



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
CITOTÓXICA *in vitro* DE *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae)**

TESIS QUE PRESENTA

EMILIO JAVIER MARTÍNEZ IMAMURA

PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ÁREA DE
TOXICOLOGÍA

TUTORES

DRA. RAQUEL GUERRERO ALBA
DRA. YENNY ADRIANA GÓMEZ AGUIRRE

COMITÉ TUTORAL

DRA. SUGELA SUSANA BLANCAS ZUGARAZO

AGUASCALIENTES, AGS., ABRIL 2021



CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **EMILIO JAVIER MARTÍNEZ IMAMURA** con ID 137691 quien realizó la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DE *Lepidium virginicum* L. (BRASSICACEAE)"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 8 de marzo de 2021.

Dra. Raquel Guerrero Alba
Tutora de tesis

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Tutora de tesis

Dra. Sugela Susana Blancas Zugarazo
Asesora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 29/03/2021

NOMBRE: Emilio Javier Martínez Imamura ID 137691

PROGRAMA: Maestría en Ciencias del Área Biotecnología Vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Toxicología

TIPO DE TRABAJO: (x) Tesis () Trabajo práctico

TITULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA in vitro DE Lepidium virginicum L. (Brassicaceae)

Se confirmó desde el punto de vista científico el efecto real de una planta ampliamente usada en la medicina tradicional. Esta información puede ser utilizada, ya con el conocimiento validado, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y oncológicas

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): enfermedades inflamatorias y oncológicas

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
N.A. Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A. Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A. Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- N.A. Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A. El estudiante es el primer autor
N.A. El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A. En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A. Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A. La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dra. Elsa Marcela Ramírez Zúñiga

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del MAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, designado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Calificar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) por haberme aceptado y acogido, abriéndome las puertas de su seno científico para poder estudiar esta maestría, gracias también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarias para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda.

Estimadas cotutoras, Dra. Raquel Guerrero Alba y Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre, no existen palabras para poder expresar toda la gratitud que siento por ustedes. En primer lugar, gracias por creer en mí y en mis habilidades. En segundo lugar, por guiarme durante todo este proceso con sus enseñanzas, apoyo, dedicación y motivación que me brindaron en todo este proceso y nos permitieron alcanzar los objetivos que nos planteamos, y en tercer lugar, pero no menos importante, porque todo lo que me han transmitido ha hecho rendir grandes frutos en mi persona, que me hicieron darme cuenta que soy capaz de realizar cosas que antes no conocía y que me han hecho ver que tengo que poner siempre mi mayor esfuerzo, amor y pasión en cada uno de mis sueños y metas. Ustedes me inspiran a luchar por ser la mejor versión de mí y son dueñas de toda mi admiración y respeto.

Estimada Dra. Sugela Susana Blancas Zugarazo gracias por fungir como mi asesora en este proyecto, sin duda alguna fue ese faro que me dio la luz y me indicó el camino cuando me encontré perdido, le agradezco mucho su apoyo, su guía, su paciencia, su humildad y sus enseñanzas.

Estimado Dr. Tonatíuh Barrios García, agradezco todas las enseñanzas, paciencia y dedicación, sin duda alguna también fue un gran maestro para mí, gracias por su valioso apoyo, sus consejos, por guiarme, motivarme constantemente y por su amistad.

Así mismo quiero agradecer al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez por permitirme realizar una estancia en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), la cual me permitió desarrollar una parte importante en mi trabajo experimental de tesis en el área fitoquímica.

Gracias a todas las personas que me brindaron amablemente las líneas celulares necesarias para poder realizar mi investigación, a la Dra. Eva María Salinas Miralles del Departamento de Microbiología de la UAA y a la Dra. Laura Elena Córdova Dávalos por

donarnos y crecer las células RAW 264.7, a la Dra. Guadalupe González Ochoa del Departamento de Ciencias Químico-biológicas agropecuarias de la Universidad de Sonora por donarnos la línea celular HT-29 y gracias especiales al Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega del Departamento de Química de la UAA por donarnos las líneas celulares Caco-2 y Detroit 548, pero más que nada por brindarme su apoyo incondicional durante todo este proceso, sin duda alguna soy muy afortunado de contar con su amistad, lo admiro, aprecio y respeto mucho.

Quiero agradecer a mi amada familia, por todo su amor, enseñanzas y apoyo incondicional. En especial quiero mencionar a mis amados padres, gracias por siempre darme la mejor educación que ha estado en sus posibilidades, por su ilimitado apoyo y por todo el esfuerzo que han puesto en mí, sin ustedes nada de esto habría sido posible. Soy muy privilegiado de pertenecer a esta familia a la cual amo con todo mi corazón.

Colega, amiga y maestra Mariana Medina Pizaño, has sido una parte muy importante para que yo alcanzara este logro, gracias por todo el apoyo, motivación, enseñanzas, humildad, paciencia y amor que brindaste en este proceso de mi vida.

A todos mis amigos y personas queridas que me han acompañado, motivado y apoyado en esta etapa de mi vida les estoy sumamente agradecido, gracias por ser un maravilloso equipo.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	10
2.1. Plantas medicinales.....	10
2.2. Actividades biológicas de las plantas medicinales.....	15
2.2.1. Actividad antioxidante.....	15
2.2.2. Actividad antiinflamatoria.....	15
2.2.3. Actividad citotóxica.....	17
2.3. Plantas medicinales en México.....	18
2.4. Taxonomía, descripción y distribución de <i>Lepidium virginicum</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. General.....	25
5.2. Específicos.....	26
6. METODOLOGÍA.....	26
6.1. Recolección de plantas silvestres de <i>L. virginicum</i>	26
6.2. Preparación de los extractos orgánicos del tallo de <i>L. virginicum</i>	26
6.3. Análisis químico de los extractos orgánicos de <i>L. virginicum</i>	27
6.3.1 Análisis por cromatografía en capa fina.....	27
6.3.2. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	27
6.3.3. Separación por cromatografía en columna abierta de compuestos fenólicos.....	28
6.4. Pruebas antiinflamatorias.....	28
6.5. Pruebas de citotoxicidad.....	30
6.6 Análisis estadístico de los datos.....	31
7. RESULTADOS.....	31
7.1. Rendimiento de los extractos orgánicos de <i>L. virginicum</i>	31
7.2. Análisis fitoquímico de los extractos orgánicos de tallo de <i>L. virginicum</i> por cromatografía en capa fina.....	31
7.3. Análisis fitoquímico del extracto metanólico de tallo de <i>L. virginicum</i> por cromatografía líquida de alta resolución.....	33

7.4 Análisis fitoquímico de las fracciones de los compuestos fenólicos del extracto metanólico de <i>L. virginicum</i>	35
7.5. Efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de <i>L. virginicum</i>	37
7.6. Efecto citotóxico del extracto metanólico de <i>L. virginicum</i>	39
8. DISCUSIÓN.....	41
9. CONCLUSIONES.....	44
GLOSARIO.....	45
REFERENCIAS.....	46



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de *L. virginicum*.....19

Tabla 2. Compuestos químicos reportados en el género *Lepidium*.....21

Tabla 3. Sistema de elución A y B usado en el método de análisis por CLAR.....28

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la evaluar la expresión de genes proinflamatorios.....30

Tabla 5. Reuniones de las fracciones obtenidas en la columna abierta.....36



ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. *L. virginicum*.....20

Figura 2. Análisis cualitativo del perfil fitoquímico presentes en los extractos orgánicos de *L. virginicum* mediante cromatografías33

Figura 3. Perfil cromatográfico del extracto metanólico de *L. virginicum* mediante cromatografía líquida de alta resolución34

Figura 4. Cromatografías de capa fina en fase reversa de algunas fracciones reunidas obtenidas por separación en columna abierta35

Figura 5. Efecto del extracto metanólico (0.1 mg/mL) de *L. virginicum* sobre la expresión de ARNm de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 mg/mL).....38

Figura 6. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre la viabilidad celular usando el ensayo de MTT.....40

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribunocleico
- ARN:** Ácido ribunocleico
- ARNm:** Ácido ribunocleico mensajero
- AS:** p-anilsaldehído sulfúrico
- CCA:** Cromatografía en columna abierta
- CCF:** Cromatografía en capa fina
- cDNA:** ADN complementario
- CFDA:** Administración de drogas y alimentos de China
- CLAR:** Cromatografía líquida de alta resolución
- CO₂:** Dióxido de carbono
- DMAPP:** Dimetilalil difosfato
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- dNTP:** Desoxirribunocleótidos trifosfato
- DOXP:** 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
- ELv:** Extracto metanólico de *Lepidium virginicum*
- FDP:** Farmesil difosfato
- GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GGPP:** Geranilgeranil difosfato.
- GPP:** Geranil difosfato
- IL-1 β :** Interleucina 1- β
- IL-6:** Interleucina 6
- iNOS:** óxido nítrico inducible
- IPP:** Isopentenil difosfato
- LB:** Liebermann Burchard
- LPS:** lipopolisacárido

MEP/DOXP: Vía metileritritol o vía del no mevalonato

MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MVA: Vía del ácido mevalónico

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

NP/PEG: Productos Naturales/Polietilenglicol

ON: Óxido nítrico

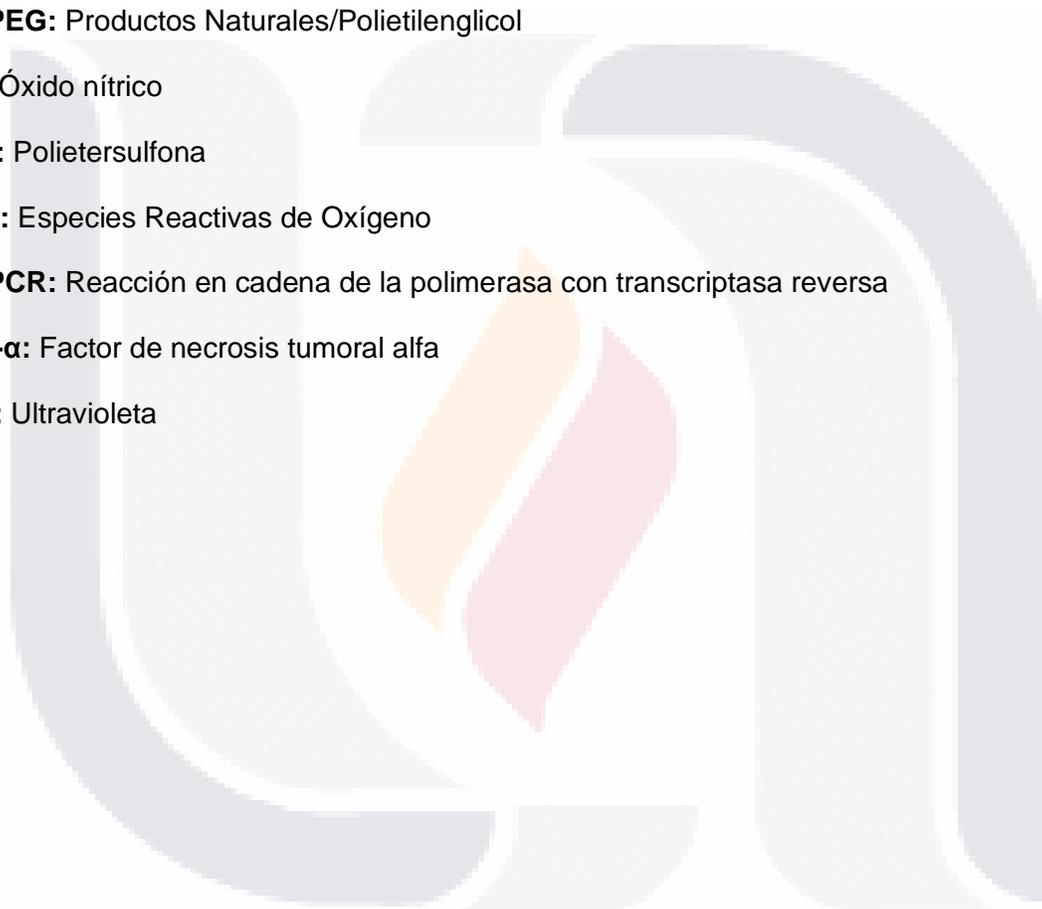
PES: Polietersulfona

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

U.V.: Ultravioleta



RESUMEN

Las plantas medicinales se utilizan en todo el mundo desde tiempos remotos para la prevención, atenuación o curación de enfermedades. En México, muchas especies de plantas se han utilizado desde tiempos prehispánicos para tratar diferentes afecciones. La planta *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), conocida como lentejilla se ha usado para aliviar dolores de cabeza, procesos inflamatorios como enteritis aguda y crónica, diarrea y trastornos biliares. Sin embargo, a la fecha no hay estudios científicos que comprueben su efecto antiinflamatorio y citotóxico. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* en la sobrevivencia de dos líneas celulares diferentes de cáncer de colon humano y sus efectos antiinflamatorios en una línea celular de macrófagos murinos. Los tallos de *L. virginicum* recolectados fueron desecados a temperatura ambiente, pulverizados y macerados secuencialmente con solventes en orden creciente de polaridad finalizando con metanol. Los extractos secos se pesaron y se diluyeron en agua bidestilada (J.T. Baker®, México) para obtener soluciones concentradas de 10 y 1 mg/mL. A partir de las cuales se prepararon soluciones de trabajo de 0.001, 0.01 y 0.1 mg/mL del extracto en medio de cultivo celular y se filtraron usando filtros de jeringa Corning™ de 28 mm de diámetro, membrana PES de poro de 0.2 micras. Se hizo un análisis químico del extracto metanólico mediante cromatografía en capa fina y cromatografía en columna abierta. Para la actividad antiinflamatoria se analizó la expresión génica de tres citocinas, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6), en macrófagos RAW 264.7 mediante la técnica de RT-PCR. La actividad citotóxica del extracto se midió mediante ensayos colorimétricos de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizados por triplicado cada 24 o 48 h en las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco-2, y en fibroblastos humanos (Detroit 548), los cuales se utilizaron como un control de células no cancerosas. El análisis fitoquímico del extracto metanólico reveló la presencia de flavonoides, polifenoles similares al ácido clorogénico, terpenos y esteroides. La prueba de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT, mostró que el extracto metanólico de *L. virginicum* exhibió un efecto citotóxico estadísticamente significativo sobre la línea celular Caco-2 a una dosis de 0.1 mg/mL, mientras que no tuvo efecto sobre las líneas celulares HT-29 y Detroit 548. Los resultados también demostraron que el extracto disminuye significativamente la expresión génica de la citocina proinflamatoria TNF- α en células RAW 264.

Palabras clave: Plantas medicinales, cáncer, compuestos terapéuticos, metabolitos secundarios, cromatografía, RT-PCR, MTT.

ABSTRACT

Since ancient times, medicinal plants have been used throughout the world to prevent, attenuate, or cure diseases. In Mexico, many species of plants have been used since prehispanic times to treat different conditions. The plant *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), known as lentil, has been used to relieve headaches, inflammatory processes such as acute and chronic enteritis, diarrhea, and biliary disorders. However, to date, there are no scientific studies that prove its anti-inflammatory and cytotoxic effect. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of the methanolic extract of *L. virginicum* on the survival of two different human colon cancer cell lines and its anti-inflammatory effects in a murine macrophage cell line (RAW 264.7). The collected stems of *L. virginicum* were dried at room temperature, pulverized, and macerated sequentially with solvents in increasing order of polarity, ending with methanol. The dry extracts were weighed and diluted in double distilled water (J.T. Baker®, Mexico) to obtain concentrated solutions of 10 and 1 mg/mL. From which working solutions of 0.001, 0.01 and 0.1 mg / mL of the extract were prepared in cell culture medium and filtered using Corning™ syringe filters of 28 mm diameter, 0.2 µm pore PES membrane. A chemical analysis of the bioactive compounds present in the methanolic extract was carried out using thin-layer chromatography and open column chromatography. For anti-inflammatory activity, the gene expression of the TNF-α and IL-1β, and IL-6 in macrophages RAW 264.7 were analyzed employing the semi-quantitative RT-PCR technique. The cytotoxic activity of the extract was measured by 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole bromide (MTT) reduction colorimetric assays performed in triplicate every 24 or 48 h in human colon adenocarcinoma cell lines HT-29 and Caco-2, and human fibroblasts (Detroit 548), which were used as a non-cancer cell control. Phytochemical analysis of the methanolic extract revealed flavonoids, polyphenols like chlorogenic acid, terpenes, and sterols. The cell viability test, performed by reducing the MTT compound, showed that the methanolic extract of *L. virginicum* exhibited a statistically significant cytotoxic effect on the Caco-2 cell line at a dose of 0.1 mg/mL, while it did not affect the HT-29 cell lines and Detroit 548. The results also demonstrated that the extract significantly decreased gene expression of the pro-inflammatory cytokine TNF-α in RAW 264 cells.

Keywords: Medicinal plants, cancer, therapeutic compounds, secondary metabolites, chromatography, RT-PCR, MTT.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional por sus diversas propiedades terapéuticas desde la antigüedad y está presente en todas las culturas del mundo. En la actualidad, el uso práctico de la medicina alternativa en los procesos de curación se ha vuelto cada vez más popular, en respuesta a una creciente demanda de una parte de la población que exige cada vez más productos de origen natural y alternativas a los medicamentos de síntesis (Masarovičová & Kráľová, 2007).

El efecto farmacológico de ciertas plantas se debe a la presencia de determinados compuestos químicos (fitoquímicos) denominados compuestos bioactivos o compuestos activos funcionales que surgen del metabolismo secundario de las plantas. Las plantas medicinales presentan una gran variedad y complejidad de metabolitos secundarios que tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna debido a que son fuente directa de agentes terapéuticos, y las estructuras químicas de dichos compuestos bioactivos pueden ser utilizadas como modelos para la elaboración de medicamentos sintéticos más complejos, de hecho, muchos de los medicamentos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, han sido obtenidos a partir de especies vegetales (Silva-Belmares et al., 2014; Oliveira et al., 2005; Akerele, 1993).

En México, se han reportado aproximadamente 4,500 especies de plantas con usos etnomedicinales, dentro de las cuales se encuentra la especie *Lepidium virginicum* L., perteneciente a la familia Brassicaceae (Guzmán-Gutiérrez et al., 2014), antiguamente llamada por los mayas como pich' tuluk', quienes empleaban la decocción de las raíces como tratamiento para la diarrea, disentería y como remedio para el dolor abdominal (Berlin & Berlin, 1995). En la actualidad, es conocida en los valles centrales de México como "lentejilla" (Martínez, 1979), y sigue siendo ampliamente utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana para aliviar el dolor de cabeza y espalda, procesos inflamatorios, trastornos biliares, diarrea y enteritis aguda o crónica, así como, antihemorrágico y regulador de la presión arterial (García-Regalado, 2014). Los estudios fitoquímicos del extracto metanólico de *L. virginicum* han demostrado la presencia de glucosinolatos, flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, terpenos y esteroides (Calzada et al., 2003; Martínez-Castro, 2016). Estos compuestos pueden tener propiedades antiinflamatorias y/o anti-proliferativas que pudieran representar una alternativa promisorias para el tratamiento de numerosos desórdenes inflamatorios y enfermedades cancerosas. Sin embargo, a la fecha no existen estudios científicos que demuestren dichas propiedades.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1. Plantas medicinales

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, s.f.) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Esta misma organización ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza los remedios herbolarios tradicionales para tratar sus afecciones o enfermedades (García de Alba García, et al., 2012).

El estudio científico de las plantas medicinales inició durante los siglos XVIII y XIX con el desarrollo de la farmoquímica, que lleva a cabo el análisis químico de las plantas medicinales, y la farmacognosia, que estudia la materia prima de origen biológico que pueden tener aplicaciones terapéuticas (Muñoz, 1996), lo que ha contribuido en la medicina moderna. Por ejemplo, son fuente directa de moléculas terapéuticas, son materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de fármacos sintéticos y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Oliveira-Miranda et al., 2005).

Los efectos farmacológicos de las plantas medicinales se deben a la presencia de determinados compuestos químicos denominados compuestos bioactivos o compuestos activos funcionales que surgen del metabolismo secundario de las plantas como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación de ambientes adversos como son cambios de temperatura, sequía, salinidad y radiación ultravioleta (Vélez-Terranova et al., 2014). La biosíntesis de los metabolitos secundarios comienza a partir de vías básicas, como son la glicólisis o vías del ácido shikímico, y posteriormente se diversifica, en gran medida según el tipo de célula, la etapa de desarrollo y las señales ambientales (Patra et al., 2013). Estos compuestos están ampliamente distribuidos en diferentes células vegetales, tejidos y órganos. Sin embargo, diferentes células, tejidos y órganos de las plantas pueden poseer diferentes propiedades medicinales en diferentes etapas de desarrollo (Bartwal et al., 2013), debido a que los factores de desarrollo influyen en la iniciación y posterior diferenciación de estructuras celulares particulares involucradas en la biosíntesis y almacenamiento de los metabolitos secundarios (Broun et al., 2006). Además, el crecimiento de la planta y el desarrollo suelen ser provocados o inhibidos por

diferentes condiciones. Por la tanto, la adaptación de la morfología vegetal, anatomía, y funciones fisiológicas al estrés bióticos y abiótico puede influir en la acumulación de metabolitos secundarios (Ma y Zhang, 2010).

Se estima que una planta puede producir de 5,000 a 25,000 compuestos diferentes y que aproximadamente 100,000 estructuras químicas conocidas representan una fracción del total del reino vegetal. Según el origen biosintético, los compuestos bioactivos se han clasificado en tres grupos principales: a) los compuestos que contienen nitrógeno como son, los glucósidos cianogénicos, alcaloides y glucosinolatos; b) los compuestos fenólicos (flavonoides) y c) los terpenos y terpenoides (Li et al., 2020).

a) Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados son aquellos que contienen un enlace carbono-nitrógeno, este puede ser sencillo o múltiple. Dentro de este grupo tenemos:

- *Glucósidos cianogénicos:*

Consisten en una aglicona de tipo α -hidroxinitrilo unida a una fracción de azúcar (principalmente D-glucosa) (Bak et al.2006; Vetter 2000; Møller 2010). Su vía biosintética se dilucidó por primera vez en el sorgo (*Sorghum bicolor*) (McFarlane et al., 1975; Møller & Conn., 1979; Shimada & Conn., 1977), donde la durrina (glucósido cianogénico) se sintetiza a partir de L-tirosina en una serie de pasos catalizados por dos enzimas multifuncionales del citocromo P450 (CYP79A1 y CYP71E1) y una UDP-glicosiltransferasa (UGT85B1) (Jones et al. 1999). Se considera que desempeñan un papel importante en el crecimiento, el desarrollo y la resistencia de las plantas contra el estrés abiótico/biótico, principalmente como defensa contra herbívoros, plagas y algunos hongos debido a su toxicidad que surge de la degradación enzimática para producir cianuro de hidrógeno, lo que resulta en una intoxicación aguda por cianuro (Gleadow y Møller 2014; Pičmanová et al. 2015., Speijers, 1993).

- *Alcaloides:*

Generalmente representan un grupo muy diverso de compuestos de bajo peso molecular que contienen estructuras cíclicas con al menos un átomo de nitrógeno básico incorporado. La biosíntesis de una gran cantidad de alcaloides se basa en

oxidorreductasas, principalmente citocromo P450 y monooxigenasas que contienen flavina, para modificaciones extensas de los andamios centrales que suelen ser contruidos a partir de aminoácidos aromáticos e isoprenos (Kishimoto et al., 2016). Estos metabolitos secundarios tienen una amplia distribución en el reino vegetal y presentan un papel importante en los sistemas de defensa de las plantas, se han reportado más de 12, 000 alcaloides de 100 familias de plantas, (Buchanan et al., 2000). Dentro de este grupo se encuentra la morfina, codeína, nicotina, heroína, cafeína, atropina, cocaína, el opio, entre otros. Presentan diversas actividades biológicas y farmacológicas (Ávalos & Pérez, 2009; Li et al., 2017) e incluso se ha reportado que numerosos alcaloides aislados de fuentes naturales exhiben actividades antiproliferativas y antimetastásicas contra varios cánceres tanto *in vitro* como *in vivo* (Lu et al., 2012; Lee, 2011).

- *Glucosinolatos:*

Son aniones formados en una estructura química genérica por un grupo tihidroximato-O-sulfonato unido a glucosa y una cadena lateral de alquilo, aralquilo o indolilo (R) (Barba et al., 2016). Se conocen más de 200 estructuras diferentes de glucosinolatos y se dificulta descifrar completamente el mecanismo de biosíntesis de cada uno de ellos (Frerigmann & Gigolashvili, 2014); sin embargo, la especie *Arabidopsis thaliana* (familia *Cruciferae*) se eligió como punto de partida para el estudio de las posibles vías biosintéticas de estos compuestos, debido a su corto genoma y ciclo de vida corto (Redovnikovi et al., 2012) y a través de estos análisis se dilucidaron los tres pasos básicos que componen la ruta general de la biosíntesis de los glucosinolatos, que son: a) Elongación de la cadena lateral de los aminoácidos precursores (esta fase solo ocurre si los aminoácidos son metionina o fenilalanina), b) la formación de la estructura central del glucosinolato y c) la decoración de la cadena lateral para dar lugar a los diferentes derivados que existen. La síntesis ocurre principalmente en el citosol celular, con la participación de los cloroplastos en algunas reacciones de los dos primeros pasos (Sønderby et al., 2010). Estos metabolitos secundarios son conocidos por su papel en la resistencia de las plantas a insectos y patógenos, por sus propiedades preventivas del cáncer y son sintetizados por numerosas especies del orden Capparales, que incluye a plantas de la familia *Brassicaceae* (Halkier & Gershenzon., 2006; Barba et al., 2016; Bell & Wagstaff., 2014, 2017).

b) Compuestos fenólicos:

Los compuestos fenólicos comprenden el amplio término de "polifenoles", que son moléculas con uno o más grupos fenólicos y uno o más grupos hidroxilo y comprenden un extenso grupo de metabolitos secundarios en el reino vegetal. Las rutas de biosíntesis para los compuestos fenólicos son la del ácido shikímico y la del ácido malónico (Avalos & Pérez, 2009; Isaza, 2007). Se sintetizan a partir de carbohidratos y generalmente se producen como mecanismos de defensa frente a patógenos, a el exceso de radiación ultravioleta y para atraer polinizadores (Ogah et al., 2014). Presentan una gran variedad de actividades biológicas, que incluyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, vasodilatadores, antimicrobianos, antivirales y también reducen el colesterol (Chen et al., 2006; Chen & Blumberg., 2008).

Dentro de este grupo tenemos:

- *Flavonoides:*

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Kühnau, 1976). Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones (Das, 1994). Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato (Heller & Forkmann, 1993). La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico (Wagner & Farkas, 1975), que, al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides (Middleton et al., 2000). Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados. Generalmente se subdividen en varios subgrupos principales que son: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavan-3-oles, e isoflavonoides, neoflavonoides, chalconas y antocianinas (Panche et al., 2016). Estos metabolitos secundarios presentan actividades antioxidantes y antiinflamatorias, y además han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (Hardigree & Epler, 1978; Birt et al., 2001; Metodiewa et al., 1997).

c) Terpenos o terpenoides:

Los terpenos o terpenoides representan el grupo más abundante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios de plantas, en el que se han identificado más de 36,000 estructuras individuales. Una variedad de terpenoides vegetales funciona como atrayentes o repelentes de insectos (Eisenreich et al., 2001; Xin et al., 2011). Las estructuras diversificadas de los terpenoides se derivan de un ensamblaje secuencial de cinco bloques de construcción de carbono llamados unidades de isopreno (C_5H_8). La llamada “regla del isopreno biogenético” ha permitido clasificarlos dependiendo las unidades de isopreno que presentan construyendo: hemiterpenos (1 unidad), monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades) y triterpenos (6 unidades), sin embargo, realmente los terpenos no derivan del isopreno, ya que nunca se le ha encontrado como producto natural. La investigación de la biosíntesis de terpenoides reveló que los verdaderos precursores son el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero alílico dimetilalil difosfato (DMAPP), y el geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FDP) y geranylgeranyl difosfato (GGPP) producido por adiciones repetitivas de IPP. La elaboración de estos prenil difosfatos alílicos produce estructuras terpenoides, y luego las modificaciones enzimáticas secundarias de las estructuras dan lugar a las propiedades funcionales y la gran diversidad química de esta familia de productos naturales (Xin et al., 2011). Los procesos de biosíntesis de terpenoides están regulados por dos amplios factores: el espacial y el temporal. La formación de IPP en la planta implica dos vías independientes ubicadas en compartimentos subcelulares separados. En el citosol, la IPP se deriva de la conocida vía del ácido mevalónico (MVA) que comienza con la condensación de acetil CoA (Newman & Chappell, 1999). En los plastidios, IPP se forma a través de dos compuestos el 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) y el 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) que se denomina vía metileritritol fosfato o vía del no mevalonato (MEP/DOXP) (Hunter, 2007; Lichtenthaler, 1999). Varios terpenoides han atraído interés comercial como productos farmacéuticos, por ejemplo, el paclitaxel (Taxol), un diterpeno que se encuentra en la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), se ha establecido como un agente citostático, asimismo el licopeno y la luteína se registraron como agentes oncopreventivos (Eisenreich et al., 2001; Wall & Wani, 1995).

2.2. Actividades biológicas de las plantas medicinales

Se ha demostrado que los compuestos bioactivos producidos por las plantas cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos, ya que se han demostrado diversas actividades biológicas, tales como: antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras (Kalemba & Kunicka., 2003).

2.2.1. Actividad antioxidante

En el metabolismo del cuerpo humano se generan Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), sin embargo, el desbalance en la producción de ROS y una deficiencia del sistema de defensa antioxidante provoca estrés oxidativo que produce una gran variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales pueden provocar el deterioro y muerte celular, debido a que se puede generar una peroxidación lipídica, daño de membrana celular, ruptura del ADN y degradación proteica (Pérez-Gastell & Pérez de Alejo, 2000; Gomes et al., 2010). Estos daños se han asociado al desarrollo de diversas enfermedades y padecimientos como cáncer, enfermedades cardiovasculares, visuales, desordenes inmune y neurodegenerativos (Quiles et al., 2006).

Los antioxidantes disminuyen los efectos de ROS (Isabelle et al., 2010), mediante la prevención del ataque de los radicales libres, ya que tienen capacidad preferencial de oxidación, inhibiendo o retardando la oxidación ya sea directamente captando radicales libres o por mecanismos que no estén relacionados con esta acción, es decir, de manera indirecta (Floegel et al., 2011). Entre los compuestos antioxidantes se encuentran las vitaminas C y E, carotenoides, antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos, tales como ácidos clorogénicos (Lako et al., 2007; Baskar et al., 2007; Contreras et al., 2010).

Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas (Harborne & Williams, 2000; Lapidot et al., 1999; Prior et al. 1998; Sánchez-Moreno, 2002; Sauté-Gracia, 1997; Schramm & German, 1998; Tsuda, 1994).

2.2.2. Actividad antiinflamatoria

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las enfermedades crónicas inflamatorias incluyen una amplia gama de trastornos y afecciones que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

caracterizan por una inflamación lenta y prolongada que dura largos períodos desde varios meses a años. Los ejemplos incluyen alergia, asma, enfermedades autoinmunes, enfermedad celíaca, glomerulonefritis, hepatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, lesión previa a la perfusión y rechazo del trasplante. Se prevé que la prevalencia de enfermedades asociadas con la inflamación crónica aumente de manera persistente durante los próximos 30 años en los Estados Unidos. En año 2000, casi 125 millones de estadounidenses vivían con enfermedades crónicas y 61 millones (21%) tenían más de una. En estimaciones recientes por la corporación de Rand, en 2014 casi el 60% de los estadounidenses tenían al menos una afección crónica, el 42% tenía más de una y el 12% de los adultos tenía 5 o más afecciones crónicas. En todo el mundo, 3 de cada 5 personas mueren debido a enfermedades inflamatorias crónicas como derrames cerebrales, enfermedades respiratorias crónicas, trastornos cardíacos y cáncer (Pahwa, et al., 2020). Por lo que, la actividad antiinflamatoria de algunos compuestos bioactivos de las plantas medicinales ha despertado un gran interés en el área farmacológica, principalmente debido a la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que conllevan procesos inflamatorios (Gómez et al., 2011).

Existen abundantes trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria realizados tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se prueban extractos íntegros, así como metabolitos secundarios aislados de plantas (Newman et al., 2003; Setty & Sigal., 2005).

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ha reportado que estos presentan una gran variedad de efectos biológicos, entre los que se destaca la actividad antiinflamatoria (Gerritsen et al., 1995).

Xagorari y colaboradores (2001) reportaron la actividad antiinflamatoria de algunos flavonoides como luteolina, luteolina-7-glucósido, del isoflavonoide genisteína y quercetina, que inhibieron la liberación de citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) e interleucina- 6 (IL-6) en macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concluyeron que la luteolina y la quercetina fueron los flavonoides más potentes tras inhibir la producción de TNF- α bajo una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 1 y 5 μ M.

También se han aislado flavonoides antioxidantes a partir de la planta *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) y mostraron tener propiedades de inhibir la expresión de la sintasa

de óxido nítrico inducible (iNOS), la producción de óxido nítrico (ON) y los niveles de TNF- α en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Kubo et al., 1984; Chen et al., 2001). Por otra parte, se reportó que la especie *Brassica nigra* L., perteneciente a la familia de las Brassicaceae, presenta actividad antiinflamatoria. Asimismo, se han identificado en esta especie diversos compuestos como: sinigrina, ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico, glucosinolatos, lípidos, mucilagos derivados del fenilpropano, entre otros (Sujatha & Srinivas, 1995).

2.2.3. Actividad citotóxica

Una sustancia citotóxica es aquella que destruye las células, que pueden ser células anómalas o cancerosas, agentes infecciosos o incluso tejidos (Cenellier, 1999).

Según la OMS, el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial; se le atribuyen 7,4 millones de las defunciones ocurridas en 2004 (13% del total). Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en el 2030. En México, en el 2001 se registraron 102,657 casos con tumores malignos que corresponden a 101.6 casos por 100,000 habitantes (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010). Por tal motivo, existe un gran número de trabajos relacionados con la búsqueda de compuestos que tengan actividad citotóxica para impedir que las células cancerosas se dividan y crezcan, y puedan disminuir el tamaño de los tumores (Restifo et al., 2012),

Las plantas han sido una fuente invaluable de compuestos citotóxicos antitumorales relevantes en la terapia anticancerosa (Newman & Cragg, 2007), como lo ejemplifica el taxol que es un alcaloide vegetal (*Taxus* spp) con actividad citotóxica utilizado actualmente como quimioterapia anticancerosa (Kim & Park, 2002). Sin embargo, el taxol no es eficiente para todos los tipos de cáncer y causa efectos adversos como son reacciones a la infusión, leucopenia o neutropenia, anemia, trombocitopenia y neuropatía periférica. Por lo que es necesario la búsqueda de más compuestos bioactivos con actividad citotóxica que cause menos efectos adversos.

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios (León et al., 2006). Uno de los métodos cuantitativos más empleados para medir la citotoxicidad *in vitro* de alguna sustancia debido a su versatilidad y rapidez, es mediante el ensayo colorimétrico de

reducción de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazolio (MTT). El MTT es una sal de tetrazolio color amarillo que, debido al movimiento causado por la reducción (aceptación de un H+) del anillo de la sal de tetrazolio por acción de la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial, forma cristales azules de formazan insolubles en agua, pero solubles en isopropanol ácido y en dimetil sulfóxido (DMSO). Este método logra medir espectrofotométricamente las células vivas, en donde la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazan en solución (Angel, 1999; Mosmann, 1983).

2.3. Plantas medicinales en México

En México, el uso y conocimiento de plantas medicinales se desarrolló desde tiempos prehispánicos. Este conocimiento se ha transmitido de generación en generación de manera que algunos usos y costumbres persisten y son practicadas tanto en áreas rurales como urbanas (Martínez, 1996). Sin embargo, el conocimiento de los pueblos indígenas se ha venido perdiendo; con cada lengua que se extingue se pierde conocimiento sobre el uso de las plantas con fines medicinales que podrían ser clave de la cura o tratamiento de algunas enfermedades actuales. Se estima que, en México, en el siglo XVI se hablaban alrededor de 170 lenguas, mientras que a principios del siglo XXI se hablaban tan solo 62 (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010).

En nuestro país existe una gran diversidad de especies vegetales, de las cuales se han identificado y registrado aproximadamente 4,500 especies de plantas que se utilizan con fines terapéuticos en la herbolaria tradicional mexicana, representando el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas registradas (Guzmán-Gutiérrez et al., 2014; Martínez, 1996). A pesar de esta riqueza de plantas medicinales, solo el 5% de las especies poseen estudios fitoquímicos y farmacológicos, lo que marca un campo de estudio importante (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010). También es importante destacar que el 99% de las plantas medicinales mexicanas se recolectan de manera silvestre, el resto se cultivan en huertos familiares o de manera comercial, por lo que es necesario crear un programa de propagación nacional para proveer de materia prima vegetal en cantidades suficientes según la demanda, y evitar con ello la depredación y exterminio de especies nativas y silvestres, garantizando así la calidad de los recursos medicinales (Osuna-Torres, et al., 2005).

Entre las especies de plantas medicinales utilizadas en México se encuentra *Lepidium virginicum* L., que los indígenas mayas la llaman pich ‘tuluk’ y emplean la decocción de las raíces como tratamiento para la diarrea y disentería (Berlín et al., 1996). Sin embargo, se conoce muy poco sobre sus compuestos fitoquímicos, sus propiedades farmacológicas y sus posibles aplicaciones médicas.

2.4. Taxonomía, descripción y distribución de *Lepidium virginicum*

L. virginicum pertenece a la familia Brassicaceae, que es una de las familias de plantas más grandes que existen, consta aproximadamente de 300 géneros y 1500 especies. El género *Lepidium* se compone de 763 especies que crecen principalmente en climas cálidos y tienen una distribución mundial, presentando mayor diversidad en la región del Mediterráneo, Asia occidental y central y partes de América del Norte (Edwards et al., 2000). La categoría taxonómica de *L. virginicum* se muestra en la Tabla 1.

La especie *L. virginicum* comúnmente conocida como “lentejilla” (Martínez, 1979), es una especie nativa de México y Estados Unidos de América que habita en varios tipos de clima, que abarca desde el clima cálido, semicálido, semiseco, hasta el clima templado. Se le ha encontrado entre el nivel del mar y los 3100 metros sobre el nivel del mar (msnm), y es común que crezca a la orilla de caminos con vegetación perturbada, en terrenos de cultivo abandonados o en zonas urbanas. Además, se ha observado en los bosques tropical caducifolio, subcaducifolio y subperennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosques mesófilos de montaña, de encino, de pino, mixto de pino-encino y bosque de junípero.

Se ha reportado en varios estados de nuestro país, incluyendo Aguascalientes, Jalisco, Estado de México, Distrito Federal (ahora Ciudad de México), Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Chihuahua Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Yucatán, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Durango (Villaseñor & Espinosa, 1998).

Tabla 1. Taxonomía de *L. virginicum*

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida

ORDEN	Brassicales
FAMILIA	Brassicaceae
GÉNERO	<i>Lepidium</i>
ESPECIE	<i>Lepidium virginicum</i> L.

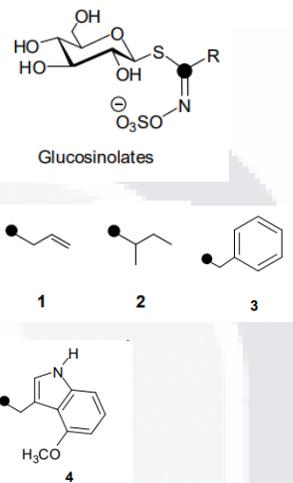
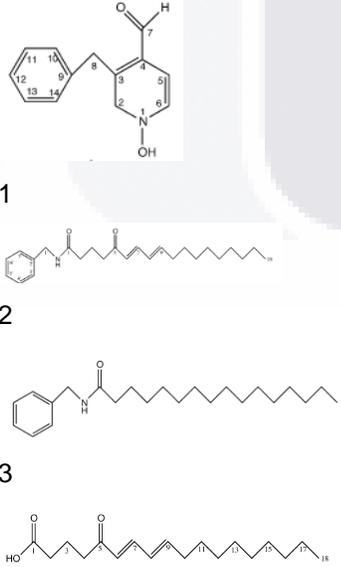
L. virginicum es una planta anual relativamente pequeña entre 20 a 70 cm de alto, generalmente erecta, aunque algunas veces con tendencias rastreras (Berlín y Berlín, 1995). Tiene hojas partidas o casi enteras que miden de 5 a 15 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho; las hojas caulinares son más pequeñas, a veces pinnatífidas o en otras ocasiones lobuladas, aunque comúnmente son más aserradas y en ocasiones enteras (Figura 1). Sus flores son muy pequeñas y blancas, se encuentran sobre pedicelos que son de uno a tres veces más largos que el fruto; sus sépalos miden aproximadamente 1 mm de largo; los pétalos generalmente son del mismo tamaño o más grandes que el tamaño de los sépalos, ya que rara vez son más cortos que estos o se encuentran ausentes; normalmente presentan dos estambres; son silicuas de 3 a 4 mm de largo, ovas tendiendo a ser orbiculares, glabras, marginadas, con una escotadura apical y en cuya base se presenta el estigma sésil (Calderón & Rzdowski, 2001).

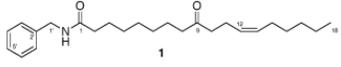
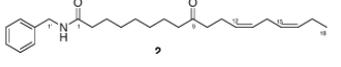
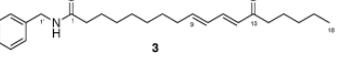
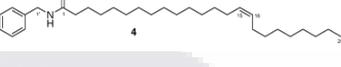
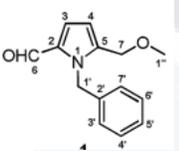
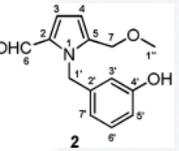
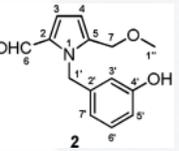
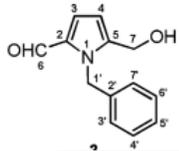
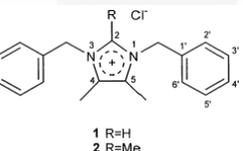
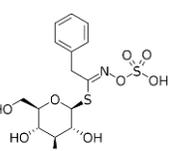
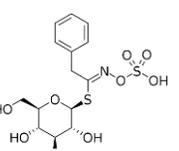
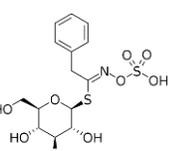
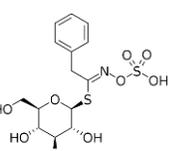


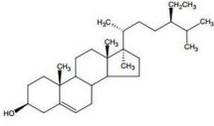
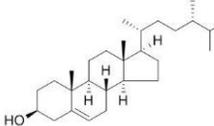
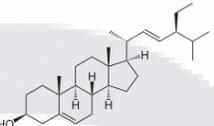
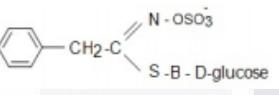
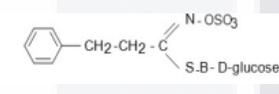
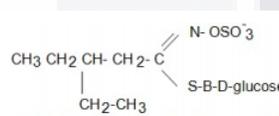
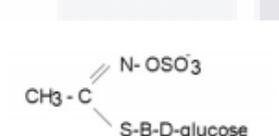
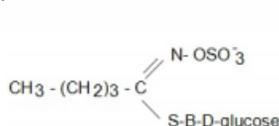
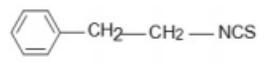
Figura 1. *L. virginicum*. Tomada de Tenorio, P. (2009). Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/lepidiumvirginicum/fichas/pagina1.htm>.

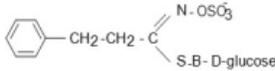
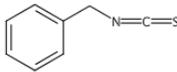
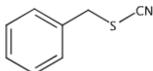
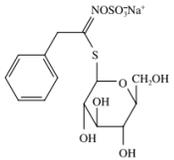
En la Tabla 2, se muestran los diversos compuestos químicos encontrados en varias especies del género *Lepidium*, entre los cuales, se destacan: compuestos fenólicos como flavonoides y cumarinas, glucósidos y saponinas, así como también los terpenos y esteroides.

Tabla 2. Compuestos químicos reportados en el género *Lepidium*

Especie	Extracto	Compuestos químicos	Estructuras químicas	Referencia
<i>L. latifolium</i> L.	Extracto de flor, hoja, tallo y raíz con diclorometano después de una hidrólisis con la enzima mirosinasa o por hidrodestilación. Se le atribuye actividad antimicrobiana y citotóxica.	<u>Glucosinolatos:</u> 1. Sinigrina (prop-2-enyl glucosinato) alil isotiocianato. 2. Glucococlearina (sec-butyl glucosinato) sec-butylisotiocianato. 3. Glucotropaeolina (Benzyl glucosinato) 2-fenil acetónitrilo y bencil isotiocianato. 4. 4-metoxiglucobrasicina (4 methoxyindol-3-ylmetil glucosinato).	 <p>Glucosinolates</p> <p>1 2 3</p> <p>4</p>	Blažević et al., 2019.
<i>L. meyenii</i> Walp.	Extracto hexánico de los tubérculos de maca. Extracto de raíces acetona acuoso (80%).	<u>Alcaloides:</u> 1. Macaridina (derivado bencilado de 1,2-dihidro- N - hidroxipiridina). Macamidas (alcamidas benciladas): 2. N-bencil-5-oxo-6E,8E-octadecadienamida 3. N-bencilhexadecanamida 4. 5-oxo-6E,8-E-ácido octadecadienoico	 <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>	Muhammad et al., 2002. Zhao et al., 2005. Dini et al., 1994. Zhou et al., 2018. Li et al., 2001.

	5. N-bencil-9-oxo-12Z-octadecenamida		
	6. N-bencil-9-oxo-12Z,15Z-octadecadienamida		
	7. N-bencil-13-oxo-9E,11E-octadecadienamida		
	8. N-bencil-15Z-tetracosenamida		
	9. N-(m-methoxybenzyl)hexadecanamida		
	Alcaloides de pirrol:		
	10. Macapirrolina A		
	11. Macapirrolina B		
	12. Macapirrolina C		
	Amidas:		
	13. Lepidilinas A [(1) 1,3-dibencil-4,5-cloruro de dimetilimidazolio] y B [(2) 1,3-dibencil-2,4,5-cloruro de trimetilimidazolio]		
	Glucosinolatos:		
	14. Glucosinolato de bencilo (glucotropaeolina)		
	Esteros:		
	15. β -sitosterol		
	16. Campesterol		
	17. Estigmasterol		

			 <p>15</p>  <p>16</p>  <p>17</p>	
<p><i>L. sativum</i> L.</p>	<p>Extracto de partes aéreas de la planta: se extrajo con metanol hirviendo que contenía CaCO al 2% para desnaturalizar la enzima mirosinasa.</p> <p>Extracto de semillas: Las semillas desgrasadas con hexano finamente trituradas (170 g) se mezclaron con H₂O. La mezcla se calentó y los componentes volátiles se extrajeron continuamente durante 4 horas</p>	<p>Glucosinolatos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Glucosinato de bencilo (glucotropaeolina) 2. Fenil Etil Glucosinato 3. 2-Etil Butil Glucosinato 4. D1 metil glucosinolato (glucocapparina) 5. D2 se identifica como glucosinolato de butilo (glucobenzosismybrain) 6. 2-fenil etil isotiocianato 7. 2-fenil etil glucosinolato (gluconasturiin) 8. Isotiocianato de bencilo 9. Tiocianato de bencilo 	 <p>1</p>  <p>2</p>  <p>3</p>  <p>4</p>  <p>5</p>  <p>6</p>	<p>Radwan et al., 2007. (Gill & Macleod, 1980).</p>

	con isopentano. Se encontró actividad hepatoprotectora		 7  8  9	
<i>L. virginicum</i>	Extracto metanólico de raíz. Tuvo un efecto antiamebiano.	Glucosinolatos: 1. Glucosinolato de bencilo (glucotropaeolina)	 1	Calzada et al., 2003.

Se tienen pocos estudios del análisis de los compuestos bioactivos presentes en *L. virginicum*. En un estudio previo se aisló el glucosinolato de bencilo a partir del extracto crudo de las raíces de esta especie, el cual exhibió un efecto antiprotozoario *in vitro* contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (Calzada et al., 2003) y por otro lado, Martínez-Castro (2016) realizó un escrutinio fitoquímico del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de *L. virginicum*, mediante cromatografía en capa fina (CCF), donde se presume la presencia de terpenos, esteroides, cumarinas y flavonoides, así como la presencia del ácido cinámico y del flavonoide apigenina (4',5,7-thihidroxiflavona). Además, determinó que el tallo recolectado de plantas silvestres de *L. virginicum* posee un mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, lo cual se correlacionó con una mayor actividad antioxidante. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se determinó si los extractos de *L. virginicum* tienen efectos citotóxicos y/o antiinflamatorios.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades que involucran procesos inflamatorios crónicos, así como las enfermedades oncológicas, son difíciles de tratar debido a que un gran porcentaje de estos pacientes no responde adecuadamente al tratamiento y/o presentan efectos secundarios adversos. Por lo que existe una gran necesidad de descubrir nuevos compuestos que representen nuevas alternativas seguras y eficaces para tratar dichos padecimientos. El uso de plantas medicinales o de sus componentes bioactivos representa una alternativa cada vez más explorada y promisoría para el tratamiento de numerosas enfermedades. Al respecto, la gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales. *L. virginicum* conocida comúnmente como lentejilla ha sido usada de manera tradicional para el tratamiento de procesos inflamatorios. Sin embargo, a la fecha no hay estudios científicos que demuestren su potencial terapéutico antiinflamatorio y citotóxico. Por tal motivo, es necesario determinar si el extracto metanólico de *L. virginicum* tiene actividad antiinflamatoria y citotóxica mediante modelos experimentales *in vitro*. Los datos obtenidos en este trabajo van a contribuir a la generación de conocimiento nuevo que puede potencialmente dar lugar a un paradigma de nuevos compuestos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y cancerosas. Así como, a la conservación y recuperación del conocimiento de las plantas medicinales que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana desde épocas prehispánicas.

4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *L. virginicum* tiene efectos citotóxicos y/o antiinflamatorios en un modelo *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica del extracto metanólico de *L. virginicum* en un modelo *in vitro*.

5.2. Específicos

- Analizar el perfil fitoquímico de los extractos orgánicos de tallo de *L. virginicum* mediante técnicas cromatográficas.
- Evaluar la actividad citotóxica del extracto metanólico de *L. virginicum* en las líneas celulares cancerosas (Caco-2 y HT-29) y en fibroblastos humanos (Detroit 548).
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *L. virginicum* en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7.

6. METODOLOGÍA

6.1. Recolección de plantas silvestres de *L. virginicum*

La especie vegetal *L. virginicum* fue recolectada en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) en los meses de febrero y marzo del 2019 (latitud: 21.917035; longitud: -102.3161046). La especie fue identificada por la Dra. María Elena Siqueiros Delgado y se depositó un ejemplar en el herbario de la UAA (HUAA) bajo el registro 30775. Para la colecta, se seleccionaron plantas de 25 cm de altura que se encontraban en etapa de floración y fructificación. Las plantas colectadas (1.97 kg), se secaron a temperatura ambiente, bajo oscuridad, durante 15 días y posteriormente se seleccionó el tallo para molerlo en una licuadora. El polvo obtenido (257 g) se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

6.2. Preparación de los extractos orgánicos del tallo de *L. virginicum*

Se realizó una maceración del tallo seco (257 g) con los siguientes solventes en orden creciente de polaridad: Hexano (J.T. Baker ®, USA), diclorometano (MACRON FINE CHEMICALS™, USA), acetato de etilo (J.T. Baker ®, México) y metanol (J.T. Baker ®, Trinidad y Tobago). Cada solvente por separado y consecutivamente, se dejó macerando con el tallo seco por 24 horas, se filtró y se volvió a macerar en el mismo solvente hasta observar ausencia de color. Posteriormente, se concentraron las muestras en un evaporador rotativo digital (Sev-Prendo®, México) al vacío. Los extractos orgánicos obtenidos se almacenaron en congelador a -4 °C y en oscuridad.

6.3. Análisis químico de los extractos orgánicos de *L. virginicum*

6.3.1 Análisis por cromatografía en capa fina

Los extractos se resuspendieron en el mismo tipo de solvente correspondiente por separado a una concentración de 0.05 mg/mL. La cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo en placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase normal) y 60 RP-18 254_s (fase reversa) (Merk® Milipore, Alemania). Se aplicaron 3 µl de cada muestra en el borde inferior de las placas; como estándares de referencia se usaron ácido clorogénico (ácido hidroxicinámico) y los flavonoides: glucósidos de quercetina, quercetina y rutina (Sigma Aldrich®, U.S.A).

Una vez aplicadas las muestras, las placas se colocaron en una cámara de vidrio previamente saturada con fase móvil, y se eluyeron hasta que ésta recorrió el 90 % de la placa. Se evaluaron diversas fases móviles [Fase normal: diclorometano: metanol (95:5 v/v) y hexano: acetato de etilo (7:3 v/v). Fase reversa: agua: acetonitrilo (7:3)] para lograr la separación y visualización de los grupos de compuestos. Posteriormente las placas se secaron a temperatura ambiente y se revelaron con diferentes reveladores, los cuales fueron: el reactivo Productos Naturales/Polietilenglicol (NP/PEG) para la detección de flavonoides por fluorescencia naranja a la luz UV a una longitud de onda de 365 nm (Wagner and Bladt, 1996) y el revelador 4-hidroxibenzaldehído para revelar terpenos que producen una coloración café y esteroides que producen una coloración que varían del violeta al rosado. El análisis cualitativo se llevó a cabo bajo cámara de luz UV a una longitud de onda de 254 y 365 nm antes y después del revelado. Finalmente, se calculó el factor de retención (R_f) para cada compuesto, el cual se determinó dividiendo el desplazamiento de la banda seleccionada entre la distancia recorrida por el solvente.

6.3.2. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Se realizó una separación de compuestos fenólicos extracto de tallo de *L. virginicum* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Waters 2695 Alliance®) con un detector de arreglo de fotodiodo (Waters 2996), usando una columna de 25 cm x 4.6 mm, 5 µm (SUPELCO Analytical, Discovery® C18, U.S.A.) a una concentración de 2.0 mg/mL. La duración de corrida fue de 30 minutos, el volumen de inyección fue de 10 µL, el flujo de 0.9 mL/min. La fase móvil consistió en el Sistema de elución A que contenía agua y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5% y el Sistema de elución B acetonitrilo (CH₃CN), todos los

reactivos utilizados fueron grado CLAR. En la Tabla 3 se muestra el gradiente de concentraciones usado en este método.

Tabla 3. Sistema de elución A y B usado en el método de análisis por CLAR

	Tiempo (minutos)	%A	%B
1	0	100	0
2	1	100	0
3	2	95	5
4	3	95	5
5	4	70	30
6	20	70	30
7	21	50	50
8	22	50	50
9	23	50	50
10	24	20	80
11	25	20	80
12	26	0	100
13	27	0	100
14	28	100	0
15	30	100	0

Sistema A: Agua (H₂O) y ácido trifluoracético (TFA) al 0.5%; Sistema B: Acetonitrilo (CH₃CN).

6.3.3. Separación por cromatografía en columna abierta de compuestos fenólicos

Se seleccionó el extracto metanólico para la separación de compuestos fenólicos mediante cromatografía de columna abierta (CCA). Se utilizaron 2 g de sílica gel 60 (Merk, Alemania) para integrar, adsorber y secar el extracto metanólico (2.8 g); como fase estacionaria reversa se utilizaron 2 g de sílica gel C18 (Sigma Aldrich, Suecia) y la fase móvil fue un gradiente de agua: acetonitrilo (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 0:100) y un lavado con 100% Metanol). Posteriormente, se realizaron las cromatografías en capa fina de las fracciones obtenidas, donde los compuestos con R_f similar se reunieron y se procedieron a concentrar en rotavaporador ® R-3 (Buchi, Suecia) al vacío, bajo una temperatura de 54°C.

6.4. Pruebas antiinflamatorias

Para examinar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *L. virginicum* se utilizó la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) de macrófagos murinos donada

amablemente por la Dra. Eva María Salinas Miralles del Departamento de Microbiología de la UAA.

Las células RAW 264.7 se cultivaron en placas de 6 pozos (aproximadamente 1×10^6 células por pozo) en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco y una mezcla de Nutrientes F-12 HAM (DMEM/F-12 HAM; Sigma-Aldrich, Reino Unido) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de antibiótico penicilina/estreptomicina (100 UI/mL-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 1.2 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en una atmósfera de 5% CO_2 a 37°C. Las células RAW 264.7 se incubaron con 0.1 mg/mL de extracto metanólico de *L. virginicum* una hora antes de la estimulación con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolisacárido (LPS). Veinticuatro horas después, las células se recolectaron y se extrajo el ARN total con el método de Trizol® (Ambion, Austin, TX, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se cuantificaron con un espectrofotómetro (Thermo Scientific), su pureza se estableció mediante la relación de absorbancia a longitudes de onda 260/280 y 1 μg de ARN se transcribió utilizando la transcriptasa reversa (iScript cDNA synthesis kit) y un oligo dT (Bio-rad) en un termociclador T100 (Bio-rad). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de dNTP, 0.5 mM de oligonucleótidos, 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Life Technologies, Texas, USA), 1 μl de cDNA y 1X de buffer de PCR ajustado con agua libre de nucleasas (DEPC; del inglés Diethyl pyrocarbonate) a un volumen final de 12.5 μl . Todas las PCR fueron realizadas en un termociclador T100 (Bio-rad). En todos los casos, se usaron condiciones estándar; una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguidos por 20 a 38 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55-56 °C por 30 s a 1 min y una extensión de 1 min a 72 °C, descartando la extensión final en todos los experimentos. Únicamente se modificó el número de ciclos, así como la temperatura y el tiempo de alineamiento dependiendo del gen. En la tabla 4, se muestran las secuencias y temperaturas de alineamiento utilizados en los ensayos de PCR semicuantitativo para cada uno de los genes. Para normalizar la expresión del ARNm, se midió la expresión del gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como referencia comparativa.

Se realizaron 4 experimentos independientes cada uno por triplicado ($n = 4$). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y teñido con bromuro de etidio (0.0005 mg/mL). El análisis densitométrico de la expresión de los amplicones de cada gen se realizó utilizando el software de libre acceso Image J.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la evaluar la expresión de genes proinflamatorios

Gen	Secuencia		Tm	No. de ciclos	Tamaño
GAPDH NM_017008.4	Forward (Fw)	5' - CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG - 3'	56°C, 1min	20	576 pb
	Reverse (Rv)	5' - CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG - 3'			
IL-1β NM_008361.4	Forward (Fw)	5' - TGA TGA GAA TGA CCT CTT CT - 3'	55 °C, 30 s	38	251 pb
	Reverse (Rv)	5' - CTTCTCAAAGATGAAGGAAA - 3'			
IL-6 NM_012589.2	Forward (Fw)	5' - TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC - 3'	55 °C, 30 s	28	76 pb
	Reverse (Rv)	5' - TTG GTC CTT AGC ACT CCT TC - 3'			
TNF-α NM_012675.3	Forward (Fw)	5' - ATG GGC TCC CTC TCA TCA GT - 3'	56 °C, 1 min	30	340 pb
	Reverse (Rv)	5' - CAA GGG CTC TTG ATG GCA GA - 3'			

6.5. Pruebas de citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron las líneas celulares Caco-2 (ATCC® HTB-37™) y HT-29 (ATCC® HTB-38™), ambas son líneas de células inmortalizadas de adenocarcinoma colorrectal humano. Como control de una línea celular no cancerosa se usaron fibroblastos humanos Detroit 548 (ATCC® CCL-116™). La línea celular HT-29 (ATCC® HTB-38™) fue amablemente donada por la Dra. Guadalupe González Ochoa del Departamento de Ciencias Químico-biológicas agropecuarias de la Universidad de Sonora, y las líneas Caco-2 (ATCC® HTB-37™) y Detroit 548 (ATCC® CCL-116™) fueron cordialmente donadas por el Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega del Departamento de Química de la UAA.

Para determinar la viabilidad celular se usó el ensayo MTT propuesto por Mosmann (1983) con algunas modificaciones. Las líneas celulares se sembraron en placas estériles NUNC de 96 pozos (Costar; Corning, NY, USA), a una densidad de 1.5×10^5 células/mL en medio DMEM/F-12 HAM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1 μ L/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (100 UI/mL-100 μ g/mL) y 1.2 g/L de NaHCO₃. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% O₂ durante 24 h. Transcurrido el tiempo, las líneas celulares fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *L. virginicum* (0.001, 0.01 y 0.1 mg/mL) dejando un grupo sin tratamiento como control negativo. Después de 24 o 48 h de incubación con los tratamientos, se añadieron 100 μ l de MTT (0.5 mg/mL) a cada pozo y se incubaron durante 4 h adicionales. Los cristales de formazan formados se disolvieron en isopropanol ácido 0.1N. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm con filtro de referencia de 655 nm, utilizando un lector de placas ELISA iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, U.S.A.). Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular

(células viables de cada tratamiento con extracto metanólico de *L. virginicum* en distintas concentraciones comparadas con las células no tratadas). Se realizaron 3 experimentos independientes por cada tiempo (24 y 48 h), cada uno por triplicado (n = 3).

6.6 Análisis estadístico de los datos

Se utilizó el software Graphpad Prism versión 7 (San Diego, CA, USA) para analizar estadísticamente los datos numéricos obtenidos. Para probar diferencias de los datos obtenidos de una variable en las pruebas de actividad antiinflamatoria se usó un Análisis de Varianza ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Bonferroni y para probar diferencias significativas en los datos obtenidos de las pruebas de actividad citotóxica se usó un Análisis de Varianza ANOVA de dos vías con prueba post-hoc de Dunnett. Los datos cuantitativos están representados como el promedio \pm el error estándar (S.E.M). Se consideraron estadísticamente significativos cuando la $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Rendimiento de los extractos orgánicos de *L. virginicum*.

Se obtuvo un peso final seco de 2.2826 g del extracto de hexano, 1.0345 g del extracto de diclorometano, 1.0482 g del extracto de acetato de etilo y 20.56 g del extracto metanólico, por lo que se produjo un rendimiento con respecto al peso total de los extractos orgánicos obtenidos (24.9253 g) del 9.15 % para el extracto de hexano, 4.15 % para el extracto de diclorometano, 4.20 % para el extracto de acetato de etilo y 82.48 % para el extracto metanólico de *L. virginicum*.

7.2. Análisis fitoquímico de los extractos orgánicos de tallo de *L. virginicum* por cromatografía en capa fina

En la Figura 2A se muestran las cromatografías en fase normal obtenidas con el sistema de elución diclorometano: metanol (95:5 v/v). Cuando se revelaron con luz UV a una longitud de onda de 365 nm se pudieron visualizar 2 bandas de color lila con valores $R_f = 0.38$ y 0.8 en los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo (Figura 2A1), lo que indica la presencia de clorofilas; no se observaron tonalidades lilas en el extracto metanólico. Mientras que con el revelador 4-hidroxibenzaldehído, que determina principalmente la presencia de terpenos y esteroides, no está clara la presencia de estos

compuestos en los extractos orgánicos, ya que se observó un barrido difuso color café-verdoso (Figura 2A2). La evidencia positiva para esta prueba son manchas café, lila y morado como lo describe (Wagner y Bladt, 1996). Aunque, con las cromatografías fase normal obtenidas con la fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3 v/v) y visualizadas bajo luz UV a 365 nm también se pudieron observar bandas de coloración lila indicando la presencia de clorofilas en los extractos de diclorometano y acetato de etilo. Las bandas de color azul sugieren la presencia de compuestos fenólicos en los extractos de diclorometano y acetato de etilo. Las bandas lilas y azules no se observan en el extracto metanólico (Figura 2B1). Con este mismo sistema de elución, pero reveladas con NP/PEG se pudo observar en el extracto metanólico una mancha de color naranja, lo cual indica presencia de flavonoides (Figura 2B2).

Adicionalmente, se realizó una cromatografía fase reversa con el sistema de elución agua: acetonitrilo (7:3 v/v) y revelada con NP/PEG. Al ser visualizada bajo luz UV de 365 nm, se pudieron observar bandas de color azul-verde y naranja en el extracto metanólico de *L. virginicum* (Figura 2C), colores característicos de los compuestos fenólicos y flavonoides, el color azul-verde relacionado con el estándar de referencia utilizado ácido clorogénico y el color naranja relacionado con los estándares glucósidos de quercetina, quercetina y rutina.

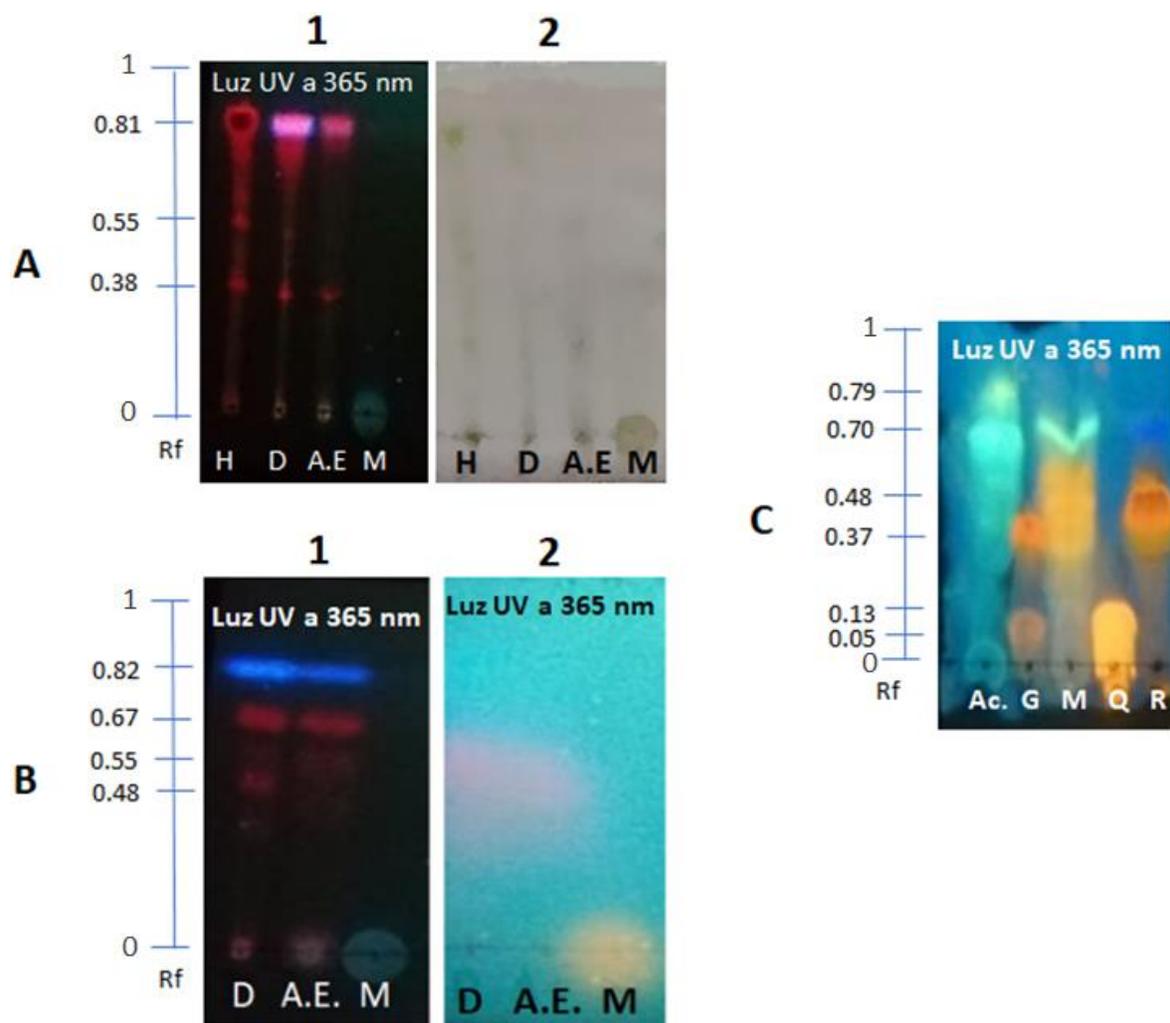


Figura 2. Análisis cualitativo del perfil fitoquímico presentes en los extractos orgánicos de *L. virginicum* mediante cromatografías. **A)** Cromatografías en fase normal con una fase móvil de diclorometano: metanol (95:5 v/v); **B)** Cromatografías en fase normal con una fase móvil de hexano: acetato de etilo (7:3 v/v) y **C)** Cromatografía en fase reversa con una fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3 v/v). H: extracto de hexano, D: extracto de diclorometano, A.E: extracto de acetato de etilo, M: extracto de metanol. Estándares de referencia Ac: ácido clorogénico, G: Glucósidos de quercetina, Q: Quercetina, R: Rutina.

7.3. Análisis fitoquímico del extracto metanólico de tallo de *L. virginicum* por cromatografía líquida de alta resolución.

En la figura 3, se muestran los perfiles cromatográficos del extracto metanólico de *L. virginicum*, que permitieron identificar los compuestos mayoritarios presentes en éste. En el cromatograma se puede observar la presencia de 5 compuestos mayoritarios con

tiempo de retención (Rt) de 8.487, 8.621, 8.819, 8.950 y 9.034 min (Figura 3A). Los espectros de absorción del compuesto con Rt = 8.487 y 8.621 min se muestran en la Figura 3B y C, respectivamente. Dichos espectros de absorción son característicos de flavonoides de acuerdo con Ugaz (1994). Sin embargo, se requieren más estudios para determinar si son flavonoides. Los espectros de absorción de los compuestos con Rt = 8.819, 8.950 y 9.034 min se muestran en la Figura 3D, E y F, no se pudo identificar la naturaleza de estos compuestos.

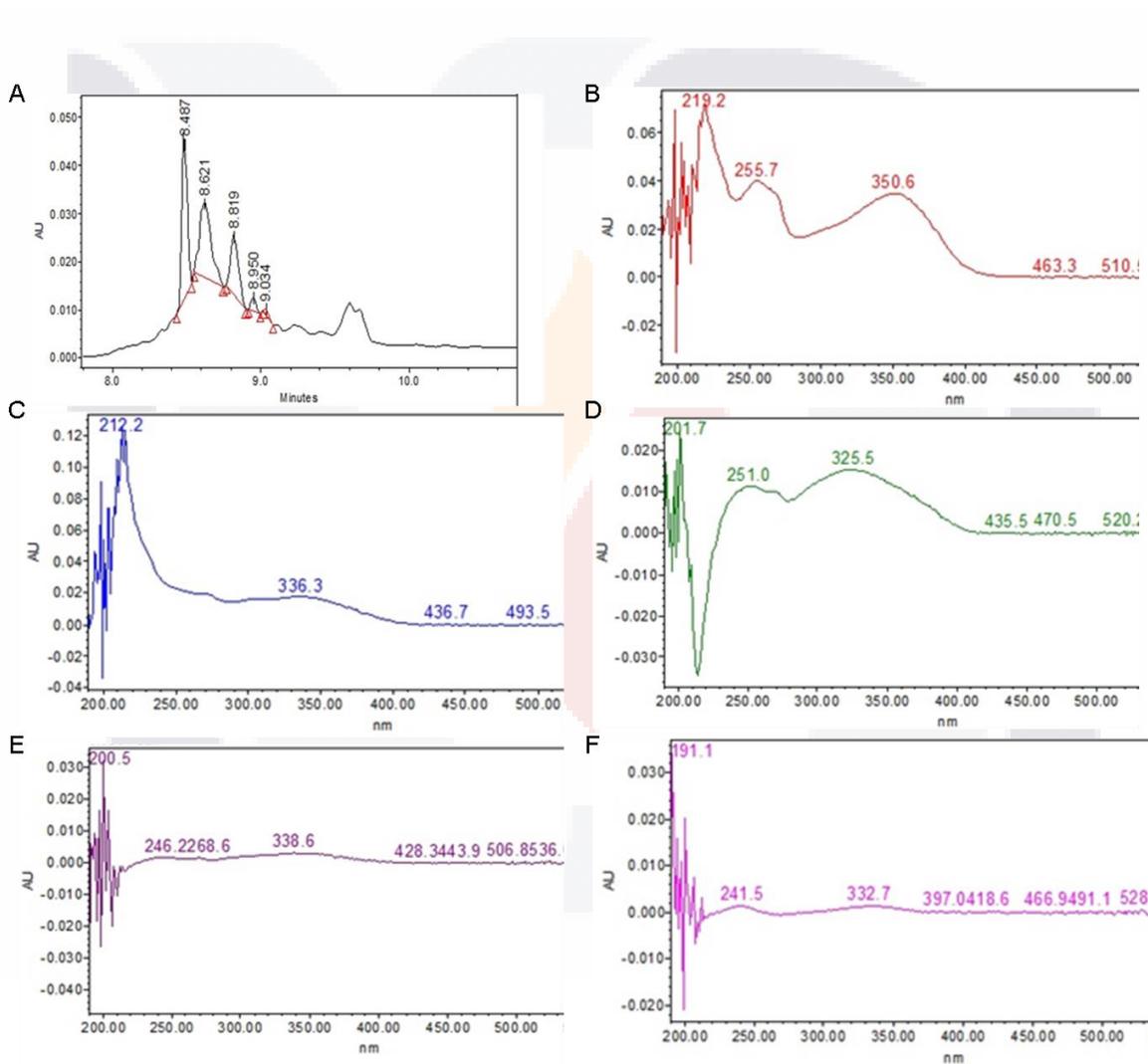


Figura 3. Perfil cromatográfico del extracto metanólico de *L. virginicum* mediante cromatografía líquida de alta resolución. **A)** Cromatograma del extracto metanólico de *L. virginicum* a una concentración de 2 mg/mL observado a una longitud de onda de 350 nm; **B), C), D), E)** y **F)** Espectros de U.V. de cada uno de los 5 compuestos mayoritarios observados en el cromatograma.

7.4 Análisis fitoquímico de las fracciones de los compuestos fenólicos del extracto metanólico de *L. virginicum*

Debido a que se identificaron mayoritariamente compuestos fenólicos en el extracto metanólico de *L. virginicum*, se seleccionó para un fraccionamiento químico mediante una cromatografía en columna abierta (CCA). En el que se recolectaron 89 fracciones, las cuales fueron reunidas según sus similitudes en el valor Rf y por grupos químicos identificados (Tabla 5).

El análisis por cromatografía en capa fina fase reversa, con el sistema de elución agua: acetonitrilo (7:3 v/v) y revelada con NP/PEG bajo luz ultravioleta de las fracciones reunidas, mostraron fluorescencia de color azul-verde en la fracción 5 (F5), mientras que en las fracciones 7, 10 y 13 (F7, F10 y F13) se observó fluorescencia de color naranja. Estos colores son característicos de flavonoides, el color naranja está relacionado con el estándar de referencia, rutina (Figura 4A).

Por otro lado, la cromatografía en capa fina fase reversa con el sistema de elución agua: acetonitrilo (7:3 v/v) y revelada con 4-hidroxibenzaldehído de las fracciones reunidas (Figura 4B), se pudieron observar una banda color café en la fracción 1 (F1) característica de los terpenos, una banda color violeta en la fracción 5 (F5) indicando la presencia esteroides, y bandas color amarillo en las fracciones 7,10 y 13 (F7, F10 y F13) indicando posiblemente la presencia de feniletanoides, como lo describe Wagner y Bladt (1996).

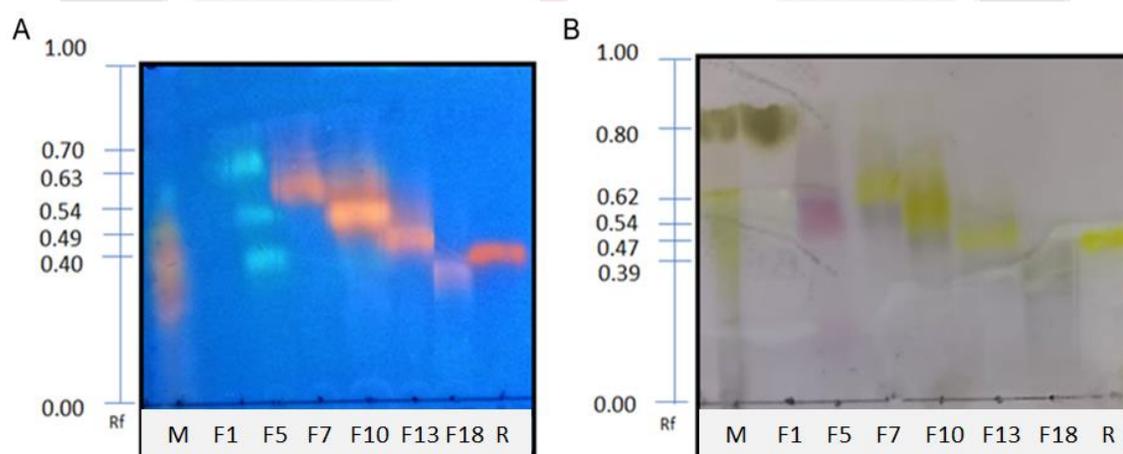


Figura 4. Cromatografías de capa fina en fase reversa de algunas fracciones reunidas obtenidas por separación en columna abierta. **A)** Cromatografía revelada con NP/PEG observada con luz UV a una longitud de 365 nm, en la que se muestran las bandas que revelaron flavonoides con diversos

R_f, lo cual indica que el extracto presenta diversos tipos flavonoides; **B)** Cromatografía revelada con 4-Hidroxibenzaldehído en la cual se observa que además de flavonoides, el extracto metanólico presenta otro tipo de compuestos, tales como terpenos y esteroides.

Tabla 5. Reuniones de las fracciones obtenidas en la columna abierta.

Reuniones de las fracciones	Nomenclatura	Observaciones (grupos de compuestos revelados)
1-9	F1	Azúcares
10	F2	Polifenol
11	F3	Polifenol
12-13	F4	Ácido clorogénico
14-17	F5	Compuestos polifenólicos y esteroides
18-20	F6	No identificado
21-22	F7	Flavonoides y terpenos
23-24	F8	Flavonoides
25-26	F9	Flavonoides
27-28	F10	Flavonoides y terpenos
29	F11	No identificado
30-32	F12	No identificado
33	F13	Flavonoides
34	F14	No identificado
35-36	F15	No identificado
37	F16	No identificado
38	F17	No identificado
39-40	F18	Terpenos
41	F19	No identificado
42-43	F20	No identificado
44-45	F21	Terpenos
46-48	F22	Terpenos
49-50	F23	Terpenos
51-53	F24	No identificado
54-58	F25	No identificado
59-76	F26	No identificado
77-85	F27	No identificado
86-87	F28	Esteroides
88-89	F29	Esteroides

7.5. Efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *L. virginicum*.

Para evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *L. virginicum* se analizó la expresión génica de tres citocinas proinflamatorias, TNF- α , IL-1 β e IL-6, en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y tratados con 0.1 mg/mL del extracto mediante la técnica PCR semicuantitativo y los productos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (Figura 5A). Los niveles del ARNm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no se incrementaron en los macrófagos estimulados con LPS en comparación con los macrófagos control (Figura 5B, C y D). No obstante, los macrófagos tratados con el extracto 1 hora antes de la estimulación con LPS mostraron una disminución estadísticamente significativa en la expresión de ARNm de TNF- α de aproximadamente un 30% respecto a los macrófagos estimulados con LPS (Figura 5B), lo que sugiere que el extracto metanólico de *L. virginicum* puede tener actividad antiinflamatoria al disminuir los niveles de esta citocina proinflamatoria. El extracto metanólico también tendió a disminuir la expresión génica de la IL-1 β e IL-6 en los macrófagos estimulados con LPS en comparación con los macrófagos estimulados sin tratar, pero este decremento no fue estadísticamente significativo (Figura 5C y D).

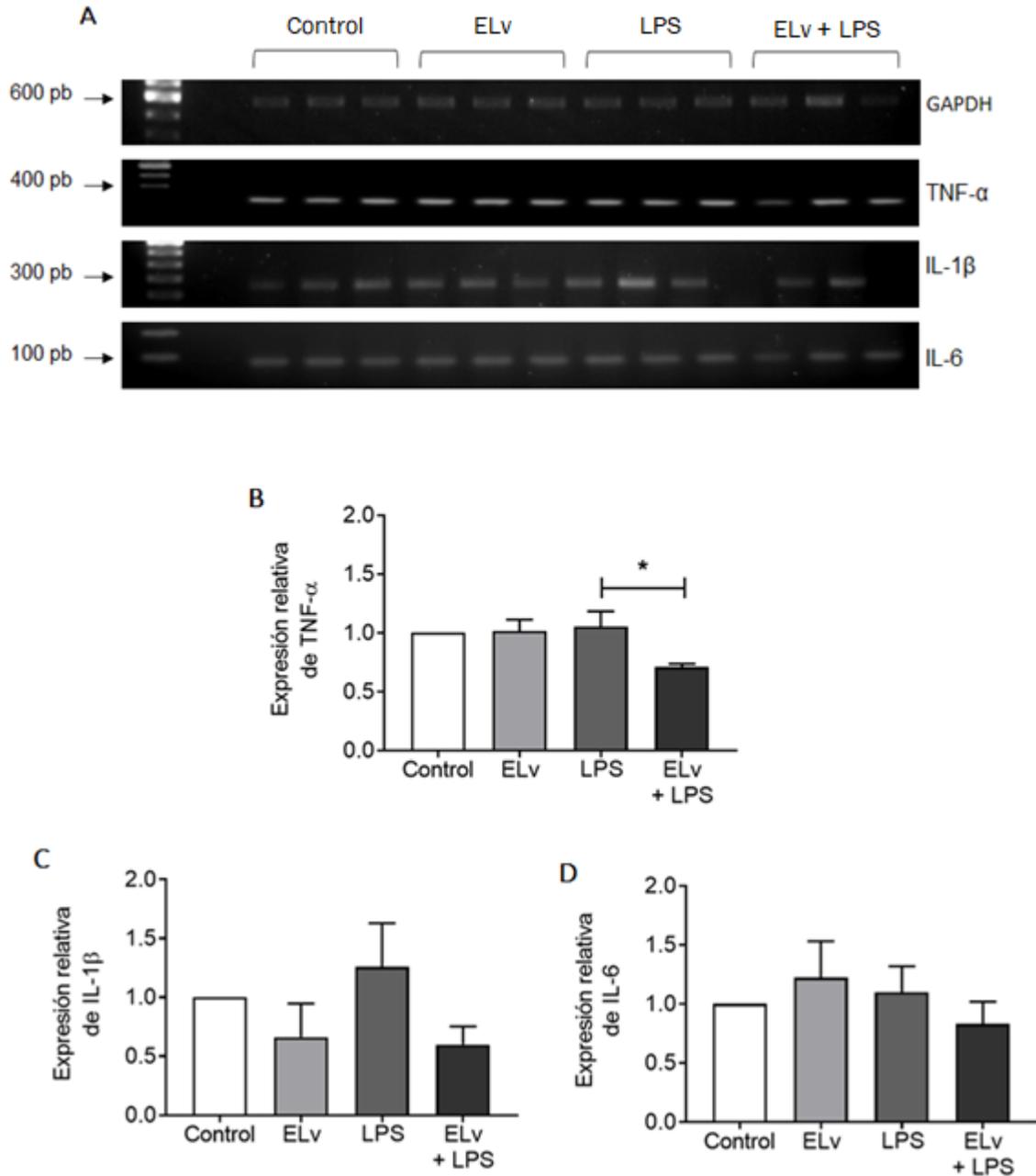


Figura 5. Efecto del extracto metanólico (0.1 mg/mL) de *L. virginicum* sobre la expresión de ARNm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 mg/mL). Geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.0005 mg/mL) mostrando los productos amplificados mediante PCR del ADNc de IL-6 (76 pb), TNF- α (334 pb), IL-1 β (251 pb) y GAPDH (576 pb) (**A**). Las gráficas representan el análisis semicuantitativo de la intensidad de las bandas de IL-6 (**B**), TNF- α (**C**) y IL-1 β (**D**). En todos los experimentos, la amplificación de GAPDH se realizó en paralelo para normalizar las muestras. Las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M obtenidos de 4 experimentos independientes por triplicado. * $P < 0.05$ denota estadísticamente significativo por una ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Bonferroni. ELv: Extracto de *L. virginicum*; LPS: lipopolisacárido; ELv + LPS: Extracto de *L. virginicum* más lipopolisacárido.

7.6. Efecto citotóxico del extracto metanólico de *L. virginicum*.

Para evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico del tallo de *L. virginicum* se hicieron ensayos de MTT usando dos líneas celulares de cáncer de colon, Caco-2 y HT-29. Los resultados mostraron que el extracto redujo el porcentaje de viabilidad de la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2 de una manera dependiente de la concentración a las 24 y 48 h (Figura 6A y B). Se observó una actividad citotóxica altamente significativa con una concentración 0.1 mg/mL de extracto, mostrando una reducción en la viabilidad del 20% a las 24 h (Figura 6A) y del 33.5% a las 48 h (Figura 6B).

El extracto metanólico de *L. virginicum* no tuvo efecto citotóxico en la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 a las 24 y 48 h (Figura 6C y D), ni en la línea no cancerosa de fibroblastos humanos Detroit 548 (Figura 6E y F). Sorpresivamente, el extracto metanólico de *L. virginicum* aumento significativamente la viabilidad celular en los fibroblastos humanos Detroit 548 a una concentración de 0.001 mg/mL a las 24 h (Figura 6E) con respecto al control, sin embargo, este efecto no fue dependiente de la concentración y no se observó a las 48 h en todas las concentraciones probadas, por lo que se requiere hacer más estudios al respecto para estar seguros de este aumento del porcentaje en la viabilidad celular.

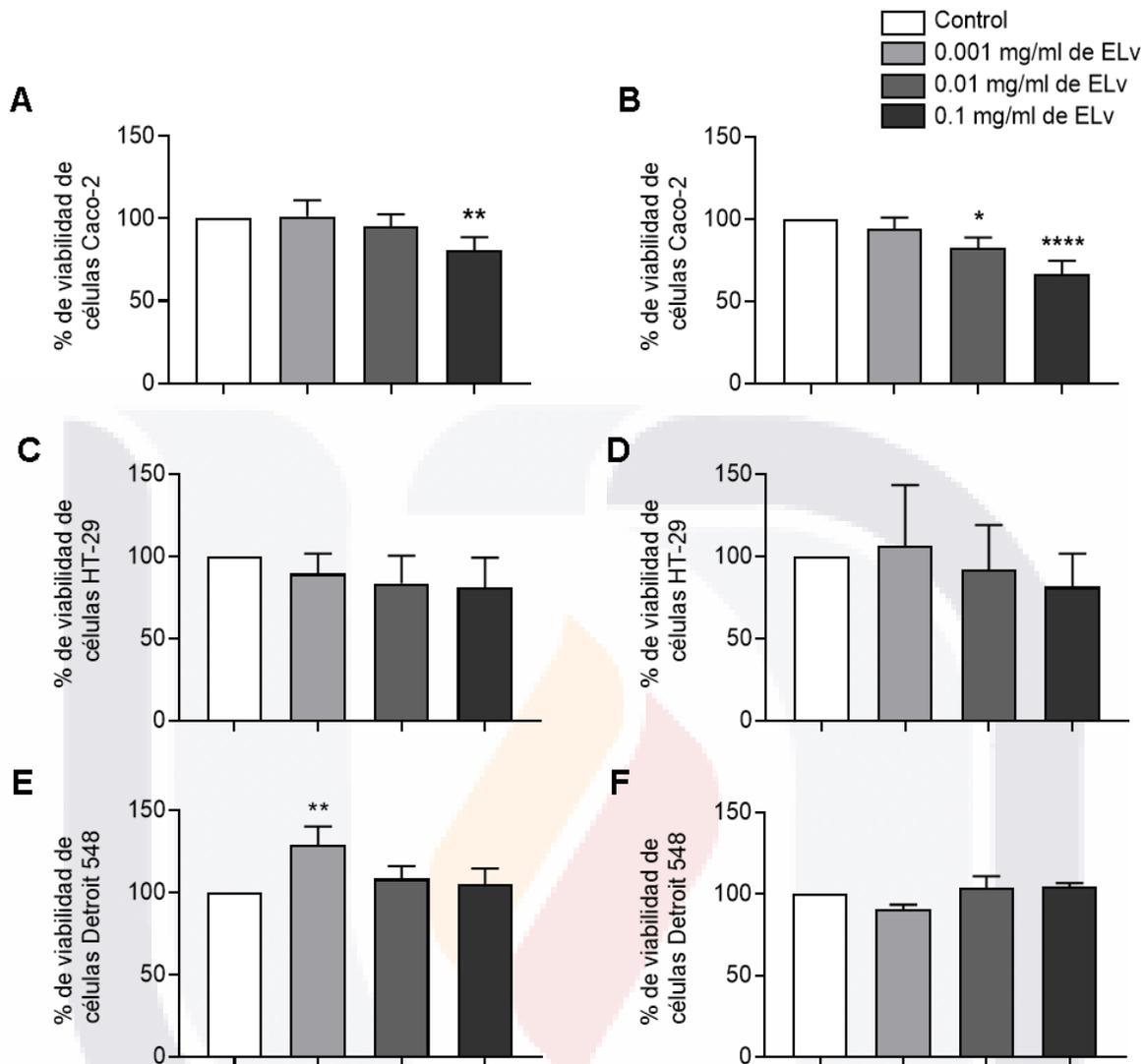


Figura 6. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre la viabilidad celular usando el ensayo de MTT. Actividad citotóxica del extracto sobre la línea celular Caco-2 a las 24 (A) y 48 (B) horas de incubación. El extracto metanólico no mostró efecto citotóxico sobre la línea celular HT-29 en ninguna de las concentraciones probadas a las 24 (C) y 48 (D) horas de incubación. Efecto del extracto metanólico sobre la línea celular de fibroblastos Detroit 548 a las 24 (E) y 48 h (F). Las líneas verticales representan el error estándar \pm SEM de la media de cada uno de los tratamientos. Se realizaron tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. *P < 0.05, **P \leq 0.005 y ****P \leq 0.0001 denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara tratamiento vs control; por una prueba ANOVA de dos vías con una prueba post-hoc de Dunnett.

8. DISCUSIÓN

El cribado de medicamentos a base de plantas puede conducir al descubrimiento de nuevos agentes antiinflamatorios y anticancerígenos, los cuales pueden ser una fuente alternativa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y cancerosas que son difíciles de tratar y representan un reto para los médicos clínicos debido a que las terapias actuales son poco eficientes y muy costosas. En este sentido, en la actualidad existe un creciente interés por las plantas medicinales como una alternativa de tratamiento debido a su bajo costo y a que presentan una gran variedad de compuestos químicos que pueden tener efectos farmacológicos en humanos (Vélez-Terranova et al., 2014).

La planta *L. virginicum* se ha utilizado tradicionalmente desde la antigüedad como remedio para procesos inflamatorios (García-Regalado, 2014) y en estudios previos se ha demostrado la presencia de glucosinolato de bencilo, cumarinas, ácido cinámico, apigenina (4',5,7-thihidroxiflavona) y flavonoides en dicha planta (Calzada et al., 2003; Martínez-Castro, 2016). En el presente estudio, el análisis fitoquímico mediante CCF y CLAR del extracto metanólico de *L. virginicum* indican la presencia de compuestos polifenólicos similares al ácido clorogénico y flavonoides, así como terpenos y esteroides. Se ha demostrado que dichos compuestos pueden tener una gran variedad de efectos biológicos, entre los que se destaca la actividad antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena (Gerritsen et al., 1995; Patel et al., 2007). Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido clorogénico parece ser activo contra procesos oxidativos e inflamatorios (Liang and Kitts, 2015) y tiene cierta actividad reguladora sobre el sistema inmune (Park, et al., 2015). Recientemente, se ha identificado al ácido clorogénico como un fármaco potencial para el tratamiento del cáncer y ha sido aprobado por la administración de drogas y alimentos de China (CFDA) primero para los ensayos clínicos de fase I (NCT02728349, abril de 2016) y luego fase II (NCT03758014, noviembre de 2018) en pacientes con glioma (Huang, et al., 2019). Por otra parte, se ha demostrado que muchos flavonoides tienen actividad antioxidante, capacidad de captación de radicales libres, prevención de enfermedades coronarias, actividades hepatoprotectoras, antiinflamatorias y anticancerígenas (Kumar and Pandey, 2013).

En el presente estudio, se evaluó el posible efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre una línea celular de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS midiendo la expresión génica de tres citocinas proinflamatorias, TNF- α , IL-1 β e IL-

6, las cuales tienen un papel relevante en los trastornos inflamatorios, siendo los principales mediadores de respuesta biológica a los estímulos de los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Gilmore, 2006; Sugimoto et al., 2016). Los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión génica de TNF- α en los macrófagos estimulados con LPS y tratados con 0.1 mg/mL del extracto metanólico una hora antes de ser estimulados en comparación con los macrófagos no tratados y estimulados. También se vio una tendencia de menor expresión de IL-1 β e IL-6 en las células tratadas con el extracto en comparación con los macrófagos estimulados sin tratar, lo que sugiere por primera vez la capacidad del extracto metanólico de *L. virginicum* para disminuir los niveles del ARNm de estas citocinas proinflamatorias en un modelo *in vitro*.

Cabe destacar que los niveles del ARNm de las tres citocinas proinflamatorias analizadas no se vieron incrementados en los macrófagos estimulados con LPS sin tratamiento, como lo han demostrado otros estudios (Bribi, et al., 2015). La discrepancia en estos resultados se puede deber a que ellos vieron los niveles de expresión a las 18 horas de haber estimulado mientras nosotros los medimos a las 24 horas de la estimulación, probablemente para ese tiempo los niveles de ARNm ya no se ven incrementados. Por otra parte, también proponemos medir los niveles de expresión de la proteína para estar seguros de que estas citocinas incrementan con la estimulación de LPS en los macrófagos RAW 264.7 y asegurarnos de que estén activos.

El ensayo colorimétrico MTT se ha usado por muchos investigadores para determinar el crecimiento y viabilidad celular (Sylvester, 2011). Por lo que se utilizó en este trabajo para determinar el efecto citotóxico del extracto metanólico de *L. virginicum*. El resultado de este ensayo mostró que el extracto tuvo una reducción significativa en la viabilidad de la línea celular cancerosa Caco-2 de una manera dependiente de la concentración, pero no así para la línea celular HT-29. Interesantemente, ambas líneas celulares Caco-2 y HT-29 provienen de adenocarcinoma colorrectal humano, sin embargo, el extracto metanólico de *L. virginicum* mostró una selectividad celular al tener actividad citotóxica únicamente sobre las células Caco-2. Una posible explicación para esta citotoxicidad diferencial del extracto es que las células HT-29 muestran un fenotipo de diferenciación epitelial mucosecretora mientras que las Caco-2 tienen un fenotipo epitelial columnar absorbente, el cual destaca la presencia de un borde en cepillo mejor definido que en poblaciones diferenciadas de HT-29 (Allen et al., 1991; Meane & O'Driscoll, 1999). En apoyo a esta suposición, se ha demostrado que las poblaciones de HT-29 diferenciadas a un fenotipo secretor de moco

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

por la exposición a concentraciones crecientes de metotrexato o 5-fluorouracilo resultaron espontáneamente más resistentes a estos dos fármacos anticancerosos que la población de células absorbentes no diferenciadas (Lesuffleur, et al., 1998). Además, varios autores han destacado la alta capacidad de la línea celular Caco-2 en absorber moléculas pequeñas altamente difusibles a las microvellosidades, debido a una falta casi completa de moco (Walter et al., 1996; Artursson et al., 2001; Menon & Barr, 2003), lo que aumenta la posibilidad de que el extracto metanólico haya podido acceder fácilmente y ejercer su efecto citotóxico en la línea celular Caco-2.

Contrario a nuestros resultados de MTT en la línea celular HT-29, Alzamora y colaboradores (2007) mostraron que el extracto metanólico de *Lepidium peruvianum* Chacón (Brassicaceae) tuvo actividad citotóxica en la línea celular HT-29. Sin embargo, en este estudio no hicieron un análisis fitoquímico del extracto. La explicación a esta discrepancia puede ser por varias razones, la primera se debe a que son especies diferentes, la segunda a que el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como los factores ambientales externos (luz, radiación UV, temperatura), influyen sobre la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios (Li, 2020), *L. peruvianum* es una planta que crece en los Andes y se cultiva en el piso bioclimático llamado Puna, mientras que *L. virginicum* es una planta silvestre nativa de Centroamérica, por lo que dichas condiciones ambientales pudieran estar dando diferentes compuestos bioactivos con diferentes efectos biológicos y la tercer razón es debido a que las condiciones experimentales no fueron las mismas.

El extracto metanólico de *L. virginicum* no tuvo actividad citotóxica sobre la línea celular no cancerosa Detroit 548, la cual proviene de fibroblasto humanos. Este resultado sugiere que el extracto metanólico de *L. virginicum* afecto diferencialmente a fibroblastos humanos Detroit 548 y células cancerosas Caco-2, ya que únicamente inhibió la supervivencia de Caco-2. Por lo que resulta importante determinar el potencial del extracto como agente anticancerígeno, aunque, es necesario contar previamente con los datos toxicológicos para conocer la dosis segura del extracto que podrá ser empleada en estudios contra el cáncer *in vivo*.

Sorpresivamente, el extracto metanólico de *L. virginicum* aumento significativamente el número de células de los fibroblastos humanos Detroit 548 a una dosis de 0.001 mg/mL en un periodo de 24 h, sin embargo, este efecto no se observó con concentraciones crecientes del extracto, por lo que es necesario hacer más estudios con concentraciones más bajas

para determinar si este efecto es dependiente de la concentración y de esta manera establecer si hay un efecto proliferativo. La estimulación del crecimiento de fibroblastos por el extracto metanólico de *L. virginicum* podría ser de utilidad para la cicatrización de heridas. Los fibroblastos juegan un papel fundamental en los procesos de cicatrización, caracterizado por una respuesta vascular y coagulación de la sangre, reepitelización, formación de tejido de granulación y remodelación de la matriz extracelular (Bainbridge, 2013). Al respecto, existen varios estudios que demuestran que los extractos de plantas pueden disminuir las lesiones en la piel (Sangiovanni, et al., 2019; Givol et al., 2019; Teplicki, et al., 2018). Sin embargo, se requieren más estudios para determinar si el extracto metanólico de *L. virginicum* tiene efectos sobre la proliferación, migración y cicatrización de heridas.

9. CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico del extracto metanólico de *L. virginicum* indica la presencia de compuestos polifenólicos similares al ácido clorogénico y flavonoides, así como terpenos y esteroides.

Se demostró que el extracto metanólico de *L. virginicum* disminuyó significativamente la expresión génica de la citocina proinflamatoria TNF- α en macrófagos RAW 264.7, lo que sugiere que el extracto puede tener propiedades antiinflamatorias.

El presente estudio demostró que el extracto metanólico de tallos de la planta medicinal tradicional *L. virginicum* tiene actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2 de una manera dependiente de la concentración, pero no así para la línea celular HT-29, ni para la línea celular de fibroblastos Detroit 548, lo que indica que el extracto metanólico tiene una citotoxicidad selectiva.

El extracto metanólico de *L. virginicum* aumentó significativamente el número de células de los fibroblastos humanos Detroit 548, lo cual sugiere un posible efecto proliferativo que pudiera ser útil para la cicatrización de heridas, sin embargo, se requieren más estudios para determinar este efecto.

El hallazgo general sugiere que esta planta podría ser una fuente potencial de nuevos compuestos antiinflamatorios y anticancerígenos para el posible tratamiento y/o desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer.

GLOSARIO

Anemia: Estado patológico producido por una disminución del contenido de hemoglobina en la sangre y, generalmente, de los glóbulos rojos.

Citostático: Dicho de un medicamento que frena la proliferación celular, por lo que se usa en tratamientos antitumorales.

Escotadura: Seno poco profundo que se forma en el ápice de los órganos laminares

Glabro/a: Denominación dada a organismos o sus partes que no presentan tricomas

Hoja aserrada: Se dice de la hoja que tiene el borde dentado inclinado hacia la punta.

Hoja Caulinar: Se dice de la hoja que se origina directamente del tallo.

Hoja Pinnatífida: Hoja con nerviación pinnada y con el limbo dividido en lóbulos que a lo máximo llegan a la mitad de la distancia entre el margen de la hoja y el nervio medio.

Leucopenia: Descenso del número de leucocitos (glóbulos blancos) en la sangre inferior a lo normal.

Marginada/o: Se dice de hojas u otros elementos de la planta que tienen reborde

Neuropatía periférica: Insuficiencia de los nervios que llevan la información hasta y desde el cerebro y la médula espinal, lo cual produce dolor, pérdida de la sensibilidad e incapacidad para controlar los músculos.

Neutropenia: Descenso del número de neutrófilos en la sangre inferior a lo normal.

Orbicular: Que tiene forma redonda o circular.

Pinnada: Nerviación que está constituida por un nervio principal del que se disponen varios nervios laterales secundarios a ambos lados.

Silicua: Nombre que recibe el fruto seco dehiscente o cápsula, cuya longitud mide al menos aproximadamente tres veces más que la anchura.

Trombocitopenia: Disminución patológica del número de trombocitos o plaquetas de la sangre.

REFERENCIAS

Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud*, 14, 390-395.

Allen, J. D., Martin, G. P., Marriott, C., Hassan, I., & Williamson, I. (1991). Drug transport across a novel mucin secreting cell model: comparison with the Caco-2 cell system. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 43, 63.

Alzamora, L., Colona, E., Acero de Mesa, N., Galán de Mera, A., Muñoz-Mingarro, D., Linares, F., Domínguez, M., & Alvarez, E. (2007). Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 219-222.

Angel, A. (1999). Estudio fitoquímico preliminar, toxicidad y determinación de la actividad antitumor de extractos etanólicos de *Cucumis dipsaceus*. *Química farmacéutica*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica. Bogotá; 81.

Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 27-43.

Bainbridge P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of wound care*, 22(8), 407–412. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>

Bak, S., Paquette, S.M., Morant, M., Morant, A.V., Saito, S., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Jørgensen, K., Osmani, S., Simonsen, H.T., Pérez, R.S., van Heeswijck, T.B., Jørgensen, B., & Møller, B.L. (2006). Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochem Rev*, 5, 309–329. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9033-1>

Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products. Impact of processing. *Frontiers in nutrition*, 3, 1-12.

Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., & Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *J. Plant Growth Regul.* 32(1), 216-232.

Baskar, R., Rajeswari, V., & Sathish-Kumar, T. (2007). *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian J Exp Biol*, 45, 480 - 485.

Bell, L., & Wagstaff, C. (2014). Glucosinolates, myrosinase hydrolysis products, and flavonols found in rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4481-4482.

Bell, L., & Wagstaff, C. (2017). Enhancement of glucosinolate and isothiocyanate profiles in Brassicaceae crops: Addressing challenges in breeding for cultivation, storage, and consumer-related traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(43), 9379-9403.

Berlin, E.A., & Berlin, B. (1995). *Medical Ethnobiology of the Highland of Chiapas México. The Gastrointestinal Diseases*. Princeton University Press: Princeton, NJ; 183–189.

Birt, D.F., Hendrich, S. & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90, 157-177.

Bribi, N., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Maiza, F., Utrilla, M. P., Rodriguez-Cabezas, M. E., & Galvez, J. (2015). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Total Alkaloid Extract from *Fumaria capreolata*. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2015, 736895. <https://doi.org/10.1155/2015/736895>

Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M.L., Leibman, M., (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance

Buchanan, B.B., Grissem, W., & Jones, R.L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.

Calderón G. & Rzedowski J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Segunda edición. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F. P. 204.

Calzada, F., Barbosa, E., & Cedillo-Rivera, R. (2003). Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy research: PTR*, 17(6), 618–619. <https://doi.org/10.1002/ptr.1210>.

Cenellier, M. (1999). *La alergia y la homeopatía*. Editorial Paidotribo. Primera Edición. Barcelona, España. p. 30.

Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. B. (2008). *In vitro* activity of almond skin polyphenols for scavenging free radicals and inducing quinone reductase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4427-4434.

Chen, C. Y., Lapsley, K., & Blumberg, J. (2006). A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2245-2250.

Chen, Y.C., Shen, S.C., Chen, L.G., Lee T.I., & Yang, L.L. (2001). Wogonin, baicalin and baicalein. Inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol*, 61, 1417-1427.

Contreras, J., Calderon, L., Guerra, E., & García, B. (2010). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res Int*. doi: 10.1016/j.foodres.2010.11.00.

Das, D.K. (1994). Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol*, 234, 410-420.

Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P.; & Schettino, O. (1994). Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry*, 49, 347–349. doi: 10.1016/0308-8146(94)90003-5.

Edwards, S., Tadesse, M., Demissew, S., & Hedberg, I. (2000). Flora de Etiopía y Eritrea. Herbario Nacional. Universidad de Addis Abeba, EE. UU. 2: 121 – 154.

Eisenreich, W., Rohdich, F., & Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2), 78–84. doi:10.1016/s1360-1385(00)01812-4

Floegel, A., Kimb, D., Chung, S., Koo, S.I., Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal*. doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008.

García-Regalado, G. (2014). Plantas medicinales de Aguascalientes. Aguascalientes, México. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes ISBN 978-607-8359-83-7, pag. 84.

Gerritsen, M.E., Carley, W.W., Ranges, G.E., Shen, C.P., Phan, S.A., Ligon, G.F., & Perry, C.A. (1995). Flavonoids Inhibit Cytokine-induced Endothelial Cell Adhesion Protein Gene Expression. *Am J Pathol*, 147, 278-292.

Gill, V., & Macleod, A.J. (1980). Studies on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* seed extracts. *Phytochemistry*. 19(7): 1369-1374.

Gilmore TD. (2006). Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-6684.

Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., & Harats, M. (2019). A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 27(5), 548–561. <https://doi.org/10.1111/wrr.12737>

Gleadow, R.M., & Møller, B.L. (2014) Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annu Rev Plant Biol* 65, 155–185. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040027>

Gómez, H., González, K., & Domingo, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.10(3): 182-217.

Guzmán-Gutiérrez, S.L., Reyes-Chilpa, R., & Bonilla-Jaime, H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 591-608.

Halkier, B.A. & Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol*. 57, 303–333

Harborne, J.B., & Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 52, 481-504.

Hardigree, A.A. & Epler, J.L. (1978). Comparative mutagenesis of plants flavonoids in microbial system. *Mutation Res*, 58, 231.

Heller, W. & Forkmann, G. (1993). Biosynthesis, in *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* (Harbone JB). Chapman and Hall Ltd., London, 499-535.

Huang, S., Wang, L. L., Xue, N. N., Li, C., Guo, H. H., Ren, T. K., Zhan, Y., Li, W. B., Zhang, J., Chen, X. G., Han, Y. X., Zhang, J. L., & Jiang, J. D. (2019). Chlorogenic acid effectively treats cancers through induction of cancer cell differentiation. *Theranostics*, 9(23), 6745–6763. <https://doi.org/10.7150/thno.34674>

Hunter, W. N. (2007). The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21573–21577. doi:10.1074/jbc.r700005200

Isabelle, M., Lee, B.L., Lim. M.T., Koh, W., Huang, D., & Ong, C.N. (2010). Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chem*, 123, 77–84.

Isaza, M. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 1(33), 13-18.

Jones, P.R., Møller, B.L., Høj, P.B. (1999). The UDP-glucose: phydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. *J Biol Chem*, 274, 35483–35491. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35483>

Kalemba, D. & A. Kunicka (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*, 10(10), 813-29.

Kishimoto, S., Sato, M., Tsunematsu, Y., & Watanabe, K. (2016). Evaluation of biosynthetic pathway and engineered biosynthesis of alkaloids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(8), 1078. <https://doi.org/10.3390/molecules21081078>

Kubo, M., Matsuda, H., Tanaka, M., Kimura, Y., Okuda, H., Higashino, M., Tani, T., Namba, K., Arichi, S. (1984). Studies on *Scutellaria radix*: VII. Antiarthritic and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoids components from *Scutellariae radix*. *Chem Pharm Bull*, 32, 2724-2729.

Kühnau, J. (1976). The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24, 117-190.

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Lako, J., Trenerry, V.C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., & Premier, R. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables, and other readily available foods. *Food Chem*, 101, 1727-1741.

Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, & R., Kanner, J. (1999). pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem*. 47, 67-70.

Lee, M.R., (2011). The history of Ephedra (ma-huang). J. R. Coll. Phys. Edinb, 41, 78–84. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2011.116>

León, C.J., Gómez, S.M., Morantes, S.J., Cordero C.P., & Ancízar, F.A. (2006). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para la valoración de la citotoxicidad *in vitro*. Biomédica, 26:161-168. doi: 10.7705/biomedica.v26i1.1405.

Lesuffleur, T., Violette, S., Vasile-Pandrea, I., Dussaulx, E., Barbat, A., Muleris, M., & Zweibaum, A. (1998). Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. International Journal of Cancer, 76(3), 383–392. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19980504)76:3<383::aid-ijc16>3.0.co;2-c

Li, G., Ammermann, U., & Quirós, C. F. (2001). Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. Economic Botany, 55(2), 255–262. doi:10.1007/bf02864563.

Li, J., Hu, D., Song, X., Han, T., Gao, Y., & Xing, Y. (2017). The role of biologically active ingredients from natural drug treatments for arrhythmias in different mechanisms. BioMed Res. Int. 4615727. doi: 10.1155/2017/4615727.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant physiology and biochemistry: PPB, 148, 80–89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006

Liang N, Kitts DD. (2015). Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. Nutrients. 8: e16

Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 47-65.

Loraine S. and Mendoza-Espinoza J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 41(4):18-27.

Lu, J.J., Bao, J.L., Chen, X.P., Huang, M., & Wang, Y.T. (2012). Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 485042. <https://doi.org/10.1155/2012/485042>.

Martínez M. (1996). Las plantas medicinales de México, Editorial Botas, México.

Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Martínez-Castro, J.R. (2016). Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante de extractos de hoja, tallo y raíz de la especie *Lepidium virginicum* L. en sistema *in vitro* e *in situ*. Tesis Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache.

Masarovičová E. and Kráľová K. (2007). Medicinal Plants-Past, Nowadays, Future. Acta Horticulturae, (749), 19-27. doi:10.17660/actahortic.2007.749.1.

McFarlane, I.J., Lees, E.M., & Conn, E.E. (1975). The *in vitro* biosynthesis of dhurrin, the cyanogenic glycoside of *Sorghum bicolor*. J. Biol. Chem. 250, 4708-13.

Menon, R. M., & Barr, W. H. (2003). Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified ussing chambers. Biopharmaceutics & drug disposition, 24(7), 299-308. doi:10.1002/bdd.366

MERCK, (1972) Reactivos de coloración para cromatografías en capa fina y en papel, Editorial Merck, Darmstadt, Alemania.

Metodiewa, D., Kochman, A., & Karolczak, S. (1997). Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl ethers of flavaone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid rutin action. IUBMB Life, 41(5), 1067-1075.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev, 52, 673-751

Møller, B.L. (2010) Functional diversifications of cyanogenic glucosides. Curr Opin Plant Biol. 13, 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.pbi>.

Møller, B.L., & Conn, E.E. (1979). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants: Nhydroxytyrosine as an intermediate in the biosynthesis of dhurrin by *Sorghum bicolor* (L.) Moench. J. Biol. Chem., 254, 8575-83.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation a cytotoxicity assays. Journal of immunological Methods. 65, 55-63.

Muhammad, I., Zhaoa, J., Dunbaralkhlas, D., & Khana, I. (2002). Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. Phytochemistry, 59, 105-110.

Muñoz, F. (1996). Plantas medicinales en España: estudio, cultivo y procesado. (1ª ed., Vol. 2, pp. 22-24). Madrid: Mundi-Prensa.

Newman, D.J., & Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod. 70(3), 461-77.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. J Nat Prod, 66, 1022-1037.

Newman, J.D., & Chappell, J. (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 34, 95-106.

Ogah, O., Watkins, C. S., Ubi, B. E., & Oraguzie, N. C. (2014). Phenolic compounds in *Rosaceae* fruit and nut crops. Journal of agricultural and food chemistry, 62(39), 9369-9386.

Oliveira, M.A., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos actuales. Interciencia, 30, 453-459.

Oliveira-Miranda M.A., Velázquez, D., Bermúdez A. (2005). La investigación etnobotánica sobre las plantas medicinales. *Revista de Ciencia y Tecnología de América*. 30(8), 453-459.

Osuna-Torres L., Tapia-Pérez M. E. & Aguilar-Contreras A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Editorial Universitat de Barcelona. 1 ed. ISBN 84-475-2986-X.

Pahwa R, Goyal A, Bansal P, et al. (2020). Chronic Inflammation. EE. UU.: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>

Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, E47. doi:10.1017/jns.2016.41

Park SH, Baek SI, Yun J, Lee S, Yoon DY, Jung JK. et al. (2015). IRAK4 as a molecular target in the amelioration of innate immunity-related endotoxic shock and acute liver injury by chlorogenic acid. *J Immunol*.194:1122–30.

Patel, D., Shukla, S., & Gupta, S. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review) *International Journal of Oncology*. 30(1), 233-245. doi: 10.3892/ijo.30.1.233.

Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Pattanaik, S., & Yuan, L. (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(11), 1236–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.09.006>

Pérez-Gastell, P.L., & Pérez de Alejo, J.L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Med Milit*. 29, 192-8.

Pérez-Urria Carril, Elena y Ávalos García, Adolfo (2009) *Metabolismo secundario de plantas*. REDUCA, 2 (3). pp. 119-145.

Pičmanová, M., Neilson, E.H., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Agerbirk, N., Gray, C.J., Flitsch, S., Meier, S., Silvestro, D., Jorgensen, K., Sanchez-Perez, R., Møller, B.L., & Bjarnholt, N. (2015). A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species. *Biochem J*, 469, 375–389. <https://doi.org/10.1042/BJ20150390>

Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewan, J., O'brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* specie. *J. Agric. Food Chem*. 46, 2686-2693.

Radwan, H.M., El-Missiry, M.M., Al-Said, W.M., Ismail, A.S., Abdel, K.A., & Seif-El-Nasr, M.M. (2007). Investigación de los glucosinolatos de *Lepidium sativum* que crecen en Egipto y su actividad biológica. *Res. J. Med. Medicina. Sci*. 2(2), 127-132.

Redovnikovic´, I.R., Textor, S., Lisnié, B., & Gershenzon, J. (2012). Expression pattern of the glucosinolate side chain biosynthetic genes MAM1 and MAM3 of *Arabidopsis thaliana* in different organs and developmental stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 77-83.

Restifo, N.P., Dudley, M.E., & Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*, 12, 269-281.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. *Actividad antioxidante. Alimentaría*, 29-40.

Sangiovanni, E., Fumagalli, M., Pacchetti, B., Piazza, S., Magnavacca, A., Khalilpour, S., Melzi, G., Martinelli, G., & Dell'Agli, M. (2019). *Cannabis sativa* L. extract and cannabidiol inhibit *in vitro* mediators of skin inflammation and wound injury. *Phytotherapy research: PTR*, 33(8), 2083–2093. <https://doi.org/10.1002/ptr.6400>

Sauté-Gracia, M.T., Heinonen, M., & Frankel, E.N. (1997). Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3362-3367.

Schramm, D.D., & German, J.B. (1998). Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *J. Nutr. Biochem*, 9, 560-566.

Setty, A.R., & Sigal, L.H. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars Arthritis Rheum*, 34, 773-784.

Shimada, M., & Conn, E.E. (1977). The enzymatic conversion of p-hydroxyphenylacetaldoxime to p-hydroxymandelonitrile. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 199-207.

Silva-Belmares, Y., Rivas-Morales, C., Viveros-Valdez, E., & De la Cruz-Galicia, G. (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots. *Pakistan J of Biol Sci.* 17(5): 748-750. doi: 10.3923/pjbs.2014.748.750.

Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., & Halkier, B.A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates - Gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283-290.

Speijers, G. (1993). Cyanogenic Glycosides, WHO Food Additives. *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Naturally Occurring Toxicants.* 30, 299-337.

Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?. *Frontiers in Immunology*, 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00160.

Sujatha, R., & Srinivas, L. (1995). Modulation of lipid peroxidation by dietary components. *Toxicology in Vitro*, 9, 231-236.

Sylvester PW. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In: *Drug Design and Discovery*. Edn. New York: Springer 157-168.

Tenorio, P. (2009) Malezas de México. Ficha - *Lepidium virginicum* L. [Figura]. 11/11/19. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/lepidium-virginicum/fichas/pagina1.htm>.

Teplicki, E., Ma, Q., Castillo, D. E., Zarei, M., Hustad, A. P., Chen, J., & Li, J. (2018). The Effects of Aloe vera on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 30(9), 263–268.

Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S.W., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1994). Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanindin 3-O-b-D glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2407-2410.

Ugaz, O. L. D. (1994). *Investigación fitoquímica: Métodos de estudio de productos naturales*. (2a. ed.). Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.

Vélez-Terranova M., Campos-Gaona R., Sánchez-Guerrero H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17:489-499.

Vetter, J. (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38, 11–36. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00128-2)

Villaseñor, R., & Espinosa, G. (1998). *Catálogo de malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Wagner, H., & Bladt, S. (1996) *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. 2nd edition, Editorial Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. Pp 359-362.

Wagner, H., & Farkas, L. (1975). Síntesis of flavonoids. En: *The Flavonoids. Part I* (Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H eds). Academic Press, New York, 127-213.

Wall, M.E., & Wani, M.C. (1995). Camptothecin and taxol: discovery to clinic-thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture, *Cancer Res*, 55(4), 753-760.

Walter, E., Janich, S., Roessler, B. J., Hilfinger, J. M., & Amidon, G. L. (1996). HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: *In vitro–in vivo* correlation with permeability data from rats and humans. *Journal of pharmaceutical sciences*, 85(10), 1070-1076.

Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T., & Roussos, C. (2001). Luteolin inhibits and endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 181-187.

Xin, F., Yang, C., Wei, Y., Ma, Q.X., Yang, L., & Chen, X-Y. (2011). Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Div Res*, 33, 53-64.

Zhao, J., Muhammad, I., Dunbar, D. C., Mustafa, J., & Khan, I. A. (2005). New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 690-693. doi:10.1021/jf048529t.

Zhou, M., Zhang, R., Chen, Y., Liao, L., Sunc, Y., Ma, Z., Yang, Q., Li, P., Ye, Y., & Hu, Q. (2018). Three new pyrrole alkaloids from the roots of *Lepidium meyenii*. *Phytochemistry Letters*. 23, 137-140.