particularly with hypoglycemic potential, which could be of interest for therapeutic and pharmacological applications.

Keywords: weed, cytotoxic activity, phytotoxic activity, antioxidant activity, hypoglycemic activity.

INTRODUCCIÓN

La producción de café (*Coffea arabica L.*) en la provincia de Chiriquí, ubicada en el oeste de Panamá, representa una de las actividades económicas más relevantes para la región, así como para la economía nacional. Según estimaciones de técnicos y especialistas del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), para el ciclo 2022-2023 hubo una previsión relacionada con el incremento en la producción de café del 15 al 20 por ciento en comparación con el ciclo agrícola anterior (2021-2022), durante el cual se cosecharon 88 mil quintales (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, 2022). Esta proyección se sustentó en datos proporcionados por la Dirección Nacional de Agricultura del MIDA, que indican que Chiriquí es la provincia con la mayor producción de café del país, con 6,434.99 hectáreas cultivadas por 1,154 productores. En contraste, las provincias de Coclé, Panamá Oeste y Colón presentan superficies cultivadas de 4,715, 2,300 y 1,801 hectáreas, respectivamente (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, 2022).

A pesar de su importancia económica, la producción cafetalera enfrenta anualmente diversos desafíos que pueden comprometer su rendimiento y rentabilidad. Dentro de estos retos, están las malezas que se destacan como uno de los factores más significativos de pérdidas económicas sustanciales al interferir con el crecimiento y desarrollo de las plantas de café. Esta interferencia no solo afecta el crecimiento vegetativo, sino que también influye directamente en el rendimiento del fruto. En los cafetales, las malezas compiten con las plantas de café por los macronutrientes disponibles en el suelo y espacio, lo que puede resultar en una disminución de la calidad y cantidad de la cosecha. Además, estas malezas pueden limitar el rendimiento del café a través de la producción de sustancias químicas alelopáticas, que inhiben el crecimiento de las plantas deseadas. También compiten por el espacio en la zona cultivada y pueden actuar como reservorios para plagas y patógenos (Radosevich, Holt, & Ghera, 1997; De Graff, 1986).

La competencia ejercida por las malezas puede disminuirse mediante estrategias efectivas de manejo que eliminen o erradiquen su presencia. Esta reducción no solo facilita un ambiente más propicio para el crecimiento del café, sino que también ayuda a aumentar notablemente el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, es importante destacar que no todas las malezas compiten de manera negativa con las plantas de café; algunas pueden tener efectos neutros o

incluso beneficiosos. Por esta razón, es esencial que los agricultores sean capaces de distinguir entre malezas benignas y malignas (Altieri, 1995). Lograr de manera correcta esta diferenciación permite implementar prácticas de manejo más sostenibles y efectivas para evitar pérdidas económicas significativas e implementar estrategias alternativas que permitan incrementar el rendimiento por unidad de superficie cultivada. Asimismo, es necesario fomentar una conciencia ambiental que promueva el uso responsable de herbicidas, dado el riesgo asociado a su alta toxicidad para la salud humana y el ambiente.

Una de las especies de malezas más problemáticas es *E. fosbergii*, reconocida por su carácter agresivo y su capacidad para invadir rápidamente los cultivos, lo que la convierte en una gran preocupación para la producción cafetalera en la región. Esta maleza es de origen africano y ha sido introducida en América Latina causando un impacto negativo como maleza. Sin embargo, está reportado que, en la medicina tradicional, varias especies del género *Emilia* se utilizan para tratar diversas dolencias, como inflamaciones, fiebre y enfermedades respiratorias (Freitas, 2020).

Tomando en consideración la información mostrada anteriormente, la presente tesis tuvo como objetivo obtener evidencia científica que permitiera inferir si los extractos orgánicos de *E. fosbergii* presentaban actividad fitotóxica marcada, con el fin de determinar si afectaban a los cultivos de café mediante un efecto alelopático negativo. Asimismo, se evaluaron los extractos orgánicos en una serie de bioensayos para determinar actividades biológicas de interés. Para facilitar el trabajo, se prepararon tres fracciones con disolventes en orden creciente de polaridad (hexano, diclorometano y metanol). A estas fracciones se les determinó su capacidad antioxidante, su efecto inhibitorio en la función de la enzima α -glucosidasa, así como su actividad citotóxica. Este estudio buscó contribuir al conocimiento científico sobre las actividades biológicas de *E. fosbergii* y su interacción con los cultivos de café. La comprensión de la composición química y las propiedades bioactivas de esta planta fue considerada como un posible aporte para identificar aplicaciones agroquímicas, proporcionando información valiosa para la gestión integrada de malezas en sistemas agrícolas. Los resultados obtenidos a partir de este proyecto ofrecieron información crucial para tomar decisiones fundamentadas sobre el manejo de esta planta en las plantaciones de café, ya sea optando por su conservación o considerando su erradicación como medida de control.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se justifica por la creciente necesidad de enfrentar, de manera sostenible e innovadora, los desafíos que representan las malezas en los cultivos de café, un cultivo de gran importancia económica y social en Panamá. Entre estas malezas, *Emilia fosbergii* ha sido identificada como una especie con potencial impacto negativo, tanto por su capacidad de competencia con cultivos agrícolas como por la presencia de compuestos tóxicos, entre ellos los alcaloides pirrolizidínicos, que representan un riesgo potencial para la salud humana y animal.

A pesar de su uso tradicional en la medicina herbal, la caracterización científica de *E. fosbergii* sigue siendo limitada, especialmente en lo que respecta a sus metabolitos secundarios y sus posibles efectos biológicos. Por ello, esta investigación propone un abordaje integral que combine la caracterización química de los metabolitos volátiles presentes en los extractos apolares con la evaluación de distintas actividades biológicas de interés: fitotoxicidad, citotoxicidad, capacidad antioxidante e inhibición de la enzima α -glucosidasa.

La identificación de estas actividades resulta clave para evaluar el potencial biotecnológico de la especie. Por un lado, si se confirma su efecto fitotóxico selectivo, esta planta podría ser utilizada como fuente de compuestos alelopáticos para el desarrollo de herbicidas naturales. Por otro lado, las actividades citotóxicas y antioxidantes detectadas podrían sustentar su uso en la medicina tradicional y abrir nuevas posibilidades en la búsqueda de agentes terapéuticos.

Esta perspectiva innovadora y multidisciplinaria permitirá ampliar el conocimiento científico sobre *E. fosbergii*, evaluando no solo sus riesgos potenciales, sino también sus posibles aplicaciones en contextos agrícolas y medicinales. Los resultados de esta investigación podrían tener implicaciones relevantes en áreas como la fitoquímica, la ecología, la toxicología ambiental y la medicina tradicional, así como en la formulación de estrategias sostenibles de manejo de malezas en sistemas de cultivo de café.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. HISTORIA DE LOS PRODUCTOS NATURALES

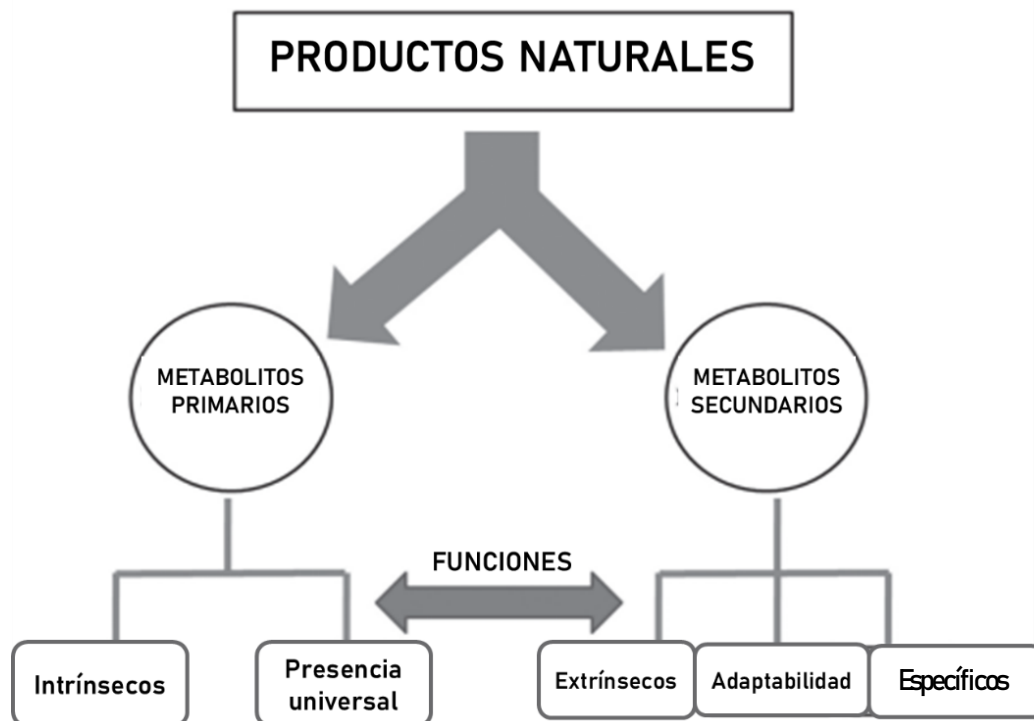
Los productos naturales son sustancias o compuestos químicos obtenidos de organismos vivos, como: plantas, animales, hongos y microorganismos. A lo largo de la historia, la humanidad ha empleado este tipo de sustancias para múltiples propósitos, incluyendo alimentación, medicina, cosmética y diversas aplicaciones industriales. Estos productos han sido fundamentales para el avance de la medicina tradicional y continúan siendo una fuente clave para el desarrollo de nuevos medicamentos y agentes terapéuticos (Yuan, Ma, Ye, & Piao, 2016). Según la propuesta de Albrecht Kossel en 1891, los productos naturales suelen dividirse en dos clases principales, los metabolitos primarios y secundarios (Figura 1) (Kossel, 1891; Kliebenstein, 2004; Karlovsky, 2008).

Los metabolitos primarios son compuestos esenciales que participan en los procesos metabólicos básicos necesarios para la supervivencia y el crecimiento de los organismos. Entre estos se encuentran biomoléculas como los carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas, vitaminas y minerales, que son fundamentales y desempeñan funciones clave en la producción de energía, la formación de estructuras celulares, las rutas bioquímicas esenciales (rutas metabólicas) y la transferencia de información genética. Estos metabolitos están presentes de manera universal en todos los seres vivos, ya que son indispensables para el funcionamiento celular básico (Chakraborty, Dhara, & Pai, 2024).

Por otro lado, los metabolitos secundarios no se involucran directamente en los procesos metabólicos primarios que son requeridos para el crecimiento y desarrollo de los organismos. Sin embargo, cumplen funciones relevantes, como la defensa contra depredadores, la competencia por recursos o la atracción de polinizadores. Estos metabolitos aumentan la competitividad del organismo dentro de su entorno (Pérez-Urria Carril & Ávalos, 2009) y pueden ofrecer ventajas adaptativas, al actuar como pesticidas naturales, antibióticos o moléculas de señalización que permiten responder a desafíos ambientales (Chakraborty, Dhara, & Pai, 2024). Muchos de estos compuestos son pigmentos que dan

color a flores y frutos, desempeñando un papel fundamental en la reproducción al atraer insectos polinizadores que utilizan los frutos como fuente de alimento, lo que contribuye a la dispersión de semillas (Pérez-Urria Carril & Ávalos, 2009). Además, muchos de ellos poseen propiedades medicinales, lo que los hace valiosos en aplicaciones médicas. La industria farmacéutica ha utilizado estos compuestos en el desarrollo de medicamentos, ya que tienen diversos usos terapéuticos que ha dado lugar a importantes fármacos (antiinflamatorios, antidiabéticos, antienviejimiento, antimicrobianos, antiparasitarios, anticancerígenos, antioxidantes y cicatrizantes) (Escamilla & Mendoza, 2018; Wink, 2015). Entre estos metabolitos secundarios se encuentran los terpenos, alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides, carotenoides y cumarinas. Es importante señalar que no todos los metabolitos secundarios están presentes en todas las especies vegetales; estos se sintetizan en cantidades limitadas a partir del metabolismo primario y su producción suele estar restringida a ciertos géneros, familias o incluso especies (Pérez-Urria Carril & Ávalos, 2009).

Figura 1. *Productos naturales: Clasificación y función*



El estudio de los productos naturales es fundamental en la investigación fitoquímica, ya que permite identificar los principios activos presentes en las especies vegetales, los cuales pueden tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales para la salud humana y el ambiente. En tipo de investigaciones no solo contribuye al conocimiento de los posibles riesgos asociados al uso de ciertas plantas, sino que también permite explorar su potencial para el desarrollo de alternativas terapéuticas más accesibles y alineadas con un enfoque de sostenibilidad.

1.2. GENERALIDADES DE LA FAMILIA *Asteraceae*

La familia *Asteraceae*, también conocida como *Compositae*, es una de las familias de plantas más grandes y diversas, con aproximadamente 23,000 especies distribuidas en más de 1,600 géneros. La clasificación contemporánea de esta familia se fundamenta en datos tanto morfológicos como moleculares, e incluye 12 subfamilias y 43 tribus (Funk *et al.*, 2009). Esta familia incluye muchas de las plantas más conocidas y utilizadas en el mundo, tanto en la alimentación como en la medicina y la ornamentación. Las *Asteraceae* incluyen hierbas, arbustos, árboles o enredaderas, y presentan una amplia gama de formas y tamaños que prosperan en casi todos los hábitats, ciclos de vida anuales o perennes. Numerosas especies de esta familia son utilizadas en la medicina tradicional y sus actividades biológicas son objeto de diversos estudios (Funk *et al.*, 2009).

Las especies de la familia *Asteraceae* son muy variables en cuanto a su forma de crecimiento y hábitat, pero pueden reconocerse por sus inflorescencias "capituladas", que son estructuras compuestas que pueden parecer flores individuales, en las que numerosas flores pequeñas se abren primero por fuera y rara vez están subtendidas por brácteas (Judd *et al.*, 2002). Las anteras de esta familia suelen estar fusionadas y forman un tubo a través del cual se extiende el estilo antes de que los dos lóbulos estigmáticos se separen y se vuelvan recurvados. Los frutos, más bien pequeños y de una sola semilla, suelen tener un "papus" plumoso y con frecuencia se dispersan por el viento (Stevens, 2001). Esta disposición permite a las *Asteraceae* atraer a una variedad de polinizadores, lo que contribuye a su éxito evolutivo (Judd *et al.*, 2002).

Funk *et al.* (2009) detallan la morfología de las flores de las *Asteraceae* de la siguiente manera:

“Flósculos dispuestos sobre un receptáculo en cabezuelas de desarrollo centripeto y rodeadas de brácteas, con anteras fusionadas en un anillo donde el polen es empujado o cepillado hacia afuera por el estilo, y la presencia de aquenios (cipselas) generalmente con un papo.”

Los miembros de esta familia se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, conquistando todos los hábitats disponibles, desde los desiertos secos hasta los pantanos y desde las selvas hasta los picos montañosos. En muchas regiones del mundo las plantas compuestas llegan a integrar hasta el 10 % de la flora vernácula (Stevens, 2001). Esta amplia distribución se debe a su adaptabilidad y a su capacidad para colonizar diversos ambientes (Stevens, 2001).

La familia *Asteraceae* tiene una importancia económica significativa. Muchas especies son cultivadas por sus flores ornamentales, como los girasoles (*Helianthus annuus*) y las margaritas (*Bellis perennis*). Además, varias especies son fuente de alimentos, como la lechuga (*Lactuca sativa*) y el alcaucil (*Cynara scolymus*). También se utilizan en la medicina tradicional y moderna, destacando el uso de plantas como la equinácea (*Echinacea spp.*) y el diente de león (*Taraxacum officinale*) por sus propiedades terapéuticas (McGregor, 1976). La mayoría de las especies de esta familia contienen un látex lechoso o aceitoso, y muchas poseen compuestos químicos que les confieren propiedades medicinales o tóxicas (Barkley, 2010).

La familia *Asteraceae* desempeña un papel crucial en los ecosistemas, proporcionando alimento y hábitat para una variedad de organismos. Sin embargo, algunas especies de esta familia son consideradas invasoras, lo que puede llevar a la disminución de la biodiversidad local y a la alteración de los ecosistemas. Por ejemplo, *E. fosbergii* y *E. sonchifolia*, que se han identificado como plantas invasoras en ciertas regiones del mundo, lo que resalta la necesidad de un manejo adecuado de las especies de esta familia (CABI, 2016; Freitas, 2020).

La diversidad biológica de las *Asteraceae* influye en la variedad de su composición química. La biosíntesis de metabolitos secundarios en esta familia abarca una amplia gama de compuestos, incluidos monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas, poliacetilenos, flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos, cumarinas y alcaloides de pirrolizidina. Dos grupos particulares de estas clases de compuestos, los poliacetilenos y las lactonas sesquiterpénicas, son exclusivas de esta familia (Funk *et al.*, 2009). En la familia *Asteraceae*, la producción de alcaloides pirrolizidínicos se limita a las tribus *Senecioneae* (la tribu más grande de las *Asteraceae*) y *Eupatorieae* (Nordenstam *et al.*, 2009). La biodiversidad y la diversidad química de las *Asteraceae* las convierten en un tema fascinante para estudios de quimiotaxonomía (Shulha & Zidorn, 2019).

En un estudio se examinó la inhibición de ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX) en 57 especies de *Asteraceae*, donde 13 [26.6 %, rango de concentración inhibitoria (CI₅₀) de 0.03-36.2 µg/mL] mostraron una inhibición dual (Chagas-Paula, Oliveira, Faleiro, Oliveira, & Costa, 2015), destacando su potencial antiinflamatorio. No obstante, uno de los compuestos bioactivos más destacados de las *Asteraceae* es el sesquiterpeno artemisinina, aislada de *Artemisia annua* L., descubierta para tratar la malaria y como precursor de derivados más eficaces contra esta enfermedad, lo que llevó a Tu You-You a recibir el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2015 (Tu, 2011; Tu *et al.*, 1982).

A pesar de la enorme diversidad de especies presentes en la familia *Asteraceae*, solo unas pocas especies se utilizan como cultivos domésticos. Algunos de los ejemplos más conocidos son el girasol, la lechuga y la achicoria (Funk *et al.*, 2009). Sin embargo, estos productos se encuentran entre los cultivos más producidos en el mundo. La achicoria (*Cichorium intybus* L.) es nativa de la región mediterránea. *C. intybus* L. comprende diversas variedades, como la achicoria, endivia belga, witloof, tipo catalogna, achicoria de café y radicchio. Los estudios describen la lechuga común (*Lactuca sativa* L.) y la achicoria como buenas fuentes de flavonoides glucosilados, derivados del ácido cafeico y lactonas sesquiterpénicas, ya que pueden consumirse crudas en ensaladas, evitando la degradación de estos compuestos (Pepe, *et al.*, 2015). Las lactonas sesquiterpénicas son responsables de la amargura de la lechuga y la achicoria (Price, *et al.*, 1990). Las lactonas sesquiterpénicas han

mostrado actividad en algunas líneas celulares tumorales, lo que ha aumentado el interés en estos compuestos como plantas comestibles (Shulha & Zidorn, 2019). Por otro lado, la diversidad de *Asteraceae* aún podría incluir plantas comestibles si consideramos especies no investigadas, ya que varios estudios etnobotánicos informan que la mayoría de las especies silvestres comestibles encontradas pertenecen a la familia *Asteraceae* (Licata, *et al.*, 2016; Renna, *et al.*, 2015). Algunos ejemplos de especies silvestres comestibles de *Asteraceae* utilizadas en todo el mundo son el diente de león (*Taraxacum officinale*), la alcachofa (*Cynara scolymus*), el cardo (*Cynara cardunculus*), la artemisa (*Artemisia vulgaris*), y el tanaceto (*Tanacetum vulgare*). Estas plantas se valoran por sus hojas, raíces y flores, y se utilizan en diversas preparaciones culinarias y remedios tradicionales (Freitas, 2020).

Bidens pilosa, conocida comúnmente como "pico de gallo", "mala madre", "hierba de los pobres" o "black-jack", se utiliza tradicionalmente para tratar diversas enfermedades y presenta propiedades antiinflamatorias (Bartolome, *et al.*, 2013), antimicrobianas (Calderín, *et al.*, 2021), antidiabéticas (Idris, *et al.*, 2023), antioxidantes (Bartolome, *et al.*, 2013) antipalúdicas (Idris, *et al.*, 2023) y hepatoprotectoras (Calderín, *et al.*, 2021). Estudios fitoquímicos han identificado casi 200 compuestos en esta especie, con especial énfasis en la quercetina y el kaempferol, que tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios, los poliacetilenos, estos compuestos se han asociado a actividades antimicrobianas y anticancerígenas, las cumarinas y flavonoides, incluyendo auronas, chalconas y flavanonas (Idris, *et al.*, 2023).

La *Galinsoga parviflora*, es comúnmente conocida como "guasca" en Colombia, "potato weed" en Reino Unido y Estados Unidos, y como "fazendeiro" en Brasil. Esta especie es nativa de América del Sur, especialmente en países como Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Perú (Cavanilles, 1796). Se utiliza tradicionalmente por sus propiedades antiinflamatorias, especialmente en el tratamiento de afecciones dermatológicas como el eccema. Según un estudio fitoquímico, esta planta es rica en vitaminas como el betacaroteno, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico (D.R, *et al.*, 2021). También contiene flavonoides, flavanonas, derivados del ácido cafeico, diterpenos y esteroides (Ali, Zameer, & Yaqoob, 2017).

1.3. ANTECEDENTES BOTÁNICOS, ETNOMÉDICOS Y QUÍMICOS DEL GÉNERO *Emilia*

Emilia Cass. es un género paleotropical de la subtribu *Senecioneae*, tribu *Senecioneae* (*Asteraceae*), que comprende 117 especies (World Flora Online, 2024a), la mayoría de las cuales son plantas anuales, comúnmente como flores de borla o “tassel flowers” en inglés. La historia taxonómica del género *Emilia* se remonta a 1817, cuando Cassini describió por primera vez el género como diferente del género linneano *Cacalia* L. (Linnaeus, 1753), sólo incluyó tres especies. Candolle amplió el género a 13 especies (Candolle, 1824), refiriendo dos de las especies descritas por Cassini, *E. purpurea* (Cassini, 1825) y *E. flammea* (Cassini, 1891), a *E. sonchifolia* (Linnaeus, 1753) y *E. sagittata* (Candolle, 1824) respectivamente (Mapaya & Cron, 2020). En su revisión de *Emilia*, Garabedian reconoció 23 especies (todas discoides) (Mapaya & Cron, 2020). Consideraba a *Emilia* “más como una asociación de especies aliadas que como un género distinto” (Nicolson, 1980). Hoffmann creó un subgénero *Emilia* Cass. dentro de *Senecio* Linnaeus (Hoffmann, 1890) y la mayoría de las especies de *Emilia* siguieron clasificándose en *Senecio* o aún no habían sido reconocidas o descritas (Cufodontis, 1967) hasta el trabajo de Jeffrey en 1986 (Tadesse & Beentje, 2004; Mapaya & Cron, 2020).

Las especies del género *Emilia* se caracterizan por ser hierbas que puede alcanzar hasta 1 metro de altura y con tallos generalmente simples o ramificados, cubiertos de pelos suaves. Las hojas son alternas, con las inferiores pecioladas y las superiores sésiles, presentando formas que varían de orbiculares a obovadas, con márgenes undulados y dentados (Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2010). En el género *Emilia*, las inflorescencias son capítulos o cabezuelas, compuestas que contienen de 15 a 30 flores pequeñas (floretes) de varios colores (blanco, amarillo, naranja, rojo, rosa o púrpura), con flores tubulares predominantes (Vibrans, 2011; Padrón & Ricart, 2015). El involucre está formado por una sola serie de brácteas, que puede variar en forma y tamaño dependiendo de la especie (Vibrans, 2011; CONABIO, 2016). Los frutos son aquenios, que son frutos secos que no se abren al madurar y contienen una sola semilla. Los aquenios suelen estar provistos de un vilano (una estructura similar a un penacho) que ayuda en la dispersión del viento. Las plantas del género *Emilia* generalmente presentan un sistema radicular fibroso, que permite

una buena absorción de nutrientes y agua del suelo (Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2010). Las especies de *Emilia* suelen valorarse por su atractivo ornamental debido a los vibrantes colores de sus flores (CONABIO, 2016).

Figura 2. Distribución global de la familia *Emilia*



Nota. La figura muestra en verde, la distribución nativa y en gris, la distribución introducida de la familia *Emilia*. Fuente: World Flora Online (2024).

Estas especies están ampliamente distribuidas por regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, como se observa en la Figura 2. En África, *E. coccinea* y *E. fosbergii* son nativas de regiones tropicales y prosperan en diversos hábitats, como praderas, bosques abiertos y zonas alteradas, como bordes de carreteras y campos (Burkill, 1985). En Asia, la *E. sonchifolia* está muy extendida y se encuentra en países como la India, China, Indonesia y Filipinas. Crece en hábitats similares a los de sus homólogas africanas, a menudo en zonas abiertas y alteradas (Flora of China Editorial Committee, 2014), *E. fosbergii* Nicolson y *E.*

sonchifolia (L.) DC, son dos especies de malezas que se han extendido hasta el Neotrópico, incluyendo Hawái y las Bahamas (Barkley, 2006). Ambas especies se han introducido en América y ahora se encuentran en regiones tropicales y subtropicales de América del Norte, Central y del Sur. Varias especies de *Emilia*, incluidas *E. sonchifolia* y *E. coccinea*, también se encuentran en Australia y varias islas del Pacífico. Han sido introducidas y se han adaptado bien a los climas de estas regiones (Henty, Owner, & Pritchard, 1988). Aunque no son nativas de Europa, algunas especies de *Emilia* pueden encontrarse en climas mediterráneos, donde se han introducido como plantas ornamentales.

La identificación correcta de estas especies es un desafío, ya que *E. fosbergii* a menudo es identificada erróneamente como *E. coccinea* o *E. sonchifolia* var. *javanica*, presente sólo en Oceanía y Asia (Nicolson, 1980). *E. sonchifolia*, *E. fosbergii* y *E. coccinea* son tres especies estrechamente relacionadas y muy similares en términos de su apariencia y biología. Se pueden distinguir por su color y forma de las hojas (Rojas & Acevedo, 2022). *E. coccinea* tiene flores de color naranja brillante a rojo, y sus hojas no tienen forma de pluma como las otras dos especies de *Emilia*. *E. coccinea* no ha sido documentada en Florida (Khamare, Marble, Steed, & Boyd, 2021). A diferencia de *E. sonchifolia* que es originaria de Asia, el origen de *E. fosbergii* Nicolson aún no está definido, pero la principal hipótesis sobre su origen sugiere que esta especie es descendiente neotropical de *E. sonchifolia* (Moraes & Guerra, 2010; Nicolson, 1980).

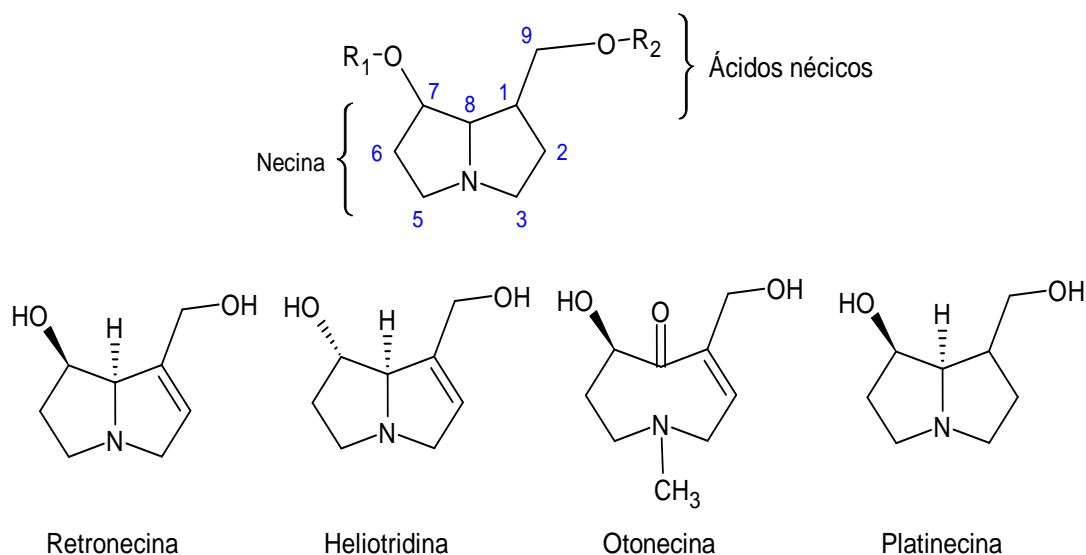
E. sonchifolia se utiliza desde hace mucho tiempo en la medicina tradicional china y en la medicina india Ayurveda para tratar muchos problemas como fiebre, heridas, afecciones respiratorias y enfermedades inflamatorias. Algunos estudios han confirmado sus actividades antiinflamatorias y anti nociceptivas (Couto, *et al.*, 2011; Muko & Ohiri, 2000). También se han evaluado sus actividades antitumorales y citotóxicas (Shylesh & Padikkala, 2000), mostrando un potencial de inhibición de la metástasis en ratones provocada por el melanoma B16F10 (George & Kuttan, 2016). Además, *E. sonchifolia* se utiliza como alimento en países asiáticos como Bangladesh, Taiwán y Hong Kong (George & Kuttan, 2016; Dash, Abdullah, & Yahaya, 2015) e incluso en Brasil (Kinupp, 2007).

Los estudios fitoquímicos previos del género *Emilia* se han limitado generalmente a *E. coccinea* y *E. sonchifolia*. En estas dos especies se describieron flavonoides, derivados del ácido clorogénico, acetilenos y cetoésteres, que podrían explicar el uso medicinal antiinflamatorio (Bohlmann & Knoll, 1978; Raj, 2012; Shen, *et al.*, 2013). Los alcaloides pirrolizidínicos (APs) están presentes solo en las familias *Asteraceae* (tribus *Eupatorieae* y *Senecioneae*) y *Boraginaceae*, y en algunos géneros de las familias *Fabaceae* y *Orchidaceae* (Hartmann & Ober, 2000), por lo que la identificación errónea de estas especies se convierte en un problema grave debido a la presencia de APs hepatotóxicos en el género *Emilia*, la mayoría de las cuestiones relacionadas con la salud y los informes de importancia quimiotaxonómica para este género están asociados con la presencia de APs tóxicos (Zidorn, 2019).

Los APs son un grupo de alcaloides derivados de la ornitina que se distribuyen en plantas de ciertos taxones, encontrándose también en insectos que los ingieren para defenderse de depredadores (Bruneton, 2001). Rara vez se presentan en forma libre como base pirrolizidínica, encontrándose en cambio como ésteres (di ésteres mono-, di- o macrocíclicos) formados por una base necina (aminoalcoholes) y uno o más ácidos néricos (ácidos alifáticos mono- o dicarboxílicos), que son responsables de su diversidad estructural (Bruneton, 2001).

Los APs se encuentran habitualmente en forma de bases terciarias o N -óxidos de alcaloides pirrolizidínicos (PANO). La base necina, que puede ser saturada (base platinéina) o insaturada (bases otonecina, heliotridina y retronecina), esta estructura se puede ver en la Figura 3. Los APs con insaturación en la base necina se transforman en pirroles altamente reactivos, capaces de unirse a proteínas e incluso formar enlaces cruzados con el ADN, lo que genera un potencial genotóxico que podría inducir tumorigenicidad (Chen & Huo, 2010; Mattocks, 1968). Los principales órganos afectados en mamíferos son el hígado, donde ocurre la bioactivación, y los pulmones (Culvenor, *et al.*, 1976).

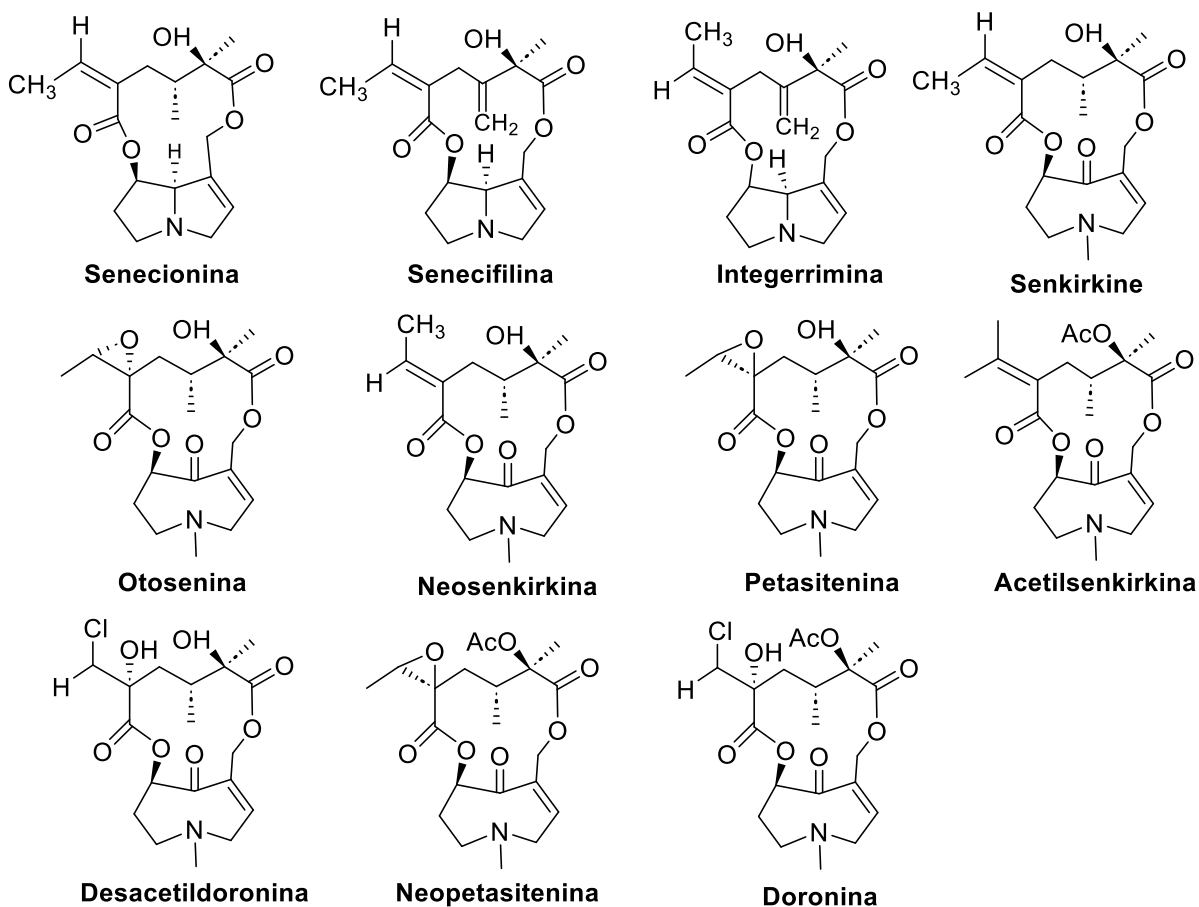
Figura 3. Estructura de un alcaloide pirrolizidínico (R_1 y R_2 corresponden a diferentes ácidos néricos) y grupos de APs, según la base de necina.



Nota. La figura muestra que los APs se encuentran formados por una base necina (aminoalcoholes) y uno o más ácidos néricos (ácidos alifáticos mono- o dicarboxílicos).

Hasta ahora un total de 11 anillos macrocíclicos APs han sido reportados en la especie *E. sonchifolia* incluyendo N-óxidos, retronecina y bases otonecinas (Figura 4) (Hsieh, Chen, Lee, He, & Yang, 2015). El análisis mediante CG-EM de las fracciones vegetales de *E. sonchifolia* permitió identificar APs que contenían tanto bases de retronecina (senecionina, seneciplitina e integerrimina) como de otonecina (senkirina, otosenina, neosenkirina, petasitenina, acetilsenkirina, acetilpetasitenina, desacetilidoronina y doronina) (Hsieh, Chen, Lee, He, & Yang, 2015).

En el extracto de *E. coccinea*, el análisis CL-EM detectó platifilina-N-óxido, tres estereoisómeros de la platifilina no tóxica, ligularidina, neoligularidina, neosenkirina y senkirina (Mroczek, Ndjoko, Głowniak, & Hostettmann, 2004). La emilina se aisló de *E. flammea*, un sinónimo de *E. coccinea* (Barbour & Robins, 1987; World Flora Online, 2024b), y hasta ahora solo se había descrito en esta especie.

Figura 4. Alcaloides de pirrolizidina aislados de *E. sonchifolia* (L.) DC. de Taiwán

Nota. La figura muestra 11 anillos macrocíclicos APs reportados hasta ahora en *E. sonchifolia*. Fuente: Hsieh et al. (2015).

1.3.1. Generalidades de la especie *Emilia fosbergii*

1.3.1.1. Clasificación taxonómica y morfología

E. fosbergii (Figura 5) es una planta perteneciente a la familia *Asteraceae*, comúnmente conocida como la familia del girasol (Tabla 1). Una reevaluación detallada de numerosos especímenes llevó a Nicolson a identificarla como una especie distinta. Esta especie fue nombrada en honor al reconocido botánico Francis Raymond Fosberg (Nicolson, 1975).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *E. fosbergii*

| | |
|----------------|--------------------------------|
| Dominio | Eucariota |
| Reino | Plantae |
| Filo | Espermatofitas. |
| Subfilo | Angiospermas |
| Clase | Eudicotiledóneas |
| Orden | Asterales |
| Familia | <i>Asteraceae</i> |
| Género | <i>Emilia</i> |
| Especie | <i>E. fosbergii</i> (Nicolson) |

Figura 5. Inflorescencias de *E. fosbergii*

Nota. Fuente: Pedro Acevedo-Rodríguez ©Smithsonian Institution (Rojas & Acevedo, 2022).

E. fosbergii es una hierba anual, erecta o ascendente, ramificada, de 10 a 50 cm (hasta 100 cm) de altura., glabra a escasamente pilosa, a veces prominente y villosa-pilosa en y cerca de las axilas de las hojas caulinares medias. Posee una raíz pivotante que, en individuos robustos, se convierte en una raíz fibrosa ramificada. Las hojas son alternas, ampliamente ovadas a oblanceoladas, a menudo afiladas hasta un pecíolo prominente y alado, lo que les da una apariencia panduriforme. La base es sésil a auriculada, el margen es débilmente serrado a dentado o, a veces, lobulado, con dientes callosos en la punta. Miden entre 5 y 10 cm de largo y entre 2 y 5 cm de ancho, siendo aproximadamente dos veces más largas que anchas. Las hojas superiores están reducidas a brácteas lineales serradas que abrazan el tallo (World Flora Online, 2024b; Missouri Botanical Garden, 2014).

Las inflorescencias consisten en cimas corimbiformes sueltas, con una a varias cabezas florales, que surgen terminal o lateralmente en las axilas de las hojas caulinares superiores. Las cabezas florales son turbinadas o, a veces, débilmente urceoladas, y se vuelven débilmente campanuladas con la edad. Son robustas, de 2 a 3 veces más largas que anchas, con floretes que sobresalen prominentemente alrededor de 2 mm más allá del involucre (Missouri Botanical Garden, 2014). Los involucros tienen 8-13 brácteas lineales de 7 a 12 mm de largo. El receptáculo es plano a convexo, con carpodios que forman tubérculos prominentes después de que los aquenios han sido desprendidos. Los floretes, de 15 a 30 en número, varían significativamente en tamaño según la robustez de la planta. Las corolas son de color rosa a púrpura claro o rojo, pero no naranja. El fruto es un aquenio cilíndrico de aproximadamente 4 mm de largo, de color marrón rojizo a bronceado claro, con una fila de pubescencia estrigosa-hirsuta en cada una de las 5 a 10 costillas prominentes. El pappus, persistente y de color blanco, está compuesto por abundantes pelos capilares. (Flora of China Editorial Committee, 2014; Missouri Botanical Garden, 2014).

1.3.1.2. Nombres vernáculos y distribución

Según las regiones y las lenguas, *E. fosbergii* se conoce localmente por diversos nombres vernáculos. Tradicionalmente, las sociedades de diversas regiones acceden fácilmente a esta planta medicinal haciendo referencia a sus nombres vernáculos, como se

muestra en la Tabla 2. Estos nombres vernáculos reflejan la adaptabilidad de la planta y su importancia cultural en diversas regiones (Rojas & Acevedo, 2022).

Tabla 2. *Nombres vernáculos de E. fosbergii*

| Lenguaje / Región | Nombre vernacular |
|-----------------------|---|
| Estados Unidos | Florida tassel-flower, purple Emilia, Cupid's-shaving-brush, Flora's paintbrush |
| Honduras, El Salvador | Pincelillo, pincel, lamparita |
| República Dominicana | Pincelito, Flor de trapo |
| Puerto Rico | Clavelito colorado, clavelitos del cafetal |
| Antillas menores | Cupid's paintbrush, rabbit meatred, tassel |
| Colombia | Clavelillo |
| Venezuela | hierba socialista |
| Brasil | Emília, serralhinha, serralha vermelha, Serralha mirim |
| India | Sankhpushpi |
| Filipinas | Puas-puas |
| China | 纓菜花 (Yīng róng huā) |

E. fosbergii está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Su área de distribución nativa incluye el Caribe, América Central y Sudamérica tropical (USDA-NRCS, 2024). *E. fosbergii* también se encuentra en otras partes del mundo, ya sea introducida o con un estatus nativo incierto, como África, el sur y el sureste de Asia, el norte de Australia, Estados Unidos (Florida, Luisiana, Texas) y varias islas oceánicas (USDA-NRCS, 2024). Es de crecimiento rápido, con capacidad de crecer como maleza y colonizar áreas perturbadas, jardines, tierras agrícolas abandonadas, bosques costeros, bordes de bosques, pastizales, bordes de caminos, áreas rocosas y riberas de ríos (Vibrans, 2011). La Tabla 3 de muestra la distribución a más detalles, proporcionada por USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System.

Tabla 3 Distribución global de la especie *E. fosbergii* Nicolson

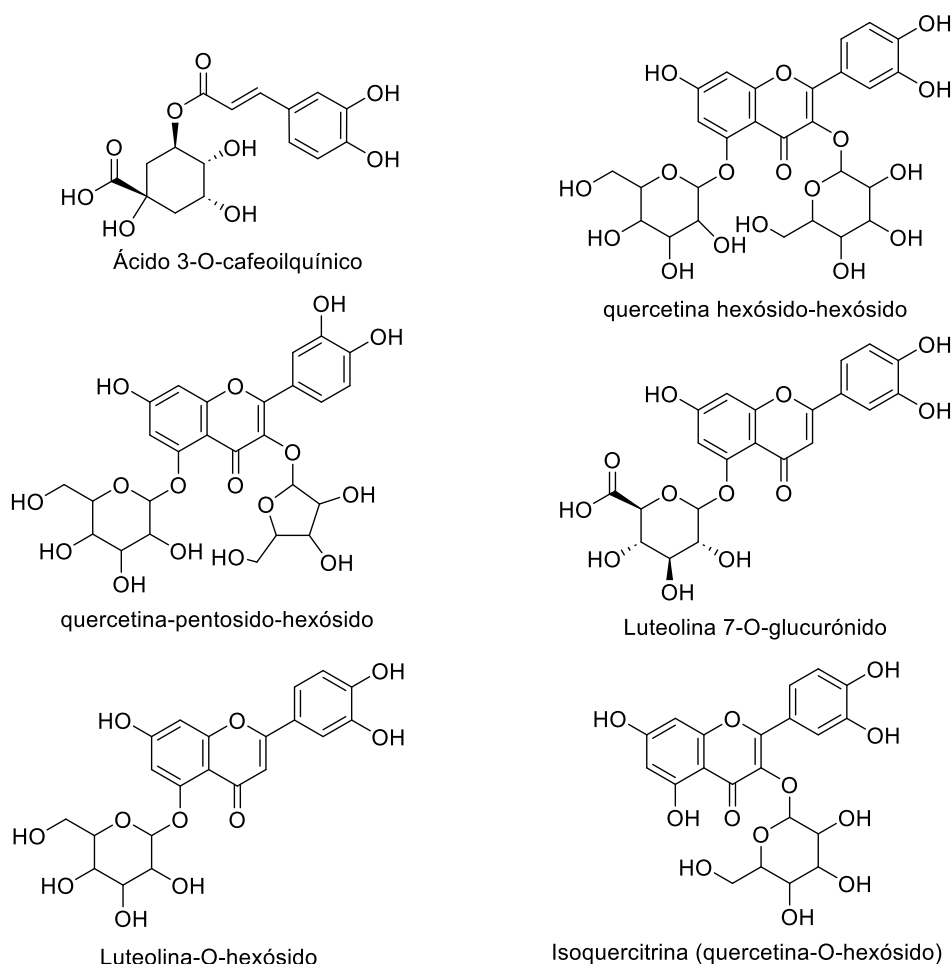
| <i>E. fosbergii</i> Nicolson GRIN-Global | | | | |
|--|-------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| Estatus | Continente | Subcontinente | País | Estado |
| Naturalizada | Asia-Templada | Asia Oriental | Taiwán | |
| Naturalizada | América del Norte | Centro-Sur de EE. UU. | Estados Unidos | Texas |
| Naturalizada | América del Norte | Sudeste de EE. UU. | Estados Unidos | Florida |
| Naturalizada | América del Norte | Sudeste de EE. UU. | Estados Unidos | Luisiana |
| Naturalizada | Pacífico | Pacífico Centro-Norte | Estados Unidos | Hawái |
| Naturalizada | Pacífico | Pacífico Noroeste | Estados Unidos | Guam |
| Naturalizada | Pacífico | Pacífico Noroeste | Estados Unidos | Islas Marianas del Norte |
| Naturalizada | Pacífico | Pacífico Centro-Sur | French Polinesia | |
| Naturalizada | Pacífico | Pacífico Suroeste | Fiji | |
| Naturalizada | América del Sur | Brasil | Brasil | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Antigua and Barbuda | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Bahamas | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Barbados | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Dominica | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Granada | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Jamaica | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Martinica | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Antillas Holandesas | |
| Naturalizada | América del Sur | Caribe | Estados Unidos | Puerto Rico |
| Naturalizada | América del Sur | Centroamérica | Belice | |
| Naturalizada | América del Sur | Centroamérica | Guatemala | |
| Naturalizada | América del Sur | Centroamérica | Nicaragua | |
| Naturalizada | América del Sur | Centroamérica | Panamá | |
| Naturalizada | América del Sur | Norte de Sudamérica | Guyana Francesa | |
| Naturalizada | América del Sur | Norte de Sudamérica | Guyana | |
| Naturalizada | América del Sur | Norte de Sudamérica | Surinam | |
| Naturalizada | América del Sur | Norte de Sudamérica | Venezuela | |
| Naturalizada | América del Sur | Sur de Sudamérica | Argentina | |
| Naturalizada | América del Sur | Sur de Sudamérica | Paraguay | |
| Naturalizada | América del Sur | Oeste de Sudamérica | Bolivia | |
| Naturalizada | América del Sur | Oeste de Sudamérica | Ecuador | |

1.3.1.3. Antecedentes fitoquímicos de *E. fosbergii*

E. fosbergii se ha confundido a veces con *E. coccinea* y variedades de *E. sonchifolia* (Nicolson, 1975), lo que probablemente sea una de las razones de la falta de estudios propios sobre esta especie.

Una investigación fitoquímica previa de *E. fosbergii*, identificó en el análisis del extracto metanólico de la hoja, la presencia de ácido clorogénico, quercetina-pentósido-hexósido, quercetina hexósido-hexósido, luteolina glucurónido, luteolina *O*-hexósido y quercetina *O*-hexósido (glucósidos de quercetina y glucósidos de luteolina) (Figura 6) (Valli, *et al.*, 2013; March, *et al.*, 2005; Peisino, *et al.*, 2020).

Figura 6. Los principales compuestos identificados en el extracto metanólico de hoja de *E. fosbergii*.



En el estudio de Freitas *et al.* (2020), los perfiles químicos de los extractos hidroetanólicos de las hojas de *E. fosbergii* se analizaron mediante CL-EM en modos de ionización positiva y negativa para revelar la presencia de isoorientina, quercitrina, isoquercitrina e isorhamnetina-3-*O*-ramnósido. Los derivados del ácido clorogénico presentes en los extractos analizados fueron el ácido 3-*O*-cafeoilquínico, el ácido 5-cafeoilquínico, el ácido 4,5-dicafeoilquínico, compuestos relacionados al ácido cafeoilquínico y ácido dicafeoilquínico, ácido maleico y ácido quínico. Además, se reveló que la especie *E. fosbergii* acumula alcaloides pirrolizidínicos, flavonoides y derivados del ácido cinámico (Freitas, Ccana-Ccapatinta, & Da Costa, 2020). En los extractos de diclorometano, se aisló la emilina, otros APs con otonecina (dos isómeros de emilina): senkirquina y neosenkirquina; un derivado acetilado de senkirquina que fue anotado como ligularidina; y un putativo AP con base de otonecina que propusieron como un derivado hidrogenado de ligularidina (Freitas, Ccana-Ccapatinta, & Da Costa, 2020).

También se encontraron alcaloides de pirrolizidina de base retronecina en las raíces *E. fosbergii* y se anotaron como senecifilina, senecionine, y acetilsenecifilina, así como los *N*-óxidos correspondientes de estos tres alcaloides de pirrolizidina: *N*-óxido de senecifilina, *N*-óxido de senecionina, y *N*-óxido de acetilsenecifilina. Finalmente se identificó la presencia de APs no tóxicos procedentes de la base de platinecina, como la platifilina, así como el *N*-óxido de platifilina. (Freitas, Ccana-Ccapatinta, & Da Costa, 2020). En el extracto hidroetanólico de hoja (80%), se identificó uno de los estereoisómeros petasitenina u otosenina.

Hasta la fecha, ningún estudio fitoquímico describe la composición química completa de *E. fosbergii* (Freitas, Ccana-Ccapatinta, & Da Costa, 2020). La información disponible se limita a estudios parciales que identifican ciertos metabolitos en extractos específicos. En la Tabla 4 se presenta una revisión bibliográfica de los compuestos reportados en esta especie, lo que permite reunir el conocimiento existente y resaltar la necesidad de continuar con investigaciones que profundicen en su perfil químico.

Tabla 4. Revisión Bibliográfica de los Compuestos Identificados en *E. fosbergii*

| Compuesto | Clasificación | Cita |
|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Ácido clorogénico | Ácido fenólico | Peisino <i>et al.</i> , 2020 |
| Quercetina-pentósido-hexósido | Flavonoide | Peisino <i>et al.</i> , 2020 |
| Quercetina hexósido-hexósido | Flavonoide | Peisino <i>et al.</i> , 2020 |
| Luteolina glucorónido | Flavonoide | Peisino <i>et al.</i> , 2020 |
| Luteolina O-hexósido | Flavonoide | Peisino <i>et al.</i> , 2020 |
| Quercetina O-hexósido | Flavonoide | Peisino <i>et al.</i> , 2020 |
| Isoorientina | Flavonoide | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Quercitrina | Flavonoide | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Isoquercitrina | Flavonoide | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Isorhamnetina-3-O-rhamnósido | Flavonoide | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Ácido 3-O-cafeoilquínico | Ácido fenólico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Ácido 5-O-cafeoilquínico | Ácido fenólico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Ácido 4,5-dicafeoilquínico | Ácido fenólico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Ácido maleico | Ácido orgánico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Ácido quínico | Ácido fenólico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Emilina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Senkirkina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Neosenkirkina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Ligularidina | Alcaloide pirrolizidínico | Hsieh <i>et al.</i> , 2015 |
| Senecifilina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Senecionina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Acetilsenecifilina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| N-óxido de Senecifilina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| N-óxido de Senecionina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| N-óxido de Acetilsenecifilina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Platifilina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| N-óxido de platifilina | Derivado de alcaloides | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |
| Petasitenina u otosenina | Alcaloide pirrolizidínico | Freitas <i>et al.</i> , 2020 |

1.3.1.4. Antecedentes farmacológicos de la especie *E. fosbergii*

A pesar de su uso tradicional en la medicina popular, los antecedentes farmacológicos y químicos de esta especie no han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, algunos reportes han revelado información relevante sobre su composición y actividades biológicas potenciales. Peisino *et al.* 2020 informan del uso de *E. fosbergii* como planta comestible con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, probablemente debido a la presencia de algunos flavonoides y ácido clorogénico. Peisino (2018), en su tesis presentada a la Universidade Vila Velha, reportó que el análisis fitoquímico reveló un contenido significativo de fenoles totales en todas las especies vegetales evaluadas. De manera destacada, *E. fosbergii* exhibió la mayor actividad antioxidante en todos los ensayos químicos, con valores de CI_{50} de 32.9 ± 4.8 , 50.2 ± 2.3 y 24.0 ± 2.9 $\mu\text{g/mL}$ en los ensayos ABTS, DPPH y FRAP (poder férrico reductor/antioxidante), respectivamente. En este estudio, el contenido total de polifenoles fue de 223.42 ± 6.98 mg/g en el extracto metanólico de hojas de *E. fosbergii*. Además, los extractos metanólicos mostraron un contenido fenólico significativamente mayor en comparación con los extractos hexánicos (Peisino M. C., 2018).

Estos resultados resaltan la importancia de los polifenoles, metabolitos secundarios presentes en casi todas las plantas, que desempeñan un papel crucial en diversas funciones fisiológicas. Los polifenoles son especialmente abundantes en frutas de sabor ácido y se les atribuyen propiedades como: antiinflamatorias, antimicrobianas, antidiabéticas, antitrombóticas, anti-aterogénicas y cardioprotectores, los cuales están altamente relacionados con sus características antioxidantes (Gorzynik-Debicka, *et al.*, 2018). Estas actividades biológicas se deben principalmente a su capacidad para neutralizar radicales libres, quelar metales de transición y romper cadenas de propagación de radicales en lípidos (Min & Ebeler, 2008).

Además, los compuestos fenólicos han mostrado la capacidad de modular el metabolismo de las prostaglandinas, inhibir enzimas proinflamatorias, prevenir la agregación plaquetaria y bloquear la activación de carcinógenos (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Estos hallazgos coinciden con la literatura existente, que señala una correlación

directa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico. Esto sugiere que los compuestos fenólicos desempeñan un papel fundamental en los efectos antioxidantes observados.

Los productos ricos en antioxidantes son cruciales en aplicaciones medicinales e industriales debido a sus potentes propiedades. En este contexto, Peisino *et al.* (2020) ampliaron su investigación sobre las plantas alimentarias no convencionales (UFPs, por sus siglas en inglés), que incluyen a *E. fosbergii*, mediante métodos celulares para evaluar su citotoxicidad. En su estudio, los extractos de hojas hexánicos y metanólicos de varias UFPs, incluida *E. fosbergii*, fueron evaluados en fibroblastos L929 y macrófagos RAW 264.7 utilizando el ensayo MTT. Los resultados mostraron que ninguno de los extractos tiene efectos citotóxicos significativos a concentraciones de hasta 100 µg/mL. Además, los extractos de *E. fosbergii* no alteraron la producción de $O_2^{\bullet-}$ en ninguna de las concentraciones probadas, ya fuera en extractos hexánicos o metanólicos.

Peisino *et al.* (2020) también demostraron que las UFPs, incluida *E. fosbergii*, exhibieron una actividad antiinflamatoria significativa al inhibir la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. En su estudio, los extractos metanólicos de hojas de *E. fosbergii* redujeron la producción de NO de forma dependiente de la dosis, con valores CI_{50} de 19.5 ± 3.1 µg/mL para el extracto hexánico y 8.4 ± 0.1 µg/mL para el metanólico. La producción de NO es esencial para varios procesos fisiológicos, pero en exceso puede ser perjudicial. Pequeñas cantidades de NO son necesarias para funciones como la vasodilatación y la regulación de la presión arterial, pero su sobreproducción, especialmente en combinación con el anión superóxido, puede formar peroxinitrito ($ONOO^-$), un radical libre altamente reactivo que contribuye al estrés oxidativo (Hardingham, Dachtler, & Fox, 2013). La inhibición de la síntesis de NO en este estudio subraya el potencial antiinflamatorio de los extractos de *E. fosbergii*, al reducir la producción de NO en macrófagos estimulados.

Además, los extractos de *E. fosbergii* mostraron capacidad para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6, en macrófagos RAW 264.7 estimulados

con LPS. La estimulación con LPS incrementó significativamente la producción de estas citocinas, pero los extractos hexánicos y metanólicos de *E. fosbergii* suprimieron esta respuesta de manera dependiente de la concentración. Estas citocinas son reguladores clave de la respuesta inmune, impulsando la inflamación en los sitios de infección o lesión. Este estudio proporciona evidencia importante de que los extractos de *E. fosbergii* inhiben eficazmente la producción de mediadores inflamatorios, lo que refuerza su potencial como agentes antiinflamatorios (Peisino, *et al.*, 2020).

La combinación de los compuestos bioactivos identificados en *E. fosbergii* y los estudios previos sugiere que esta planta podría tener potencial terapéutico tanto en la medicina tradicional como moderna. Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias observadas respaldan su relevancia en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y en la prevención de afecciones crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como las cardiovasculares, la diabetes y los trastornos neurodegenerativos. En particular, su capacidad para inhibir la producción de mediadores inflamatorios clave, como las citocinas proinflamatorias y el óxido nítrico inducido, resalta su posible aplicación en enfermedades inflamatorias crónicas.

1.4. LA CROMATOGRAFÍA Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

La cromatografía es una técnica fundamental que agrupa métodos diversos diseñados para separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. Este proceso se basa en la interacción de los analitos con una fase estacionaria y su transporte a través de esta por medio de una fase móvil. Las diferencias en las velocidades de migración de los componentes, determinadas por sus propiedades fisicoquímicas, permiten una separación efectiva mediante un proceso de distribución en múltiples etapas. Complementada con la espectrometría de masas, esta herramienta no solo facilita la identificación precisa de los compuestos, sino que también aporta información estructural valiosa, lo que la convierte en una metodología esencial para el análisis de productos naturales complejos (Fried & Sherma, 1999).

1.4.1. Cromatografía en capa fina, TLC

La cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) es una técnica analítica ampliamente utilizada dentro de la cromatografía líquida, especialmente en el análisis e identificación de productos naturales, debido a su simplicidad, rapidez, bajo costo y eficacia. Esta técnica emplea una fase estacionaria sólida, conformada por una delgada capa de material adsorbente depositada sobre una placa plana, y una fase móvil líquida, que puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. El principio fundamental de la TLC radica en afinidad diferencial de los compuestos de una mezcla con ambas fases. Durante el proceso, la fase móvil asciende por capilaridad (a veces asistida por gravedad) a través de la capa estacionaria. Los analitos que presentan mayor afinidad con la fase estacionaria migran más lentamente, mientras que aquellos con mayor afinidad por la fase móvil lo hacen con mayor rapidez, permitiendo así su separación en función de sus propiedades fisicoquímicas. Las separaciones en TLC tienen lugar en la fase estacionaria teniendo cada componente el mismo tiempo total de migración, pero diferentes distancias de migración (Fried & Sherma, 1999).

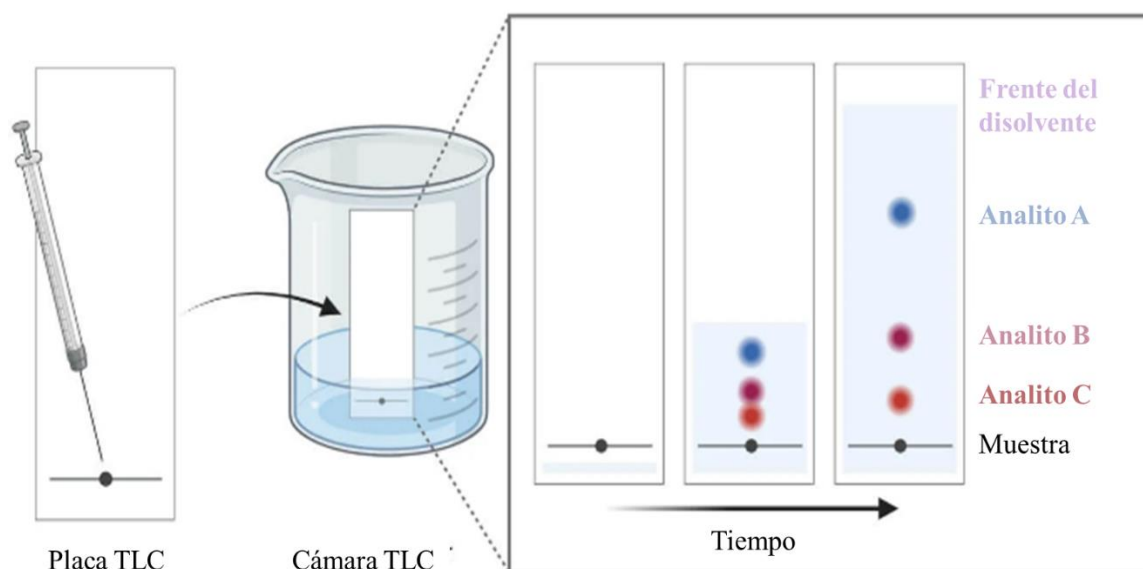
La velocidad de migración de los solutos depende tanto de la fuerza del disolvente, encargado de disolver y transportar los compuestos, como de la interacción con el material adsorbente, que los retiene temporalmente a través de procesos de adsorción y desorción. Este mecanismo genera un movimiento discontinuo, donde solo una fracción de los solutos avanza en cada momento, influenciado además por variaciones en la uniformidad del adsorbente y el comportamiento aleatorio de las moléculas. Como resultado, los compuestos que interactúan con mayor intensidad con el adsorbente se desplazan más lentamente que aquellos con menor afinidad (Fried & Sherma, 1999).

La TLC puede clasificarse según el mecanismo de separación: adsorción, partición, intercambio iónico o exclusión por tamaño. En la mayoría de los casos, las separaciones se fundamentan en la adsorción o partición, que implican interacciones como fuerzas dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. La adsorción es particularmente útil para separar compuestos según su polaridad, mientras que la partición depende de la solubilidad de los compuestos en la fase móvil (Fried & Sherma, 1999). La cromatografía en capa fina es también altamente

flexible en cuanto a los modos, en sistemas de fase normal, el adsorbente es polar y retiene compuestos polares con mayor fuerza, mientras que en sistemas de fase inversa (RP-TLC), el adsorbente es no polar y favorece la separación de compuestos apolares. Esta versatilidad permite adaptar la técnica a una amplia gama de aplicaciones (Santiago & Strobel, 2013).

El procedimiento básico de la TLC incluye la aplicación de la muestra en la parte inferior de la placa, dejando que el disolvente de la muestra se evapore antes de colocar la placa en una cámara cromatográfica con una pequeña cantidad de fase móvil (Figura 7). Esta asciende por la placa mediante capilaridad, separando los componentes de la mezcla. El proceso se detiene cuando el frente del disolvente alcanza una distancia de 10 a 15 cm desde el origen, momento en el cual se retira la placa y se marca la posición final del frente del disolvente. Posteriormente, se elimina la fase móvil residual y, si es necesario, se aplican reactivos para visualizar las manchas que representan los compuestos separados. Estas posiciones y tamaños de las manchas permiten tanto la identificación cualitativa como, en ciertos casos, la cuantificación de los compuestos.

Figura 7. Representación esquemática de la cámara de desarrollo ascendente para TLC



Nota. Adaptado de Sagar Aryal (2023). Fuente: <https://microbenotes.com/thin-layer-chromatography/>

La TLC tiene aplicaciones destacadas en el análisis de productos naturales, particularmente en la identificación y caracterización de metabolitos secundarios. Se utiliza habitualmente para (1) determinar el número de componentes de una mezcla; (2) verificar la identidad y pureza de un compuesto; (3) controlar el progreso de una reacción; (4) determinar la composición del disolvente para separaciones preparativas; y (5) analizar las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna. Esta técnica es fundamental para el perfilado químico de extractos vegetales, permitiendo la comparación entre especies y métodos de extracción. Además, su capacidad para detectar adulteraciones y evaluar la pureza de productos naturales la convierte en una herramienta valiosa en las industrias farmacéutica y alimentaria (Cai, 2014).

Entre los adsorbentes más comunes utilizados en la TLC se encuentran el gel de sílice (SiO_2) y sus derivados modificados. Este es un material poroso blanco fabricado por precipitación a partir de soluciones de silicato mediante la adición de ácido (Wall, 2007). Se compone de silicio y oxígeno enlazados con grupos hidroxilos residuales. Se pueden obtener comercialmente muchos adsorbentes con tamaños de partícula estandarizados unidos a placas de plástico, aluminio o vidrio. Las placas de gel de sílice pueden separar todas las clases de compuestos y pueden impregnarse con otros compuestos para aumentar la selectividad. Los adsorbentes no basados en gel de sílice incluyen: kieselguhr (compuesto de restos de diatomeas cuya pared celular está compuesta de sílice), celulosa, poliamida (producida a partir de policaprolactama, polihexametildiaminoadipato o ácido poliaminoundecanoico) y óxido de aluminio (Al_2O_3 , también llamado alúmina) (Wall, 2007; Santiago & Strobel, 2013).

Para seleccionar un eluyente, se debe tener en cuenta las propiedades de los compuestos que se van a separar: en primer lugar, la solubilidad de los compuestos de la muestra (hidrófilos o hidrófobos); y luego, si los compuestos pueden reaccionar químicamente con el adsorbente o el eluyente (Santiago & Strobel, 2013). Asimismo, la elección de la fase móvil se basa en la serie eluotrópica, desarrollada por Lloyd Snyder, quien definió la fuerza del disolvente en función de las características físicas del líquido y del adsorbente utilizado (Snyder, 1966). Esta serie clasifica los disolventes según su polaridad y capacidad de elución. La fase móvil utilizada para las placas de gel de sílice y de gel de

sílice modificado suele ser un disolvente o un disolvente con un disolvente polar añadido para aumentar la polaridad de la fase móvil. La optimización del sistema de disolventes es crucial para lograr una separación eficiente, y con frecuencia se recurre a mezclas de disolventes con propiedades complementarias para ajustar la fuerza de elución y la selectividad (Santiago & Strobel, 2013).

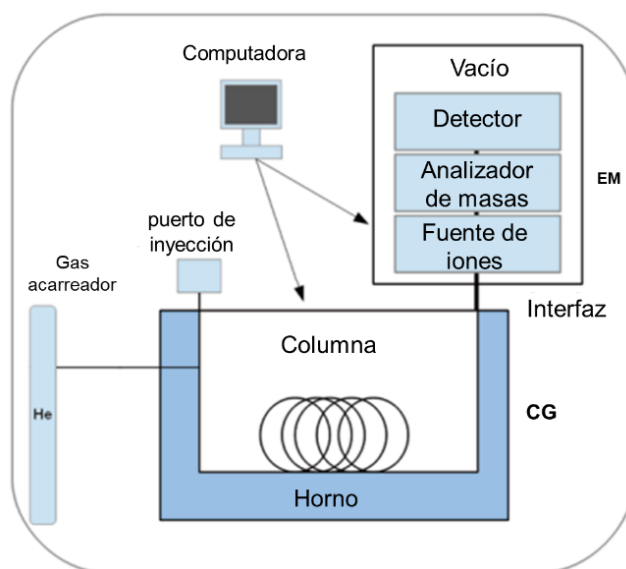
Una vez seleccionado el sistema de disolventes, es recomendable realizar pruebas de detección y visualización. Entre los métodos de detección, los más comunes incluyen la observación bajo luz visible para compuestos coloreados, luz UV para aquellos fluorescentes, o mediante la aplicación de reactivos químicos que generan manchas visibles. Como ayuda para la detección de diversas clases de compuestos, los fabricantes de placas de TLC han incluido en ellas indicadores inorgánicos de fluorescencia, o fósforo inorgánico (Fried & Sherma, 1999). Ciertos compuestos con dobles enlaces y/o anillos aromáticos en sus estructuras, absorberán las longitudes de onda fluorescentes (365 nm) utilizadas para activar los indicadores, esto se denomina «apagado». Tales áreas en la placa de TLC aparecerán como manchas o bandas oscuras rodeadas por la fluorescencia de fondo más brillante. En caso de utilizar placas impregnadas con fósforo inorgánico, los compuestos no fluorescentes se visualizan como manchas oscuras bajo luz UV de onda corta (254 nm). Otros métodos incluyen la pulverización o impregnación de reactivos específicos sobre la placa, lo que permite identificar zonas reveladas, entre estos reactivos el anisaldehído, la vainillina, dragendorff y el sulfato cérico (Fried & Sherma, 1999; Santiago & Strobel, 2013).

Las adaptaciones de esta técnica, como la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) mejoran la sensibilidad y la resolución, haciéndola idónea para estudios más complejos. Además, la combinación de la TLC con ensayos bioautográficos permite evaluar actividades biológicas directamente sobre la placa, como la actividad antimicrobiana y antioxidante de los compuestos separados. Por lo que esta es una herramienta fundamental para el análisis e identificación de productos naturales debido a su capacidad para separar compuestos complejos, proporcionar información cualitativa y cuantitativa, y adaptarse a las necesidades específicas de cada estudio (Cai, 2014) (Santiago & Strobel, 2013).

1.4.2. Cromatografía de Gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica ampliamente utilizada para el análisis e identificación de productos naturales, especialmente para compuestos volátiles y semivolátiles. Esta técnica se basa en la separación de los componentes de una mezcla mediante su distribución diferencial entre una fase estacionaria inmovilizada dentro de una columna capilar y una fase móvil gaseosa, comúnmente un gas inerte como helio, hidrógeno o nitrógeno. El principio fundamental de la CG radica en las diferencias en la volatilidad y la interacción de los compuestos con la fase estacionaria, lo que determina su tiempo de retención en la columna (Al-Bukhaiti, *et al.*, 2017; Sánchez-Guijo, *et al.*, 2013; Alvarez-Rivera, *et al.*, 2019).

Figura 8. Unidad CG-EM

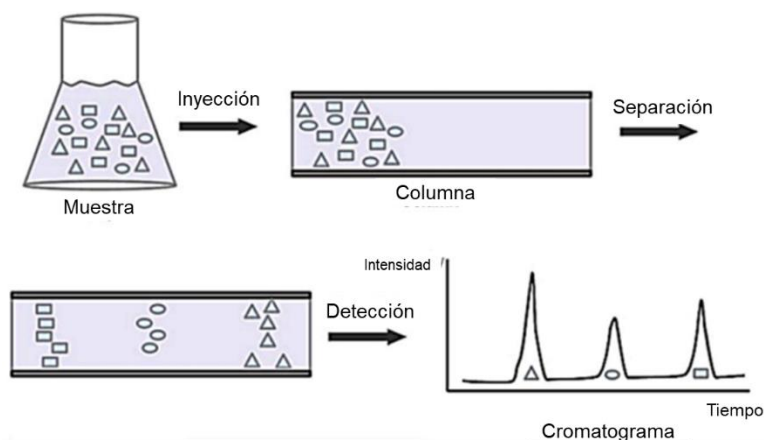


Nota. Adaptado de Sánchez-Guijo *et al.*, (2013). Fuente: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-616-0_3

El procedimiento experimental típico en la CG comienza con la inyección de forma manual o mediante un muestreador automático de una muestra líquida o gaseosa en el sistema. La muestra se volatiliza rápidamente en el inyector, donde se mezcla con el gas portador (Figura 8). Este flujo lleva la mezcla a través de una columna capilar recubierta internamente con la fase estacionaria, donde ocurre la separación de los compuestos. A

medida que los analitos migran a través de la columna, sus interacciones con la fase estacionaria afectan sus velocidades de desplazamiento, permitiendo su separación en función de sus propiedades fisicoquímicas, como el punto de ebullición y la polaridad. Finalmente, los compuestos eluyen de la columna y son detectados, generando un cromatograma que refleja las señales correspondientes a cada componente (Figura 9).

Figura 9. Principio de funcionamiento de la CG-EM



Nota. Adaptado de Sánchez-Guijo *et al.*, (2013). Fuente: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-616-0_3

Una columna es, por supuesto, la pieza inicial y central de un cromatógrafo. Una columna seleccionada adecuadamente puede producir una buena separación cromatográfica que proporcione un análisis preciso y fiable. Una columna mal utilizada puede generar a menudo separaciones confusas, inadecuadas y pobres que pueden conducir a resultados no válidos o complejos de interpretar. Las columnas capilares son las más empleadas en la actualidad debido a su alta capacidad de separación, derivada de su pequeño diámetro interno (entre 0,1 y 1 mm), longitudes de hasta 60 metros y del tipo de fase estacionaria utilizada. Su material de fabricación más común es la sílice fundida, que está recubierta externamente con una capa de material protector, como poliamida, para mejorar su durabilidad y resistencia. En el interior de estas columnas, la fase estacionaria líquida se aplica sobre las paredes internas del tubo en una fina capa que varía en espesor, lo que permite la partición adecuada de los analitos. Entre las más utilizadas se encuentran los polisiloxanos, cuya estructura química puede modificarse mediante la inclusión de diferentes grupos funcionales para

ajustar su polaridad y selectividad. Una separación cromatográfica optimizada comienza con la selección de la columna capilar adecuada, para cualquier aplicación debe basarse en cuatro factores significativos: la fase estacionaria, el diámetro interno de la columna, el grosor de la película y la longitud de la columna. Cuando la fuerza de las interacciones analito-fase difiere significativamente para dos compuestos, uno se retiene más tiempo que el otro. El tiempo que permanecen retenidos en la columna (tiempo de retención) es una medida de estas interacciones analito-fase. (Al-Bukhaiti *et al.*, 2017; Sánchez-Guijo *et al.*, 2013). La modificación de las características químicas de la fase estacionaria altera sus propiedades físicas (Guo, 2014). Dos compuestos que coeluyen (no se separan) en una determinada fase estacionaria pueden separarse en otra fase de química diferente (Al-Bukhaiti *et al.*, 2017).

La temperatura de la columna se controla cuidadosamente mediante un horno que permite realizar separaciones isotérmicas o por gradiente de temperatura, optimizando así el tiempo de análisis y la calidad de la separación. El gas portador, que constituye la fase móvil, debe cumplir ciertas características: ser inerte para evitar reacciones con los analitos o la fase estacionaria, ser puro, fácil de obtener y compatible con el método de detección. Entre los gases utilizados, el hidrógeno presenta mejores propiedades que el helio y el nitrógeno, proporcionando mayor eficiencia y tiempos de análisis más cortos. Sin embargo, el helio sigue siendo el gas portador más utilizado en CG-EM debido a su compatibilidad con la mayoría de los detectores (Al-Bukhaiti *et al.*, 2017). Una vez que los analitos se separan en la columna de CG, el espectrómetro de masas los detecta y analiza.

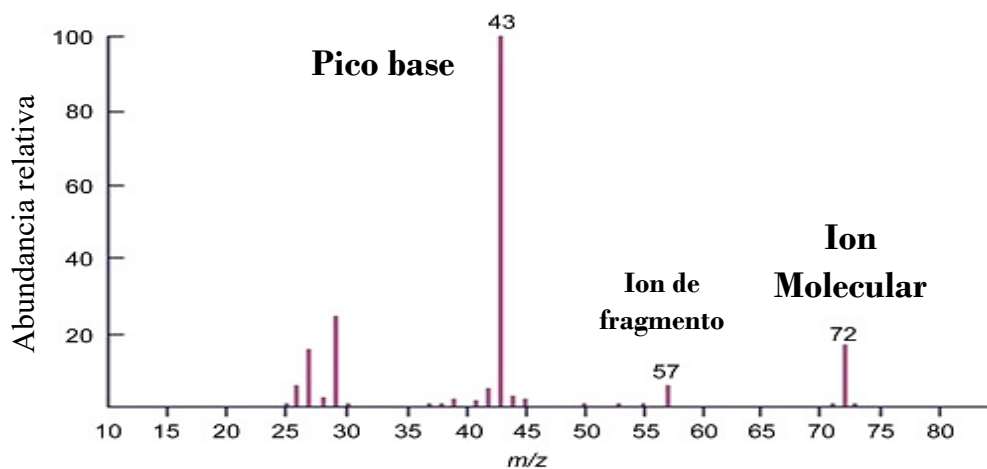
La espectrometría de masas es una técnica analítica fundamental para la caracterización cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos e inorgánicos. Su principio básico radica en la generación de iones a partir de las moléculas de los analitos, permitiendo obtener información detallada sobre su peso molecular y estructura química. Esta información se logra mediante la separación y fragmentación de los iones en función de su relación masa-carga (m/z). El resultado se representa en un espectro de masas, considerado como la "huella digital" de una molécula, lo que facilita su identificación y análisis estructural (Silverstein, *et al.*, 2005). El espectrómetro de masas se compone de cinco partes principales:

- **Entrada de muestra:** el analito requerido se introduce en cantidades del orden de microgramos, lo que minimiza la cantidad de material necesario para el análisis.
- **Fuente de iones:** en esta etapa, la muestra se ioniza, generalmente mediante la pérdida de un electrón, produciendo cationes que pueden ser manipulados y analizados.
- **Analizador de masas:** clasifica y separa los iones en función de su masa y carga utilizando campos eléctricos o magnéticos, permitiendo una resolución precisa.
- **Detector:** mide la abundancia de los iones separados, generando datos cuantitativos y cualitativos esenciales para el análisis.
- **Sistema de datos:** se encarga de recopilar, procesar y almacenar la información proveniente del detector, transformando los datos en espectros útiles para la interpretación.

El EM ioniza las moléculas eluidas de la columna, convirtiéndolas en iones que son separados según su relación masa-carga (m/z). Para garantizar la eficacia del análisis, el espectrómetro de masas opera bajo condiciones de alto vacío, las cuales se mantienen mediante sistemas especializados de evacuación (Sánchez-Guijo *et al.*, 2013; Silverstein *et al.*, 2005). El proceso de ionización puede realizarse por ionización electrónica (EI) o ionización química (CI). La EI es el método más utilizado en análisis cualitativos debido a su capacidad para generar fragmentación molecular, proporcionando información estructural detallada que facilita la identificación precisa de los compuestos. En este proceso, un electrón se acelera con una energía de 70 electronvoltios (eV), provocando la expulsión de un electrón de la molécula y formando un ion molecular en forma de catión radical. La alta energía involucrada en la ionización puede generar un ion molecular inestable que disipa el exceso de energía a través de procesos de fragmentación. Durante estos procesos, pueden ocurrir rupturas de enlaces químicos que resultan en la pérdida de moléculas neutras o radicales. Asimismo, pueden tener lugar reordenamientos moleculares. Como consecuencia, se produce un espectro de iones con diferentes relaciones masa/carga, destacándose el ion molecular como el de mayor masa, acompañado de una variedad de iones fragmentados de menor masa

(Figura 10). La CI, por otro lado, es preferida en estudios cuantitativos, ya que genera menos fragmentaciones y produce señales más claras.

Figura 10. *Espectro de masas*



Un aspecto clave en la identificación de compuestos mediante espectrometría de masas es el uso de bases de datos espectrales, como la Base de Datos de Espectros de Masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). Estas bases contienen espectros de referencia obtenidos experimentalmente para miles de compuestos, facilitando la identificación de analitos al comparar sus espectros experimentales con los almacenados. El proceso de identificación incluye algoritmos que calculan similitudes entre espectros en función de patrones de fragmentación y relaciones m/z, asignando puntuaciones para evaluar la probabilidad de coincidencia. El uso de bases de datos como NIST no solo agiliza el proceso de identificación, sino que también mejora la precisión, ya que permite diferenciar entre isómeros y compuestos estructuralmente similares (Sánchez-Guijo *et al.*, 2013).

La cromatografía de gases es una técnica esencial para el análisis e identificación de productos naturales, destacándose por su alta resolución, sensibilidad y versatilidad. Su capacidad para separar y caracterizar compuestos volátiles y semivolátiles, junto con su integración con técnicas avanzadas como la CG-EM, la posiciona como una herramienta indispensable en la investigación de metabolitos secundarios, el control de calidad de extractos y el desarrollo de nuevos productos bioactivos.

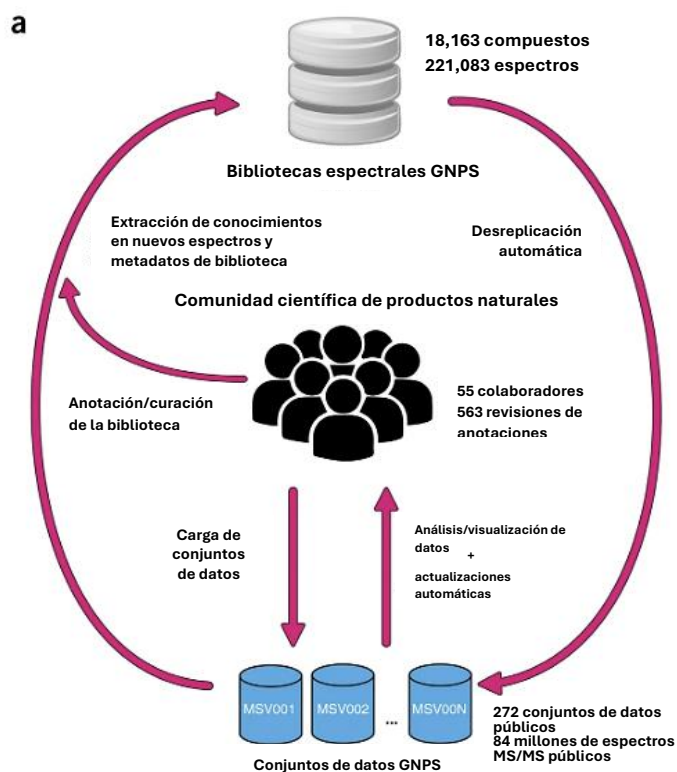
1.5. ENFOQUE AUTOMATIZADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS: INTEGRACIÓN DE GNPS Y MZMINE EN REDES MOLECULARES

Los metabolitos secundarios de fuentes naturales son puntos de partida prometedores para descubrir y desarrollar prototipos de fármacos y nuevos medicamentos, ya que muchos tratamientos actuales para diversas enfermedades están relacionados directa o indirectamente con dichos compuestos. Uno de los principales desafíos en la evaluación de extractos vegetales para determinar su actividad biológica es la identificación de compuestos que presenten una actividad única y relevante, en contraste con aquellos que pueden mostrar resultados positivos en un bioensayo determinado, pero que no son deseables en un programa de descubrimiento de fármacos. Un objetivo fundamental en el descubrimiento de fármacos es mejorar la eficiencia y rapidez en la identificación de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de una variedad de moléculas presentes en los extractos de plantas. El término de desreplicación se utiliza en el ámbito del descubrimiento de fármacos para describir los esfuerzos destinados a identificar y caracterizar, de manera rápida y eficiente, tipos específicos de compuestos. La disponibilidad de herramientas analíticas fitoquímicas sofisticadas ha simplificado enormemente el proceso de desreplicación al permitir combinar la capacidad de separación de las técnicas cromatográficas modernas con los espectrofotómetros para desenfocar las muestras no deseadas del proceso de descubrimiento (Girawale, Meena, & Kodam, 2023).

Los recientes avances en herramientas bioinformáticas y métodos de redes moleculares han facilitado la identificación de nuevos compuestos bioactivos, permitiendo un enfoque más eficiente en el descubrimiento de fármacos. Entre estas herramientas, destaca el Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, <http://gnps.ucsd.edu>), una plataforma de acceso abierto diseñada para compartir, organizar y analizar datos de espectrometría de masas, ya sean fragmentados o procesados. GNPS permite a los investigadores visualizar las relaciones entre compuestos químicos a través de la creación de redes moleculares, facilita las búsquedas en bibliotecas espectrales y desreplicación de compuestos conocidos (Baskiyar, *et al.*, 2022; Wang, *et al.*, 2018; Mohimani, *et al.*, 2017; Nothias, *et al.*, 2020). Cada uno de estos millones de espectros en los conjuntos de datos

añadidos al GNPS se compara con bibliotecas espectrales de referencia para anotar moléculas y descubrir análogos putativos (Figura 11).

Figura 11. Descripción general del GNPS.



Nota. Adaptado de Wang *et al.*, (2016). Fuente: <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>

La plataforma hace hincapié en la colaboración de la comunidad proporcionando acceso a una amplia base de datos de conjuntos de datos MS/MS disponibles públicamente, que pueden utilizarse para el análisis comparativo y la identificación de compuestos en nuevas muestras. Este enfoque basado en la comunidad fomenta un entorno en el que los investigadores pueden compartir sus hallazgos y metodologías, acelerando el ritmo de los descubrimientos en la química de productos naturales. Además, GNPS ha integrado diversas bibliotecas espectrales MS/MS relacionadas con productos naturales, como MassBank (Horai, *et al.*, 2010), ReSpec (Sawada, *et al.*, 2012) y NIST (Linstrom & Mallard, 2001). En conjunto, estas bibliotecas incluyen un total de 212,230 espectros MS/MS que corresponden a 12,694 compuestos únicos (Wang, *et al.*, 2018). Aunque esta recopilación de espectros de

referencia constituye una base valiosa para la de replicación, sólo el 1.01% de los espectros presentes en los conjuntos de datos públicos de GNPS se han asociado a esta colección, lo que pone de manifiesto una cobertura limitada del espacio químico. Si bien la comunidad de productos naturales está realizando esfuerzos significativos para expandir este espacio químico, aún no existe un formato estándar que permita reportar los hallazgos químicos de manera verificable y reutilizable (Wang, *et al.*, 2018).

Las redes moleculares son representaciones visuales del espacio químico presente en experimentos de espectrometría de masas. GNPS permite generar redes moleculares mediante un enfoque de correlación y visualización espectral que identifica conjuntos de espectros provenientes de moléculas relacionadas, conocidas como redes espectrales, incluso cuando estos espectros no se corresponden con compuestos conocidos (Wang, *et al.*, 2018; Baskiyar, *et al.*, 2022). El alineamiento espectral detecta similitudes entre espectros de moléculas estructuralmente relacionadas, basándose en la suposición de que estas moléculas presentan patrones de fragmentación similares en sus análisis MS/MS, de manera análoga al alineamiento de secuencias en proteínas o nucleótidos. Actualmente, GNPS es la única plataforma pública que facilita la creación de redes moleculares (Wang, *et al.*, 2018). En estas visualizaciones, cada espectro se representa como un nodo, y las conexiones entre nodos reflejan alineamientos espectrales. Los nodos pueden enriquecerse con metadatos, como coincidencias de desreplicación o información proporcionada por el usuario, incluyendo abundancia, origen, actividad bioquímica o hidrofobicidad, atributos que pueden reflejarse en el tamaño o color del nodo. Las redes moleculares pueden visualizarse directamente en GNPS o exportarse para análisis en herramientas como el software Cytoscape (Wang, *et al.*, 2018; Baskiyar, *et al.*, 2022; Pluskal, *et al.*, 2020).

MZmine sirve como herramienta complementaria centrada en el procesamiento de datos de espectrometría de masas, ofreciendo funcionalidades para la detección de picos, la alineación y la integración, que son cruciales para preparar conjuntos de datos de alta calidad para el análisis posterior en GNPS (Baskiyar, *et al.*, 2022; Pluskal, *et al.*, 2020). MZmine es una plataforma de software de código abierto que soporta una variedad de formatos de datos en bruto, incluyendo mzML y mzXML. Es particularmente valioso para los investigadores

que realizan estudios de espectrometría de masas a gran escala debido a su capacidad para manejar grandes conjuntos de datos de manera eficiente (Baskiyar, *et al.*, 2022; Pluskal, *et al.*, 2020). El software emplea un enfoque de tres pasos para la detección de características: centrado inicial de datos brutos, detección de características (o selección de picos) y anotación de características (Baskiyar, *et al.*, 2022; Pluskal, *et al.*, 2020). Una característica notable de MZmine es su capacidad para ejecutar procesos por lotes en múltiples archivos simultáneamente, lo que es esencial para los experimentos de alto rendimiento. MZmine permite a los usuarios automatizar flujos de trabajo de procesamiento completos con sólo unos clics o incluso a través de aplicaciones de línea de comandos. (Baskiyar, *et al.*, 2022; Pluskal, *et al.*, 2020).

Además, la combinación de GNPS con software como MZmine2 y Cytoscape crea un panel integrado que permite generar rápidamente redes moleculares bioactivas con una mínima intervención del usuario. Esta integración mejora la eficiencia del proceso y reduce significativamente el tiempo necesario para el análisis, lo que es crucial en un campo donde la rapidez puede determinar el éxito en el desarrollo de nuevos fármacos. La automatización de estos flujos de trabajo no solo acelera el proceso de descubrimiento de compuestos bioactivos a partir de productos naturales, sino que también abre nuevas oportunidades para la identificación rápida y precisa de metabolitos secundarios con potencial terapéutico. Al aplicar estos métodos a una variedad de fuentes naturales, se espera avanzar en la investigación farmacéutica y contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos basados en compuestos bioactivos (Baskiyar, *et al.*, 2022; Pluskal, *et al.*, 2020).

Además, los avances recientes en GNPS han introducido características como la Red Molecular Basada en Características (FBMN), que mejora la capacidad de cuantificar compuestos basándose en sus perfiles cromatográficos. Este método permite a los investigadores no sólo identificar compuestos, sino también determinar su abundancia relativa en muestras biológicas complejas (Nothias, *et al.*, 2020). Estas capacidades son particularmente importantes en campos como la farmacognosia y el descubrimiento de fármacos, donde la comprensión de la concentración de compuestos bioactivos puede influir en la eficacia terapéutica.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la actividad fitotóxica, citotóxica, antioxidante y el potencial inhibitorio de la enzima α -glucosidasa de las fracciones orgánicas de *Emilia fosbergii* mediante ensayos *in vitro*.

Caracterizar la composición química de sus fracciones volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos orgánicos de las partes aéreas de la planta *E. fosbergii* recolectada en la provincia de Chiriquí, utilizando disolventes de diferente polaridad.
- Evaluar la capacidad fitotóxica de los extractos orgánicos de *E. fosbergii* sobre semillas de rábano y tomate; y la actividad citotóxica sobre nauplios de *A. salina*.
- Determinar la actividad antioxidante de las fracciones orgánicas por el método DPPH.
- Realizar la caracterización química de las fracciones activas y, mediante una revisión bibliográfica, identificar los metabolitos secundarios responsable de alguna de las actividades biológicas detectadas en *E. fosbergii*.
- Efectuar un fraccionamiento biodirigido de las fracciones de *E. fosbergii* para disminuir la complejidad de las fracciones y mejorar la identificación de los compuestos presentes.

2.3. HIPÓTESIS

Emilia fosbergii ha sido reportada en la literatura como una especie que contiene metabolitos secundarios potencialmente tóxicos, como los alcaloides pirrolizidínicos. Esta situación plantea preocupación, especialmente porque la planta es comúnmente consumida por animales. Sin embargo, su identificación taxonómica presenta dificultades debido a su similitud morfológica con *E. coccinea* y *E. sonchifolia*, lo que genera incertidumbre sobre la validez de algunos reportes fitoquímicos disponibles, ya que podrían corresponder a estas otras especies.

Gracias a los avances actuales en metodologías de identificación taxonómica y análisis químico, es posible confirmar con mayor precisión la identidad de la especie y caracterizar sus metabolitos de forma confiable. Además, no se han reportado estudios previos sobre la composición química ni sobre las actividades biológicas de *E. fosbergii* en Panamá, un aspecto relevante considerando que los factores geográficos pueden influir significativamente en su metabolismo secundario.

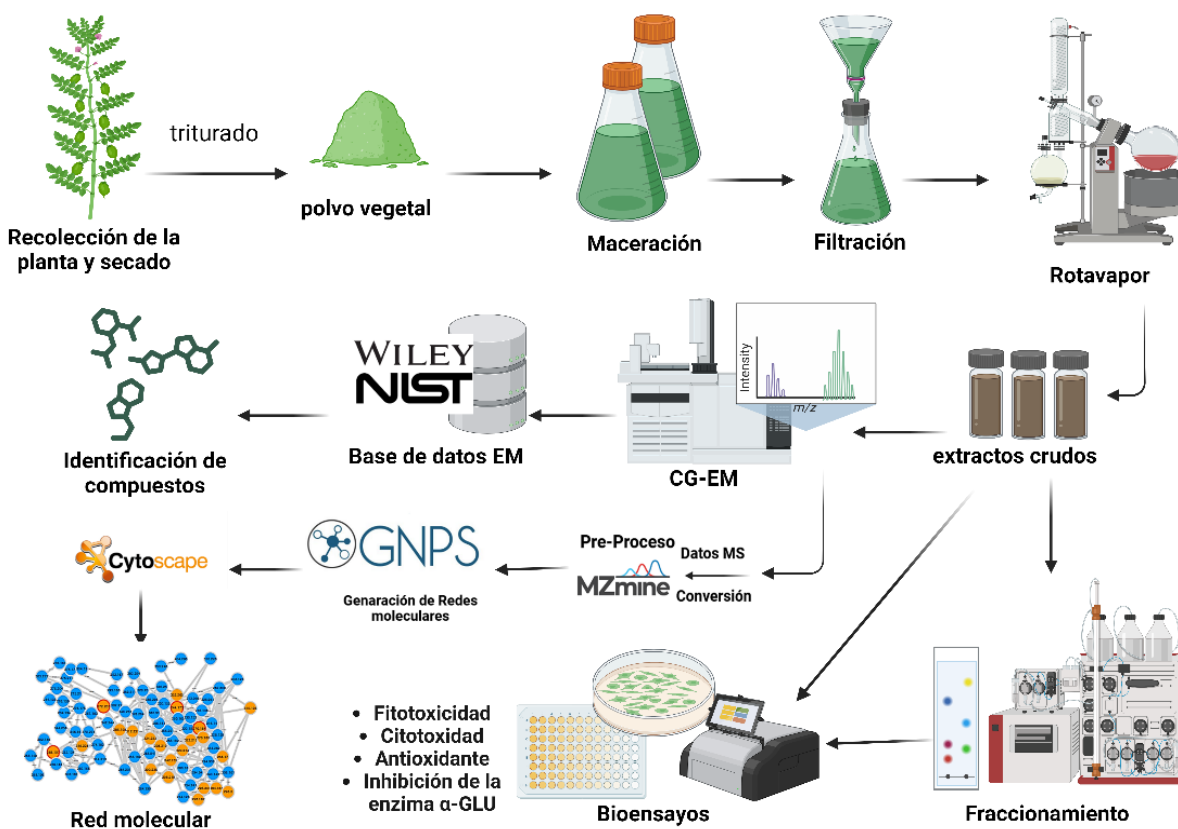
Por tanto, se plantea la hipótesis de que *E. fosbergii*, correctamente identificada y recolectada en Panamá, contiene compuestos bioactivos con propiedades fitotóxicas, citotóxicas, antioxidantes y capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, con potencial de aplicación en el desarrollo de herbicidas selectivos y en la medicina tradicional.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. ESQUEMA DE TRABAJO

Con el fin de cumplir con todos los objetivos se planteó el siguiente esquema de trabajo (Figura 12): (1) Recolectar muestras de *E. fosbergii*, planta que crece como maleza en la zona cafetalera de Santa Clara, provincia de Chiriquí, República de Panamá. (2) Preparar fracciones primarias orgánicas de la planta *E. fosbergii*, para luego evaluar en ensayos *in vitro* su potencial actividad fitotóxica, citotóxica, antioxidante e inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. (3) Realizar el fraccionamiento de las fracciones orgánicas primarias de *E. fosbergii* e identificar las subfracciones potencialmente activas. (4) Generar red molecular de la fracción de hexano y diclorometano y fracciones secundarias activas de la *E. fosbergii*.

Figura 12. Esquema del trabajo de investigación



Nota. Creado en BioRender. Bernal, M. (2024) BioRender.com/l31w018

3.2. MATERIALES Y REACTIVOS

El hexano y el diclorometano utilizado para la extracción, y la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés, Thin Layer Chromatography) (Figura 13) fueron de grado de la American Chemical Society (Tedia[®], Tedia Company Inc., Fairfield, OH, EE. UU.). El metanol utilizado para la extracción fue de grado HPLC (Tedia[®], Tedia Company Inc. o Merck, EMD Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU.).

Cromatografía: Para la cromatografía en capa fina, se utilizó placas de matriz de gel de sílice L × W 20 cm × 20 cm Sigma-Aldrich[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), lámpara ultravioleta (254/365 nm, UVP[®]). El hexano, diclorometano y el metanol para Sistema de cromatografía Pure Flash eran de grado HPLC (Tedia[®], Tedia Company Inc. o Merck, EMD Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU.) y para la columna gel de sílice (200-400 mesh, 60Å) Sigma-Aldrich[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). El hexano para el análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) era de calidad CG-EM (HPLC/Spectro, Tedia[®], Tedia Company Inc., Fairfield, OH, EE. UU.).

Figura 13. Placas de TLC Sigma-Aldrich



Para los ensayos de actividad biológica; se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol (Alcohol anhidrido 99.9%) de grado de la American Chemical Society (Tedia[®], Tedia

Company Inc., Fairfield, OH, EE. UU.). Para el ensayo de actividad antioxidante se empleó el 2,2-Difenil-1-Picrihidrazilo (DPPH) (Figura 14) y el ácido ascórbico de grado de la American Chemical Society (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EE. UU.). El di-Potasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4) usado era de grado de la American Chemical Society (PanReac AppliChem ITW Reagents[®], PANREAC QUÍMICA S.L.U., Barcelona, España) utilizados para el ensayo de α -glucosidasa. Todos los siguientes productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.): Kit de ensayo de actividad de α -glucosidasa: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG), enzima comercial (α -glucosidasa) y el Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) grado de la American Chemical Society.

Figura 14. Reactivo 2,2-Difenil-1-Picrihidrazilo (DPPH) de Sigma-Aldrich



3.3. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

Para el trabajo general se utilizaron los siguientes equipos: Evaporador rotatorio Buchi R210 y R300 y Labconco (Figura 15), Cámara de extracción de gases, bombas de alto vacío, recicladores refrigerantes, plato calentador, baño ultrasónico, lámpara Ultravioleta 254 y 365 nm, balanza analítica, micropipetas, Horno, línea de nitrógeno, espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu UV-2401PC, Espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan (Figura 16), estéreo microscopio Olympus SZX10, espátulas, Parafilm, papel filtro, soporte Universal, anillos, tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer, matraces aforado, balones de destilación, balones recolectores, columna cromatográfica de vidrio, embudo simple, embudo de separación, cámara de elución, policial, pipetas Pasteur, probetas, viales, vasos de precipitado, platos Petri.

Figura 15. *Evaporador rotatorio Buchi R300***Figura 16.** *Espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan*

En cuanto a el equipo para el fraccionamiento y Cromatografía se utilizaron: Buchi Pure Sistema de cromatografía Flash preparativa C-850, cargador de muestras sólidas Pure (hasta 50 bar), cartuchos FlashPure (re llenados con gel de sílice, 200-400 mesh, 60Å Sigma-Aldrich®); Cromatógrafo de gases Agilent 5977 GC/MSD con muestreador

automático acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo hiperbólico monolítico (Figura 17), detector de Triple Eje con EM de larga duración y con ionización por ionización electrónica y ionización química (positiva y negativa); columna HP-5ms (5%-fenil)-metilpolisiloxano y Helio como gas acarreador.

Figura 17. Cromatógrafo de gases Agilent 5977 GC/MSD con muestreador automático



3.4. PROCEDIMIENTO

3.4.1. Recolección y secado de la planta

La planta estudiada (Figura 18) fue recolectada en una plantación de café ubicada en el corregimiento de Santa Clara, provincia de Chiriquí en la República de Panamá durante el mes de enero de 2023. La muestra colectada fue identificada mediante criterios taxonómicos por un especialista botánico como *E. fosbergii*. La muestra recolectada fue expuesta al sol durante varios días para eliminar el agua de vegetación, posteriormente, se separaron las

hojas y tallos, los cuales fueron cortados y triturados para ser almacenado a temperatura ambiente en bolsas Ziploc (Figura 19).

Figura 18. *Emilia fosbergii*, espécimen en sitio de colecta



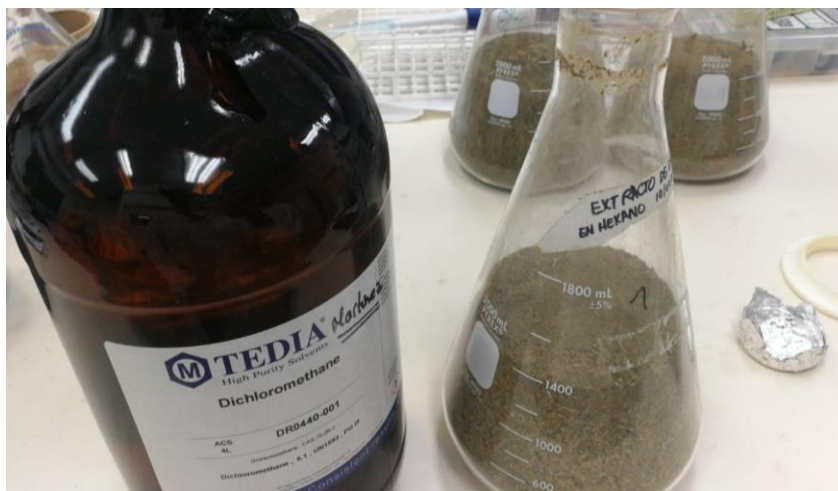
Nota. La planta fue recolectada en un cafetal en Santa Clara, Provincia de Chiriquí. Crédito: Mgtr. Juan Fernández.

Figura 19. La planta seca fue triturada y almacenada antes de la maceración



3.4.2. Preparación del extracto orgánico de *E. fosbergii*

Para preparar los extractos orgánicos, se tomó 1.79 kg de las partes aéreas procesadas de *E. fosbergii* y se colocaron en un cuatro matraces Erlenmeyer de 2L (Figura 20), y se procedió a realizar un macerado con hexano, el preparado se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se filtra el disolvente con ayuda de papel filtro y el disolvente se evapora a 30°C con ayuda de un evaporador rotatorio, este proceso se realizó sucesivamente hasta que el disolvente filtrado era de un color muy claro en comparación con la primera extracción, se repitió un total de cinco veces, para extraer la mayor cantidad posible de los metabolitos afines al disolvente de extracción. La fracción obtenida se guardó en viales, para luego ser secados en su totalidad ya sea dentro de un desecador conectado a vacío o bajo corriente de nitrógeno. Todo el proceso anterior se repitió usando diclorometano y luego metanol, como disolventes, para obtener un total de tres fracciones para realizar los posteriores bioensayos y fraccionamientos.

Figura 20. Material vegetal preparado para la maceración

Nota. Material vegetal que fue triturado dentro de un Erlenmeyer de 2L.

3.4.3. Análisis de las fracciones por TLC y CG-EM

Se colocó una pequeña cantidad de la fracción de hexano en una placa de aluminio recubierta con gel de sílice en una cámara de elución con diferentes eluyentes; hexano; hexano/diclorometano (7:3); hexano/diclorometano (6:4). Para la fracción de diclorometano, se colocó una pequeña cantidad del extracto en una placa de aluminio recubierta con gel de sílice en una cámara de elución con diferentes eluyentes; diclorometano; hexano/diclorometano (7:3); hexano/diclorometano (6:4). Finalmente, para la fracción de metanol, se colocó una pequeña cantidad del extracto en una placa de aluminio recubierta con gel de sílice en una cámara de elución con metanol. Cada una de las placas se observaron bajo luz UV de onda corta y larga (254 y 365 nm) y se revelaron con soluciones de H₂SO₄/EtOH 5%, Vainillina y Dragendorff y calor.

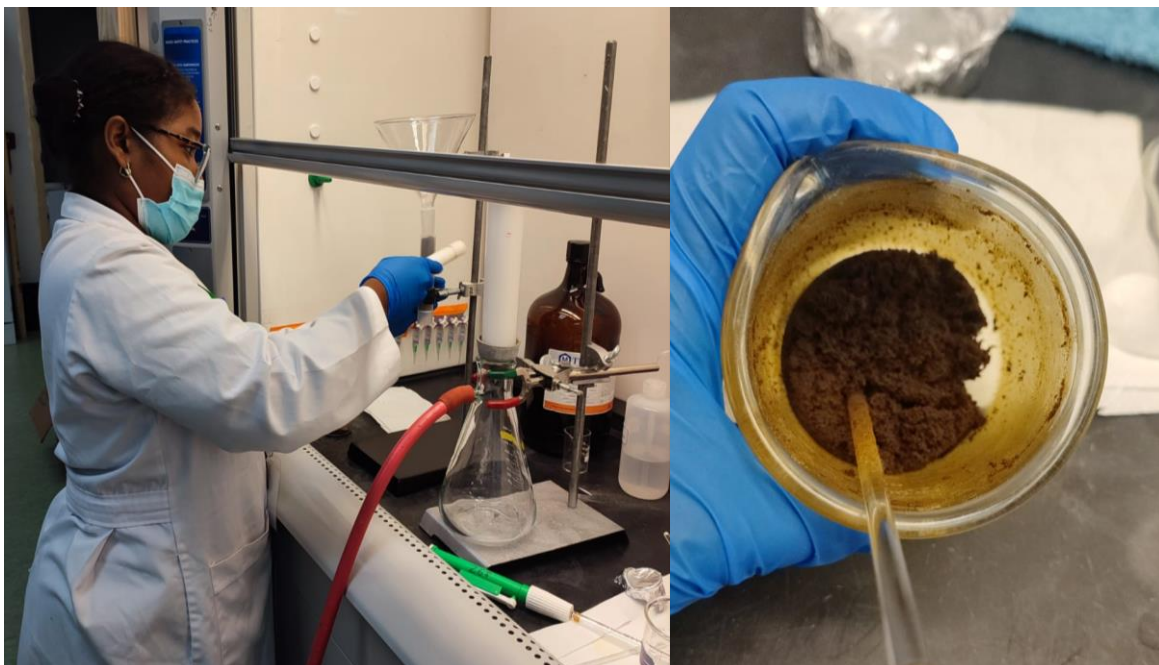
Se realizó un análisis químico preliminar en un Cromatógrafo de gases Agilent 5977 GC/MSD que incluye una bomba de paletas rotativas y una bomba turbomolecular, un detector de masas selectivo (MSD) de cuadrupolo hiperbólico monolítico. Para el análisis se utilizó una columna capilar HP-5ms de fase 5% fenil-metilpolisiloxano, 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m. De una disolución de 1 mg/ μ L se inyectaron 1 μ L, con un flujo de 1.1 mL/min.

3.4.4. Fraccionamiento primario de la fracción de hexano con el Sistema de cromatografía Flash

▪ Preparación del cabezal con muestra y la columna

Después de analizar los resultados de los ensayos biológicos se seleccionó la fracción de hexano para su fraccionamiento empleando el Sistema de Cromatografía Pure (Buchi) C-850. Se pesó 8.0 gramos del vial EF-A-1 y EF-A-2 y se colocó en un vaso químico de 100 mL para disolverlo con una mezcla de hexano-diclorometano. Luego, se agregó, poco a poco, silica gel manteniendo una relación de 1:1.5 extracto y silica, se revolvió con un policial hasta obtener un aspecto sólido y fino como la silica (Figura 21). Una vez que se secó por completo la mezcla, se pasó al cabezal y luego se procedió a preparar la columna de con los cartuchos FlashPure rellenos con 120 g de gel de sílice aplicando vacío para compactar la silica.

Figura 21. *Preparación de la columna y cabezal*

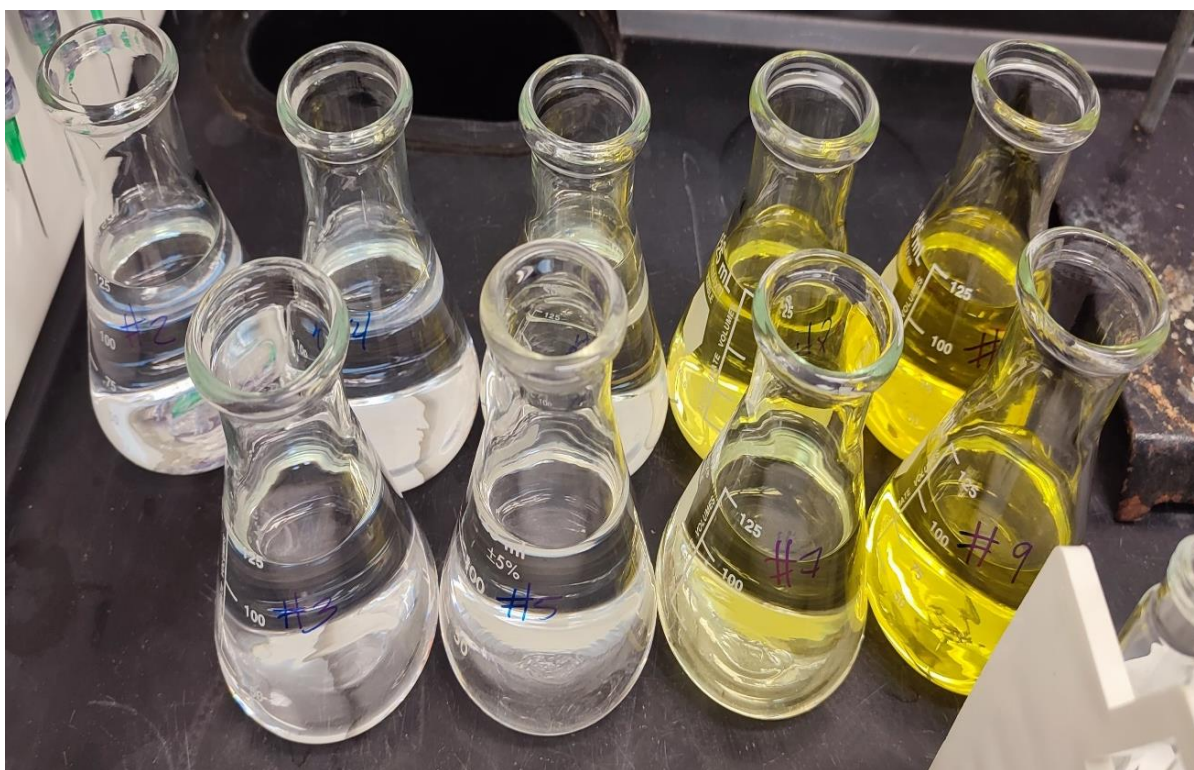


Nota. Compactación de la columna con vacío en el cartucho FlashPure (figura izquierda). Preparación de la muestra con la silica (imagen derecha).

- **Procedimiento de Elución en el equipo Pure y obtención de las fracciones primarias**

Se realizó una separación por cromatografía Flash preparativa en fase normal usando un gradiente de polaridad creciente con hexano, cloroformo y metanol. Para la recolección de la muestra se colocó la opción de auto colectado para utilizar la vía de desechos como mecanismo de almacenamiento en los matraces Erlenmeyer de 125 mL (Figura 22). Luego de obtener las fracciones, estas fueron secadas en el rotavapor y luego almacenadas en tubos de ensayos que luego fueron agrupadas por su similitud mediante cromatografía de capa fina. El gradiente del eluyente de la corrida cromatográfica se resume en la Tabla 5.

Figura 22. *Obtención de fracciones primarias*



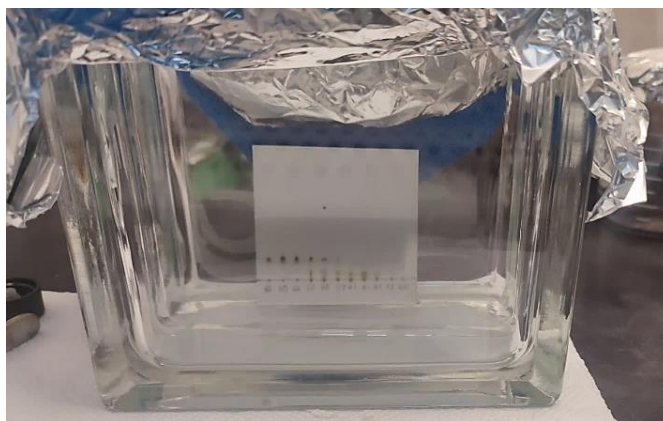
Nota. Fracciones recolectas del Pure en matraces Erlenmeyer de 125 mL, para el posterior secado con el rotavapor y almacenadas en tubos de ensayo.

Tabla 5. *Sistemas de elución utilizados para la fracción de hexano*

| Fase móvil | Proporción |
|-----------------------|------------|
| Hexano | 100% |
| Hexano:Diclorometano | 9:1 |
| Hexano:Diclorometano | 8:2 |
| Hexano:Diclorometano | 6:4 |
| Hexano:Diclorometano | 2:8 |
| Hexano:Diclorometano | 1:9 |
| Diclorometano | 100% |
| Diclorometano:Metanol | 9:1 |

▪ **Monitoreo de la complejidad de las fracciones mediante TLC y unión de las fracciones**

Se cortaron placas en tamaños de 6 cm x 6 cm, en las que se colocaron con un capilar 11 muestras diferentes. Cada placa se colocó en una cámara de elución, que contenía la fase móvil, la cual depende de la polaridad a la cual fueron eluidas las fracciones obtenidas del sistema Pure. Las fracciones obtenidas se agruparon y separaron en base a su similitud y diferencias por TLC (Figura 23). Las placas observaron bajo en una cámara UV a 254 y 365 nm y posteriormente con reveladas con H₂SO₄/EtOH 5%. Estas fracciones obtenidas se les realizó un análisis químico en el cromatógrafo de gases.

Figura 23. *Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas*

Nota. Corrida en la cámara de elución de las fracciones 54 a 64.

3.4.5. Ensayo de fitotoxicidad de las fracciones de *E. fosbergii*.

▪ Fundamento

El ensayo de fitotoxicidad con semillas se utiliza para evaluar cómo una sustancia o compuesto afecta el crecimiento radicular de dichas semillas. Este método es importante ya que se ha empleado para determinar el impacto de contaminantes, pesticidas, herbicidas, y extractos de plantas en el desarrollo vegetal. El potencial fitotóxico del extracto de *E. fosbergii* en hexano, diclorometano y metanol se evaluó empleando el método de la medición de la elongación de la radícula en plato Petri con semillas de *Raphanus sativus* y *Solanum lycopersicum*. Este método consiste en exponer las semillas ante diferentes concentraciones de las fracciones y compuestos de la planta objeto de estudio para determinar el porcentaje de inhibición al crecimiento (Leather & Einhellig, 1988).

▪ Ensayo en Plato Petri

Este método consiste en colocar uniformemente un círculo de papel en la base de una placa Petri, entonces con la ayuda de una micropipeta se impregna el papel de forma homogénea con 1 mL de una de las tres diluciones de la muestra de prueba a concentraciones de 1000, 100 o 10 ppm, y se deja evaporar el disolvente durante 1 día. A continuación, se coloca sobre el papel filtro 12 semillas de *R. sativus* de forma espaciada y uniforme. Finalmente, se agregaron 3mL de agua destilada y se selló el plato con un pedazo de papel parafinado (Figura 24 y 25). Este procedimiento se realizó por triplicado y se repitió con cada una de las muestras a evaluar.

Además, se prepararon platos utilizando las mismas condiciones para el control disolvente, el control agua (negativo) y el control positivo [herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)] para cuantificar su efecto inhibitorio. Posteriormente, todos los platos Petri se colocaron en un horno a una temperatura de 25°C, por 3 días, para luego calcular el efecto sobre la germinación y crecimiento de las semillas midiendo el crecimiento

de la radícula. Se realizó este mismo procedimiento para las semillas de *S. lycopersicum*. El porcentaje de inhibición se calcula con la siguiente ecuación:

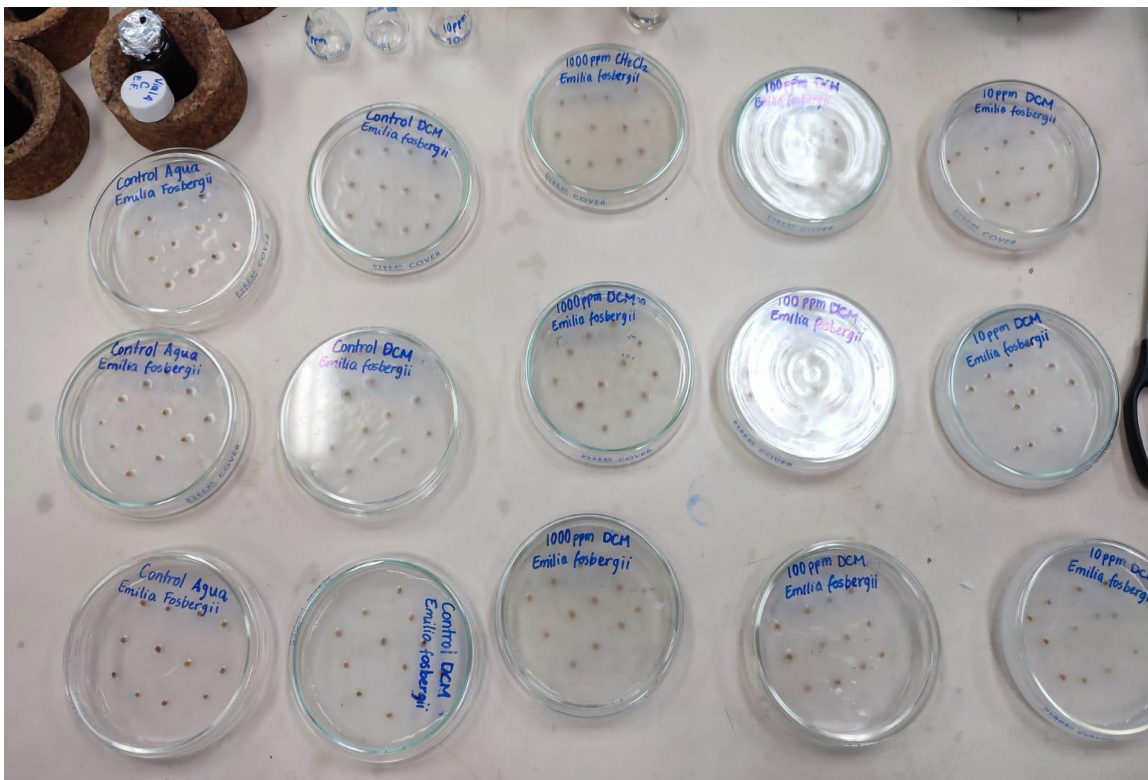
$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{L_{\text{agua}} - L_{\text{extracto}}}{L_{\text{agua}}} \times 100$$

Donde:

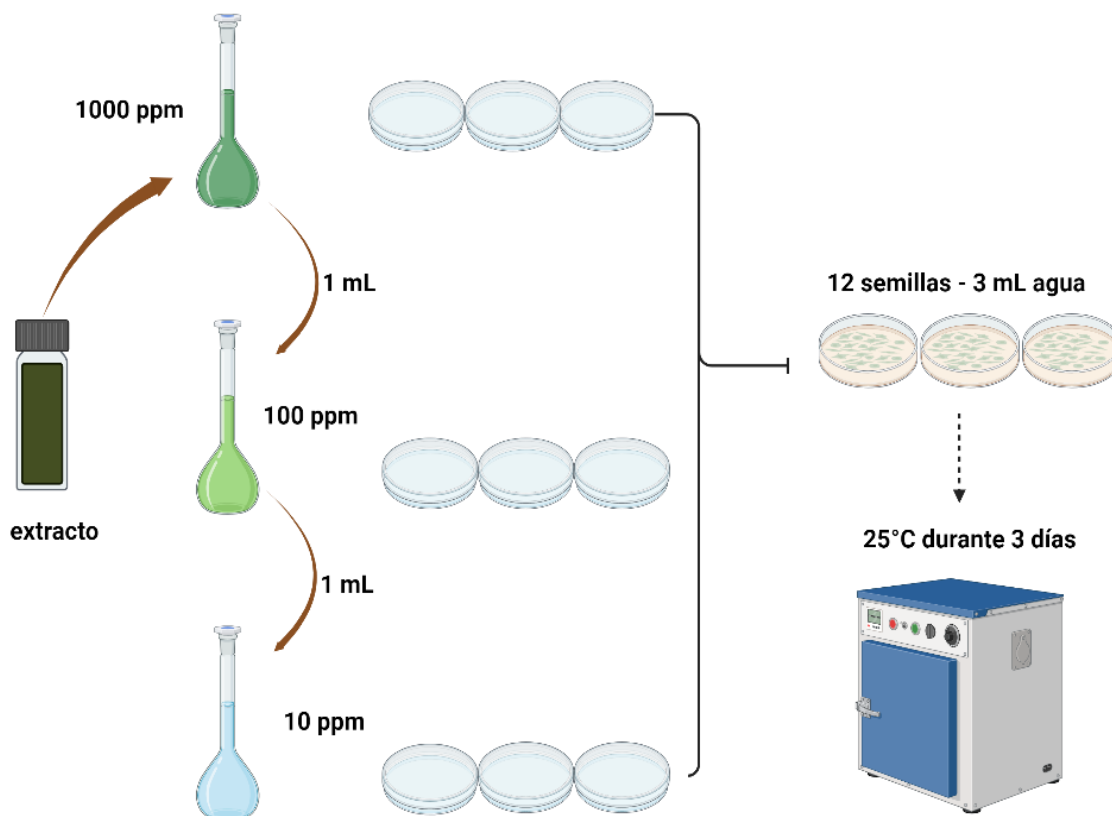
L_{agua} : es el promedio de la longitud de las semillas del control agua.

L_{extracto} : es el promedio de la longitud de las semillas en placas Petri que contienen extracto.

Figura 24. Ensayo de fitotoxicidad con semillas de tomate



Nota. Para el ensayo se utilizaron 12 semillas en cada plato Petri.

Figura 25. Esquema del ensayo de fitotoxicidad

Nota. Este mismo procedimiento se realizó para ambas semillas.

3.4.6. Ensayo de citotoxicidad del extracto crudo de *E. fosbergii*.

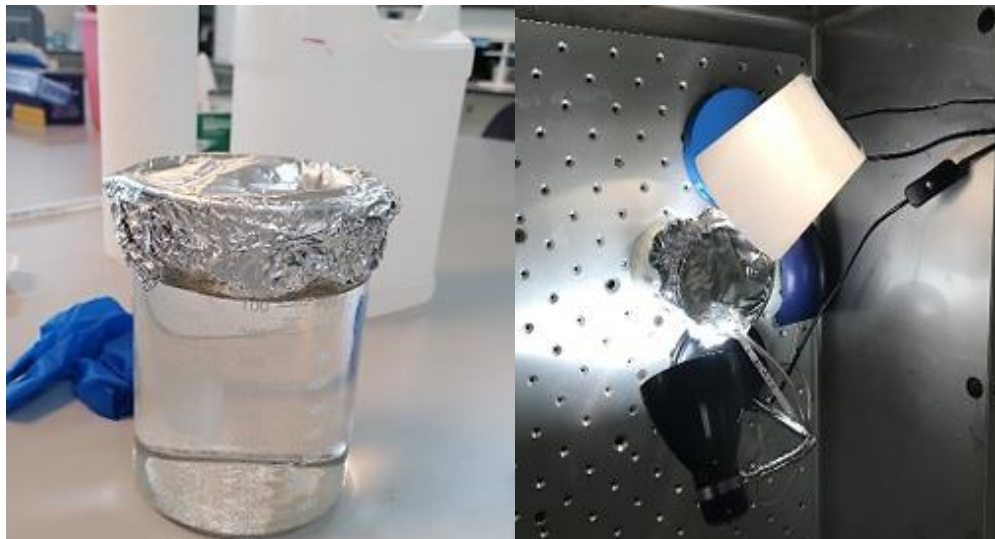
▪ Fundamento

El potencial citotóxico de los extractos de *E. fosbergii* en hexano, diclorometano y metanol se evaluó empleando el ensayo de *A. salina* (camarones de mar). El ensayo consiste en exponer a los nauplios de *A. salina* ante diferentes concentraciones de los extractos, fracciones y compuestos de la planta a evaluar para determinar los valores de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), expresada en ppm o mg/L.

■ Cultivo e incubación de *Artemia salina*

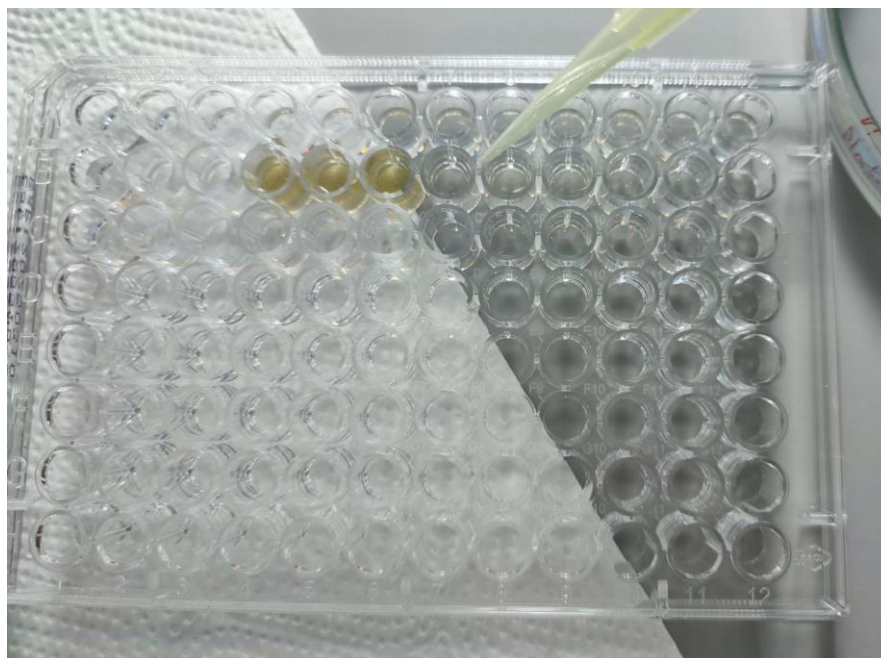
En un vaso químico de 1000 mL, se agregaron 900 mL de solución salina (sal de acuario 35 g/L), entonces se ajustó el pH de la solución con bicarbonato de sodio para que tuviera un valor entre 7–8 con la ayuda de un potenciómetro. Luego, se pesaron 140 mg de huevos de *A. salina* y se agregaron al vaso químico con solución salina, estos se dejaron incubar durante 48 horas procurando tener cerca la luz de dos lámparas y una bomba de oxígeno a 27°C (ver figura 26).

Figura 26. Cultivo e incubación de *Artemia salina*



■ Ensayo en platos de 96 pocillos

Luego que los huevecillos de *A. salina* eclosionaran, se realizó el ensayo en un plato de 96 pocillos, cada concentración se analizó por triplicado agregando en cada pocillo 10 artemias. Para realizar el ensayo se agregó 100 μ L de solución en la que crecieron las artemias y 100 μ L de la disolución de cada extracto a las concentraciones previamente preparadas (Figura 27). También se incluyó un control positivo de dicromato de potasio, un control disolvente y un control negativo (artemias con agua salina). Después de las 24 horas se realizó el conteo de los nauplios muertos con ayuda de un estéreo microscopio.

Figura 27. *Ensayo de citotoxicidad con A. salina*

Nota. Adición de las disoluciones de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol en los pocillos.

Para el análisis de la citotoxicidad sobre las larvas de *A. salina*, el recuento de los nauplios totales y de los que murieron por el tratamiento se calculó la dosis letal al 50% (DL₅₀) según el método de Reed-Muench (Reed & Muench, 1938). En este método se asume que cada *A. salina* que sobrevive una dosis dada también sobreviviría otra dosis más baja, así como cualquier animal que muere a una dosis dada también lo haría a una concentración más alta, así se obtiene un conteo de vivos y muertos acumulados, el porcentaje de mortalidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{muertes acumuladas}}{\text{muertes acumuladas} + \text{vivos acumulados}} \times 100$$

La DL₅₀ o concentración que mata el 50% de la población se estimó mediante el gráfico en el que se coloca el número de vivos y el número de muertes en el eje y, y el logaritmo de la concentración en el eje x, el punto en el que ambos gráficos se interceptan es el valor de la DL₅₀ para obtener el valor en ppm se aplicó la función antilogaritmo.

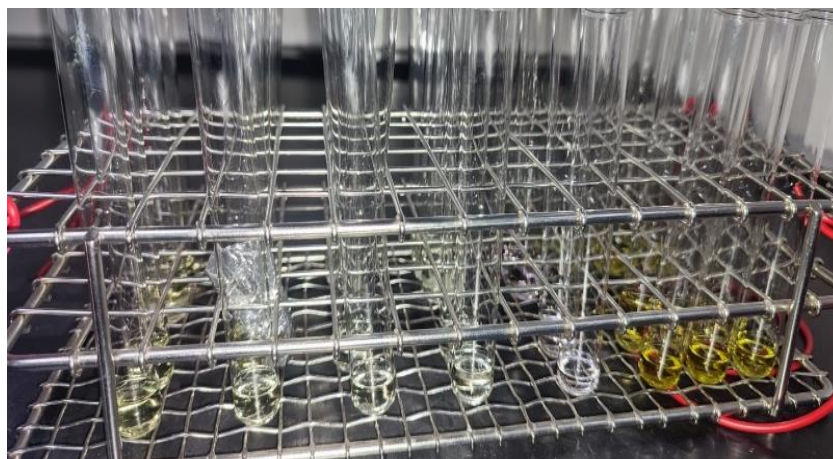
- **Preparación de la solución de DPPH (0.1 mg/mL)**

En un vial de color ámbar, se pesaron 10 mg de DPPH en un ambiente con muy poca luz, ya que el DPPH es un reactivo fotosensible. Se añadieron 25 mL de metanol grado HPLC al vial y, con la ayuda de una pipeta, se transfirió lentamente la solución a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL, aforando con metanol. La solución preparada se almacenó en el refrigerador para su uso posterior.

- **Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones primarias (hexano, diclorometano y metanol)**

Se prepararon por triplicado concentraciones de 6 mg/mL de cada extracto (hexano, cloroformo y metanol) en matraces volumétricos de 10 mL, aforando con etanol al 95%. Se agregaron 0.4 mL de las soluciones de cada extracto en tres tubos de ensayo, como se observa en la Figura 22. En otros tres tubos, se colocó el blanco de DPPH, que consistió en 0.4 ml de la solución de DPPH y 2 ml de etanol. En tres tubos adicionales, se realizó un control de color, agregando 0.4 ml de cada extracto más 2 ml de etanol. Se agregaron 2 mL de la solución de DPPH a los tubos que contienen el extracto, permitiendo un intervalo de tiempo de 5 minutos entre cada adición de DPPH. Se agitó suavemente cada tubo y se dejó reposar durante 30 minutos (Figura 29).

Figura 29. Preparación de triplicados de las fracciones en los tubos de ensayo



Finalmente, se realizó la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-2401PC a una longitud de onda de 517 nm, realizando un lavado de la línea del espectrofotómetro con metanol entre cada cambio de muestra.

▪ **Curva de calibración del extracto de diclorometano**

Se preparó una solución madre a una concentración de 12.3 mg/mL del extracto de diclorometano y a partir de esta se realizaron tres disoluciones, las cuales fueron a 2, 6 y 10 mg/mL en matraces volumétricos de 10 mL. Cada concentración se realizó por triplicado, para ello se tomó 0.4 mL de cada concentración y se añadió en un tubo de ensayo. Además, se realizó triplicados del blanco, que consistió en 0.4 ml de la solución de DPPH y 2 ml de etanol y control color, que consistió en 0.4 ml de la disolución y 2 mL de etanol por cada concentración para conocer la absorbancia de la muestra y de esta manera corregir la absorbancia. Posteriormente, se añadió 2 mL de DPPH a las concentraciones del extracto y blanco con un intervalo de tiempo de 5 minutos entre cada concentración, se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se realizó la medición a una longitud de onda de 517 nm. Se realizó un lavado de la línea con metanol por cada cambio de la muestra.

▪ **Curva de calibración del extracto de metanol**

Se preparó una solución madre a una concentración de 11.4 mg/mL del extracto de metanol y a partir de esta se realizaron tres disoluciones, las cuales fueron a 1, 3 y 6 mg/mL en matraces volumétricos de 10 mL. Cada concentración se analizó por triplicado. Para realizar el análisis se tomaron 0.4 mL de cada concentración y se añadió en un tubo de ensayo. El blanco empleado consistió en 0.4 ml de la solución de DPPH y 2 ml de etanol y control color, que consistió en 0.4 ml de la disolución y 2 mL de etanol por cada concentración para conocer la absorbancia de la muestra y de esta manera corregir la absorbancia. Posteriormente, se añadió 2 mL de DPPH a las concentraciones del extracto y blanco con un intervalo de tiempo de 5 minutos entre cada concentración, se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos. La medición de cada muestra se hizo a una longitud de onda de 517 nm. Se realizó un lavado de la línea con metanol por cada cambio de la muestra.

▪ Curva de calibración de ácido ascórbico

Para la preparación de la curva de calibración de ácido ascórbico en el ensayo de DPPH, se prepararon soluciones de ácido ascórbico a concentraciones de 1000, 600, 200 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Se pesaron cantidades necesarias de ácido ascórbico y se disolvieron en un volumen adecuado de metanol, utilizando matraces volumétricos de 5 mL. Para la solución de 1000 $\mu\text{g/mL}$, se disolvieron 5 mg de ácido ascórbico en metanol y se llevó el volumen hasta 10 mL. Las soluciones de 600, 200 y 50 $\mu\text{g/mL}$ se prepararon mediante diluciones adecuadas de la solución madre, utilizando metanol para aforar cada matraz volumétrico. Una vez preparadas las soluciones estándar, se procedió a realizar el ensayo, se agregaron 0.4 ml de cada solución de ácido ascórbico en tubos de ensayo, junto con 2 ml de la solución de DPPH previamente preparada (0.1 mg/mL).

Se dejó reposar cada mezcla durante 30 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm. Los datos de absorbancia se utilizaron para construir la curva de calibración, graficando la absorbancia frente a las concentraciones de ácido ascórbico. Esta curva permitió determinar la capacidad antioxidante de las muestras desconocidas mediante interpolación. Los datos obtenidos mediante el ensayo se expresan en forma de “Porcentaje de actividad antioxidante”, y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{DPPH}} - \text{Absorbancia}_{\text{real}}}{\text{Absorbancia}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Si la muestra presentaba color, fue necesario hacer la corrección de la absorbancia. Este mismo procedimiento se realizó para la muestra de diclorometano y metanol. Con la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia}_{\text{real}} = \text{Absorbancia}_{\text{muestra+DPPH}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}$$

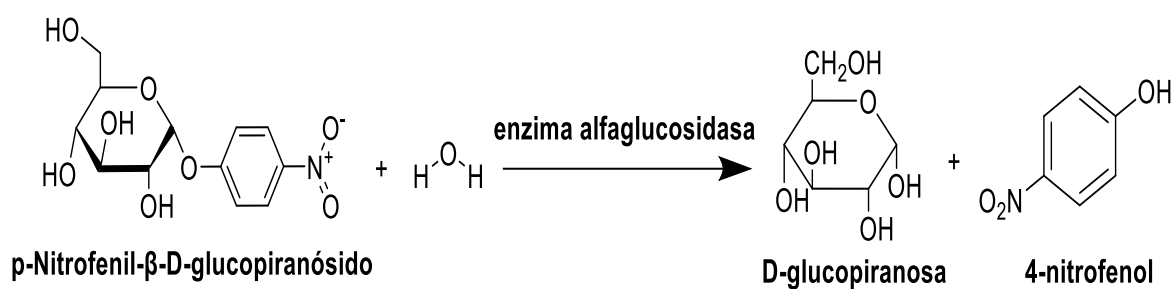
Con un gráfico con el porcentaje de actividad en el eje y y la concentración en el eje x, se obtuvo la ecuación de la recta para conocer la concentración a la que se neutraliza el 50% de los radicales libres CI_{50} .

3.4.8. Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa

▪ Fundamento

Los inhibidores de la enzima α -glucosidasa (como la acarbosa) disminuyen la absorción de los carbohidratos desde el tracto digestivo de las personas, reduciendo así los niveles de glucosa después de las comidas. El p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG, por sus siglas en inglés *p-nitrophenyl glucopyranoside*) en solución es un compuesto incoloro que funciona como sustrato de la enzima, pero cuando las α -glucosidasa rompe el enlace α -1,4-glucosídico, se produce β -D-glucopiranosido y p-nitrofenol (compuesto de color amarillo) (Figura 30). Este último se puede emplear como agente cromógeno de utilidad para el ensayo. Entonces, mientras mayor actividad enzimática exista se produce una mayor intensidad en la coloración amarilla.

Figura 30. Acción de la enzima α -glucosidasa sobre el pNPG



▪ Preparación del buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (PBS) 7.0

Se prepararon 250 ml de solución de buffer de fosfatos (PBS) a una concentración de 0,2 M y un pH de 7. Para ello, se pesaron 2,08712 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) y 1,68422 g de hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4). Ambos compuestos se disolvieron en 200 ml de agua destilada. Posteriormente, se utilizó un potenciómetro previamente calibrado para medir el pH de la solución. Finalmente, se transfirió a un volumétrico de 250 mL y adicionó de agua destilada hasta el aforo.

▪ **Preparación de solución enzimática de α -glucosidasa**

Se preparó una solución enzimática de α -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae* adquirida a Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) a partir de una solución madre de 3.413 U/mL que se encontraba previamente almacenada. Se tomó 500 μ L de la enzima a un matraz volumétrico de 25 mL. Posteriormente, se ajustó el volumen de la solución utilizando el tampón correspondiente hasta alcanzar la marca de aforo del matraz. La concentración final de la enzima en el pocillo fue de 32 mU/mL (tomando en cuenta los volúmenes de las otras soluciones).

▪ **Solución de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG)**

Se preparó una solución de 50 ml con una concentración de 5.33 mM. Para ello, se pesaron 81.09 mg de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) y se disolvieron en 25 mL de buffer en un matraz volumétrico de 50 mL. Posteriormente, se sometió la solución a un proceso de sonicación y se agitó utilizando un vortex para asegurar una disolución homogénea. Finalmente, se ajustó el volumen de la solución con el buffer hasta alcanzar la marca de 50 mL en el matraz volumétrico.

▪ **Evaluación de las fracciones primarias (hexano, cloroformo y metanol) y subfracciones a 6.25 μ g/mL**

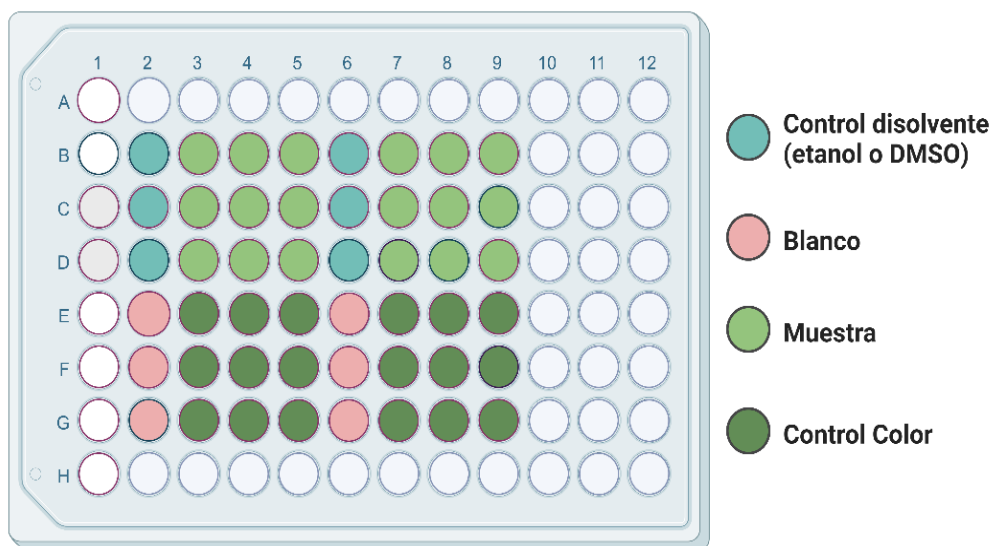
El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Tanto las muestras de prueba como el control positivo se disolvieron en DMSO o EtOH. Para todas las fracciones se prepararon dos soluciones madre de 1000 μ g/mL o ppm, de estos disolventes, a partir de esta se prepararon diluciones de 100 μ g/mL disueltos en etanol y DMSO, según su solubilidad. Luego, se sonicaron y agitaron las muestras hasta que se disolvieran. Se diseñó un modelo de placa como guía al momento de añadir las diferentes disoluciones y reactivos (Figura 31). Se añadieron 20 μ L de las muestras de prueba a sus respectivos pocillos, 150 μ L del buffer PBS o enzima y luego se incubó a 37 °C durante 7 minutos. Posteriormente, se introdujeron 150 μ L de pNPG en cada pocillo y la placa se incubó a 37 °C durante 20 min. La absorbancia

resultante, correspondiente al p-nitrofenol liberado durante la reacción, se midió a 400 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La actividad de las muestras se calculó como porcentaje relativo al control (DMSO o EtOH, en lugar de la solución de muestra), utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = 1 - \frac{A_M - A_{CC}}{A_{CD} - A_B} \times 100$$

Donde: A_M : es el promedio de la absorbancia de la muestra; A_{CC} : es el promedio de la absorbancia de control color; A_{CD} : es el promedio de la absorbancia del control disolvente; A_B : es el promedio de la absorbancia del blanco.

Figura 31. Diseño de la placa de 96 pocillos



▪ Curva del extracto de hexano

Se prepararon 2 mL de las siguientes disoluciones a 12, 1.20 y 0.120 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de hexano en los dos disolventes anteriormente mencionados: DMSO y etanol. También se diseñó un modelo de placa para que funcionaria de guía al momento de añadir las diferentes

disoluciones. Se procedió a añadir 20 μL de cada disolución en los pocillos con color verde, por triplicado para cada concentración.

Figura 32. Preparación de la curva de hexano



En los pocillos azules (control) se agregaron 20 μL del disolvente utilizado, en este caso se realizó un duplicado por cada disolvente (DMSO y etanol). En el blanco también se agregaron 20 μL del disolvente utilizado. Luego, se añadieron 150 μL de buffer en las últimas tres columnas solamente. Y en las tres primeras columnas, se agregaron 150 μL de la solución de la enzima previamente preparada.

La placa se incubó a 37°C, por 7 minutos. Una vez que pasaron los 7 minutos se sacó la placa de la incubadora y se procedió a añadir 150 μL de la solución de pNPG, comenzando primero con las últimas tres columnas y después con las tres primeras. Nuevamente, se colocó la placa en la incubadora por 20 minutos. Una vez realizada la curva se determina la CI_{50} .

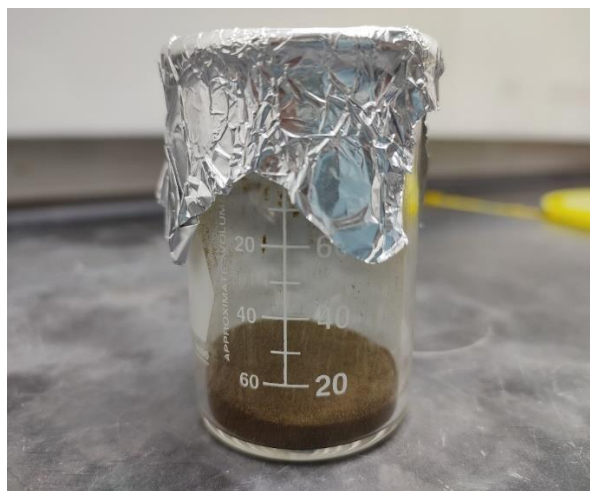
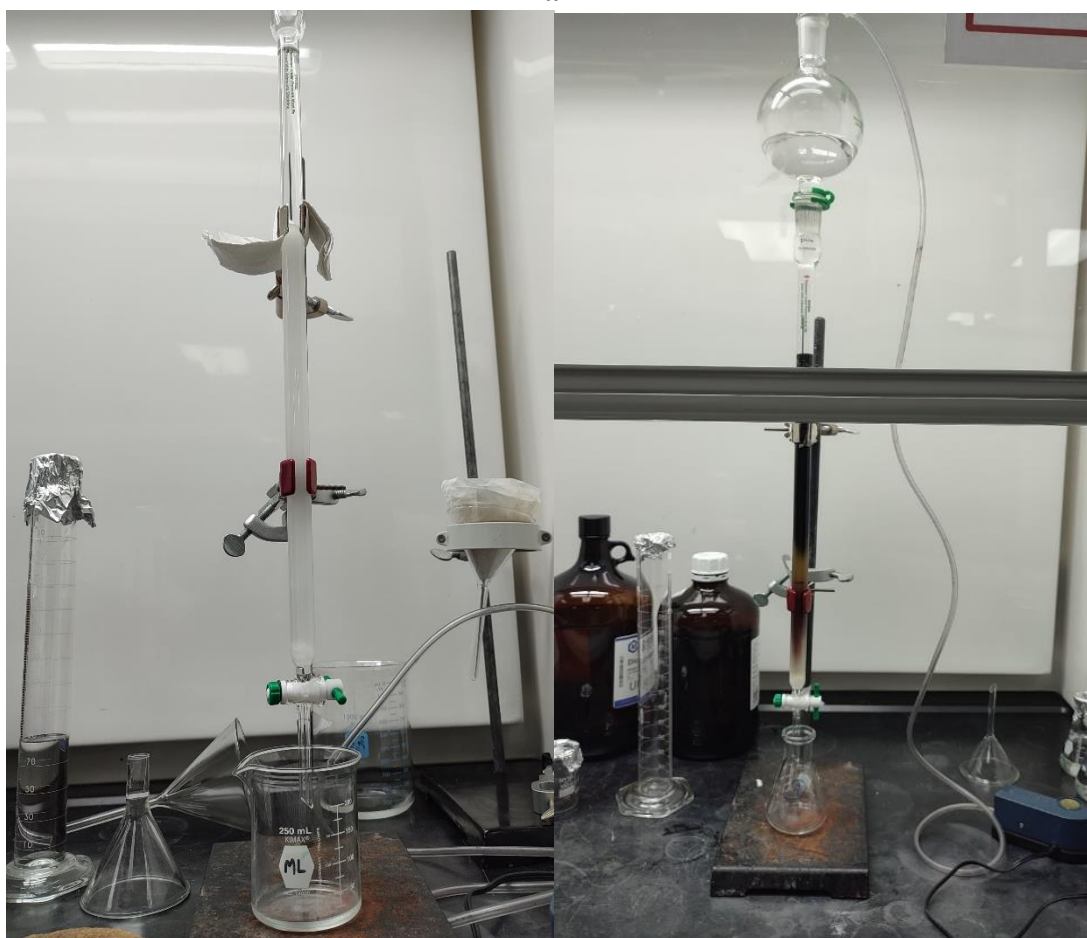
3.4.9. Fraccionamiento secundario

▪ Preparación del cabezal con muestra y la columna

Para llevar a cabo el fraccionamiento secundario de la fracción **EF-A-16**, se empleó 1.5 g de muestra, una columna de vidrio empaquetada con sílica gel y lana de vidrio en la base de la columna para evitar pérdidas de la fase estacionaria durante la elución. Para garantizar una adecuada separación, se realizó una TLC previamente, para determinar el sistema de elución inicial más adecuado, siendo este una mezcla de diclorometano y hexano en proporción 8:2. La sílica se suspendió en una mezcla de eluyente inicial y se vertió cuidadosamente en la columna. Para garantizar una distribución uniforme y evitar burbujas de aire, la columna se acondicionó con este mismo sistema de elución hasta que se observó una fase estacionaria completamente homogénea (Figura 33b).

La carga de la muestra se realizó con una cantidad calculada de sílica gel en una relación 1:2 (1 g de muestra por cada 2 g de sílica gel). Para ello, se disolvió la muestra en un volumen mínimo de disolvente volátil compatible con la fase estacionaria (diclorometano) y se mezcló homogéneamente con la sílica gel hasta obtener una pasta uniforme. Posteriormente, se eliminó el disolvente en la cámara de extracción, resultando en un polvo seco (Figura 33a) que fue cuidadosamente cargado sobre la parte superior de la columna ya empaquetada y acondicionada.

La separación se llevó a cabo utilizando un sistema de gradiente que inició con diclorometano:hexano (8:2), seguido por proporciones crecientes de diclorometano hasta alcanzar el 100% de este disolvente, y posteriormente mezclas decrecientes de diclorometano con pequeñas proporciones de metanol (99:1, 98:2, 90:10). El flujo fue mantenido principalmente por gravedad, con la aplicación ocasional de presión ligera para optimizar la velocidad de elución (Figura 33c).

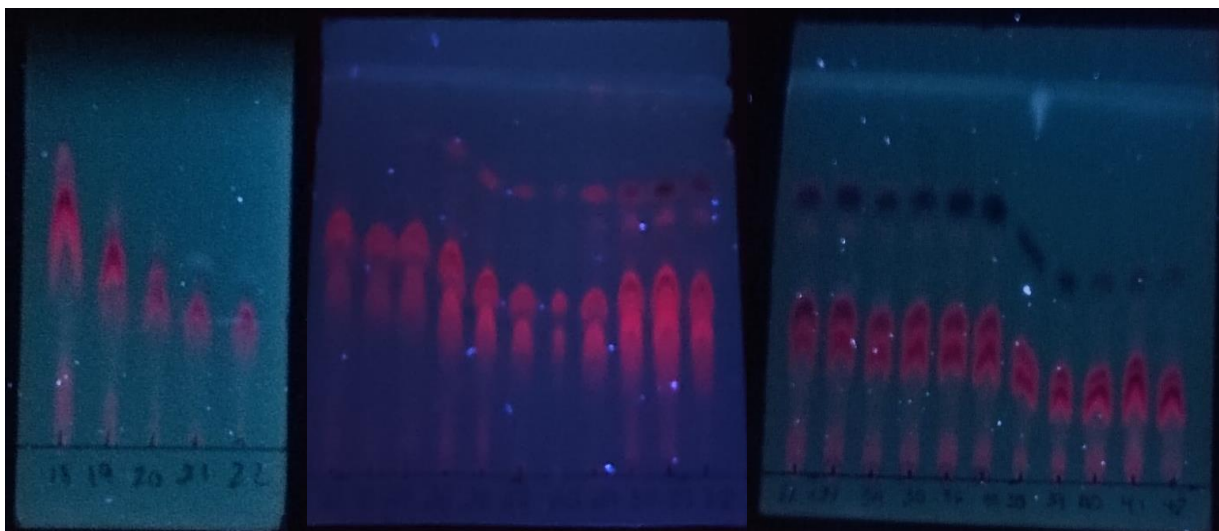
Figura 33. *Procedimiento del fraccionamiento secundario***a****b****c**

Nota. (a) Carga de la muestra; (b) Empaquetamiento y acondicionamiento de la columna; (c) Obtención de fracciones secundarias.

▪ Análisis por TLC y GC de las fracciones

Se cortaron placas en tamaños de 6 cm x 6 cm, en las que se colocaron con de un capilar muestras diferentes. Cada placa se colocó en una cámara de elución, que contenía la fase móvil, la cual dependió de la polaridad a la cual fueron eluidas las fracciones obtenidas en la columna. Las fracciones obtenidas se agruparon y separaron en base a su similitud por TLC. Las placas observaron bajo en una cámara UV a 254 y 365 nm (Figura 34) y posteriormente con reveladas con H₂SO₄/EtOH 5%. A estas fracciones se les realizó un análisis químico con cromatógrafo de gases Agilent 5977.

Figura 34. *TLC de las fracciones obtenidas a 365 nm*



Nota. Fracciones obtenidas de la 18 a 42

3.4.10. REDES MOLECULARES

Los datos CG-EI/EM se procesaron inicialmente utilizando el software MassHunter de Agilent. Las redes moleculares de espectrometría de masas se generaron utilizando la plataforma GNPS. Dado que los datos de masa obtenidos de los experimentos EI no tenían iones precursores preseleccionados (denominados formato de adquisición DIA), fue necesaria la deconvolución espectral. Para este propósito, los datos GC-EM se analizaron y

procesaron utilizando el software MZMine 3.9, los datos crudos se convirtieron y luego cargaron en un formato compatible, mzXML. Los datos se procesaron a través de una serie de pasos específicos que incluyen el procesamiento cromatográfico y la extracción de características. En primer lugar, se utilizó ADAP Chromatogram Builder para construir los cromatogramas a partir de los datos brutos. Este paso requirió configurar parámetros como la tolerancia de masa (ppm), la intensidad mínima de los puntos de datos y el ancho mínimo del intervalo para asegurar la detección de todas las señales relevantes. Posteriormente, se aplicó ADAP Chromatogram Resolver para separar señales que se solapaban en los cromatogramas, ajustando parámetros como la resolución y los umbrales de intensidad. Finalmente, se realizó la deconvolución mediante el Spectral Deconvolution, donde se optimizaron parámetros como la forma del pico y la relación señal-ruido para identificar compuestos individuales dentro de los datos complejos. Los picos detectados y deconvolucionados se alinearon empleando la herramienta ADAP Alignment, configurando tolerancias específicas para masa (ppm) y tiempo de retención, lo que permitió comparar las muestras. Los picos redundantes se agruparon mediante herramientas de deduplicación como Feature Grouper. Posteriormente, los resultados se exportan en formato .mgf para GNPS y en .csv para generar tablas de características.

En GNPS, los archivos que se exportaron de MZmine se cargaron en el pipeline "Feature-Based Molecular Networking" (FBMN), donde se configuran parámetros como la una tolerancia de masa de iones de fragmentos de 0.5 Da y los umbrales de similitud espectral a $\text{Cosine} > 0.7$. En términos de opciones de búsqueda, se utilizaron los siguientes parámetros: una clase de biblioteca de oro, el historial superior por espectro se seleccionó como 10 y se utilizaron las bibliotecas espectrales NIST20 y GNPS. Una vez ejecutado el análisis, GNPS generó una red molecular basada en la similitud espectral, la cual puede descargarse en formato .cyjs para su visualización. La visualización de las redes moleculares se realizó en Cytoscape v.3.4.3. El archivo .cyjs generado en GNPS se importó en esta plataforma. Los colores y tamaños de los nodos se asignaron en función de los archivos de metadatos, para enriquecer la interpretación. El grosor de los bordes representó los puntajes de similitud del coseno, donde las líneas más gruesas indican un mayor grado de similitud

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE HEXANO, DICLOROMETANO Y METANOL

Para la maceración se utilizaron las partes aéreas secas y molidas de *E. fosbergii* (Figura 35). El trabajo se realizó con aproximadamente 1.79 kg. Luego de la extracción del material vegetal por maceración y la evaporación de la mezcla de disolventes utilizada para la extracción se obtuvo 11.2965 g del extracto seco de hexano; 29.4477 g del extracto seco de diclorometano y finalmente 43.65162 g del extracto seco metanol.

Se utilizó el código EF-A, B, C-# donde EF son las iniciales de *E. fosbergii*, las letras mayúsculas corresponden a la fracción, A es para hexano, B para diclorometano y C para metanol. Por último, los #, el número de vial de cada fracción (Ver Tabla 6).

Figura 35. Partes aéreas de *E. fosbergii*



Tabla 6. Masa de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol

| Fracción | Código del vial | Masa (g) |
|----------------------|------------------------|-----------------|
| Hexano | EF-A-1 | 5.55470 |
| Hexano | EF-A-2 | 5.74180 |
| Diclorometano | EF-B-1 | 12.6996 |
| Diclorometano | EF-B-2 | 8.76620 |
| Diclorometano | EF-B-3 | 7.98190 |
| Metanol | EF-C-1 | 18.0979 |
| Metanol | EF-C-2 | 9.76270 |
| Metanol | EF-C-3 | 4.02320 |
| Metanol | EF-C-4 | 6.41730 |
| Metanol | EF-C-5 | 5.35052 |

4.2. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

El extracto seco obtenido de la maceración con hexano fue de 11.2965 g, lo que representa un rendimiento del 0.63%. Posteriormente, la maceración con diclorometano rindió 29.4477 g de extracto seco, equivalente a un 1.65% del peso del material vegetal seco. Finalmente, la maceración con metanol resultó en 43.65162 g de extracto seco, lo que representa un 2.44% del total del peso inicial. Estos resultados reflejan que el metanol fue el disolvente que extrajo la mayor cantidad de compuestos, seguido del diclorometano.

4.3. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES POR TLC Y CG

El perfil químico la fracción hexánica fue evaluado mediante TLC. Para optimizar la visualización de las manchas, se ajustó la polaridad de la fase móvil en tres etapas: inicialmente se utilizó hexano al 100%, seguido de una mezcla de (8:2 v/v) de hexano y diclorometano, y finalmente una mezcla de (6:4 v/v) de hexano y diclorometano, siendo esta última la que proporcionó los resultados más favorables en términos de separación y claridad de las manchas, como se muestra en la figura 36.

Las placas fueron expuestas a luz ultravioleta (UV) a longitudes de onda de 254 nm (Figura 37b) y 365 nm (Figura 37a). Posteriormente, se revelaron utilizando soluciones del reactivo de Dragendorff (Figura 37c), $H_2SO_4/EtOH$ al 5% (Figura 37d) y vainillina (Figura 37f) y un posterior calentamiento para mejorar la visualización de las manchas.

Figura 36. TLC (fase normal) de la fracción de hexano

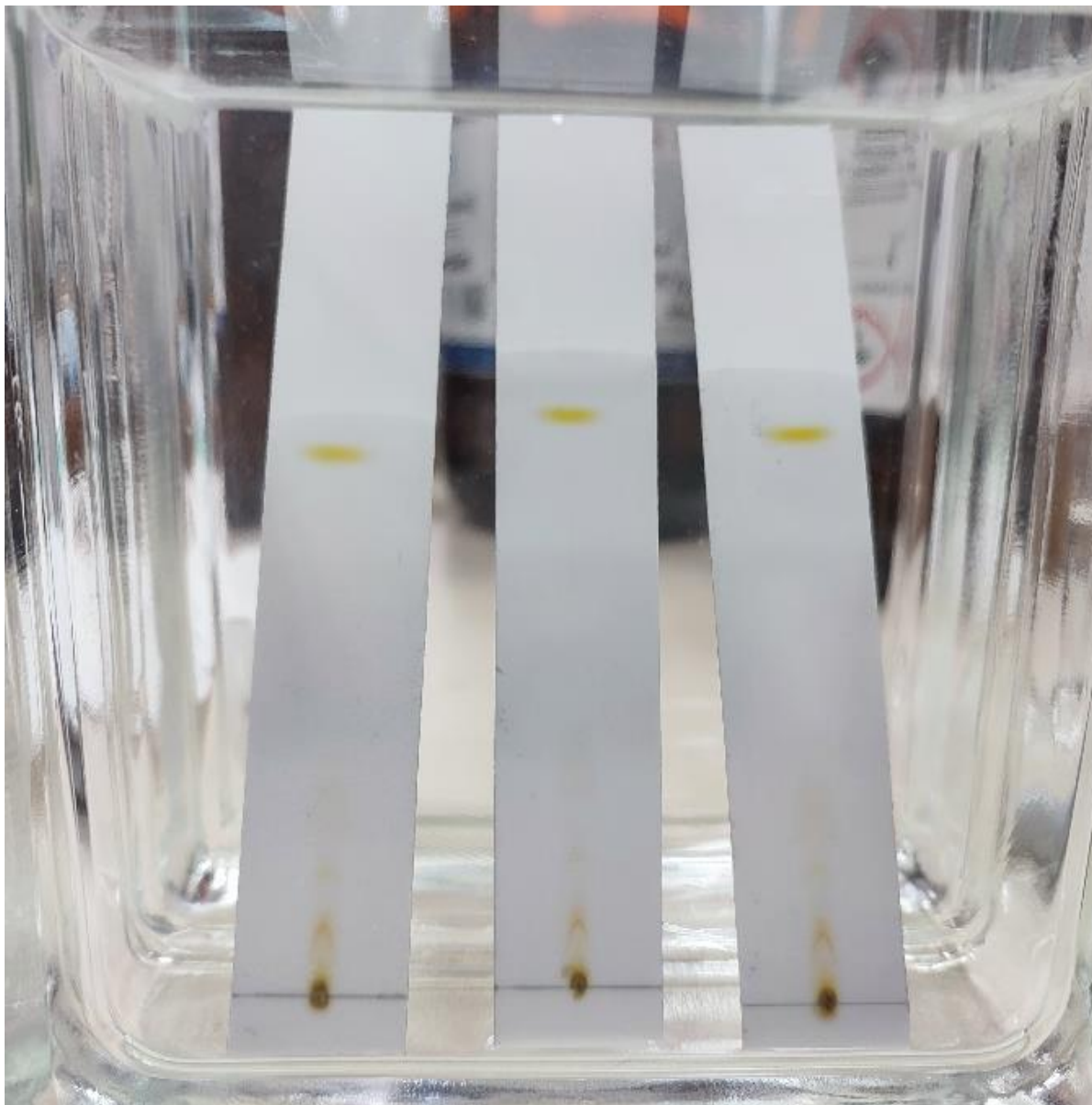
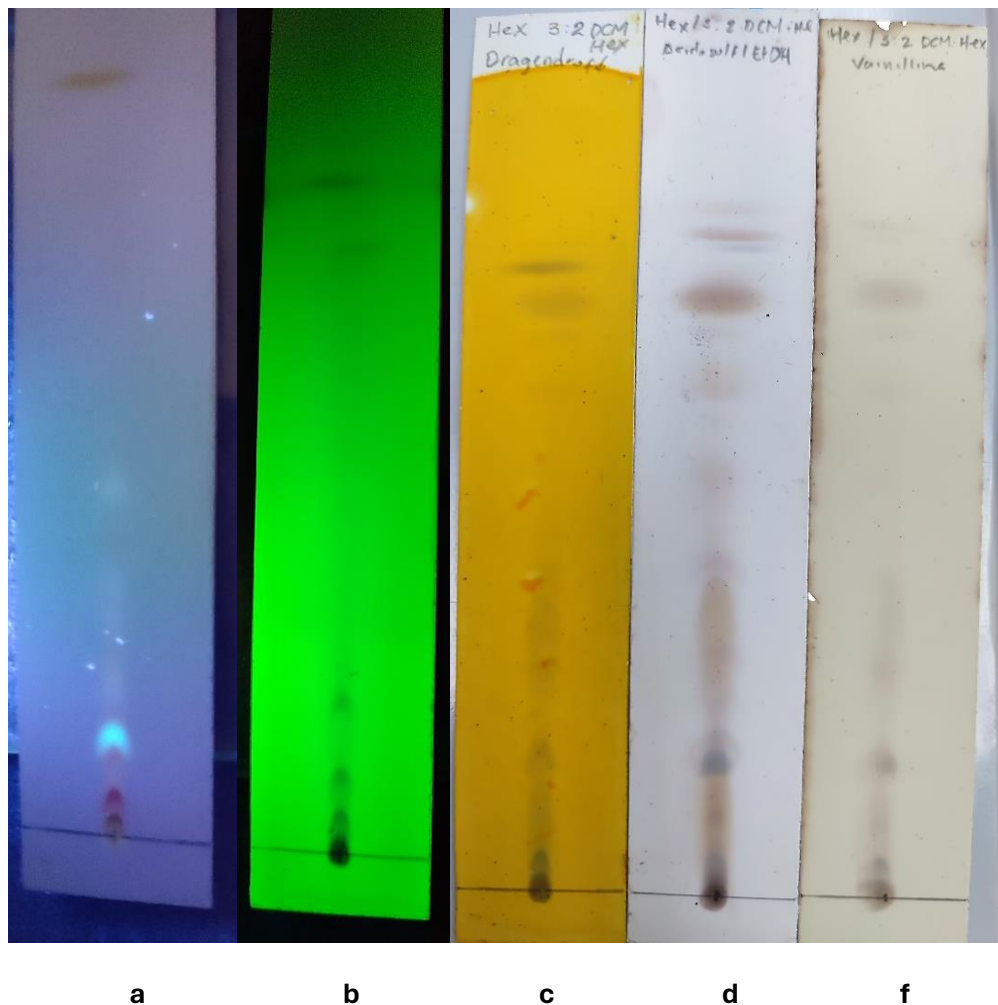
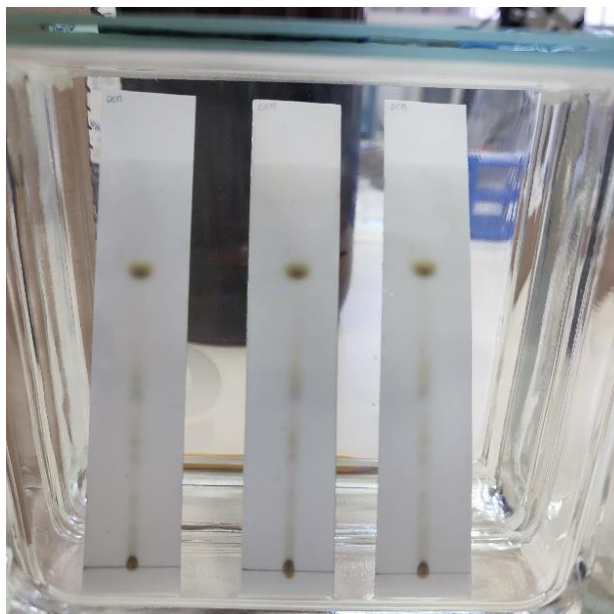
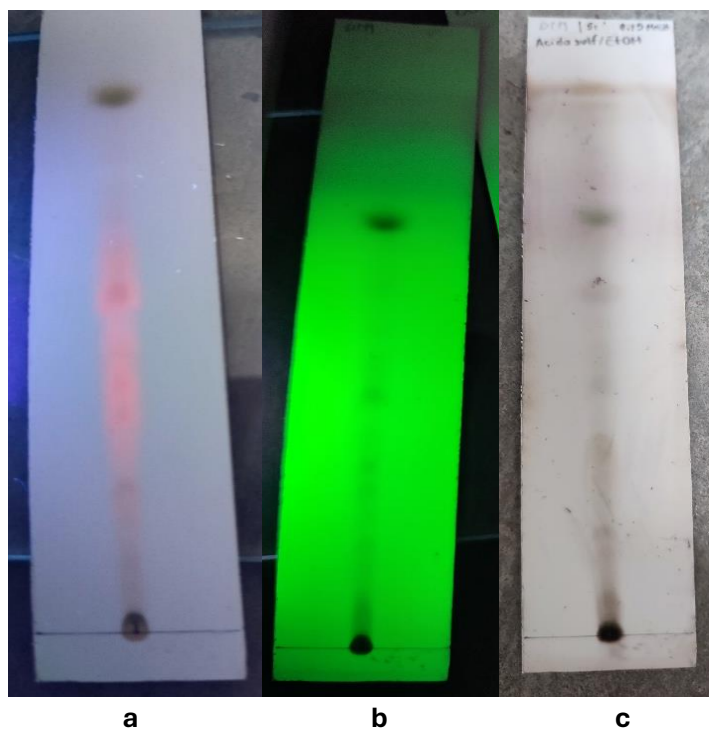


Figura 37. Placas de la fracción de hexano expuestas a luz UV y reveladores

Nota. (a) Luz UV 365 nm; (b) Luz UV 254 nm; (c) Revelador Dragendorff; (d) Revelador H₂SO₄/EtOH al 5%; (f) Revelador Vainillina.

Para observar mejor el perfil químico de la fracción de diclorometano, se ajustó la polaridad de la fase móvil en dos etapas: inicialmente se utilizó diclorometano al 100%, y seguido de una mezcla de diclorometano y tres gotas de metanol, siendo esta última la que proporcionó los resultados más favorables en términos de separación y claridad de las manchas, como se muestra en la figura 38. Las placas fueron expuestas a luz ultravioleta (UV) a longitudes de onda de 365 nm (Figura 39a) y 254 nm (Figura 39b). Posteriormente, se revelaron utilizando soluciones del reactivo de Dragendorff, H₂SO₄/EtOH al 5% (Figura 39c) y calentamiento para mejorar la visualización de las manchas.

Figura 38. TLC (fase normal) de la fracción de diclorometano**Figura 39.** Placas de la fracción de diclorometano expuestas a luz UV y reveladores

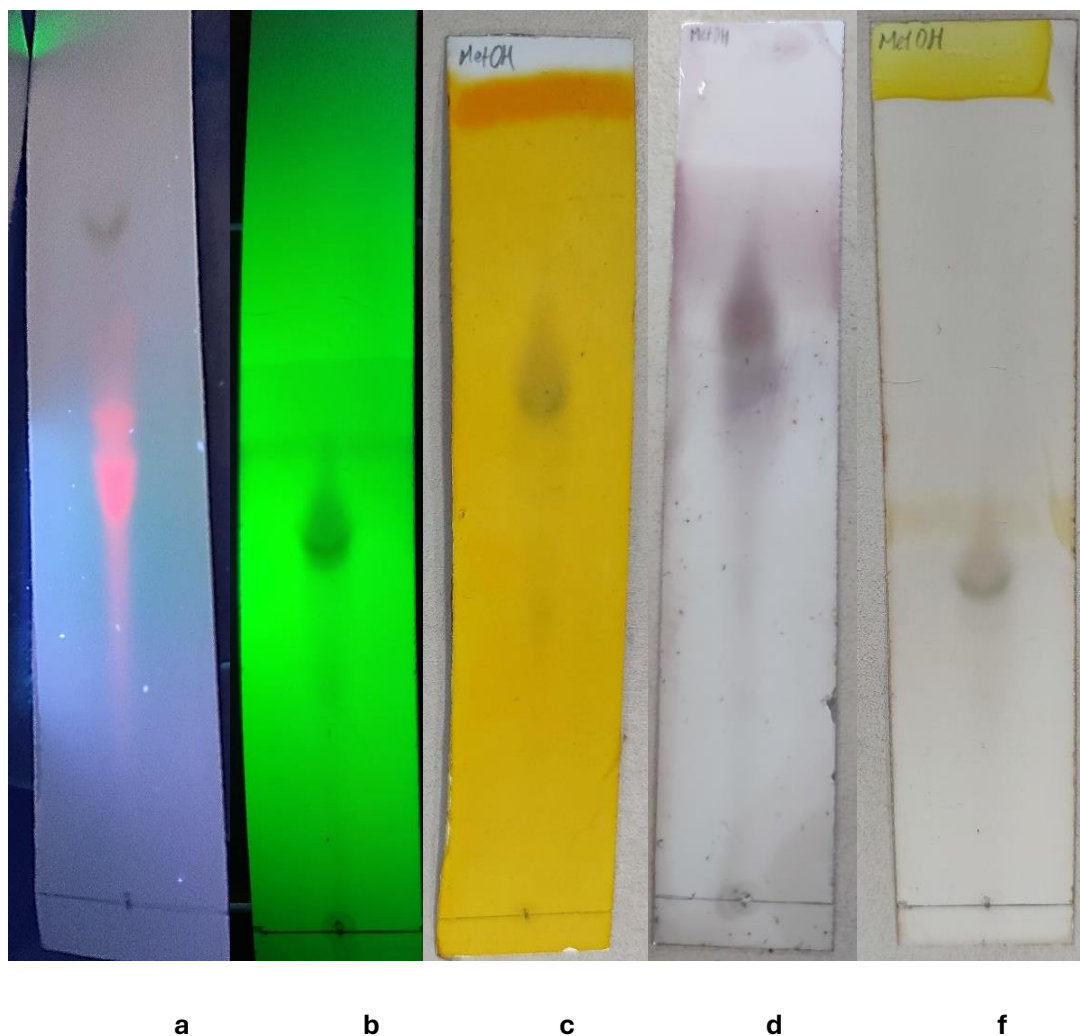
Nota. (a) Luz UV 365 nm; (b) Luz UV 254 nm; (c) Revelador H₂SO₄/EtOH al 5%.

Por último, el perfil químico de la fracción de metanol, se ajustó la polaridad de la fase móvil en tres etapas: inicialmente se utilizó una mezcla de (5:5 v/v) de metanol y diclorometano, seguido de una mezcla de (6:4 v/v) de metanol y diclorometano, y finalmente una mezcla de (8:2 v/v) de metanol y diclorometano, siendo esta última la que proporcionó los resultados más favorables en términos de separación y claridad de las manchas, como se muestra en la figura 40.

Las placas fueron expuestas a luz ultravioleta (UV) a longitudes de onda de 365 nm (Figura 41a) y 254 nm (Figura 41b). Posteriormente, se revelaron utilizando soluciones del reactivo de Dragendorff (Figura 41c), $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ al 5% (Figura 41d) y Vainillina (Figura 41fb) y el posterior calentamiento para mejorar la visualización de las manchas.

Figura 40. *TLC (fase normal) de la fracción de metanol*



Figura 41. Placas de la fracción de diclorometano expuestas a luz UV y reveladores

Nota. (a) Luz UV 365 nm; (b) Luz UV 254 nm; (c) Revelador Dragendorff; (d) Revelador H₂SO₄/EtOH al 5%; (f) Revelador Vainillina.

El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) permitió la elaboración de perfiles químicos de los metabolitos secundarios. Los perfiles de TLC revelaron la diversidad de metabolitos secundarios presentes, mostrando diferencias en la visualización de manchas al utilizar distintos reveladores como Dragendorff, vainillina y H₂SO₄/EtOH al 5%. La Tabla 8 muestra los resultados del análisis de TLC de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol con estos reveladores.

Tabla 7. Resultados del Análisis de TLC de las fracciones de Hexano, Diclorometano y Metanol con Reveladores Específicos

| Fracción | Dragendorff | H ₂ SO ₄ /EtOH 5% | Vainillina |
|---------------|-------------|---|------------|
| Hexano | - | + | - |
| Diclorometano | - | + | + |
| Metanol | - | + | + |

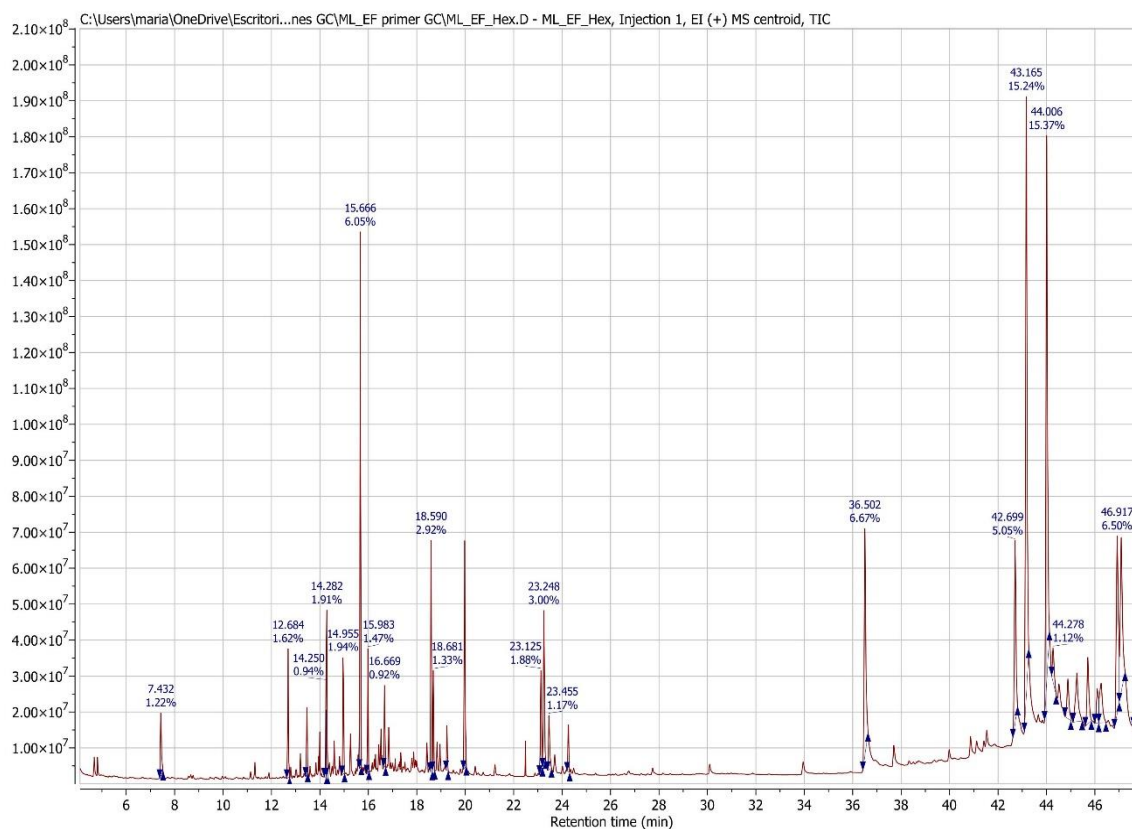
Nota. +: Reacción positiva; se observa una coloración; -: Reacción negativa; no se observa coloración.

El uso del reactivo de Dragendorff fue particularmente relevante en este análisis debido a estudios previos que reportaron la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en *E. fosbergii*. Sin embargo, en este estudio, la reacción con Dragendorff resultó negativa para las fracciones de hexano, diclorometano y metanol, lo que sugiere la ausencia de estos alcaloides en las fracciones evaluadas. Por otro lado, las coloraciones obtenidas con vainillina sugirieron la presencia de compuestos aromáticos y fenoles, como flavonoides y taninos. En los resultados, el revelador de vainillina fue negativo para la fracción de hexano, pero dio una respuesta positiva para las fracciones de diclorometano y metanol, lo que indica la presencia de estos compuestos en dichas fracciones. El uso de H₂SO₄/EtOH al 5% permitió identificar de manera general compuestos orgánicos oxidables por la reacción de carbonización. Este revelador mostró una respuesta positiva en todas las fracciones, evidenciando la presencia de compuestos susceptibles de oxidación.

Además, los perfiles de TLC, combinados con la visualización bajo luz UV a 254 nm y 366 nm, proporcionaron datos adicionales sobre los metabolitos presentes. Los compuestos aromáticos y sistemas altamente conjugados se detectaron a 254 nm debido a su absorción en esta longitud de onda, muchos compuestos orgánicos que no emiten fluorescencia aparecerán como manchas oscuras si absorben esta longitud de onda. Mientras que las sustancias fluorescentes, como las clorofilas, fueron visibles a 365 nm. Muchos compuestos orgánicos que no absorben la luz ultravioleta a 254 nm pueden presentar fluorescencia por debajo de los 365 nm y aparecer en varios colores, como azul o violeta. Las visualizaciones

de manchas han confirmado la presencia de diversos compuestos, por tanto, la TLC es de ayuda para la detección de metabolitos secundarios en productos naturales.

Cromatograma 1. Cromatograma por CG-EM de la fracción de hexano de *E. fosbergii*



Para realizar la identificación preliminar de los componentes mayoritarios de la fracción de hexano se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, la cual permite separar y analizar compuestos volátiles. Una vez completada la separación, los compuestos fueron ionizados y fragmentados en el espectrómetro de masas, que midió la relación masa/carga (m/z) de los iones generados, proporcionando un espectro que representa los diferentes fragmentos moleculares. Para identificar los compuestos separados, se utilizó la base de datos NIST 20, que contiene una extensa colección de espectros de masas y datos relacionados. Al comparar el espectro obtenido con los registros en esta base de datos, se pudieron identificar los compuestos basándose en el porcentaje de similitud en sus patrones espectrales. A continuación, se muestran en el Cromatograma 1 que corresponde a la fracción de hexano.

Se puede observar en la Tabla 9 y Cromatograma 2 diferentes compuestos mayoritarios identificados junto con sus tiempos de retención y porcentajes de abundancia. Entre los compuestos identificados se encuentran hidrocarburos sesquiterpénicos como el óxido de β -cariofileno y el neofitadieno, que contribuyen a las propiedades aromáticas y a las potenciales actividades biológicas de las plantas.

También se detectaron ésteres de ácidos grasos, como el 14-metilpentadecanoato de metilo y el linolenato de metilo, los cuales juegan un papel clave en la composición lipídica y las funciones metabólicas. Asimismo, se identificó el escualeno, un triterpeno precursor en la biosíntesis de esteroides, y es reconocido por su potente capacidad antioxidante (Huang, Lin, & Fang, 2009). Es un ingrediente valorado en la industria cosmética y farmacéutica, con aplicaciones en productos hidratantes y antienvjecimiento (Huang, Lin, & Fang, 2009).

Tabla 8. *Compuestos de Mayor Abundancia Identificados de la fracción de hexano*

| t_R (min) | Compuesto | Similitud (%) | FM | PM (g/mol) | Área relativa (%) |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------------|
| 7.4346 | 1-Undeceno | 97 | C ₁₁ H ₂₂ | 154.29 | 0.787 |
| 12.688 | Ciclosativeno | 99 | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 0.853 |
| 13.467 | Cariofileno | 99 | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 0.528 |
| 14.287 | 1- Pentadeceno | 98 | C ₁₅ H ₃₀ | 210.40 | 0.985 |
| 14.958 | Kessano | 97 | C ₁₅ H ₂₆ | 222.37 | 1.12 |
| 15.669 | Óxido de β -Cariofileno | 94 | C ₁₅ H ₂₆ O | 220.35 | 3.50 |
| 15.987 | Epóxido de humuleno II | 93 | C ₁₅ H ₂₄ O | 220.35 | 0.869 |
| 18.590 | Neofitadieno | 97 | C ₃₀ H ₅₀ | 278.5 | 1.60 |
| 19.981 | 14-metilpentadecanoato de metilo | 98 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.5 | 2.48 |
| 23.127 | Linoleato de metilo | 99 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 294.5 | 1.07 |
| 23.250 | Linolenato de metilo | 99 | C ₁₉ H ₃₂ O ₂ | 292.5 | 2.00 |
| 23.458 | Fitol | 96 | C ₂₀ H ₄₀ O | 296.5 | 0.861 |
| 36.502 | Escualeno | 93 | C ₃₀ H ₅₀ | 410.7 | 5.08 |

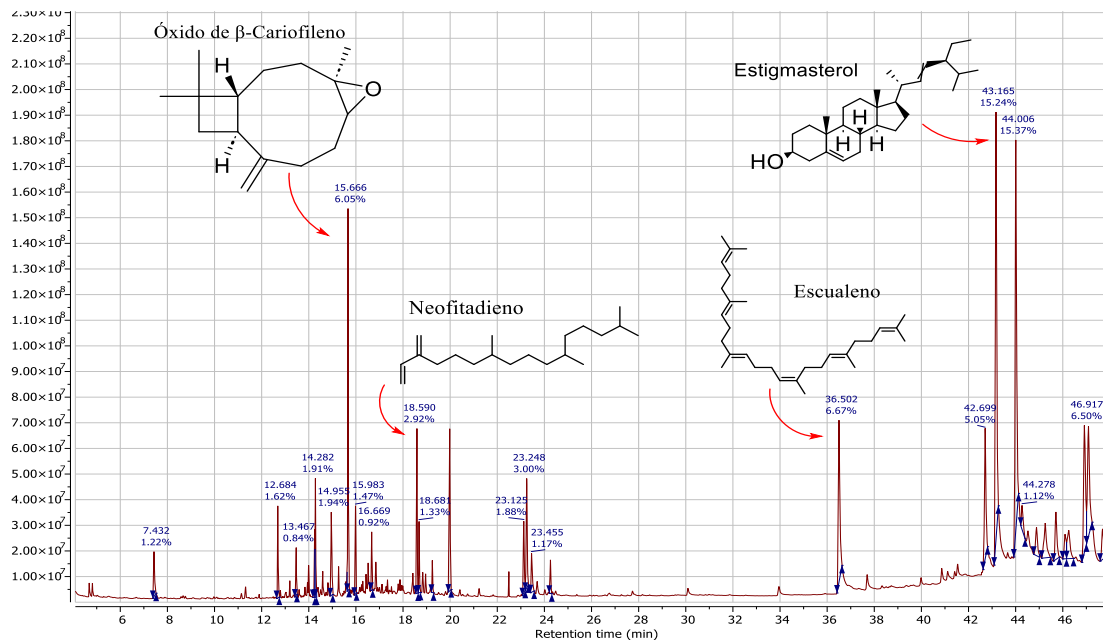
| | | | | | |
|---------------|--|----|---|-------|------|
| 42.699 | Campesterol | 99 | C ₂₈ H ₄₈ O | 400.7 | 5.00 |
| 43.165 | Stigmasterol | 99 | C ₂₉ H ₄₈ O | 412.7 | 12.7 |
| 44.006 | γ-Sitosterol | 99 | C ₂₉ H ₅₀ O | 414.7 | 12.3 |
| 44.278 | Isofucosterol | 99 | C ₂₉ H ₄₈ O | 412.7 | 3.15 |
| 44.520 | β-Amirina | 95 | C ₃₀ H ₅₀ O | 426.7 | 2.48 |
| 45.254 | α-Amirina | 91 | C ₃₀ H ₅₀ O | 426.7 | 2.85 |
| 45.707 | Ácido (5-oxo-3-fenil-4H,6H-pirazolo[1,5-a]imidazol-6-il) acético | 92 | C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₃ | 257.2 | 1.89 |
| 47.091 | Acetato de lupeol | 99 | C ₃₂ H ₅₂ O ₂ | 468.8 | 6.56 |

t_R: tiempo de retención; FM: fórmula molecular; PM: peso molecular

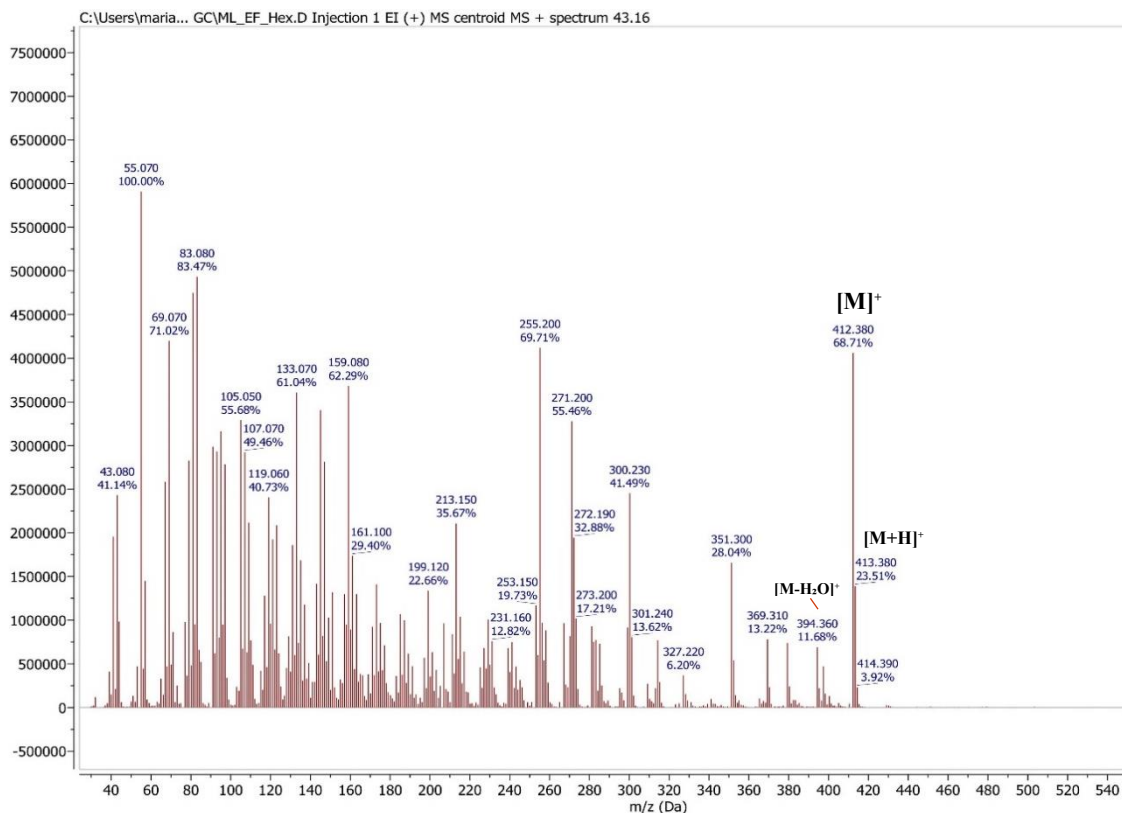
Los fitoesteroles como el campesterol, el estigmasterol y el γ-sitosterol, conocidos por sus funciones estructurales y beneficios potenciales para la salud, como antioxidantes e inhibidores de la α-glucosidasa sugiere su potencial uso como compuestos bioactivos naturales en la formulación de tratamientos complementarios o preventivos para la diabetes (Cherigo, Liao-Luo, Fernández, & Martínez-Luis, 2024; Cherigo & Martínez-Luis, 2019). El campesterol es un fitoesterol común en aceites vegetales y semillas y además ayuda a reducir el colesterol LDL (Hallikainen, Sarkkinen, Wester, & Uusitupa, 2002). El estigmasterol tiene estructura similar al colesterol y es precursor para la síntesis de hormonas esteroides. Por último, se observó la presencia de acetato de lupeol, un triterpeno con destacadas propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y hepatoprotectoras (Liu, *et al.*, 2020).

Los compuestos mencionados, junto con otros detectados en el cromatograma de CG, revelan un perfil complejo y valioso de compuestos bioactivos. Su presencia resalta el probable potencial de la muestra para su empleo en aplicaciones de diversas áreas, incluyendo la industria farmacéutica, cosmética y nutracéutica.

Cromatograma 2. Estructuras de algunos compuestos abundantes de la fracción de hexano y sus correspondientes tiempos de retención

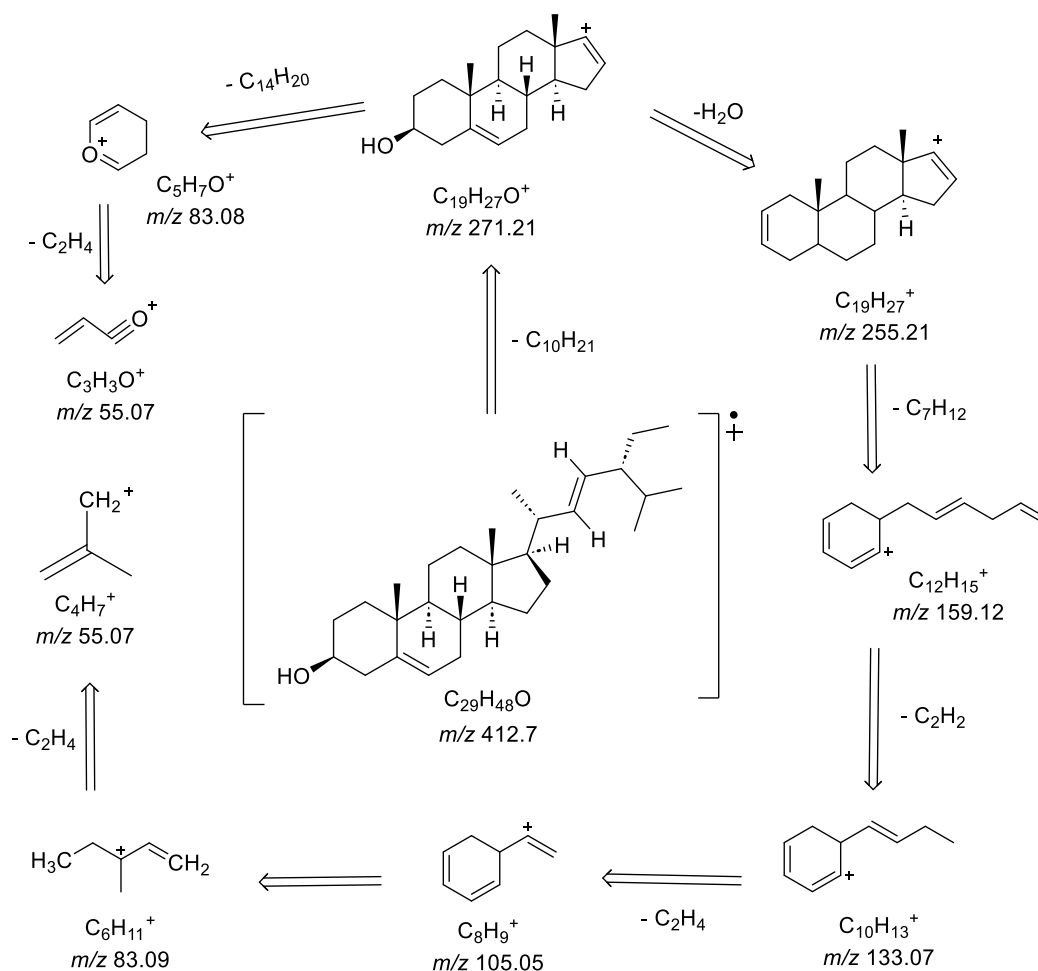


Espectro 1. Espectro de masas del Estigmasterol



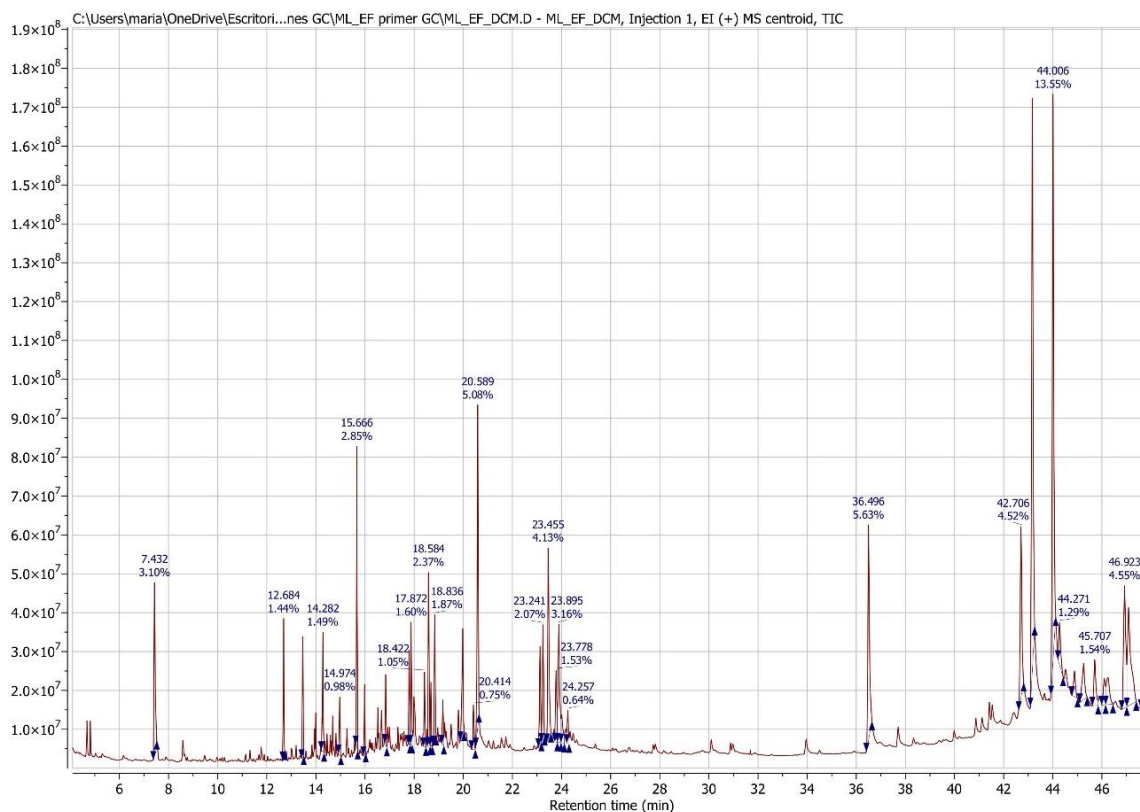
Con el análisis cromatográfico y la espectrometría de masas se identificó al compuesto más abundante de la fracción de hexano, el estigmasterol. El espectro de masas mostró un pico de ion molecular $[M]^+$ a m/z 412.380 (Espectro 1), consistente con el peso molecular de este compuesto. Además, el espectro presentó un pico base en m/z 55.070 (100%), junto con fragmentos secundarios relevantes en m/z 255.2 (69.7%), 159.1 (62.3%), 133.01 (61.0%), 107.07 (49.5%), 105.1 (55.7%), 83.1 (83.5%) y 69.1 (71.02%) (Espectro 1). En la Figura 42, se propusieron los posibles fragmentos del compuesto, considerando el patrón de fragmentación obtenido. Estos datos, al ser comparados con la información de la base de datos del NIST Office of Data & Informatics, confirmaron que el compuesto principal era efectivamente estigmasterol.

Figura 42. Fragmentos registrados en el espectro de masas para el estigmasterol



También se realizó el análisis preliminar e identificación de los componentes mayoritarios para la fracción de diclorometano (Cromatograma 3 y Tabla 10). El análisis químico de la fracción de diclorometano permitió identificar una amplia variedad de compuestos mayoritarios de interés biológico y químico. Entre los hidrocarburos identificados, destacó el 1-undeceno, un compuesto volátil con propiedades antimicrobianas (Velivelli, *et al.*, 2014; Tagele, Lee, Kim, & Lee, 2019). Los terpenoides incluyeron el óxido de β -cariofileno, y el neofitadieno. Además, se identificó el fitol, un diterpeno relacionado con la biosíntesis de clorofilas y potenciales actividades antioxidantes y antimicrobianas (Islam, *et al.*, 2018).

Cromatograma 3. Cromatograma por CG-EM de la fracción de diclorometano de *E. fosbergii*



Dentro de los compuestos lipídicos, se encontraron el palmitato de metilo y el linolenato de metilo, ambos ésteres de ácidos grasos esenciales asociados con funciones metabólicas y estructurales, así como los ácidos grasos libres ácido palmítico y ácido

linolénico, que desempeñan un papel fundamental en la arquitectura de las membranas celulares y la señalización biológica. Entre los triterpenos y esteroides, se identificaron el escualeno, y fitoesteroides como el campesterol, el estigmasterol, el γ -sitosterol y también el acetato de lupeol. Estos resultados destacan la afinidad del diclorometano por metabolitos secundarios lipofílicos.

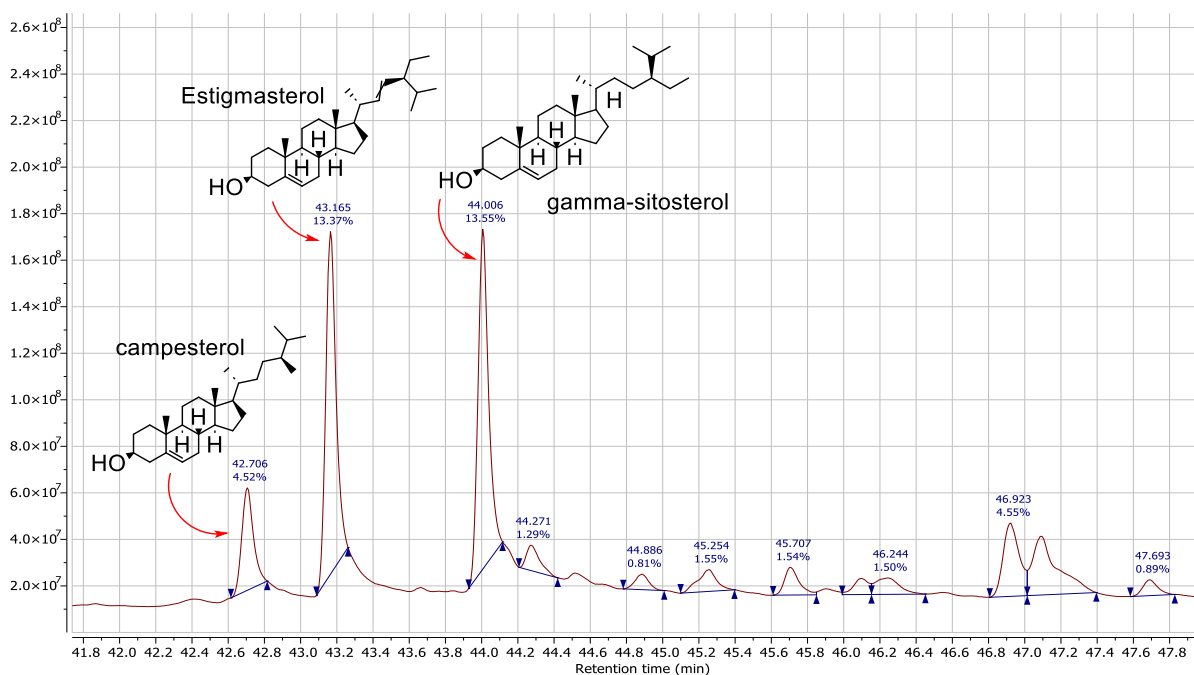
Tabla 9. *Compuestos de Mayor Abundancia Identificados de la fracción de diclorometano*

| t_R (min) | Compuesto | Similitud (%) | FM | PM (g/mol) | Área relativa (%) |
|--------------------------------------|--|--------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------------|
| 7.4326 | 1-Undeceno | 95 | C ₁₁ H ₂₂ | 154.29 | 1.96 |
| 12.684 | Ciclosativeno | 99 | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 0.82 |
| 13.467 | Cariofileno | 99 | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 0.68 |
| 14.282 | 1- Pentadeceno | 99 | C ₁₅ H ₃₀ | 210.40 | 0.91 |
| 14.974 | Dihidroactinidiolida | 98 | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ | 180.24 | 0.58 |
| 15.666 | Óxido de β -Cariofileno | 91 | C ₁₅ H ₂₆ O | 220.35 | 1.61 |
| 15.983 | Epóxido de humuleno II | 99 | C ₁₅ H ₂₄ O | 220.35 | 0.46 |
| 17.795 | 6-Hidroxi-4,4, 7a-trimetil- 5,6,7,7a-tetrahidro benzofuran-2(4H)-ona | 99 | C ₁₁ H ₁₆ O ₃ | 196.24 | 0.79 |
| 18.584 | Neofitadieno | 99 | C ₃₀ H ₅₀ | 278.5 | 1.30 |
| 18.681 | 6,10,14-Trimetilpentadecan- 2-ona | 96 | C ₁₈ H ₃₆ O | 268.5 | 0.55 |
| 19.975 | Palmitato de metilo | 99 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.5 | 1.59 |
| 20.589 | Ácido palmítico | 99 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256.4 | 3.63 |
| 23.127 | Linoleato de metilo | 99 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 294.5 | 0.92 |
| 23.241 | Linolenato de metilo | 99 | C ₁₉ H ₃₂ O ₂ | 292.5 | 1.35 |
| 23.455 | Fitol | 98 | C ₂₀ H ₄₀ O | 296.5 | 2.46 |
| 23.778 | Ácido 10-trans,12-cis- linoleico | 99 | C ₂₀ H ₄₀ O | 280.4 | 0.84 |
| 23.895 | Ácido linolénico | 99 | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | 278.4 | 1.71 |

| | | | | | |
|--------|--|----|---|-------|------|
| 36.496 | Escualeno | 99 | C ₃₀ H ₅₀ | 410.7 | 3.93 |
| 42.706 | Campesterol | 99 | C ₂₈ H ₄₈ O | 400.7 | 4.84 |
| 43.165 | Stigmasterol | 99 | C ₂₉ H ₄₈ O | 412.7 | 11.2 |
| 44.006 | γ - Sitosterol | 99 | C ₂₉ H ₅₀ O | 414.7 | 10.5 |
| 44.271 | Isofucosterol | 99 | C ₂₉ H ₄₈ O | 412.7 | 2.92 |
| 44.886 | Lupenona | 91 | C ₃₀ H ₄₈ O | 424.7 | 1.75 |
| 45.254 | α -Amirina | 91 | C ₃₀ H ₅₀ O | 426.7 | 2.40 |
| 45.707 | Ácido (5-oxo-3-fenil-4H,6H-pirazolo[1,5-a]imidazol-6-il) acético | 86 | C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₃ | 257.2 | 1.27 |
| 46.244 | Acetato de olean-12-en-3-alfa-ilo | 93 | C ₃₂ H ₅₂ O ₂ | 468.8 | 1.32 |
| 47.091 | Acetato de lupeol | 99 | C ₃₂ H ₅₂ O ₂ | 468.8 | 3.45 |
| 47.693 | Friedelina | 98 | C ₃₀ H ₅₀ O | 426.7 | 0.69 |

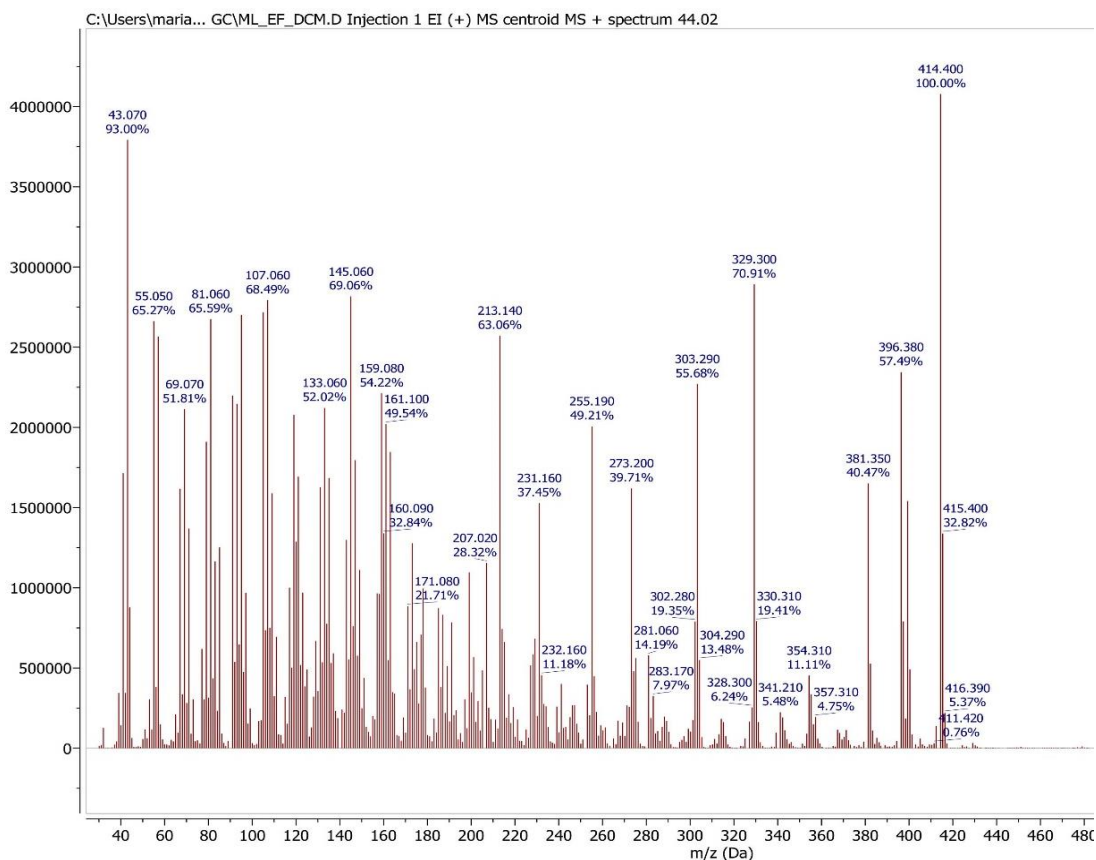
tr: tiempo de retención; PM: peso molecular; FM: fórmula molecular

Cromatograma 4. Estructuras de algunos compuestos volátiles abundantes de la fracción de diclorometano y sus correspondientes tiempos de retención



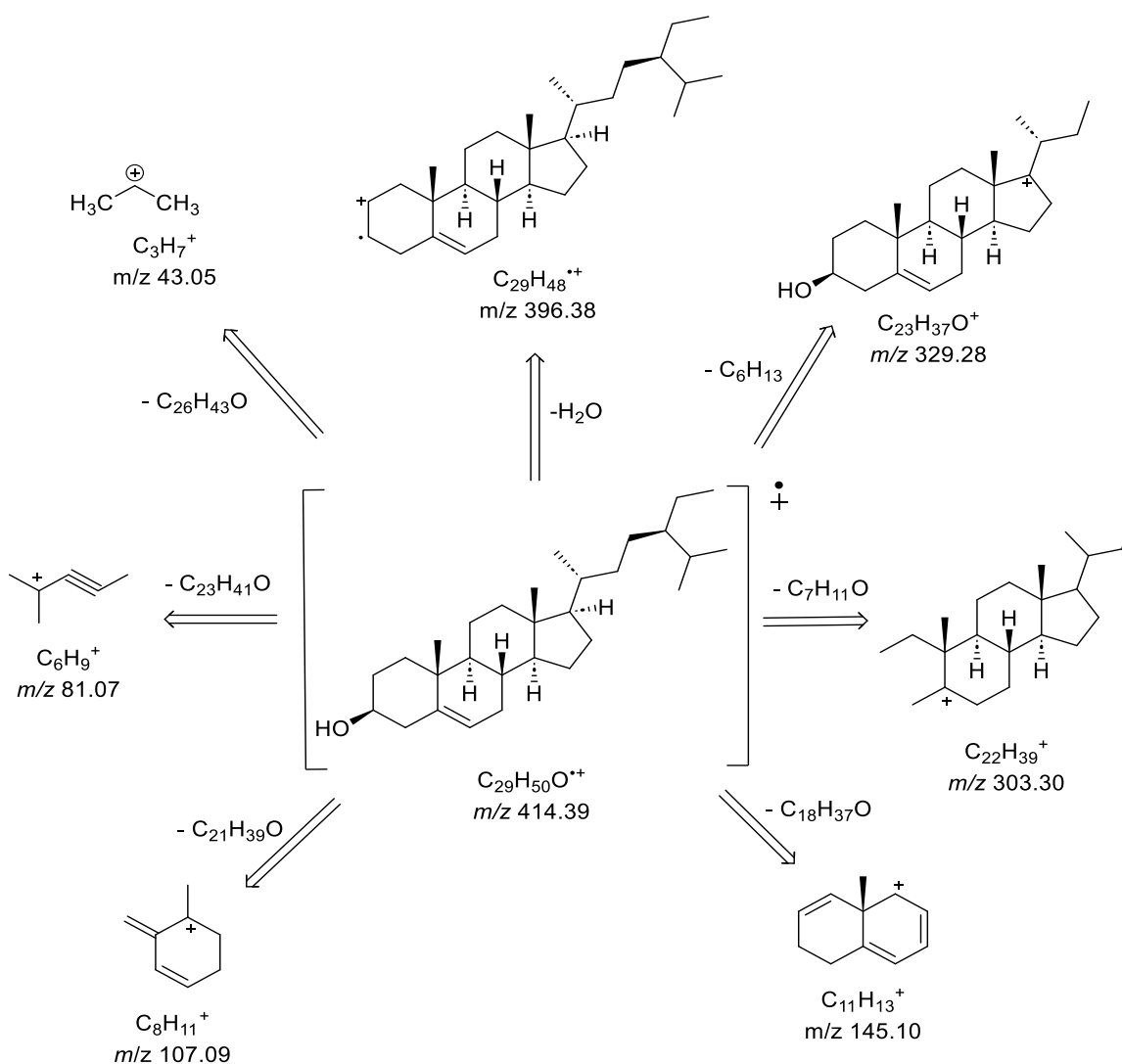
Al comparar la composición de la fracción de diclorometano con la obtenida en la fracción de hexano, se observó que ambas compartían compuestos relevantes, como los hidrocarburos sesquiterpénicos óxido de β -cariofileno y neofitadieno, así como triterpenos y esteroides como el escualeno, el estigmasterol, el campesterol y el γ -sitosterol. Sin embargo, los triterpenos y esteroides mostraron un mayor porcentaje de área en el cromatograma en la fracción de hexano, lo que indica que este disolvente favoreció la extracción de estos compuestos en mayores cantidades en comparación con la fracción de diclorometano. Por otro lado, aunque lípidos como los ésteres de ácidos grasos (palmitato de metilo y linolenato de metilo) y los ácidos grasos libres (ácido palmítico y ácido linolénico) también se detectaron en la fracción de hexano, sus concentraciones fueron notablemente mayores en la fracción de diclorometano. Esto se debe a la afinidad del diclorometano por compuestos moderadamente polares, lo que permitió una extracción más eficiente de lípidos y terpenoides en esta fracción.

Espectro 2. Espectro de masas del γ -Sitosterol



Con el análisis cromatográfico y la espectrometría de masas se identificó al compuesto más abundante de la fracción de diclorometano el γ -sitosterol. En la figura 43 se muestra el patrón de fragmentación del compuesto β -sitosterol. El espectro de masas mostró un pico de ion molecular $[M]^+$ a m/z 414.400 (Espectro 2), consistente con el peso molecular de este compuesto.

Figura 43. Fragmentos registrados en el espectro de masas para el γ -sitosterol



Además, el espectro presentó un pico base en m/z 414.400 (100%), junto con fragmentos secundarios relevantes en m/z 396.380 (57.4%), 329.300 (70.91%), 303.290 (55.7%), 213.140 (63.1%), 145.060 (69.1%), 107.060 (68.5%) y 43.070 (93.0%) (Espectro

2). Estos datos, al ser comparados con la información de la base de datos del NIST Office of Data & Informatics, confirmaron que el compuesto principal era el sitosterol.

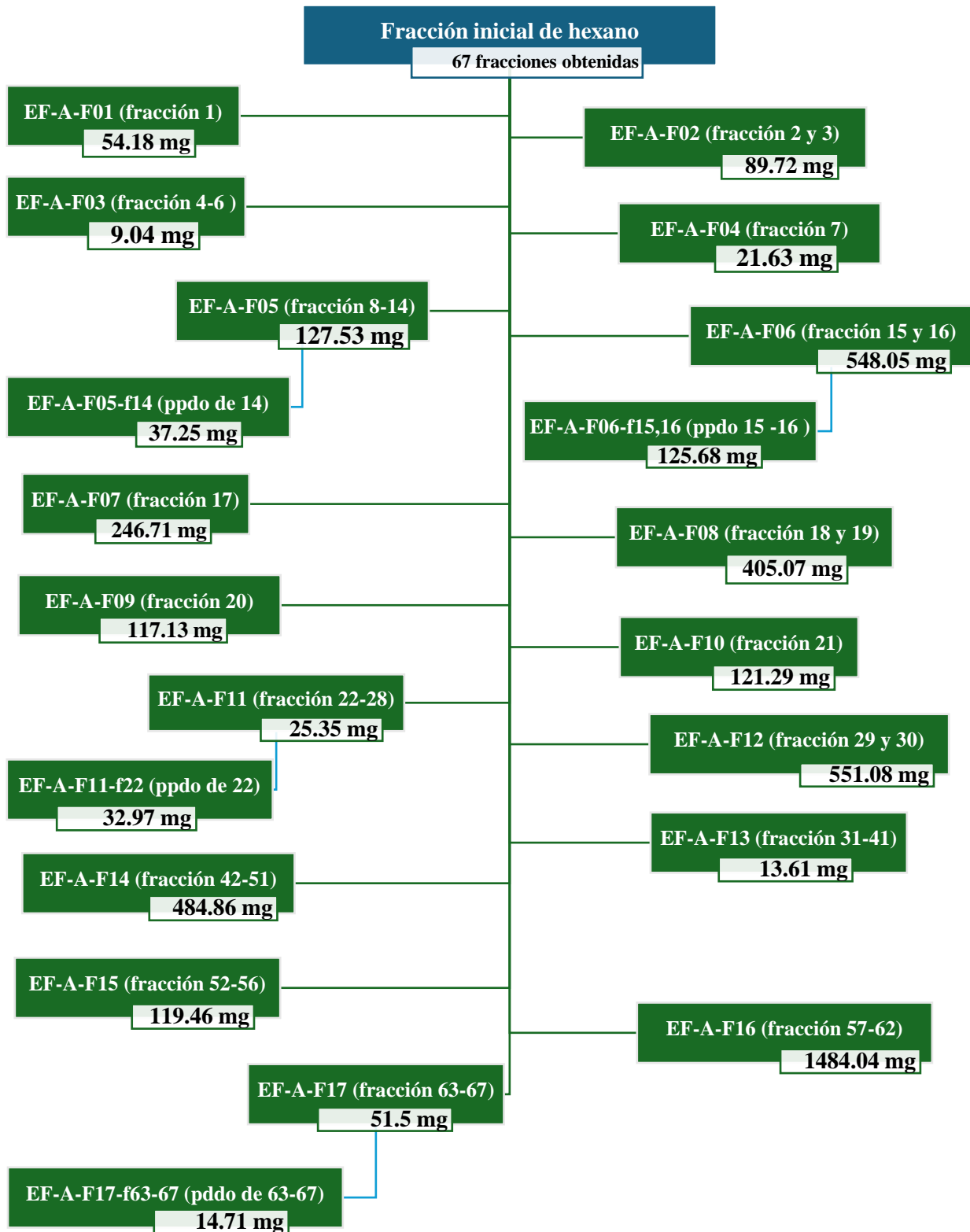
4.4. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DE LA FRACCIÓN DE HEXANO CON EL SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA FLASH

Durante el fraccionamiento primario de la fracción de hexano mediante cromatografía flash, se obtuvieron un total de 67 fracciones (Figura 44), las cuales fueron agrupadas en base a sus similitudes y diferencias observadas mediante cromatografía en capa fina (Figura 23). Las placas fueron visualizadas bajo luz UV a 254 nm y 365 nm, y posteriormente se revelaron con una solución de H₂SO₄/EtOH al 5%. Este análisis permitió la agrupación de las fracciones en 17 fracciones distintas, codificadas como EF-A-F01 a EF-A-F17. Además, se observaron precipitados en ciertas fracciones, los cuales fueron aislados y etiquetados con códigos adicionales, tales como EF-A-F05-f14, EF-A-F06-f15,16, EF-A-F11-f22 y EF-A-F17-f63,67 (Figura 45).

Figura 44. *Fracciones primarias obtenidas*



Nota. Fracciones recolectas del sistema Pure en matraces Erlenmeyer de 125 mL, para el posterior secado con el rotavapor y almacenadas en tubos de ensayo.

Figura 45. Esquema del Fraccionamiento Primario de la Fracción de Hexano

La obtención de 67 fracciones iniciales refleja la complejidad de la fracción de hexano. Sin embargo, el análisis por TLC facilitó el agrupamiento basado en similitudes cromatográficas, permitiendo una reducción eficiente a 17 fracciones finales.

En cuanto al rendimiento del proceso, se obtuvo una masa total de 4.681 g de fracciones combinadas, mientras que la masa inicial cargada en la columna fue de 8.0 g. Esto permitió calcular un rendimiento del **58.51%**. Este valor sugiere que más de la mitad de los compuestos apolares presentes en el extracto de hexano fueron recuperados exitosamente durante el fraccionamiento. Las pérdidas observadas pueden atribuirse a varios factores, como la retención de ciertos compuestos en la columna, su volatilidad o la posible presencia de compuestos no eluibles bajo las condiciones experimentales empleadas.

4.5. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió identificar los compuestos presentes en las fracciones primarias más activas en el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa. Estas 7 fracciones, obtenidas del fraccionamiento primario, mostraron una alta actividad enzimática, con porcentajes de inhibición superiores al 82%. Las tablas 11-17 muestran listas de compuestos detectados con un porcentaje de identificación superior al 90% según la NIST20. La fracción EF-A-F06-f15,16 contenía principalmente ácidos grasos saturados e insaturados, como el ácido pentadecanoico, ácido palmítico y sus derivados metílicos (palmitato de etilo, propilo y hexilo).

Tabla 10. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F06-f15,16

| No | tr (min) | Compuesto | P% | MW | FM |
|----|----------|---|----|--------|--|
| 1 | 19.15 | Ácido pentadecanoico, 14-metil-, éster metílico | 96 | 270.5 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ |
| 2 | 20.14 | Ácido palmítico | 99 | 256.42 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ |
| 3 | 21.19 | Palmitato de etilo | 97 | 284.5 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ |

| | | | | | |
|----|-------|--|----|-------|-------------------|
| 4 | 22.14 | Ácido hexadecanoico, 14-metil-, éster metílico | 96 | 284.5 | $C_{18}H_{36}O_2$ |
| 5 | 24.02 | Palmitato de propilo | 99 | 298.5 | $C_{19}H_{38}O_2$ |
| 6 | 25.08 | Ácido octadecanoico, éster metílico | 99 | 298.5 | $C_{19}H_{38}O_2$ |
| 7 | 25.59 | Palmitato de isobutilo | 95 | 312.5 | $C_{20}H_{40}O_2$ |
| 8 | 25.81 | Neofitadieno | 94 | 278.5 | $C_{20}H_{38}$ |
| 9 | 26.77 | Palmitato de butilo | 91 | 312.5 | $C_{20}H_{40}O_2$ |
| 10 | 27.01 | Estearato de etilo | 90 | 312.5 | $C_{20}H_{40}O_2$ |
| 11 | 30.70 | Ácido eicosanoico, éster metílico | 99 | 326.6 | $C_{21}H_{42}O_2$ |
| 12 | 32.14 | Palmitato de hexilo | 99 | 340.6 | $C_{22}H_{44}O_2$ |
| 13 | 32.70 | Eicosano | 99 | 282.5 | $C_{20}H_{42}$ |
| 14 | 36.64 | Docosanoato de metilo | 97 | 354.6 | $C_{23}H_{46}O_2$ |
| 15 | 46.14 | Tetracosanal | 98 | 352.6 | $C_{24}H_{48}O$ |
| 16 | 58.47 | Triacontanal | 99 | 436.8 | $C_{30}H_{60}O$ |
| 17 | 67.77 | Dotriacontanal | 98 | 464.8 | $C_{32}H_{64}O$ |

t_R : tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

La fracción EF-A-F11-f22 presentó una mayor complejidad química. Entre los compuestos identificados se encuentran terpenos como el óxido de β -cariofileno, neofitadieno y fitol, así como ácidos grasos y sus derivados, como el palmitato de metilo y el linoleato de etilo. Compuestos como la friedelina, la β -amirona, y sesquiterpenos oxigenados como el longipinocarvona, son potenciales moduladores del sitio activo de la enzima de acuerdo con la literatura.

Tabla 11. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F11-f22

| No | t_R (min) | Compuesto | P% | MM | FM |
|----|-------------|--|----|--------|-------------------|
| 1 | 6.431 | Geranilacetona | 95 | 194.31 | $C_{13}H_{22}O$ |
| 2 | 8.912 | Óxido de β -Cariofileno | 90 | 220.35 | $C_{15}H_{24}O$ |
| 3 | 10.986 | Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol | 91 | 220.35 | $C_{15}H_{24}O$ |
| 4 | 11.522 | 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregnan-20-ona | 91 | 332.5 | $C_{21}H_{32}O_3$ |
| 5 | 11.748 | (-)-Aloaromadendreno | 94 | 204.35 | $C_{15}H_{24}$ |

| | | | | | |
|----|--------|--|----|--------|--|
| 6 | 13.814 | Longipinocarvona | 93 | 218.33 | C ₁₅ H ₂₂ O |
| 7 | 16.556 | Neofitadieno | 99 | 278.50 | C ₂₀ H ₃₈ |
| 8 | 16.717 | 6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona | 93 | 268.50 | C ₁₈ H ₃₆ O |
| 9 | 19.146 | Palmitato de metilo | 99 | 240.50 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ |
| 10 | 24.112 | Linoleato de metilo | 96 | 294.50 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ |
| 11 | 24.637 | Fitol | 91 | 296.50 | C ₂₀ H ₄₀ O |
| 12 | 26.058 | Linoleato de etilo | 99 | 308.50 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ |
| 13 | 26.244 | Linolenato de etilo | 99 | 306.50 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ |
| 14 | 32.219 | Geranilgeraniol | 98 | 290.50 | C ₂₀ H ₃₄ O |
| 15 | 35.699 | Eicosano | 99 | 282.50 | C ₂₀ H ₄₂ |
| 16 | 41.905 | Heptacosano | 96 | 380.70 | C ₂₇ H ₅₆ |
| 17 | 48.209 | 2-Metildotriacontano | 92 | 464.90 | C ₃₃ H ₆₈ |
| 18 | 51.103 | 2,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, acetato, (E,E,E)- | 91 | 332.52 | C ₂₂ H ₃₆ O ₂ |
| 19 | 51.604 | 1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3- ol, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (todo-E)- | 93 | 426.70 | C ₃₀ H ₅₀ O |
| 20 | 63.597 | β-amirona | 95 | 424.70 | C ₃₀ H ₄₈ O |
| 21 | 64.258 | Dotriacontanal | 97 | 464.8 | C ₃₂ H ₆₄ O |
| 21 | 65.468 | Friedelina | 99 | 426.70 | C ₃₀ H ₅₀ O |

tr: tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

La EF-A-F12 también presentó una mayor complejidad química, con terpenos como (-)-espatulenol, óxido de β-cariofileno e isospatulenol, así como esteroides (campesterol, estigmasterol y γ-sitosterol). También se identificaron ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico, palmitoleico y sus ésteres metílicos.

Tabla 12. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F12

| No | tr (min) | Compuesto | P% | MM | FM |
|----|----------|------------------------|----|--------|--|
| 1 | 9.50 | (-)-Espatulenol | 98 | 220.35 | C ₁₅ H ₂₄ O |
| 2 | 9.68 | Óxido de β-cariofileno | 98 | 220.35 | C ₁₅ H ₂₄ O |
| 3 | 10.74 | Isospatulenol | 98 | 220.35 | C ₁₅ H ₂₄ O |
| 4 | 14.17 | Ácido mirístico | 99 | 228.37 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ |
| 5 | 17.14 | Ácido pentadecanoico | 95 | 242.40 | C ₁₅ H ₃₀ O ₂ |

| | | | | | |
|----|-------|--------------------------------------|----|--------|--|
| 6 | 17.83 | Neofitadieno | 99 | 278.5 | C ₂₀ H ₃₈ |
| 7 | 19.14 | Palmitato de metilo | 91 | 270.5 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ |
| 8 | 19.63 | Ácido palmitoleico | 90 | 254.41 | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ |
| 9 | 21.02 | Ácido palmítico | 99 | 256.42 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ |
| 10 | 24.11 | Linoleato de metilo | 99 | 294.50 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ |
| 11 | 24.31 | Ácido cis-11-octadecenoico | 96 | 282.50 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ |
| 12 | 24.64 | Fitol | 95 | 296.50 | C ₂₀ H ₄₀ O |
| 13 | 27.32 | Ácido linoleico | 95 | 280.40 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ |
| 14 | 29.41 | 8,11,14-heptadecatrienoato de metilo | 99 | 278.40 | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ |
| 15 | 31.62 | Ácido icosanoico | 99 | 312.50 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ |
| 16 | 46.59 | α-Tocospiro B | 99 | 462.70 | C ₂₉ H ₅₀ O ₄ |
| 17 | 57.17 | Campesterol | 99 | 400.70 | C ₂₈ H ₄₈ O |
| 18 | 58.18 | Estigmasterol | 95 | 412.70 | C ₂₉ H ₄₈ O |
| 19 | 59.84 | γ-Sitosterol | 97 | 414.71 | C ₂₉ H ₅₀ O |
| 20 | 61.83 | Lupeol | 97 | 426.70 | C ₃₀ H ₅₀ O |
| 21 | 64.45 | Glutinol | 96 | 426.70 | C ₃₀ H ₅₀ O |

t_R: tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

En la EF-A-F13, se identificaron compuestos similares, incluidos óxido de β-cariofileno, ácido palmítico, ácido linoleico, linolenato de metilo y estigmasta-5,24(28)-dien-3-ol. La presencia de fitol y otros terpenos, conocidos por sus propiedades antioxidantes, sugiere que podrían estar contribuyendo a la inhibición enzimática al reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden influir en la actividad de la enzima α-glucosidasa.

Tabla 13. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F13

| No | t _R (min) | Compuesto | P% | MM | FM |
|----|----------------------|--|----|--------|-----------------------------------|
| 1 | 9.50 | 1H-Cicloprop[e]azulen-7-ol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-, [1ar-(1α,4α,7β,7aβ,7bα)] - | 99 | 220.35 | C ₁₅ H ₂₄ O |
| 2 | 9.67 | Óxido de β-cariofileno | 98 | 220.35 | C ₁₅ H ₂₄ O |
| 3 | 13.42 | Colestan-3-ol | 94 | 388.70 | C ₂₇ H ₄₈ O |

| | | | | | |
|----|-------|----------------------------------|----|--------|--|
| 4 | 14.15 | Ácido mirístico | 98 | 228.37 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ |
| 5 | 16.71 | 6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona | 98 | 268.50 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ |
| 6 | 17.13 | Ácido pentadecanoico | 99 | 242.40 | C ₁₅ H ₃₀ O ₂ |
| 7 | 19.15 | Palmitato de metilo | 99 | 270.5 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ |
| 8 | 19.61 | Ácido palmitoleico | 99 | 254.41 | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ |
| 9 | 19.80 | Ácido (Z)-11-hexadecenoico | 93 | 254.41 | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ |
| 10 | 21.00 | Ácido palmítico | 99 | 256.42 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ |
| 11 | 22.48 | 17-pentatriaconteno | 91 | 490.90 | C ₃₅ H ₇₀ |
| 12 | 24.11 | Linoleato de metilo | 99 | 294.50 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ |
| 13 | 24.30 | Linolenato de metilo | 99 | 292.50 | C ₁₉ H ₃₂ O ₂ |
| 14 | 24.64 | Fitol | 99 | 296.50 | C ₂₀ H ₄₀ O |
| 13 | 27.32 | Ácido linoleico | 96 | 280.40 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ |
| 15 | 31.61 | Ácido icosanoico | 98 | 312.50 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ |
| 16 | 46.56 | α -Tocospiro B | 99 | 462.70 | C ₂₉ H ₅₀ O ₄ |
| 17 | 57.17 | Campesterol | 9 | 400.70 | C ₂₈ H ₄₈ O |
| 18 | 60.38 | Estigmasta-5,24(28)-dien-3-ol | 95 | 412.70 | C ₂₉ H ₄₈ O |

tr: tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

La EF-A-F14 contenía compuestos como octadecano, ácido linoleico, ácido palmítico, γ -sitosterol y colesterol. Los esteroides y ácidos grasos en esta fracción son conocidos por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

Tabla 14. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F14

| No | tr (min) | Compuesto | P% | MM | FM |
|----|----------|----------------------------------|----|--------|--|
| 1 | 6.54 | Octadecano | 99 | 254.50 | C ₁₈ H ₃₈ |
| 2 | 8.66 | 2-Metiltriacontano | 94 | 478.91 | C ₃₄ H ₇₀ |
| 3 | 9.63 | Batilol | 90 | 344.60 | C ₂₁ H ₄₄ O ₃ |
| 4 | 11.76 | Eicosano | 95 | 282.50 | C ₂₀ H ₄₂ |
| 5 | 13.19 | 2-Metildotriacontano | 93 | 464.90 | C ₃₃ H ₆₈ |
| 6 | 14.13 | Ácido mirístico | 97 | 228.37 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ |
| 7 | 16.71 | 6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona | 98 | 268.50 | C ₁₈ H ₃₆ O |
| 8 | 17.12 | Ácido pentadecanoico | 99 | 242.40 | C ₁₅ H ₃₀ O ₂ |

| | | | | | |
|----|-------|----------------------|----|--------|-------------------|
| 9 | 19.07 | 3-Metilheptacosano | 90 | 394.80 | $C_{28}H_{58}$ |
| 10 | 19.63 | Ácido gadoleico | 95 | 310.50 | $C_{20}H_{30}O_2$ |
| 11 | 21.00 | Ácido palmítico | 98 | 256.42 | $C_{16}H_{32}O_2$ |
| 12 | 24.11 | Linoleato de metilo | 99 | 294.50 | $C_{19}H_{34}O_2$ |
| 13 | 26.54 | Heptacosano | 91 | 380.70 | $C_{27}H_{56}$ |
| 14 | 26.97 | Ácido linoleico | 91 | 280.40 | $C_{18}H_{32}O_2$ |
| 15 | 30.39 | Linolenato de metilo | 90 | 292.50 | $C_{19}H_{32}O_2$ |
| 16 | 31.61 | Ácido araquídico | 96 | 312.50 | $C_{20}H_{40}O_2$ |
| 13 | 32.69 | Dotriacontano | 97 | 450.90 | $C_{32}H_{66}$ |
| 14 | 24.64 | Colesterol | 98 | 386.70 | $C_{27}H_{46}O$ |
| 15 | 57.18 | Campesterol | 99 | 400.70 | $C_{28}H_{48}O$ |
| 16 | 59.86 | γ -Sitosterol | 91 | 414.70 | $C_{29}H_{50}O$ |

t_R : tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

La EF-A-F15 destacó por su mezcla de ácidos grasos como el ácido láurico, ácido mirístico, ácido linoleico y linolenato de metilo, además de compuestos como el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olida.

Tabla 15. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F15

| No | t_R (min) | Compuesto | P% | MM | FM |
|----|-------------|----------------------------------|----|--------|-------------------|
| 1 | 6.54 | 2,6,10-trimetiltridecano | 94 | 226.44 | $C_{16}H_{34}$ |
| 2 | 8.67 | Ácido láurico | 98 | 200.32 | $C_{12}H_{24}O_2$ |
| 3 | 12.76 | Tetracosano | 93 | 338.70 | $C_{24}H_{50}$ |
| 4 | 14.13 | Ácido mirístico | 98 | 228.37 | $C_{14}H_{28}O_2$ |
| 5 | 16.71 | 6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona | 98 | 268.50 | $C_{18}H_{36}O_2$ |
| 6 | 17.12 | Ácido pentadecanoico | 99 | 242.40 | $C_{15}H_{30}O_2$ |
| 7 | 19.14 | Palmitato de metilo | 99 | 270.5 | $C_{17}H_{34}O_2$ |
| 8 | 19.57 | Ácido (Z)-11-hexadecenoico | 95 | 254.41 | $C_{16}H_{30}O_2$ |
| 9 | 20.98 | Ácido palmítico | 99 | 256.42 | $C_{16}H_{32}O_2$ |
| 10 | 23.84 | 17-pentatriaconteno | 91 | 490.90 | $C_{35}H_{70}$ |
| 11 | 24.11 | Linoleato de metilo | 99 | 294.50 | $C_{19}H_{34}O_2$ |
| 12 | 26.05 | Ácido esteárico | 93 | 284.50 | $C_{18}H_{36}O_2$ |

| | | | | | |
|----|-------|--|----|--------|-------------------|
| 13 | 26.54 | Ácido linoleico | 96 | 280.40 | $C_{18}H_{32}O_2$ |
| 14 | 29.17 | Ácido linolénico | 93 | 278.40 | $C_{18}H_{30}O_2$ |
| 15 | 29.39 | Éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico | 94 | 294.50 | $C_{19}H_{34}O_2$ |
| 16 | 29.56 | Éster metílico del ácido docosapentaenoico | 94 | 344.50 | $C_{23}H_{36}O_2$ |
| 17 | 30.39 | Linolenato de metilo | 92 | 292.50 | $C_{19}H_{32}O_2$ |
| 18 | 31.30 | 4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olida | 96 | 324.50 | $C_{21}H_{40}O_2$ |
| 19 | 41.89 | Eicosano | 91 | 282.5 | $C_{20}H_{42}$ |

t_R : tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

Por último, la EF-A-F16 presentó una notable composición de terpenos y ácidos grasos, como epóxido de isoaromadendreno, neofitadieno, fitol, ácido linoleico y linolenato de metilo, además de thunbergol. Esta fracción se caracteriza por su equilibrio entre compuestos lipofílicos y antioxidantes.

Tabla 16. Composición química de la fracción hexánica EF-A-F16

| No | t_R (min) | Compuesto | P% | MM | FM |
|----|-------------|----------------------------------|----|--------|-------------------|
| 1 | 6.54 | 2,6,10-trimetiltridecano | 94 | 226.44 | $C_{16}H_{34}$ |
| 2 | 8.67 | Ácido láurico | 98 | 200.32 | $C_{12}H_{24}O_2$ |
| 3 | 12.76 | Tetracosano | 93 | 338.70 | $C_{24}H_{50}$ |
| 4 | 14.13 | Ácido mirístico | 98 | 228.37 | $C_{14}H_{28}O_2$ |
| 5 | 16.71 | 6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona | 98 | 268.50 | $C_{18}H_{36}O_2$ |
| 6 | 17.12 | Ácido pentadecanoico | 99 | 242.40 | $C_{15}H_{30}O_2$ |
| 7 | 19.14 | Palmitato de metilo | 99 | 270.5 | $C_{17}H_{34}O_2$ |
| 8 | 19.57 | Ácido (Z)-11-hexadecenoico | 95 | 254.41 | $C_{16}H_{30}O_2$ |
| 9 | 20.98 | Ácido palmítico | 99 | 256.42 | $C_{16}H_{32}O_2$ |
| 10 | 23.84 | 17-pentatriaconteno | 91 | 490.90 | $C_{35}H_{70}$ |
| 11 | 24.11 | Linoleato de metilo | 99 | 294.50 | $C_{19}H_{34}O_2$ |
| 12 | 26.05 | Ácido esteárico | 93 | 284.50 | $C_{18}H_{36}O_2$ |
| 13 | 26.54 | Ácido linoleico | 96 | 280.40 | $C_{18}H_{32}O_2$ |
| 14 | 29.17 | Ácido linolénico | 93 | 278.40 | $C_{18}H_{30}O_2$ |

| | | | | | |
|----|-------|--|----|--------|--|
| 15 | 29.39 | Éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico | 94 | 294.50 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ |
| 16 | 29.56 | Éster metílico del ácido docosapentaenoico | 94 | 344.50 | C ₂₃ H ₃₆ O ₂ |
| 17 | 30.39 | Linolenato de metilo | 92 | 292.50 | C ₁₉ H ₃₂ O ₂ |
| 18 | 31.30 | 4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olida | 96 | 324.50 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ |
| 19 | 41.89 | Eicosano | 91 | 282.5 | C ₂₀ H ₄₂ |

t_R: tiempo de retención; MM: Masa Molecular, P%: Porcentaje de probabilidad, FM: Fórmula molecular

En conjunto, los resultados muestran que las fracciones activas comparten una composición química rica en ácidos grasos, terpenos y esteroides, lo que podría estar relacionado con su capacidad para interactuar con la enzima α -glucosidasa. Los ácidos grasos y sus derivados, por ejemplo, podrían actuar como inhibidores competitivos o no competitivos, mientras que los terpenos y esteroides pueden alterar la conformación de la enzima a través de interacciones hidrofóbicas o por estabilización de los sitios activos (al disminuir la energía del complejo) (Elwekeel, *et al.*, 2022; Shayegan, *et al.*, 2023). Además, la presencia de compuestos con propiedades antioxidantes podría contribuir indirectamente a la inhibición de la enzima al reducir el estrés oxidativo, una condición que puede potenciar la actividad enzimática en sistemas biológicos (Şöhretoğlu & Sari, 2020).

Estos hallazgos subrayan la importancia de estas fracciones como fuente potencial de inhibidores naturales de la enzima α -glucosidasa, estableciendo una base sólida para futuros estudios. La diversidad química observada resalta la posibilidad de efectos sinérgicos que merecen ser explorados en profundidad, especialmente en el contexto de su aplicación terapéutica en enfermedades como la diabetes tipo 2.

4.6. ENSAYO DE FITOTOXICIDAD

Se realizó el ensayo de fitotoxicidad *in vitro* con semillas de *R. sativus* y *S. lycopersicum*, también conocidas como rábano y tomate, respectivamente. Estas fueron incubadas en platos Petri para su crecimiento por 48 h junto al extracto orgánico, el cuál fue agregado en solución sobre papel filtro, posteriormente se impregnaron los compuestos y se

evaporó el disolvente, y se procedió a agregar 3 mL de agua destilada. En este ensayo se evaluaron las fracciones de hexano, diclorometano y metanol, a concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm. La Tabla 18 y 19 muestran los resultados obtenidos para este ensayo.

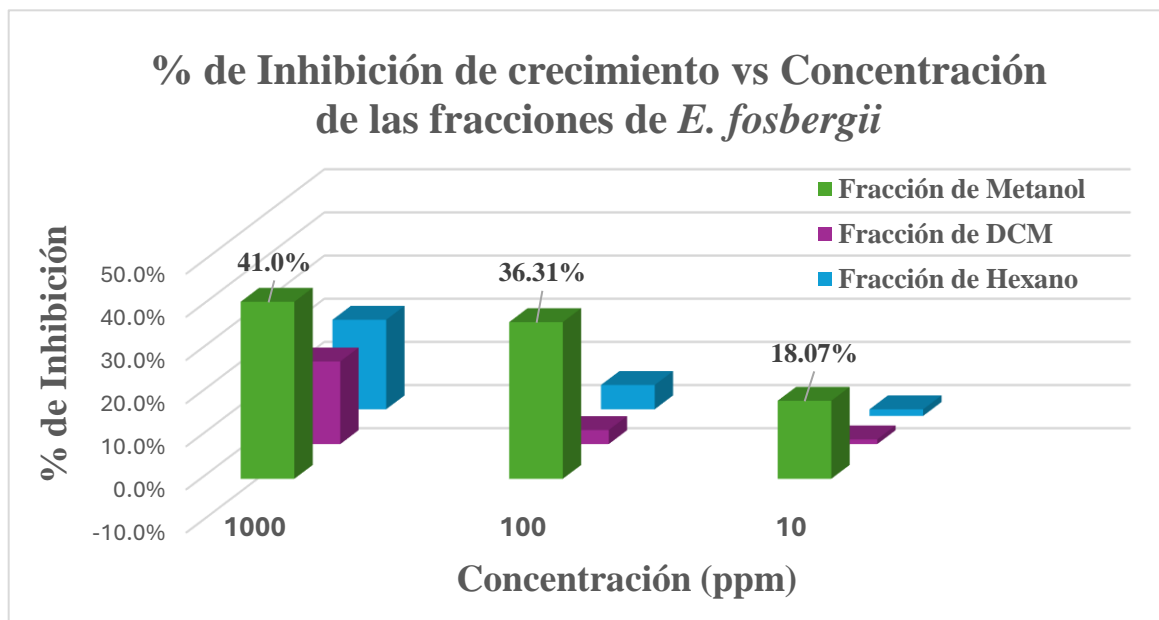
Tabla 17. *Porcentaje de inhibición del crecimiento en semillas de rábano tratadas con fracciones de metanol, hexano y diclorometano a diferentes concentraciones*

| Fracción de Metanol | | |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Concentración (ppm) | Promedio de crecimiento | % de Inhibición |
| 1000 | 3.63 ±0.055 | 41.0 ±0.622 |
| 100 | 3.92 ±0.150 | 36.3 ±1.39 |
| 10 | 5.04 ±0.250 | 18.1 ± 0.90 |
| Fracción de Diclorometano | | |
| Concentración (ppm) | Promedio de crecimiento | % de Inhibición |
| 1000 | 4.97 ±0.093 | 19.1 ±0.358 |
| 100 | 5.95 ±0.41 | 3.25 ±0.224 |
| 10 | 6.08 ±0.37 | 1.08 ± 0.066 |
| Fracción de Hexano | | |
| Concentración (ppm) | Promedio de crecimiento | % de Inhibición |
| 1000 | 4.87 ±0.13 | 20.8 ±0.554 |
| 100 | 5.80 ±0.25 | 5.64 ±0.243 |
| 10 | 6.24 ±0.12 | -1.52 ± 0.03 |

Tabla 18. *Porcentaje de inhibición del crecimiento en semillas de tomate tratadas con fracciones de metanol, hexano y diclorometano a diferentes concentraciones*

| Fracción de Diclorometano | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Concentración (ppm) | Promedio de crecimiento (cm) | % de Inhibición |
| 1000 | 2.59 ±0.075 | 59.8 ±1.73 |
| 100 | 4.91 ±0.14 | 23.93 ±0.683 |
| 10 | 6.30 ±0.09 | 2.38 ±0.034 |
| Fracción de Metanol | | |
| Concentración (ppm) | Promedio de crecimiento (cm) | % de Inhibición |
| 1000 | 4.30 ±0.076 | 33.4 ±0.590 |
| 100 | 5.50 ±0.140 | 14.8 ±0.380 |
| 10 | 5.77 ±0.070 | 10.5 ± 0.127 |
| Fracción de Hexano | | |
| Concentración (ppm) | Promedio de crecimiento (cm) | % de Inhibición |
| 1000 | 5.35 ±0.170 | 17.0 ±0.540 |
| 100 | 5.70 ±0.190 | 11.6 ±0.386 |
| 10 | 6.07 ±0.44 | 5.84 ± 0.423 |

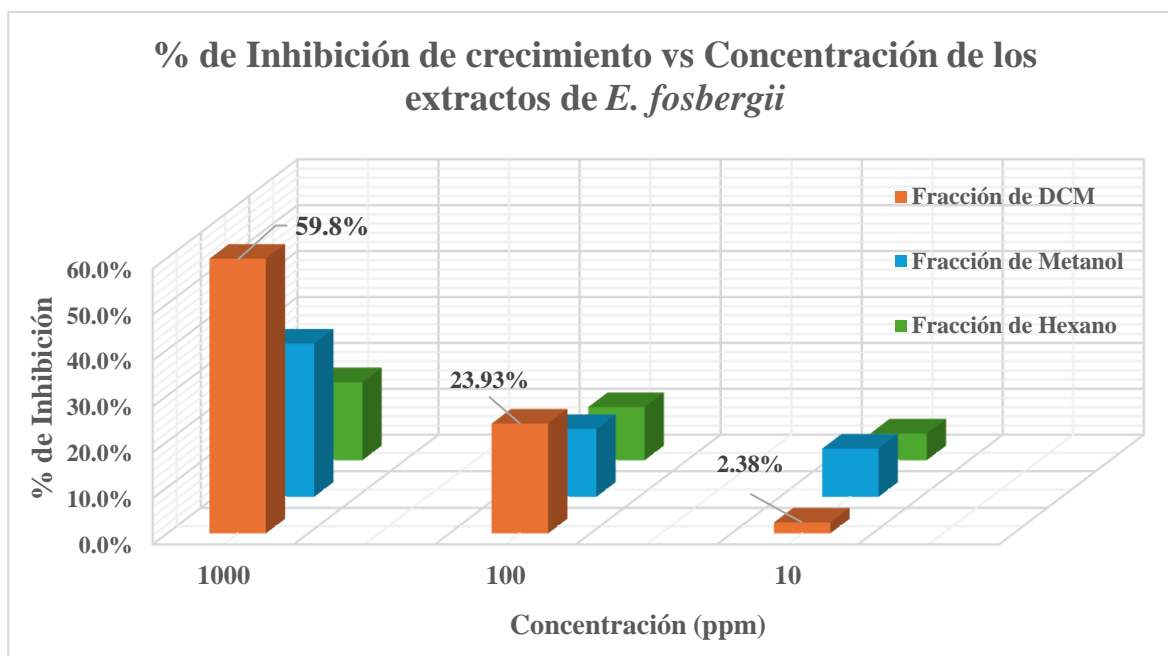
Gráfico 1. Actividad Fitotóxica de las fracciones de *E. fosbergii* sobre las semillas de *R. sativus*



En el Gráfico 1 se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de semillas de *R. sativus* (rábano) tratadas con fracciones orgánicas de *E. fosbergii* (extractos de metanol, diclorometano y hexano) a concentraciones de 1000 ppm, 100 ppm y 10 ppm. Los resultados destacan diferencias significativas en la actividad fitotóxica dependiendo del extracto y la concentración utilizada. La fracción de metanol presentó la mayor actividad fitotóxica, con un 41.0% de inhibición a una concentración de 1000 ppm.

En el Gráfico 2 se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de semillas de *S. lycopersicum* (tomate) tratadas con fracciones orgánicas de *E. fosbergii* (extractos de metanol, diclorometano y hexano) a concentraciones de 1000 ppm, 100 ppm y 10 ppm. La fracción de diclorometano presentó la mayor actividad a 1000 ppm (59.8%), superando a los extractos de metanol (33.4%) y hexano (17%). A 100 ppm, la inhibición del extracto de diclorometano disminuyó a 23.93%, mientras que los de metanol y hexano presentaron valores cercanos al 15%. A 10 ppm, se observó una actividad residual muy baja en todos los extractos.

Gráfico 2. Actividad Fitotóxica de las fracciones de *E. fosbergii* sobre las semillas de *S. lycopersicum*



La actividad fitotóxica de los extractos está directamente relacionada con la concentración aplicada, observándose una tendencia decreciente en la inhibición conforme se reduce la concentración. Esto sugiere que los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de *E. fosbergii* tienen un efecto dosis-dependiente sobre el crecimiento de las semillas de *R. sativus* y *S. lycopersicum*.

El extracto de diclorometano destacó como el más activo en la semilla de tomate, lo que sugiere que contiene metabolitos de polaridad intermedia con alta capacidad fitotóxica. En extracto de metanol, mostró mayor eficacia con las semillas de rábano, posiblemente debido a la concentración de compuestos polares como fenoles o flavonoides. En general, las fracciones de *E. fosbergii* mostraron una mayor actividad en semillas de *R. sativus* en comparación con *S. lycopersicum*. Esto podría deberse a diferencias en la sensibilidad de las especies a los compuestos bioactivos presentes en los extractos.

Adicionalmente, considerando la siguiente escala de fitotoxicidad (Chérigo, (Cherigo, Lezcano, & Martínez-Luis, Diversity and Allelopathic Potential of Weeds among Panamanian Coffee Crops, 2017), & Martínez-Luis, 2017):

| CI ₅₀ (ppm) | Descripción |
|------------------------|--------------------------|
| <100 | Muy fitotóxico |
| 100-500 | Fitotóxico |
| 500-1000 | Moderadamente fitotóxico |
| >1000 | No fitotóxico |

Como la concentración máxima utilizada en el bioensayo fue de 1000 ppm, y solamente la fracción de diclorometano alcanzó a inhibir el 50% de la población (CI₅₀), solo dicha fracción presento una actividad moderadamente fitotóxica sobre las semillas de *S. lycopersicum*.

4.7. BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD

El bioensayo de citotoxicidad realizado con *A. salina* permitió evaluar la toxicidad de las fracciones obtenidas de *E. fosbergii* (hexano, diclorometano y metanol). Para este ensayo, se utilizó el método de Reed-Muench (1938) para calcular la DL₅₀, basado en el supuesto de que cada nauplio que sobrevive a una dosis también lo haría a concentraciones más bajas, mientras que los nauplios que mueren a una dosis perecerían a concentraciones más altas.

Las Artemias fueron contadas manualmente utilizando un estereomicroscopio, registrando el número de vivos y muertos en cada concentración (Figura 46). Los resultados de porcentaje de mortalidad se pueden observar en la Tabla 20, donde la fracción de diclorometano presentó la mayor citotoxicidad (93.3% de mortalidad a 1000 ppm), mientras que la fracción de metanol mostró la menor toxicidad (60% de mortalidad a 1000 ppm). La fracción de hexano mostró una toxicidad intermedia con 76.9% de mortalidad a la mayor concentración.

Tabla 19. Resultados del bioensayo de citotoxicidad de las fracciones de *E. fosbergii*

| HEXANO | | | | | | |
|---------------|-------|---------|-------|-------------|-----------|--------------|
| Dosis (ppm) | Total | Muertas | Vivas | Muertas ac. | Vivas ac. | Mortalidad % |
| 1000 | 10 | 7 | 3 | 10 | 3 | 76.9 |
| 100 | 10 | 2 | 8 | 3 | 11 | 21.4 |
| 10 | 10 | 1 | 9 | 1 | 20 | 4.8 |
| DICLOROMETANO | | | | | | |
| Dosis (ppm) | Total | Muertas | Vivas | Muertas ac. | Vivas ac. | Mortalidad % |
| 1000 | 10 | 9 | 1 | 14 | 1 | 93.3 |
| 100 | 10 | 3 | 7 | 5 | 8 | 38.5 |
| 10 | 10 | 2 | 8 | 2 | 16 | 11.1 |
| METANOL | | | | | | |
| Dosis (ppm) | Total | Muertas | Vivas | Muertas ac. | Vivas ac. | Mortalidad % |
| 1000 | 10 | 4 | 6 | 9 | 6 | 60 |
| 100 | 10 | 3 | 7 | 5 | 13 | 27.8 |
| 10 | 10 | 2 | 8 | 2 | 21 | 8.70 |

Figura 46. Visualización de las artemias en el estereomicroscopio

Los resultados se graficaron, colocando el número acumulado de nauplios vivos y muertos en el eje y y el logaritmo de la concentración en el eje x . El punto de intersección entre las curvas de vivos y muertos acumulados permitió estimar el valor de la DL_{50} (en log concentración), que posteriormente se transformó a ppm aplicando la función antilogaritmo.

A partir de los análisis, se determinó que la **fracción de hexano** tuvo una mortalidad del 76.9% a 1000 ppm y una DL_{50} de **354.8 ppm** (intersección en log concentración 2.55) (Gráfico 3), mientras que la **fracción de diclorometano** presentó la mayor toxicidad, con una DL_{50} de **158.5 ppm** y el mayor porcentaje de mortalidad (93.3% a 1000 ppm) (intersección en log concentración 2.2) (Gráfico 4). Por otro lado, la fracción de metanol mostró la menor toxicidad, una mortalidad de 60% a 1000 ppm y una DL_{50} de 501.2 ppm (intersección en log concentración 2.7) (Gráfico 5).

Gráfico 3. Estimación del LD_{50} del extracto de hexano

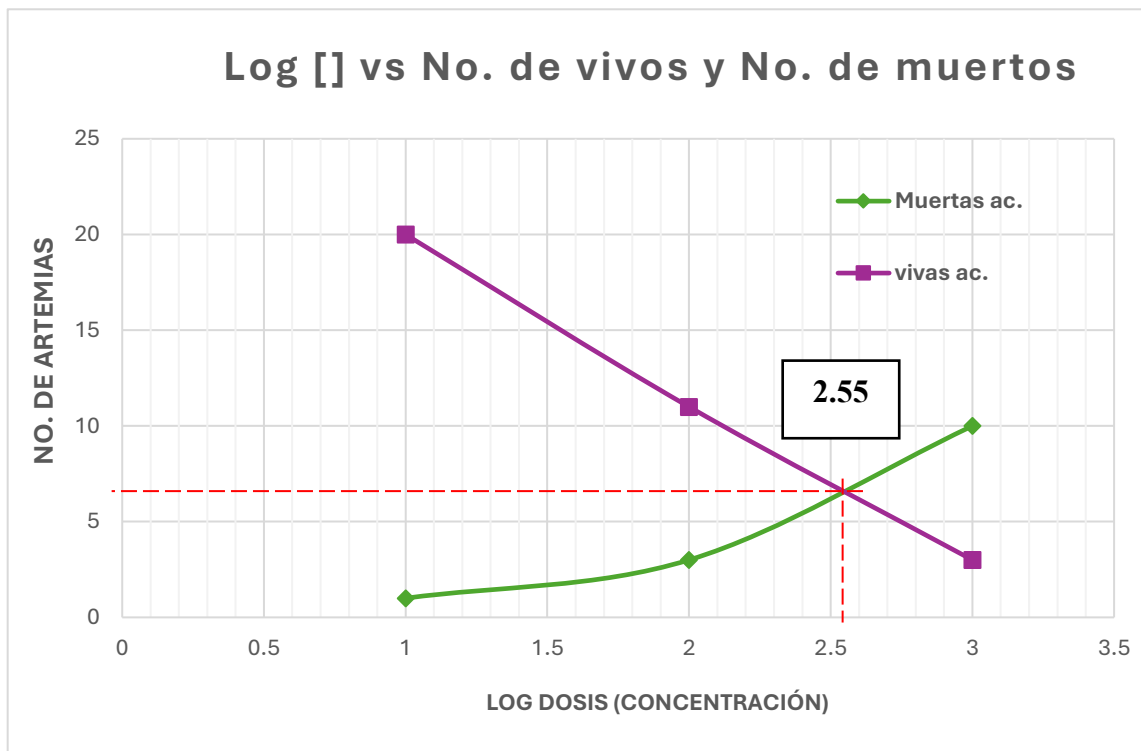
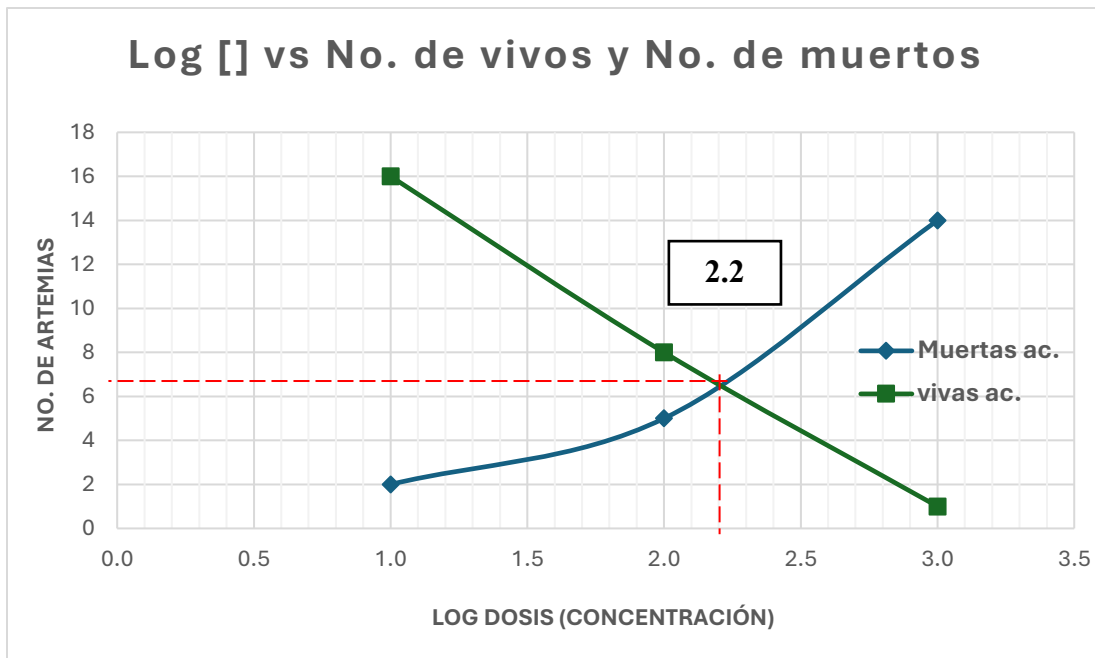
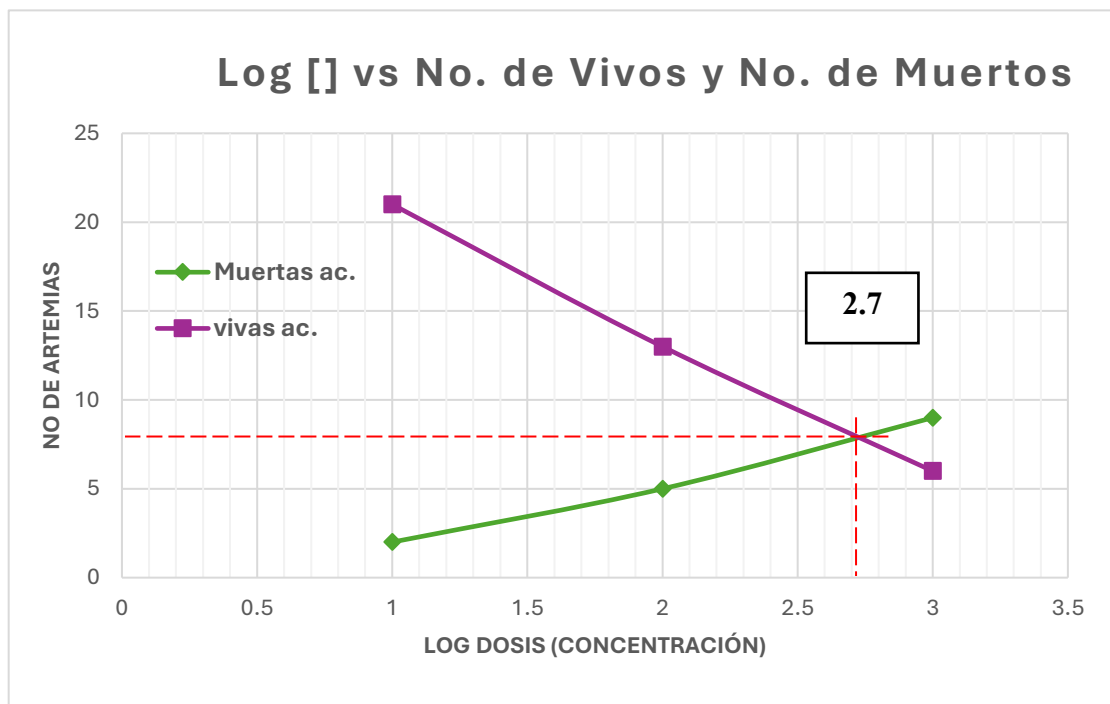


Gráfico 4. Estimación del LD_{50} del extracto de diclorometano**Gráfico 5.** Estimación del LD_{50} del extracto de metanol

La mayor toxicidad observada en la fracción de diclorometano puede estar asociada a la presencia de metabolitos bioactivos con alta citotoxicidad. En comparación, la fracción de hexano presentó una toxicidad moderada, lo que podría estar relacionado con la presencia de compuestos apolares específicos como hidrocarburos y terpenos., mientras que la fracción de metanol, con predominancia de compuestos fenólicos y flavonoides, exhibió una baja citotoxicidad consistente con su actividad antioxidante reportada.

4.8. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

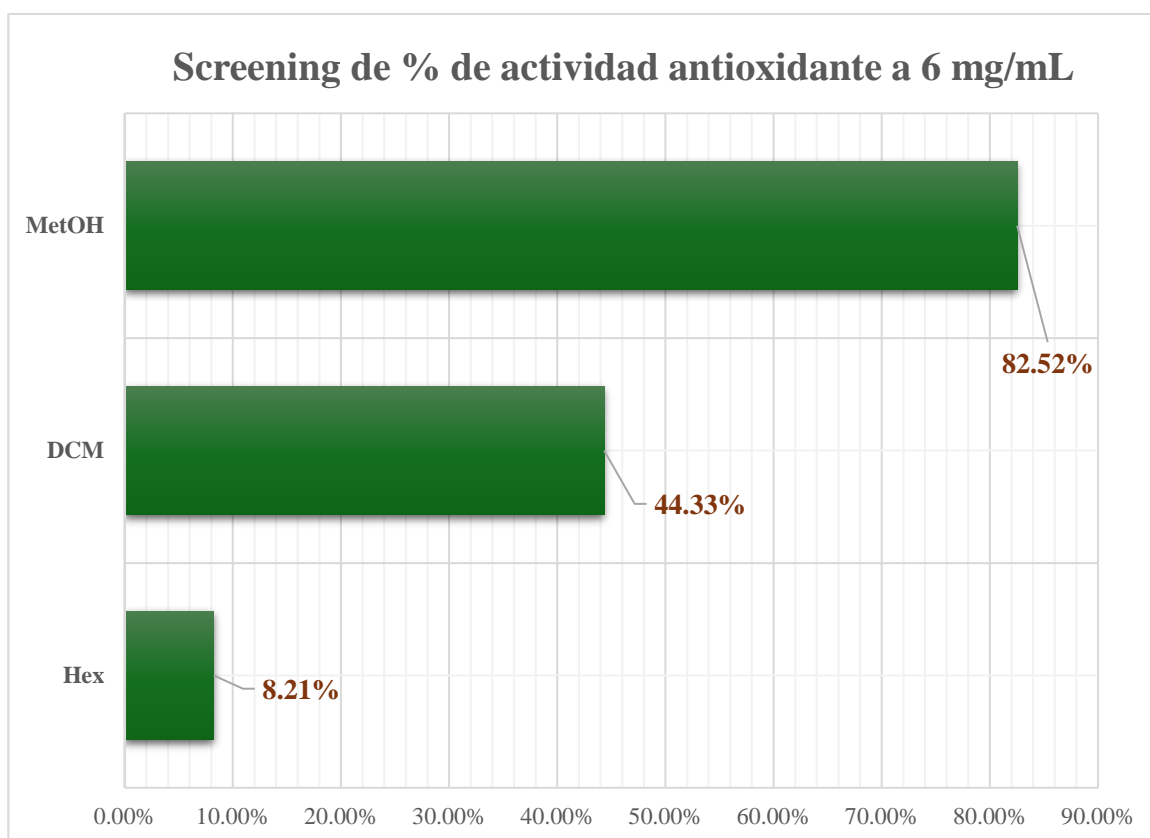
El análisis de la actividad antioxidante mediante el método DPPH es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la capacidad de los compuestos presentes en extractos naturales para donar electrones o átomos de hidrógeno, neutralizando así radicales libres y retrasando procesos de oxidación. Se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol obtenidos de *E. fosbergii*, mostrando diferencias claras en su capacidad de inhibir el radical DPPH, dependiendo de la polaridad de los disolventes utilizados. Además de realizar un análisis comparativo de la CI_{50} con el ácido ascórbico como estándar.

El análisis preliminar inicial realizado a una concentración fija de 6 mg/mL reveló que la fracción metanólica exhibió el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH (82.52%), seguido por la fracción de diclorometano (44.33%) y la fracción hexánica, que mostró un porcentaje significativamente menor (8.21%) (ver Gráfico 6). Este comportamiento sugiere que los compuestos antioxidantes presentes en *E. fosbergii* están más asociados con disolventes polares como el metanol.

Esto es consistente con la naturaleza química de muchos metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos y flavonoides, que son conocidos por su capacidad antioxidante y su mayor solubilidad en disolventes polares. Por el contrario, la baja actividad antioxidante observada en la fracción hexánica indica que este disolvente no es eficiente para extraer compuestos con alta reactividad frente al radical DPPH, posiblemente debido a que este tipo

de fracción está compuesta predominantemente por metabolitos no polares como lípidos o terpenos con menor actividad antioxidante.

Gráfico 6. Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol a 6 mg/mL.



Para un análisis cuantitativo más detallado, se generaron curvas de actividad antioxidante versus concentración, obteniéndose modelos lineales para las fracciones de diclorometano y metanol. El modelo para la fracción de diclorometano fue $y = 6.337x + 5.1183$ ($R^2 = 0.988$) (ver Gráfico 7), mientras que para la fracción de metanol fue $y = 14.775x + 2.8142$ ($R^2 = 0.9992$) (ver Gráfico 8). Estas ecuaciones permitieron calcular los valores de CI_{50} de cada fracción, los cuales corresponden a la concentración necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH.

Gráfico 7. Curva del porcentaje de actividad antioxidante de la fracción de diclorometano en función de la concentración

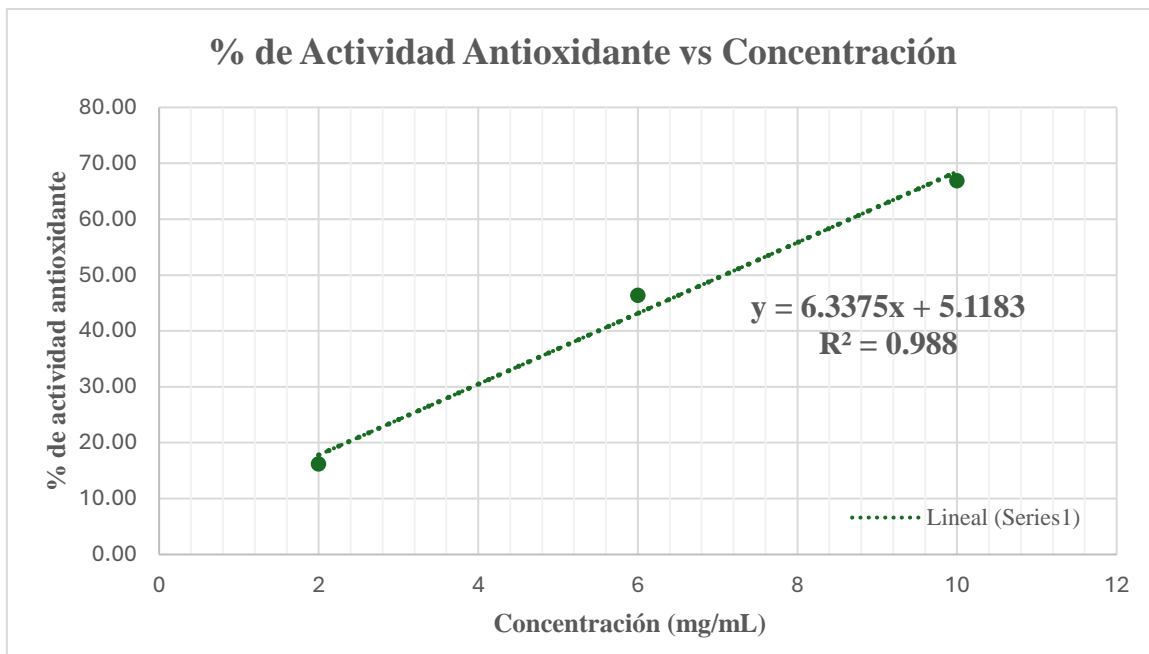
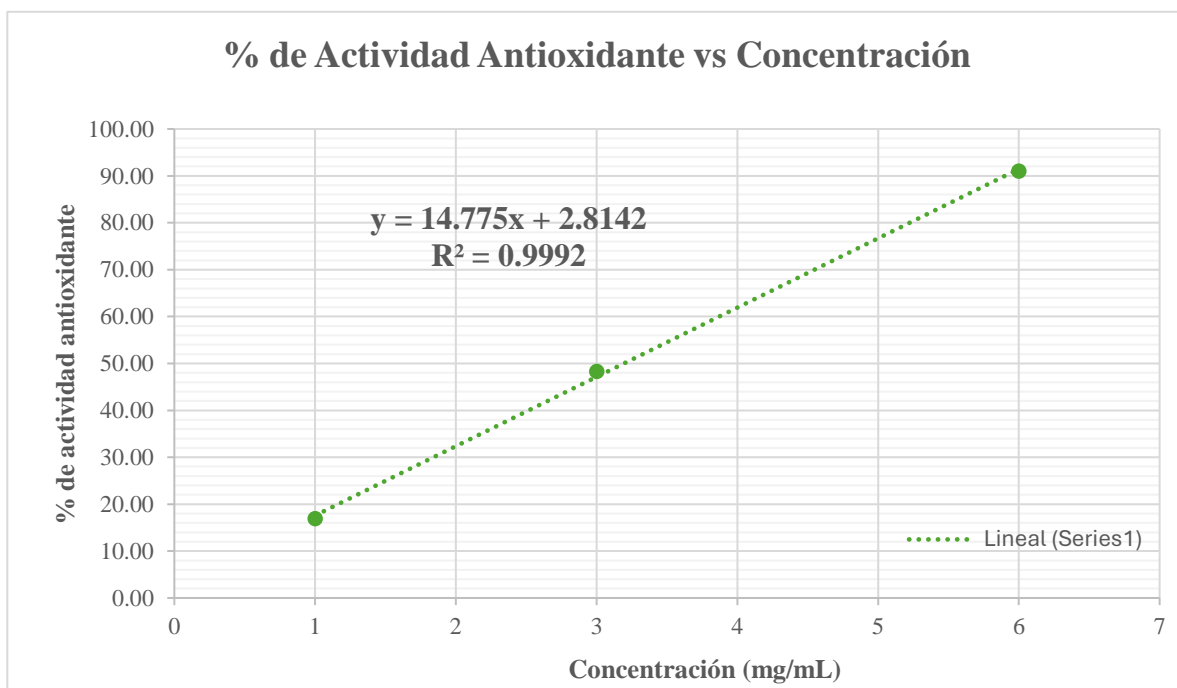
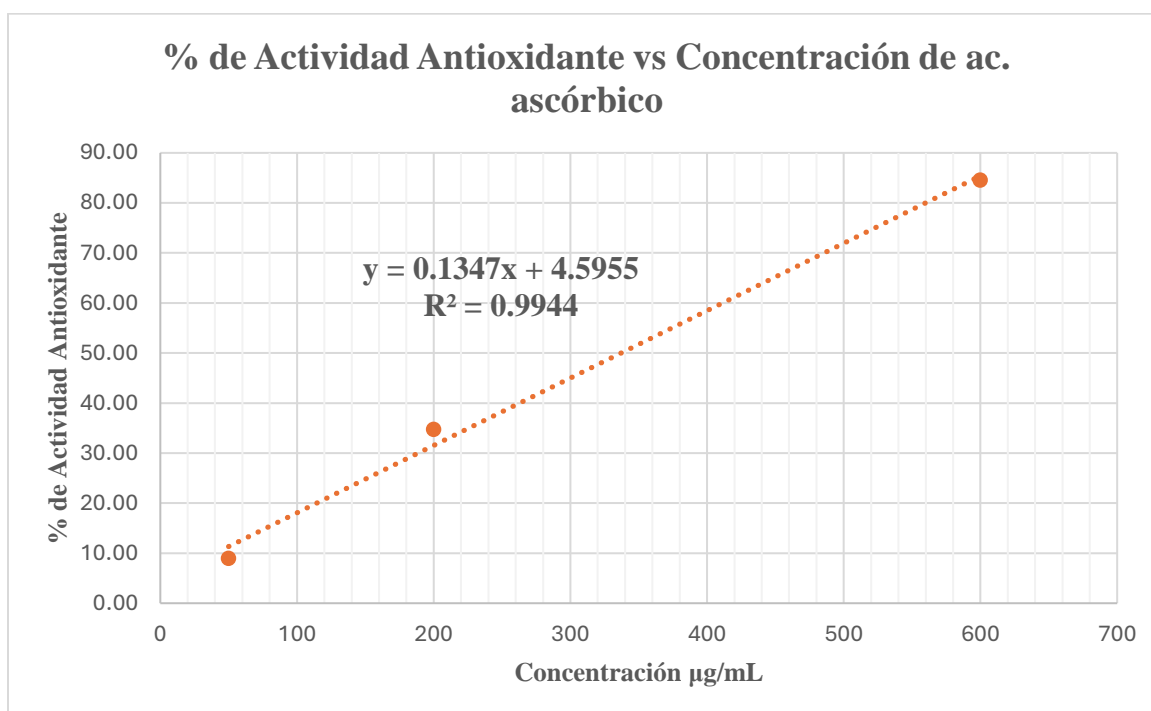


Gráfico 8. Curva de porcentaje de actividad antioxidante la fracción de metanol en función de la concentración



La fracción metanólica presentó una CI_{50} de 3.19 mg/mL, mientras que la fracción diclorometánica mostró un CI_{50} mayor de 7.08 mg/mL, reflejando una menor capacidad antioxidante en comparación con el metanol. Cuando se comparan estos resultados con el estándar de ácido ascórbico, cuya CI_{50} fue de 0.337 mg/mL (Gráfico 9), es evidente que, aunque la fracción metanólica presenta una aparente actividad prometedora, su potencia es considerablemente menor que la del estándar. Este resultado es esperado, dado que el ácido ascórbico es un antioxidante puro y altamente eficiente, mientras que las fracciones evaluadas son mezclas complejas de compuestos, donde la proporción de metabolitos activos puede estar diluida.

Gráfico 9. Curva de porcentaje de actividad antioxidante del ácido ascórbico en función de la concentración



El modelo de regresión lineal aplicado para el cálculo de la CI_{50} mostró una fuerte correlación en ambos casos, con valores de $R^2 = 0.9992$ para la fracción metanólica y $R^2 = 0.988$ para la fracción de diclorometano. Estos altos valores de R^2 indican una confiabilidad significativa en los datos obtenidos. Sin embargo, existen posibles fuentes de error que podrían haber influido en los resultados. Por ejemplo, la estabilidad del radical DPPH puede

ser afectada por factores externos como la luz, la temperatura o el tiempo de almacenamiento, lo que podría alterar la reactividad de este compuesto durante el ensayo. Además, la solubilidad y homogeneidad de las soluciones preparadas de las fracciones pueden variar, especialmente en concentraciones altas, afectando la interacción entre los compuestos antioxidantes y el radical. Otro aspecto por considerar es la presencia de compuestos que, aunque pueden reaccionar con el DPPH, lo hacen de forma más lenta o con menor eficiencia, lo cual puede subestimar la actividad antioxidante total del extracto.

Figura 47. Resultados de la fracción de metanol frente al DPPH

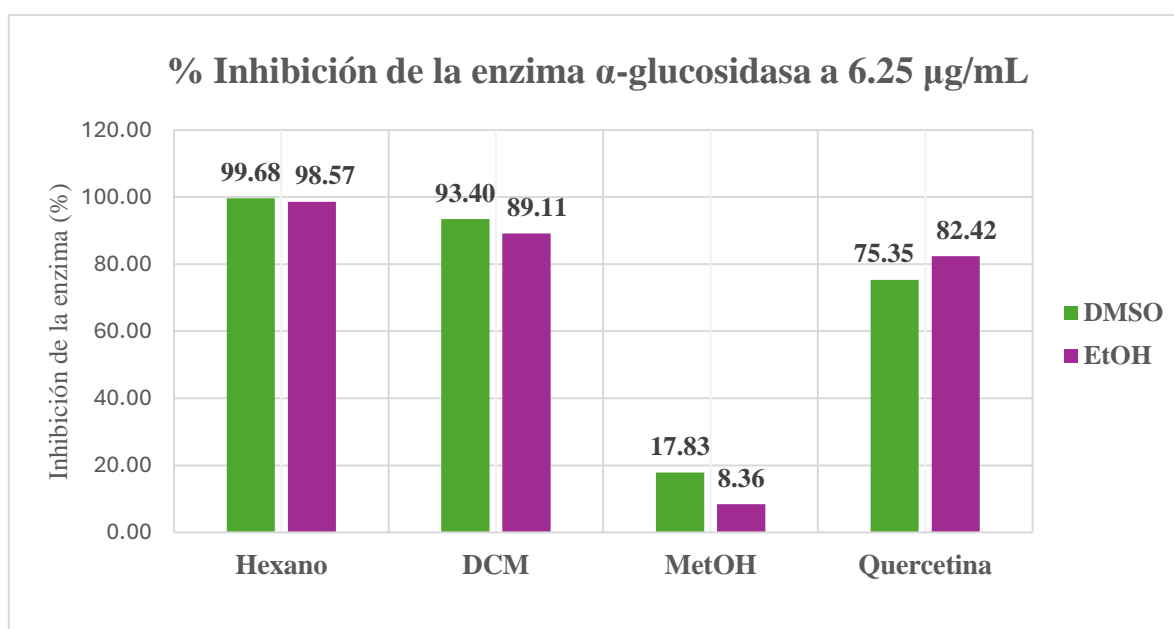


El método DPPH, aunque rápido y conveniente, presenta limitaciones inherentes, ya que evalúa la capacidad antioxidante *in vitro* de forma simplificada y no necesariamente refleja el comportamiento en sistemas biológicos más complejos. Por ello, sería relevante complementar este análisis con otros métodos, como la reducción de hierro (FRAP) o la capacidad de inhibición de lípidos peroxidables, para obtener un panorama más amplio de las propiedades antioxidantes de los extractos.

4.9. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA α -GLUCOSIDASA

En el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa, se realizó un análisis inicial utilizando una concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ en el pocillo de cada una de las fracciones obtenidas de *E. fosbergii*. Según un estudio de Chérigo *et al.*, la solubilidad de los compuestos puede influir significativamente en los resultados de este ensayo, por lo que se emplearon los disolventes DMSO y EtOH para asegurar la solubilidad de los compuestos (Cherigo, Liao-Luo, Fernández, & Martínez-Luis, 2024). En DMSO, la fracción hexánica presentó una inhibición del 99.68%, seguida por la fracción de diclorometano con 93.40% y la de metanol con un 17.83%. En EtOH, se observó una inhibición del 98.57% para la fracción hexánica, 89.11% para la fracción de diclorometano y 8.36% para la de metanol. En contraste, el control positivo de quercetina mostró un 75.35% de inhibición en DMSO y un 82.42% en EtOH, lo que indica que las fracciones hexánica y de diclorometano poseen una mayor actividad inhibitoria bajo las condiciones evaluadas (Gráfico 10). Estos resultados sugieren que las fracciones de hexano y diclorometano contienen compuestos más efectivos para inhibir la α -glucosidasa en comparación con la fracción de metanol.

Gráfico 10. Porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de las fracciones de hexano, diclorometano, metanol y control de quercetina a 6.25 $\mu\text{g/mL}$



Para obtener la CI_{50} se construyó una curva graficando el logaritmo de la concentración versus el porcentaje de inhibición para la fracción hexánica en ambos disolventes, utilizando concentraciones de 12.0, 1.20 y 0.012 ppm (Gráfico11). Esta misma gráfica se construyó para la fracción en DMSO y las inhibiciones obtenidas fueron 92.15%, 39.22% y 1.03%, respectivamente, mientras que para el caso de la fracción en EtOH se alcanzaron valores de 99.06%, 60.57% y 5.66%, respectivamente.

Las ecuaciones de las curvas de ajuste lineal fueron $y = 45.559x + 40.525$ ($R^2 = 0.9914$) para DMSO y $y = 46.698x + 51.397$ ($R^2 = 0.9898$) para EtOH. A partir de estas ecuaciones, se calculó el CI_{50} de la fracción hexánica en ambos disolventes, resultando en 1.615 ppm para DMSO y 0.933 ppm para EtOH, lo que evidencia una alta correlación entre las concentraciones logarítmicas y el porcentaje de inhibición en ambos disolventes.

Gráfico 11. Curva de porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa en función al logaritmo de la concentración en DMSO

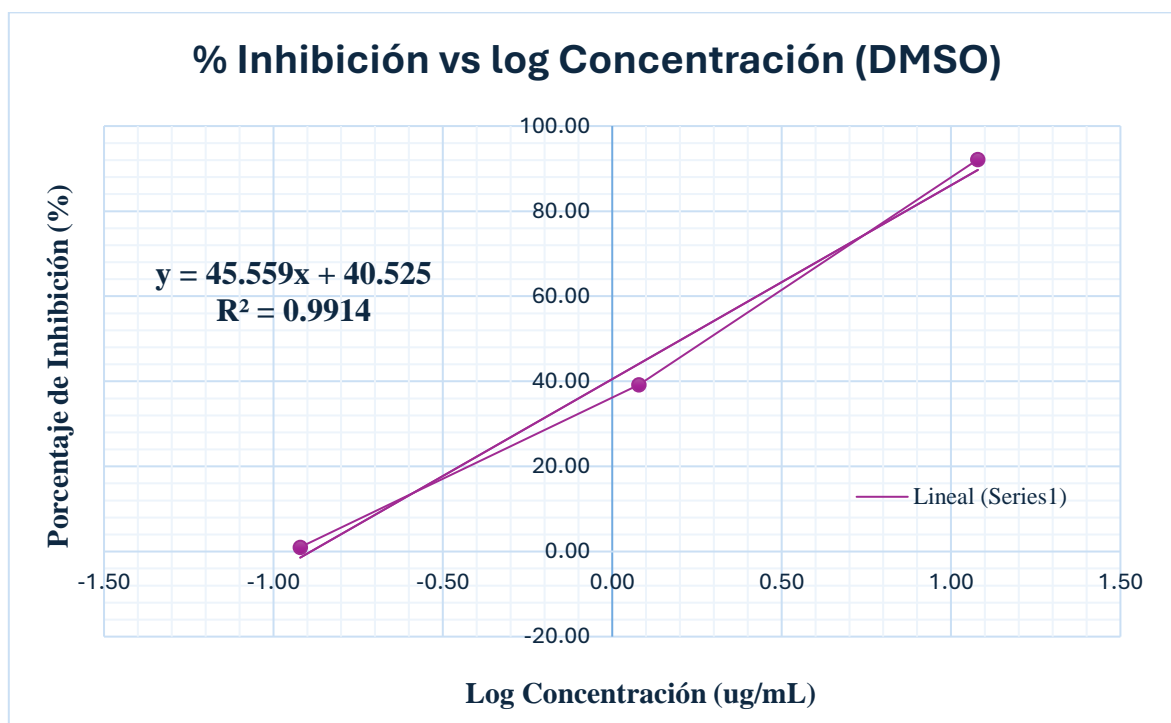
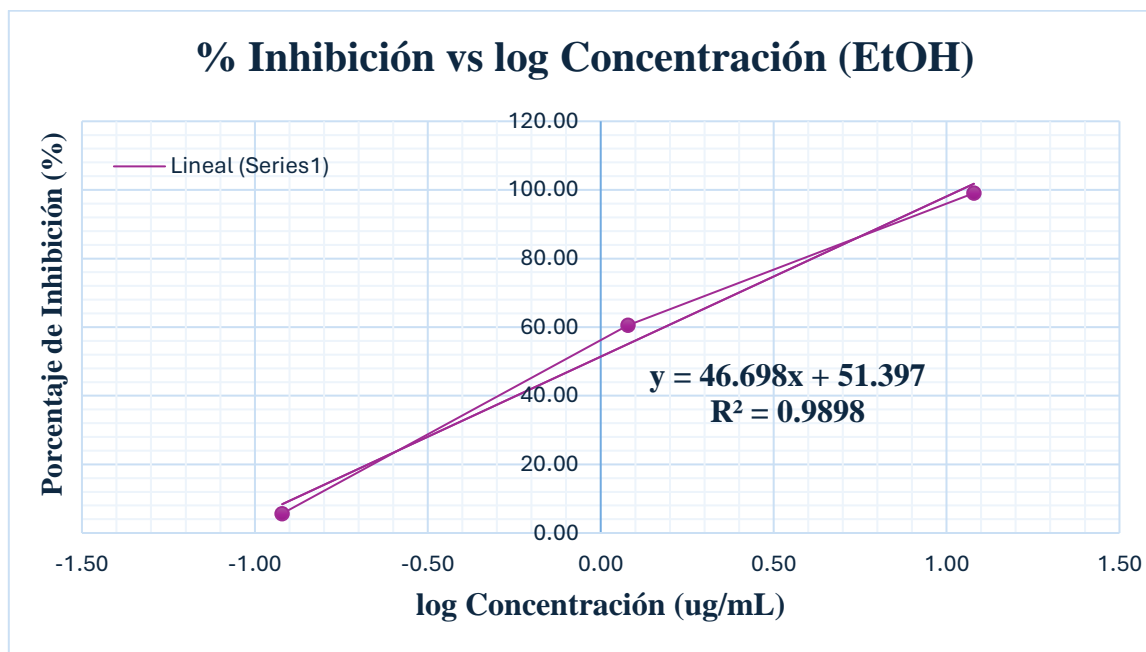


Gráfico 12. Curva de porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa en función al logaritmo de la concentración en etanol

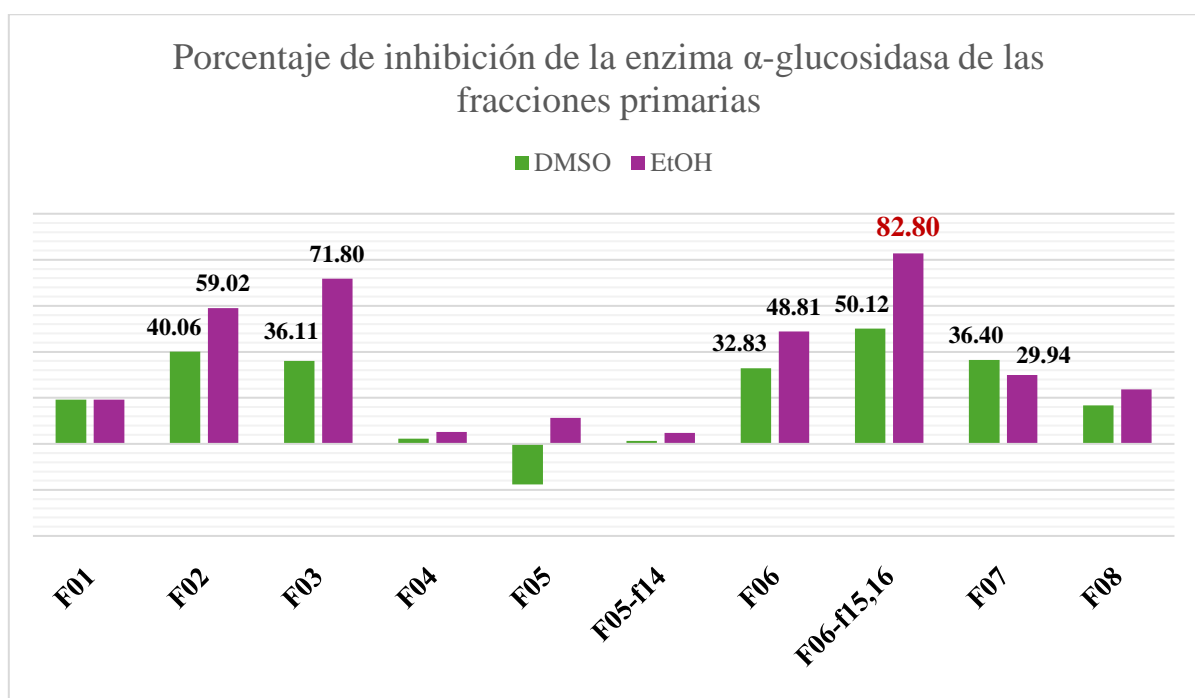


El valor obtenido de la CI_{50} para cada fracción analizada, mostró diferencias entre los disolventes utilizados para su solubilización. Estos resultados corroboran la importancia de seleccionar el disolvente adecuado para ensayos bioquímicos, ya que este puede influir tanto en la disponibilidad como en la interacción de los compuestos activos con la enzima. Al comparar estos resultados con los valores documentados para la quercetina (CI_{50} generalmente entre 3.32 ppm) y la acarbosa (CI_{50} generalmente entre 32.28 ppm) (Şöhretoğlu & Sari, 2020), se observa que la fracción hexánica tiene un desempeño comparable o incluso superior, especialmente en etanol. Además, los altos valores de R^2 obtenidos en las ecuaciones de regresión sugieren que las curvas de calibración son confiables y precisas.

Los datos obtenidos demuestran que la fracción de hexano y diclorometano contienen compuestos con una alta capacidad inhibitoria hacia la función de la α -glucosidasa, esto confirma el potencial de estas fracciones como una fuente de compuestos bioactivos con potencial inhibitorio de la enzima α -glucosidasa, lo que podría tener aplicaciones en el desarrollo de agentes terapéuticos para el control de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2.

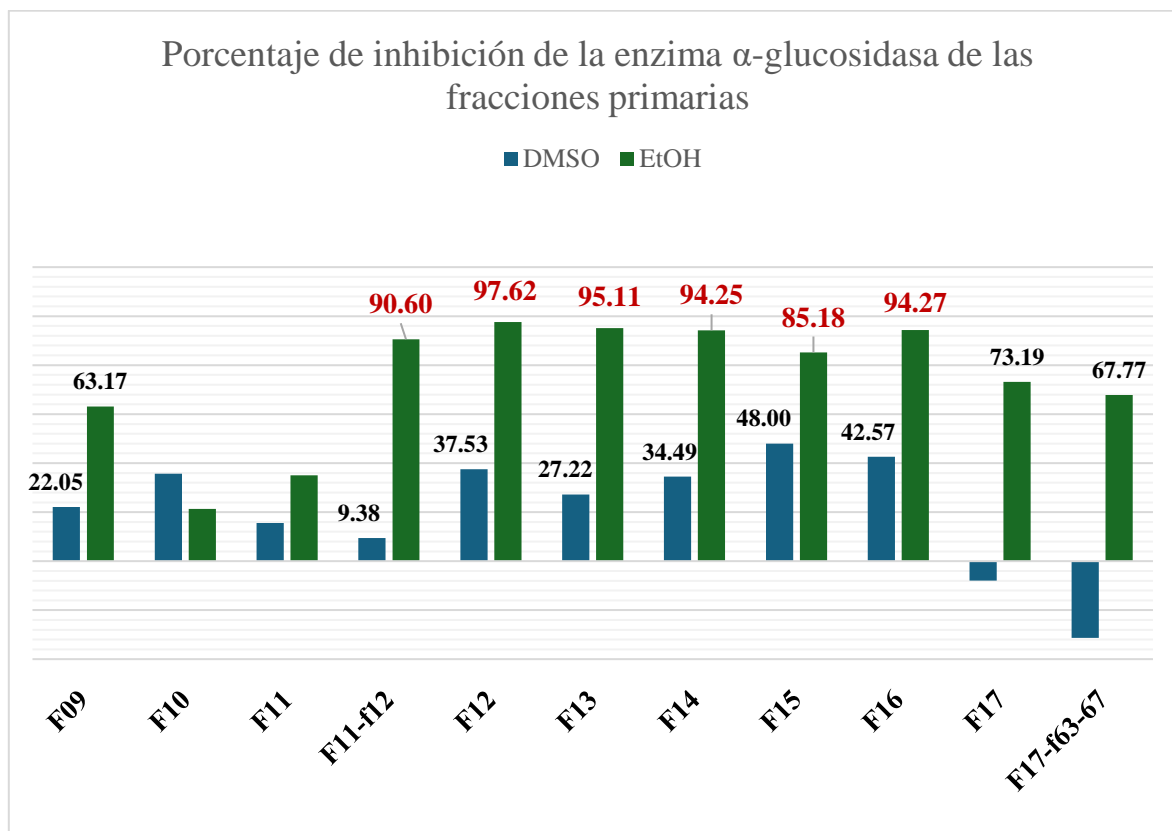
También se evaluaron las 21 fracciones obtenidas del fraccionamiento realizado a la fracción de hexano a una concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados en el disolvente de etanol mostraron que siete de estas fracciones destacaron por su alta actividad enzimática, superando el 82% de inhibición, lo cual resalta su potencial como inhibidores efectivos de la enzima α -glucosidasa. Entre estas fracciones, la fracción **EF-A-F06-f15,16** presentó una inhibición del **82.80%**, siendo el valor más bajo dentro de este grupo de fracciones activas, aunque todavía significativo (Gráfico 13).

Gráfico 13. Porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de las fracciones primarias de la EF-A-F01 a EF-A-F08 a una concentración 6.25 $\mu\text{g/mL}$



Por otro lado, la fracción **EF-A-F11-f22** mostró una inhibición del **90.60%**, evidenciando una actividad notable. Las fracciones **EF-A-F12 (97.62%)**, **EF-A-F13 (95.11%)**, **EF-A-F14 (94.25%)** y **EF-A-F16 (94.27%)** destacaron con inhibiciones superiores al 94%, consolidándose como las más potentes. Finalmente, la fracción **EF-A-F15** presentó un **85.18% de inhibición**, lo que también la posiciona como una de las fracciones con actividad destacada (Gráfico 14).

Gráfico 14. Porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de las fracciones primarias de la EF-A-F09 a EF-A-F17-63-67 a una concentración 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Estos resultados sugieren que las fracciones mencionadas contienen compuestos bioactivos con alta afinidad hacia el sitio activo de la enzima α -glucosidasa, actuando como potentes inhibidores. La variabilidad en los porcentajes de inhibición entre las fracciones podría estar relacionada con diferencias en la composición química, polaridad o pureza de los compuestos presentes en cada fracción. Particularmente, la fracción **EF-A-F12**, que mostró un porcentaje de inhibición del **97.62%**, se posiciona como la más prometedora para estudios futuros. En esta fracción se identificaron terpenos como (-)-espatulenol, óxido de β -cariofileno e isospatulenol, además de esteroides como campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol. Asimismo, se detectaron ácidos grasos esenciales, incluidos el ácido linoleico, el ácido palmítico y sus ésteres metílicos. En trabajos futuros, sería relevante explorar el aislamiento de los compuestos activos presentes en estas fracciones entender mejor sus mecanismos de acción.

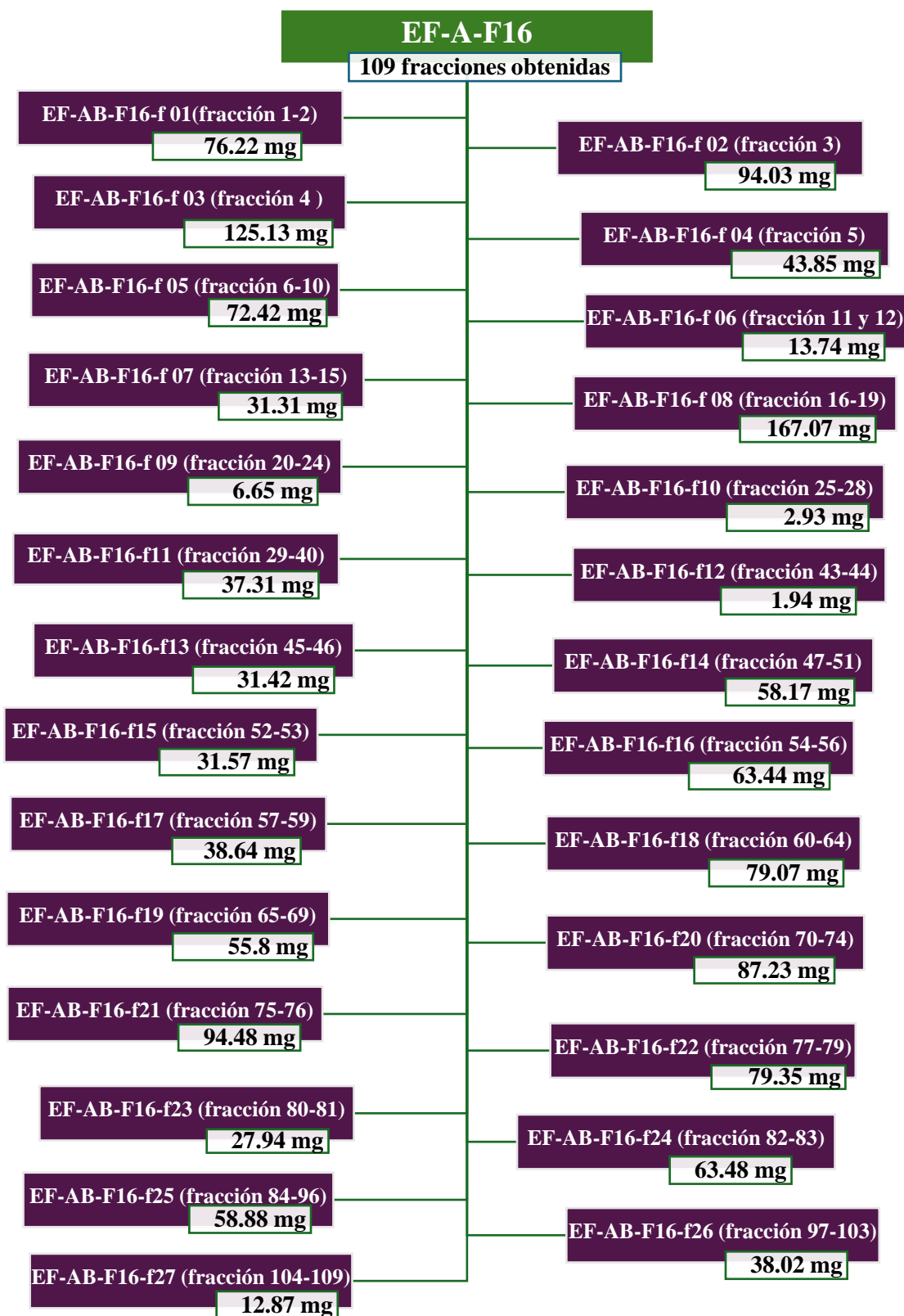
4.10. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO Y ENSAYOS

Se procedió a realizar un fraccionamiento secundario a la fracción **EF-A-F16** con base en su alta actividad en el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa. También esta fracción tenía una masa considerable para intentar aislar compuestos bioactivos mayoritarios. A partir del fraccionamiento realizado se obtuvieron 109 fracciones iniciales, las cuales se agruparon en 27 fracciones finales basadas en su similitud identificada mediante TLC.

Para las fracciones obtenidas se utilizó la codificación **EF-AB-F16-f##**: "EF" identifica las iniciales de *E. fosbergii*, "A" corresponde al primer extracto (hexano), "B" al fraccionamiento secundario, y "F16" indica la fracción primaria seleccionada. Los números asignados (##) corresponden a cada una de las fracciones obtenidas durante el fraccionamiento realizado.

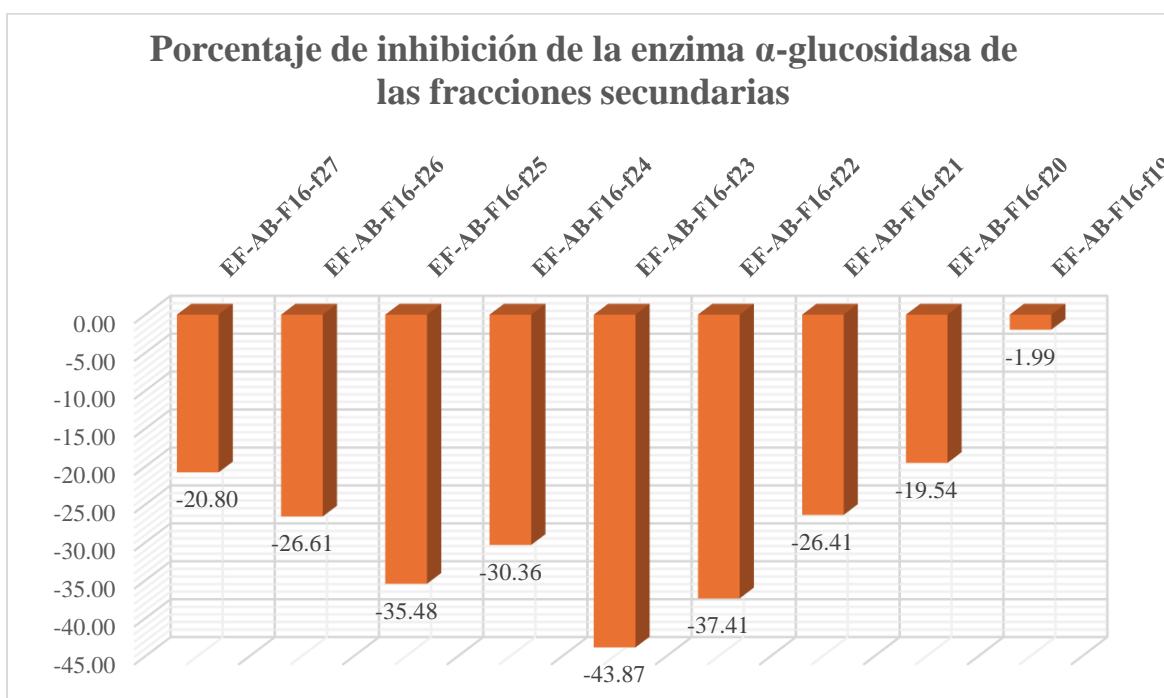
Tabla 20. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Secundario del EF-A-F16

| Proporción del Eluyente | Proporción | Fracción |
|-------------------------|------------|--------------------|
| Diclorometano:Hexano | 80:20 | EF-AB-f 1 al 6 |
| Diclorometano:Hexano | 85:15 | EF-AB-f 7 al 9 |
| Diclorometano:Hexano | 90:10 | EF-AB-f 10 al 20 |
| Diclorometano:Hexano | 95:5 | EF-AB-f 21 al 28 |
| Diclorometano | 100 | EF-AB-f 29 al 40 |
| Diclorometano:Metanol | 99:1 | EF-AB-f 41 al 49 |
| Diclorometano:Metanol | 98:2 | EF-AB-f 50 al 59 |
| Diclorometano:Metanol | 97:3 | EF-AB-f 60 al 76 |
| Diclorometano:Metanol | 95:5 | EF-AB-f 77 al 96 |
| Diclorometano:Metanol | 90:10 | EF-AB-f 97 al 103 |
| Metanol | 100 | EF-AB-f 104 al 109 |

Figura 48. Esquema del Fraccionamiento Secundario de la EF-A-F16

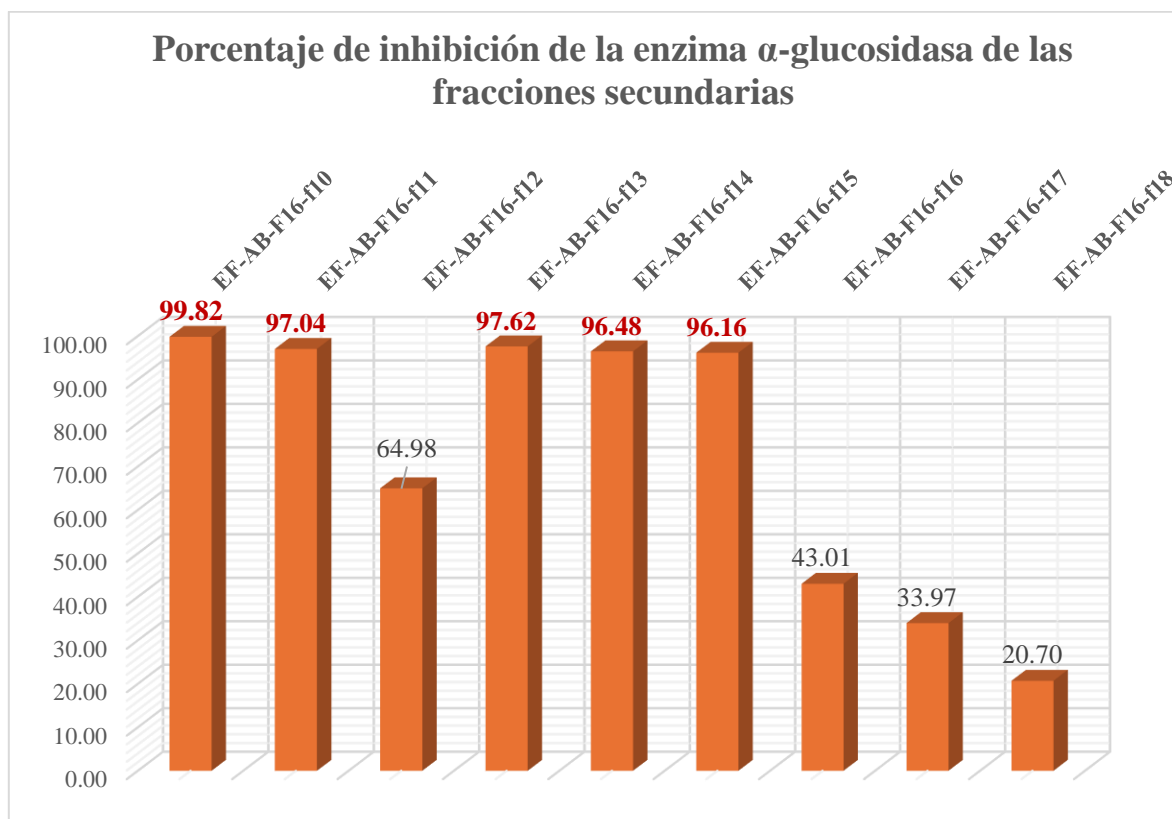
El ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa realizado a las fracciones secundarias obtenidas reveló un comportamiento diverso en cuanto a su actividad biológica. De las 27 fracciones analizadas, 13 mostraron un porcentaje de inhibición superior al 50%, mientras que el resto presentó actividades significativamente menores, e incluso valores negativos, lo que sugiere un potencial efecto activador de la enzima en algunos casos.

Gráfico 15. Porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de las fracciones secundarias de la EF-AB-F16-f27 a EF-AB-F16-f19 a una concentración 6.25 $\mu\text{g/mL}$



Entre las fracciones más activas, destacan EF-A-B-F16-f10 con un 99.82%, EF-A-B-F16-f13 con un 97.62%, EF-A-B-F16-f11 con un 97.04%, EF-A-B-F16-f14 con un 96.48%, y EF-A-B-F16-f15 con un 96.16% (Gráfico 16). Estas fracciones no solo presentaron una inhibición superior al estándar, sino que, además al compararlas con los resultados de las fracciones primarias, muestran que el fraccionamiento secundario permitió concentrar los compuestos activos responsables de la inhibición. Esto indica que la separación cromatográfica utilizada fue eficiente en la concentración de los compuestos bioactivos.

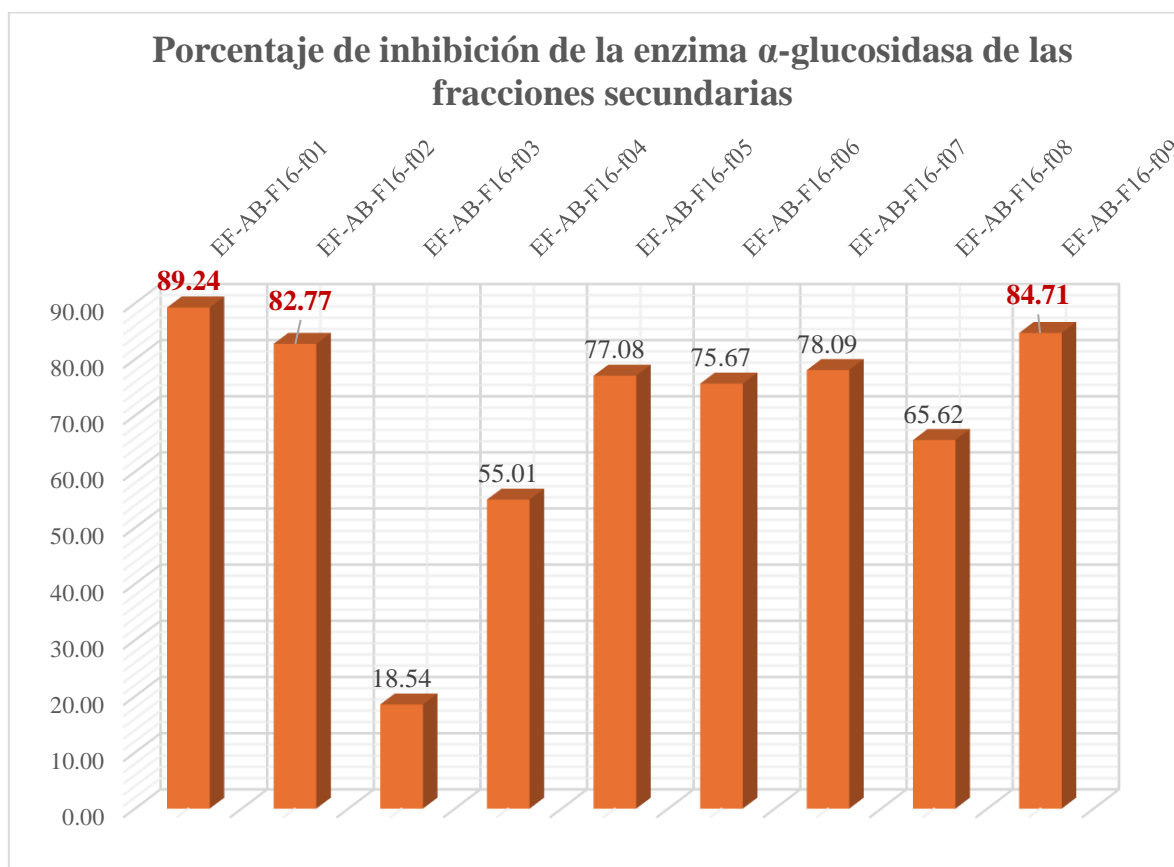
Gráfico 16. Porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de las fracciones secundarias de la EF-AB-F16-f10 a EF-AB-F16-f18 a una concentración 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$



En contraste, las fracciones EF-AB-F16-f27 a f20 mostraron valores negativos en el porcentaje de inhibición, con un rango de -20.80% (f27) a -1.99% (f19) (Ver Gráfico 15). Este comportamiento puede atribuirse a la presencia de compuestos que, en lugar de inhibir, pueden estar estabilizando la actividad enzimática o incluso favoreciendo su acción. Por otro lado, las fracciones EF-AB-F16-f05, f06 y f07 presentaron inhibiciones moderadas de 77.08%, 75.67% y 78.09%, respectivamente.

Es importante resaltar que los compuestos presentes en las fracciones con mayor actividad inhibidora, como f10, f11, f13, f14, y f15, podrían ser candidatos para un posterior aislamiento y caracterización estructural.

Gráfico 17. Porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de las fracciones secundarias de la EF-AB-F16-f01 a EF-AB-F16-f09 a una concentración 6.25 $\mu\text{g/mL}$



4.11. REDES MOLECULARES

El uso de herramientas avanzadas permite realizar análisis detallados en metabolómica a partir de datos generados por espectrometría de masas. Dentro de este tipo de herramientas destaca GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), la cual facilita la visualización y análisis de similitudes moleculares, permitiendo identificar compuestos relacionados y explorar conexiones estructurales entre ellos. Esta plataforma es particularmente útil para estudiar la diversidad química de un conjunto de datos y comprender mejor las relaciones entre los metabolitos.

Se utilizó GNPS para generar una red molecular basada en los datos obtenidos mediante GC-EI/MS de las fracciones de hexano y diclorometano de *E. fosbergii*. La Figura 49 muestra cómo los compuestos detectados se agrupan en clústeres según sus características químicas compartidas. Estos grupos revelan la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos, esteroides y ácidos grasos, los cuales representan los principales compuestos presentes en las fracciones analizadas. El análisis incluyó la visualización de nodos de diferentes tamaños, los cuales fueron filtrados por la abundancia relativa de iones en las fracciones de hexano y diclorometano. El tamaño del nodo refleja directamente la abundancia relativa de cada compuesto, permitiendo identificar cuáles son los más predominantes en cada fracción. Adicionalmente, se utilizó un código de colores para distinguir la composición: los nodos correspondientes a la fracción de hexano están representados en verde, mientras que aquellos de la fracción de diclorometano aparecen en azul. Este esquema facilita la comparación visual entre las fracciones y resalta las diferencias en su composición química.

El grosor de las líneas que conectan los nodos en la red molecular representa la distancia de coseno entre los espectros de masas de los compuestos. Las líneas más gruesas indican una mayor similitud entre los compuestos, lo que sugiere una relación estructural más estrecha. Este tipo de representación ayuda a identificar familias de compuestos relacionados y posibles rutas biosintéticas dentro del perfil metabólico de *E. fosbergii*.

Un aspecto notable del análisis es la identificación de múltiples nodos que no presentan coincidencia con compuestos reportados en las bases de datos públicas integradas en GNPS. Estos nodos podrían corresponder a compuestos conocidos, pero no registrados en la base de datos, o bien a posibles compuestos novedosos aún no descritos. Este hallazgo resalta la necesidad de llevar a cabo estudios complementarios, utilizando técnicas espectroscópicas avanzadas y comparaciones con estándares de referencia, para confirmar la identidad estructural de estos compuestos.

CONCLUSIONES

Por medio de los ensayos *in vitro* se detectó que las fracciones de *E. fosbergii* no presentan actividad fitotóxica significativa contra las semillas de *S. lycopersicum* y *R. sativus*. Estos resultados nos permiten inferir que la planta *E. fosbergii* no debe tener un efecto alelopático negativo marcado, es decir, la probabilidad de que afecte a las otras malezas presentes en los cultivos de café o a la planta del café *per se* es mínima. Por otro lado, esto también sugiere que su alta abundancia parece estar relacionado con su alta capacidad para captar nutrientes y agua disponibles en los campos de cultivo.

En cuanto a las otras actividades biológicas evaluadas, solo la fracción de diclorometano mostró una actividad significativa ($DL_{50} = 158.5 \mu\text{g/mL}$) contra los nauplios de *A. salina*. Además, solo la fracción metanólica de *E. fosbergii* mostró una actividad antioxidante detectable, donde se encontraron principalmente compuestos fenólicos y flavonoides, reconocidos en la literatura como antioxidantes efectivos. En el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa, la fracción hexánica mostró una alta capacidad de inhibir la actividad enzimática.

Del fraccionamiento primario de la fracción de hexano se obtuvieron 21 subfracciones, de las cuales 7 mantuvieron una alta capacidad inhibitoria (>82%). En el análisis por CG-EM de las fracciones apolares, se identificaron varios compuestos, incluyendo escualeno, óxido de cariofileno, campesterol, estigmasterol, y γ -sitosterol, entre otros. De acuerdo con reportes en la literatura, el ácido palmítico, palmitato de metilo, estigmasterol, y sitosterol se pueden considerar como los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. Por lo tanto, los extractos apolares de *E. fosbergii* podrían constituir una fuente alternativa prometedora como agente hipoglucemiante.

A través del fraccionamiento secundario de la fracción **EF-A-F16**, se obtuvieron 28 fracciones. En el ensayo de inhibición de α -glucosidasa, se identificaron fracciones con

actividad inhibitoria destacada, siendo EF-AB-F16-f10 la más prometedora con un 99.82% de inhibición.

El análisis de las redes moleculares con GNPS permitió agrupar los compuestos según sus similitudes químicas y patrones de fragmentación. Los nodos activos dentro de las redes mostraron relaciones químicas entre los compuestos, agrupándolos en familias con perfiles de espectrometría de masas similares. Además, el tamaño del nodo representó la abundancia relativa de iones, mientras que el grosor de las conexiones indicó la proximidad coseno entre los compuestos. Este análisis reveló la presencia de compuestos conocidos y de potenciales compuestos nuevos, destacando la necesidad de investigaciones futuras para identificar y caracterizar a las moléculas no reportadas. Entre los compuestos identificados se encuentran miembros de diversas familias químicas, como los esteroides (estigmasterol, campesterol, γ -sitosterol y supraeno), los ésteres de ácidos grasos (metil palmitato, linoleato de metilo y metil linolenato), los terpenos (β -cariofileno y escualeno), así como ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y ácido palmítico) y vitaminas (retinol).

RECOMENDACIONES

Para explicar a mayor detalle la composición química y los potenciales compuestos activos presentes en las hojas de la *E. fosbergii* se requiere realizar un estudio más profundo. También, es importante realizar estudios adicionales para comprender los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos, especialmente en el caso de la inhibición de α -glucosidasa, lo cual ayudará a clarificar cómo interactúan. Además, como los resultados fueron obtenidos en ensayos *in vitro* es necesario validarlos en ensayos *in vivo*.

Otro aspecto que se debe considerar es la profundización en la evaluación de la toxicidad de los compuestos y fracciones bioactivas, tanto a nivel celular como en modelos animales, para garantizar su seguridad antes de considerar sus potenciales aplicaciones farmacológicas. Dado que *E. fosbergii* no mostró actividad fitotóxica significativa, se sugiere explorar la actividad en otros sistemas biológicos, lo que podría revelar nuevas aplicaciones terapéuticas.

Las redes moleculares generadas con GNPS identificaron posibles compuestos no reportados, por lo que se recomienda realizar un análisis más exhaustivo, para lograr confirmar la identidad de estos compuestos y evaluar su actividad biológica.

Dado la inhibición de la enzima α -glucosidasa encontrada, se propone probar las fracciones de *E. fosbergii* contra otras enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, como la **enzima α -amilasa**.

Estas recomendaciones buscan maximizar el valor de los hallazgos de este estudio y orientar investigaciones futuras hacia aplicaciones farmacológicas, agrícolas y ecológicas basadas en los compuestos bioactivos de *E. fosbergii*.

REFERENCIAS

- Al-Bukhaiti, W., Noman, A., Qasim, A. S., & Al-Farga, A. (2017). Gas chromatography: Principles, advantages and applications in food analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 6(1), 1473-2319. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/342360886_Gas_Chromatography_Principles_Advantages_and_Applications_in_Food_Analysis
- Ali, S., Zameer, S., & Yaqoob, M. (2017). Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological properties of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(12), 3023-3033. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v16i12.29>
- Altieri, M. (1995). *Agroecology: The scientific basis of alternative agriculture*. Boulder: West View Press.
- Alvarez-Rivera, G., Ballesteros-Vivas, D., Parada-Alfonso, F., Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2019). Recent applications of high-resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 10-87. doi:10.1016/j.trac.2019.01.002
- Aryal, S. (2023). *Thin Layer Chromatography: Principle, Parts, Steps, Uses*. *Microbe Notes*. Retrieved agosto 19, 2024, from <https://microbenotes.com/thin-layer-chromatography/>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- Barbour, R., & Robins, D. (1987). Structure revision of emiline a pyrrolizidine alkaloid from *Emilia flammea*. *Phytochemistry*, 26(8), 2430-2431. doi:10.1016/s0031-9422(00)84744-5
- Barkley, T. (2006). *Emilia*. Asteraceae. In F. o. (eds.), *Flora of North America North of Mexico* (Vol. 20, pp. 605–607). New York & Oxford.
- Barkley, T. (2010). *The Asteraceae: A Comprehensive Review*. New York: Academic Press.
- Bartolome, A. P., Villaseñor, I. M., & Yang, W.-C. (2013). *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Bartolome, A., Villaseñor, I., & Yang, W. (20Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 340215, 51. doi:10.1155/2013/340215
- Baskiyar, S., Ren, C., Heck, K., Hall, A., Gulfam, M., Packer, S., Calderón, A. (2022). Bioactive Natural Products Identification Using Automation of Molecular Networking Software. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(24), 6378-6385. doi:10.1021/acs.jcim.2c00307

- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. doi:10.3390/antiox9080709
- Bohlmann, F., & Knoll, K. (1978). New acetylenic compounds from *Emilia* species. *Phytochemistry*, 17, 557-558. doi:Bohlmann F., Knoll K. (1978). New acetylenic compounds from Emilia s10.1016/S0031-9422(00)89367-X
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*. España: Editorial Acribia.
- Burkill, H. (1985). *The Useful Plants of West Tropical Africa* (Vol. 40). Kew, UK: Royal Botanic Gardens. doi:10.1007/BF02859140
- CABI. (2016). *Emilia fosbergii*. In *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. Retrieved mayo 15, 2023, from <http://www.cabi.org/isc/datasheet/114086>
- Cai, L. (2014). Thin Layer Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 8(1). doi:10.1002/9780470089941.et0603s08
- Calderín, J., Aguiar, B., & Díaz, M. (2021). Actividad farmacológica y composición fitoquímica de *Bidens pilosa* L. 2021(4), 1-23. Retrieved from <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/634>
- Candolle, A. P. (1824). *Emilia*. In A. Candolle, & A. d. Candolle, *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* (pp. 301-303). Paris: Treutel & Würtz. Retrieved from <https://doi.org/10.5962/bhl.title.286>
- Cassini, H. (1825). Néocéide Neoceis. In F. Cuvier, *Dictionnaire des sciences naturelles* (pp. 386-396). Strasbourg & Paris: F.G. Levrault.
- Cassini, H. (1891). Emilie, Emilia. In F. Cuvier, *Dictionnaire des sciences naturelles* (pp. 405-406). Strasbourg & Paris,: F.G.Levrault.
- Cavanilles, A. (1796). *Icones Plantarum*. Madrid: Real Jardín Botánico.
- Centro de Investigación Científica de Yucatán. (2010). *Flora: Península de Yucatán*. Retrieved agosto 1, 2024, from Cicy.mx: https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/info_proy.html
- Chagas-Paula, D., Oliveira, T., Faleiro, D., Oliveira, R., & Costa, F. (2015). Outstanding anti-inflammatory potential of selected *Asteraceae* species through the potent dual inhibition of cyclooxygenase-1 and 5- lipoxygenase. *Planta Medica*, 1296-1307. doi:10.1055/s-0035-1546206
- Chakraborty, K., Dhara, S., & Pai, S. K. (2024). INTRODUCTION TO NATURAL PRODUCTS. In M. B. Division, *Course Manual: ICAR Winter School on Harnessing*

- Recent Advances in High-Value Compound Development and Seaweed Biomass Utilization for* (pp. 37-55). Kochi: ICAR- Central Marine Fisheries Research Institute.
- Chen, Z., & Huo, J.-R. (2010). Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. *The Netherlands journal of medicine*, 68(6), 252-260. Retrieved from <https://njmonline.nl/getpdf.php?id=933>
- Cherigo, L., Lezcano, J., & Martínez-Luis, S. (2017). Diversity and Allelopathic Potential of Weeds among Panamanian Coffee Crops. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 17, 232-239. doi:10.3844/ojbsci.2017.232.239.
- Cherigo, L., & Martínez-Luis, S. (2019). Identification of major α -glucosidase inhibitors from stem bark of Panamanian mangrove plant *Pelliciera rhizophorae*. *Natural Product Communications*, 14(1). doi:10.1177/1934578X1901400105
- Cherigo, L., Liao-Luo, J., Fernández, J., & Martínez-Luis, S. (2024). Isolation of Alpha-Glucosidase Inhibitors from the Panamanian Mangrove Plant *Mora oleifera* (Triana ex Hemsl.) Ducke. *Pharmaceuticals*, 17(7), 890. doi:10.3390/ph17070890
- CONABIO. (2016). *Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México*. Retrieved agosto 25, 2023, from Emilia fosbergii Nicolson: https://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/MenuPrincipal/07Fichas%20tecnicas_OK/02Fichas%20tecnicas/Fichas%20t%C3%A9cnicas%20CONABIO_especies%20ex%C3%B3ticas/Fichas%20plantas%20invasoras/D_E/Emilia%20fosbergii.pdf
- Contreras-Guzmán, E. S., & Strong, F. C. (1982). Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 65(5), 1215-1221. doi:10.1093/jaoac/65.5.1215
- Couto, V., Vilela, F., Dias, D., Dos Santos, M., Soncini, R., Nascimento, C., & Giusti-Paiva, A. (2011). Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 134(2), 348-353. doi:10.1016/j.jep.2010.12.028
- Cufondontis, G. (1967). Enumeratio plantarum Aethiopiae Spermato-phyta (sequential). *Bull. Jard. Bot. Natl. Belg.*, 37, 1115-1193. doi:10.2307/3667631
- Culvenor, C., Edgar, J., Jago, M., Qutteridge, A., Peterson, J., & Smith, L. (1976). Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chemico-biological interactions*, 12(3-4), 299-324. doi:10.1016/0009-2797(76)90046-6
- D.R, B., Bhat, W., Mani, R., Ahmed, S., Dinesan, A., Pavithran, A., & George, D. (2021). Ethnobotanical and pharmacological profile of *Galinsoga parviflora*. *International Journal of Health Care and Biological Sciences*, 63-69. doi:10.46795/ijhcbs.v2i4.243

- Dash, G., Abdullah, M. S., & Yahaya, R. (2015). Traditional Uses, Phytochemical and Pharmacological Aspects of *Emilia sonchifolia* (L.) DC. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 6, 551-556. doi:10.7897/2277-4343.064103
- De Graff, J. (1986). *The economics of coffee*. Wageningen: The Netherlands: Pudoc Wageningen.
- Elwekeel, A., El Amir, D., Mohamed, E. I., Amin, E., Hassan, M. H., & Zaki, M. A. (2022). Characterization of Possible α -Glucosidase Inhibitors from *Trigonella stellata* Extract Using LC–MS and In Silico Molecular Docking. *Plants*, 11(2), 208. doi:10.3390/plants11020208
- Escamilla, E., & Mendoza, N. (2018). Introduction to phytochemicals: secondary metabolites from plants with active principles for pharmacological importance. In T. Asao, & M. Asaduzzaman, *Phytochemicals: Source of antioxidants and role in disease prevention*. InTech. doi:10.5772/intechopen.78226
- Flora of China Editorial Committee. (2014). *Emilia Cass.* Retrieved from eFloras.org: http://www.efloras.org/browse.aspx?flora_id=0&name_str=emilia&btnSearch=Search
- Freitas, J. (2020). *Metabolomics studies of wild edible plants from Asteraceae family*. [Tesis de doctorado, Universidad de São Paulo]. doi:10.11606/t.60.2020.tde-21092021-042202
- Freitas, J., Ccana-Ccapatinta, G., & Da Costa, F. (2020). Pyrrolizidine alkaloids and other constituents from *Emilia fosbergii* Nicolson. *Biochemical Systematics and Ecology*, 92, 104-110. doi:10.1016/j.bse.2020.104110
- Fried, B., & Sherma, J. (1999). *Thin-Layer Chromatography*. CRC Press. doi:10.1201/9780203910214
- Funk *et al.* (2009). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Viena: International Association for Plant Taxonomy.
- George, G., & Kuttan, G. (2016). Inhibition of pulmonary metastasis by *Emilia sonchifolia* (L.) DC: An in vivo experimental study. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 23(2), 123-130. doi:10.1016/j.phymed.2015.11.017
- Girawale, S., Meena, S. N., & Kodam, K. M. (2023). Modern approaches for mining of novel compounds from the microbes. In S. N. Meena, V. Nandre, K. Kodam, & R. S. Meena, *New Horizons in Natural Compound Research* (pp. 133-146). Elsevier.
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowka, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 686. doi:10.3390/ijms19030686

- Guo, X. (2014). Advances in Gas Chromatography. *InTech*. doi:10.5772/57016
- Hallikainen, M., Sarkkinen, E., Wester, I., & Uusitupa, M. (2002). Short-term LDL cholesterol-lowering efficacy of plant stanol esters. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2(1). doi:10.1186/1471-2261-2-14
- Hardingham, N., Dachtler, J., & Fox, K. (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front. Cell. Neurosci*, 7, 190. doi: 10.3389/fncel.2013.00190
- Hartmann, T., & Ober, D. (2000). Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. In F. Leeper, & J. Vederas, *Biosynthesis. Topics in Current Chemistry* (Vol. 209). Berlin, Heidelberg: Springer. doi:10.1007/3-540-48146-X_5
- Henty, E., Owner, F., & Pritchard, G. (1988). *Weeds of New Guinea & Their Control*. Department of Forests, Lae: Division of Botany. Retrieved from https://www.google.com.pa/books/edition/Weeds_of_New_Guinea_Their_Control/hdv_uQAACAAJ?hl=es-419&kptab=publisherseries
- Hoffmann, O. (1890). Compositae. In A. Engler, & K. Prantl, *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (Vol. IV, pp. 87–391). Leipzig: Engelmann. doi:<https://doi.org/10.5962/bhl.title.4635>
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., & Nishioka, T. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of mass spectrometry*, 45(7), 703-714. doi:10.1002/jms.1777
- Hsieh, C., Chen, H., Lee, C., He, B., & Yang, Y. (2015). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Emilia sonchifolia* from Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015,42, 1-7. doi:10.1016/j.jfca.2015.01.020 42
- Huang, Z.-R., Lin, Y.-K., & Fang, J.-Y. (2009). Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules*, 14(1), 540-554. doi:10.3390/molecules14010540
- Idris, O., Kerebba, N., Horn, S., Maboeta, M., & Pieters, R. (2023). Phytochemical-based evidence of the health benefits of *Bidens pilosa* extracts and cytotoxicity. *Chemistry Africa*, 6(4), 1767-1788. doi:10.1007/s42250-023-00626-2
- Islam, M., Ali, E. S., Uddin, S., Shaw, S., Islam, M., Ahmed, M., *et al.* (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 121, 82-94. doi:10.1016/j.fct.2018.08.032
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E. A., & Stevens, P. F. (2002). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Karlovsky, P. (2008). Secondary Metabolites in Soil Ecology. *Soil Biology*, 1–19. doi:10.1007/978-3-540-74543-3_1
- Khamare, Y., Marble, C., Steed, S., & Boyd, N. (2021). Biology and Management of Tasselflower (*Emilia* spp.) in Ornamental Crop Production. *EDIS*, 2021(3). doi:10.32473/edis-ep606-2021
- Kinupp, V. (2007). *Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS*. (F. d. [Tese (Doutorado em Agronomia), Editor] Retrieved from UFRGS.BR: <http://hdl.handle.net/10183/12870>
- Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell & Environment*, 27(6), 675–684. doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01180.x
- Kossel, A. (1891). Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Archiv für Physiologie*, 181-186.
- Leather, G. R., & Einhellig, F. A. (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal Chemical Ecology* 14, 1821–1828 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF01013479>, 14, 1821-1828. doi:10.1007/BF01013479
- Licata, M., Tuttolomondo, T., Leto, C., Virga, G., Bonsangue, G., Cammalleri, I., . . . La Bella, S. (2016). A survey of wild plant species for food use in Sicily (Italy) - results of a 3-year study in four Regional Parks. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 12, 12.
- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum*. Holmiae [Stockholm]: impensis Laurentii Salvii. doi: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.669>
- Linstrom, P. J., & Mallard, W. G. (2001, Marzo 17). *The NIST Chemistry WebBook: A Chemical Data Resource on the Internet*. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/jc000236i>
- Liu, K., Zhang, X., Xie, L., Deng, M., Chen, H., Song, J., Luo, J. (2020). Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological Research*, 164, 105373. doi:10.1016/j.phrs.2020.105373
- Mapaya, R., & Cron, G. (2020). A phylogeny of *Emilia* (Senecioneae, Asteraceae)—implications for generic and sectional circumscription. *Taxon*, 70(1), 127–138. doi:10.1002/tax.12417
- March, R. E., Lewars, E. G., Stadey, C. J., Miao, X., Zhao, X., & Metcalfe, C. (2005). A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 248(1-2), 61-85. doi:10.1016/j.ijms.2005.09.011

- Mattocks, A. (1968). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature*, 217(5130), 723-728. doi:10.1038/217723a0
- McGregor, S. E. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants*. Virginia: Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. Retrieved from <https://books.google.com.pa/books?id=mQoUAAAAYAAJ>
- Min, K., & Ebeler, S. E. (2008). Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 96-104. doi:10.1016/j.fct.2007.07.002
- Ministerio de Desarrollo Agropecuario. (29 de Septiembre de 2022). *MIDA*. Obtenido de Se prevé un incremento en la producción de café en Chiriquí: <https://mida.gob.pa/2022/09/29/se-preve-un-incremento-en-la-produccion-de-cafe-en-chiriqui/>
- Missouri Botanical Garden. (2014). *Emilia fosbergii*. Retrieved agosto 10, 2024, from Tropicos database. St. Louis, Missouri, USA: Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/Name/2702411>
- Mohimani, H., Gurevich, A., Mikheenko, A., Garg, N., Nothias, L.-F., Ninomiya, A., Pevzner, P. A. (2017). Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. *Nature Chemical Biology*, 13, 30-37. doi:10.1038/nchembio.2219
- Moraes, A., & Guerra, M. (2010). Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 287, 113-118. doi:10.1007/s00606-010-0302-5
- Mroczek, T., Ndjoko, K., Głowniak, K., & Hostettmann, K. (2004). On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of chromatography*, 1056(1-2), 91-97. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.086
- Muko, K., & Ohiri, F. (2000). A preliminary study on the anti-inflammatory properties of *Emilia sonchifolia* leaf extracts. *Fitoterapia*, 71(1), 65-68. doi:10.1016/s0367-326x(99)00123-9
- Nicolson, D. (1975). *Emilia fosbergii*. A new species. In H. Gleason, A. Moldenke, & H. Moldenke, *Phytologia* (pp. 33-34). Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/page/12971251#page/41/mode/1up>
- Nicolson, D. (1980). Summary of cytological information on *Emilia* and the taxonomy of four Pacific taxa of *Emilia* (Asteraceae: Senecioneae). *Systematic Botany*, 5, 391-407.

- Nordenstam, B., Pelser, P., Kadereit, J., & Watson, L. (2009). Senecioneae. In F. e. (Eds), *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae* (pp. 503-525). Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., *et al.* (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, *17*, 905-908. doi:10.1038/s41592-020-0933-6
- Padrón, V., & Ricart, P. (2015). *Sinopsis anotada y comentada de la flora del bosque estatal de Guilarte*. Puerto Rico: Ediciones y Taller CIBA.
- Peisino, M. C. (2018). *Atividade antioxidante e anti-Inflamatória in vitro de plantas alimentícias não convencionais. [Tesis de maestría, Universidade Vila Velha]*. Programa de posgraduación en Ciencias Farmacéuticas.
- Peisino, M. C., Zouain, M., Pimentel Schmitt, E. F., de Christo Scherer, M., Toledo e Silva, M. V., Endringer, D. C., Fronza, M. (2020). Health-Promoting Properties of Brazilian Unconventional Food Plants. *Waste Biomass Valor*(11), 4691-4700. doi:10.1007/s12649-019-00792-w
- Pepe, G., Sommella, E., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G., Scopa, A., Campiglia, P. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.; var. Maravilla de Verano). *Food chemistry*, *167*, 153-161. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.105
- Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos, A. (2009). Metabolismo de plantas. (A. Moreno, Ed.) *Reduca (Biología)*, *2* (3), pp. 119-145. Retrieved mayo 15, 2024
- Pluskal, T., Korf, A., Smirnov, A., Schmid, R., Fallon, T. R., Du, X., & Weng, J.-K. (2020). Metabolomics Data Analysis Using MZmine. In R. Winkler, *Processing Metabolomics and Proteomics Data with Open Software: A Practical Guide* (pp. 232-254). doi:10.1039/9781788019880-00232
- Price, K., Dupont, M. S., Shepherd, R., Chan, H., & Fenwick, G. (1990). Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—coloured lettuce (*lactuca sativa*) and chicory (*cichorium intybus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *53*(2), 185-192. doi:10.1002/jsfa.2740530206
- Radosevich, S., Holt, J., & Ghera, C. (1997). *Weed ecology: implications for management*. New York: Wiley and Sons.
- Raj, M. (2012). Natural antioxidant (flavone glycoside) from *Emilia sonchifolia* DC. and its potential activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*, 159-162. Retrieved from <https://bit.ly/3LTFHS8>

- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 27(3), 493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Renna, M., Coccozza, C., Gonnella, M., Abdelrahman, H., & Santamaria, P. (2015). Elemental characterization of wild edible plants from countryside and urban areas. *Food chemistry*, 177, 29–36. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.069
- Rojas, J., & Acevedo, P. (2022). *Emilia fosbergii* (Florida tassel-flower). *CABI Compendium*, <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.114086> .
- Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M. F., & Wudy, S. A. (2013). Introduction to gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1065, 27–44. doi:10.1007/978-1-62703-616-0_3
- Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin Layer Chromatography. Methods in Enzymology on CD-ROM. *Methods in Enzymology*, 303-324. doi:10.1016/b978-0-12-420067-8.00024-6
- Sawada, Y., Nakabayashi, R., Yamada, Y., Suzuki, M., Sato, M., Sakata, A., Saito, K. (2012). RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry*, 82, 38-45. doi:10.1016/j.phytochem.2012.07.007
- Shayegan, N., Haghypour, S., Tanideh, N., Moazzam, A., Mojtabavi, S., Faramarzi, M. A., Mahdavi, M. (2023). Synthesis, in vitro α -glucosidase inhibitory activities, and molecular dynamic simulations of novel 4-hydroxyquinolinone-hydrazones as potential antidiabetic agents. *Scientific Reports*, 13, 6304. doi:10.1038/s41598-023-32889-7
- Shen, S., Shen, L., Lei, Q., Zhang, J., Li, G., & Si, J. (2013). A new cyclohexylacetic acid derivative from the aerial parts of *Emilia sonchifolia*. *Natural product research*, 27(15), 1330-1334. doi:10.1080/14786419.2012.738205
- Shulha, O., & Zidorn, C. (2019). Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae revisited: An update (2008-2017). *Phytochemistry*, 163, 149-177. doi:10.1016/j.phytochem.2019.02.0
- Shylesh, B., & Padikkala, J. (2000). In vitro cytotoxic and antitumor property of *Emilia sonchifolia* (L.) DC in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 73(3), 495-500. doi:10.1016/s0378-8741(00)00317-2
- Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39(11). doi:10.1021/ed039p546
- Snyder, L. R. (1966). Linear elution adsorption chromatography. *Journal of Chromatography*, 25, 274-293.

- Şöhretoğlu, D., & Sari, S. (2020). Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochem Reviews*, *19*, 1081-1092. doi:10.1007/s11101-019-09610-6
- Stevens, P. F. (2001). *Asteraceae. Angiosperm Phylogeny*. Retrieved marzo 13, 2024, from <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Tadesse, M., & Beentje, H. (2004). A synopsis and new species of Emilia (Compositae-Senecioneae) in Northeast Tropical Africa. *Kew Bull*, *59*, 469-482. doi:10.2307/4110954
- Tagele, S., Lee, H., Kim, S., & Lee, Y. (2019). Phenazine and 1-Undecene Producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* Strain KNU17Pc1 for Growth Promotion and Disease Suppression in Korean Maize Cultivars. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(1), 66-78. doi:10.4014/jmb.1808.08026
- Tu *et al.* (1982). Studies on the Constituents of *Artemisia annua* Part II. *Planta medica*, *44*(3), 143-145. doi:10.1055/s-2007-971424
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, *17*(10), 1217–1220. doi:10.1038/nm.2471
- USDA-NRCS. (2024). *The Plants Database*. (N. P. Team, Editor) Retrieved agosto 12, 2024, from <http://plants.usda.gov>
- Valli, M., Dos Santos, R., Figueira, L., Nakajima, C., Castro-Gamboa, I., Andricopulo, A., & Bolzani, V. (2013). Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. *Journal of Natural Products*, *76*(3), 439-444. doi:10.1021/np300687
- Velivelli, S., Kromann, P., Lojan, P., Rojas, M., Franco, J., Suarez, J. P., & Prestwich, B. (2014). Identification of mVOCs from Andean Rhizobacteria and Field Evaluation of Bacterial and Mycorrhizal Inoculants on Growth of Potato in its Center of Origin. *Microbial Ecology*, 652-667. doi:10.1007/s00248-014-0514-2
- Vibrans, H. (2011, septiembre 30). *Malezas de México, Ficha -Emilia fosbergii*. Retrieved agosto 15, 2023, from [Conabio.gob.mx.: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/emilia-fosbergii/fichas/ficha.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/emilia-fosbergii/fichas/ficha.htm)
- Wall, P. E. (2007). *Thin-layer chromatography: a modern practical approach*. Royal Society of Chemistry.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., *et al.*, (2018). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, *34*, 828-837. doi:https://doi.org/10.1038/nbt.3597

-
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 2(3), 251-286. doi:10.3390/medicines2030251
- World Flora Online. (2024a). *Emilia Cass.* Retrieved agosto 1, 2024, from WFO: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000013312>
- World Flora Online. (2024b). *Emilia fosbergii Nicolson.* Retrieved febrero 10, 2024, from WFO: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000084726>. Consultado el 10 de agosto de 2024.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(5), 559. doi:10.3390/molecules21050559
- Zidorn, C. (2019). Plant chemophenetics - A new term for plant chemosystematics/ plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. *Phytochemistry*, 163, 147-148. doi:10.1016/j.phytochem.2019.02.013