



Universidad Autónoma de Sinaloa  
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas  
Programa de Posgrado Integral en Biotecnología

Caracterización química y evaluación de la actividad adaptogénica, antioxidante e inmunomoduladora de dos especies de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*)

## TESIS

Que presenta

QFB. Katia Melissa Meza Lizárraga

Como requisito para obtener el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Biotecnología de Salud

Director (es)

Dra. Gabriela López Angulo

Dr. Julio Montes Avila



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y en la Unidad de Investigación en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms" de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Bajo la dirección de los C Dra. Gabriela López Angulo y Dr. Julio Montes Avila. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto A1-S-24537). Asimismo, se agradece a CONACYT por la beca otorgada a la estudiante Katia Melissa Meza Lizárraga.

## DEDICATORIA

*“A mi madre Laura Lizárraga Larrañaga por nunca cortarle las alas a mis sueños, a mi abuela Elpidia Aispuro Larrañaga por siempre brindarme su amor cálido y nuestra estrella en el cielo, Lorena Lizárraga Larrañaga, gracias por siempre iluminarnos el camino.”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco grandemente a la Universidad Autónoma de Sinaloa por ser el recinto académico que me permitió ser parte de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas.

Al Programa Integral de Posgrado en Biotecnología por darme la oportunidad de seguir alimentando mis sueños académicos.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme el apoyo económico durante estos dos años.

También me es grato agradecer a mis directores de tesis; al Dr. Julio Montes Avila por ser el primer contacto en abrirme las puertas del Laboratorio de Química de Productos Naturales (LQPN), por su paciencia y confianza; a la Dra. Gabriela López Angulo, por su invaluable ayuda en la elaboración de este proyecto, por brindarme la confianza, el cariño y la paciencia, a ambos les estoy infinitamente agradecida, gracias por formar parte de mi formación como profesionista.

A mis asesores; al Dr. Francisco Delgado Vargas por sus atenciones, tiempo y presencia en la elaboración de este proyecto; al Dr. Juan Fernando Pio León por su amable disponibilidad en todo momento y al Dr. Rito Vega Aviña por contribuir en la recolección de las especies evaluadas.

A mi mejor amiga Mariana por siempre estar en las buenas y en las malas conmigo, por demostrarme su cariño inmenso y por acompañarme en esta etapa.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio, fue muy grato coincidir con ustedes, gracias por la amistad y los momentos de risa, gracias por la paciencia y los consejos, gracias por entender que a veces suelo ser una persona complicada.

Y especialmente agradezco a Ricardo, Edgar, Mario, Eleazar y Antonio por siempre darme ánimos y creer en mi aun cuando yo no lo hacía.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE CUADROS .....	VI
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	2
III. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	4
A Estrés.....	4
1 El estrés: eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA).....	6
2 Estrés y sistema inmunitario .....	8
3 Estrés oxidativo .....	11
4 Terapias utilizadas para tratar el estrés .....	12
B Adaptogénos y actividad adaptogénica .....	13
1 Plantas con actividad adaptogénica .....	15
C Familia Asteraceae .....	17
1 Subfamilia Asteroideae .....	19
2 Tribu Senecioneae.....	21
3 <i>Roldana</i> .....	22
a Taxonomía y distribución .....	22
b Descripción morfológica del género <i>Roldana</i> .....	22
c Usos etnofarmacológicos del género <i>Roldana</i> .....	24
d Composición química del género <i>Roldana</i> .....	24

e	<i>Roldana sessilifolia</i> .....	24
f	<i>Roldana hartwegii</i> .....	27
	IV. JUSTIFICACIÓN .....	28
	V. HIPÓTESIS .....	29
	VI. OBJETIVOS .....	30
A	Objetivo General.....	30
B	Objetivos Específicos.....	30
	VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
A	Materiales .....	31
1	Material vegetal .....	31
2	Material biológico.....	31
3	Reactivos.....	31
B	Métodos .....	32
1	Elaboración de harinas .....	32
2	Obtención de extractos etanólicos (EEs).....	32
3	Caracterización fitoquímica.....	33
4	Cuantificación de metabolitos totales .....	33
a	Fenólicos totales.....	33
b	Flavonoides totales .....	35
c	Taninos totales.....	35
5	Análisis de los extractos etanólicos mediante Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (GC-MS) .....	36
a	Preparación de las muestras para el análisis .....	36

b	Derivatización de las muestras .....	36
c	Condiciones del análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS).....	37
6	Perfil de compuestos fenólicos .....	37
7	Evaluación de la toxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	38
a	Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> en <i>Artemia salina</i> .....	38
b	Determinación de la toxicidad aguda en ratones por el método OECD .....	40
8	Métodos de evaluación de la actividad biológica .....	40
a	Evaluación de la actividad adaptogénica .....	40
b	Prueba de anoxia.....	41
c	Prueba de nado forzado .....	41
d	Prueba de resistencia de nado en frío .....	41
e	Actividad antioxidante .....	42
f	Método DPPH.....	42
g	Método ABTS.....	42
h	Evaluación de la actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i> .....	43
9	Análisis estadístico .....	44
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
A	Contenido de humedad y rendimientos de extracción .....	46
B	Caracterización química .....	48
1	Análisis fitoquímico de los extractos etanólicos de <i>Roldana</i> .....	48
2	Contenido de metabolitos totales.....	50
3	Caracterización de los extractos etanólicos mediante GC-MS .....	53
4	Caracterización de los extractos etanólicos mediante HPLC-ESI-MS .....	60



a	<i>Roldana sessilifolia</i> .....	61
b	<i>Roldana hartwegii</i> .....	70
5	Toxicidad de los extractos etanólicos de <i>Roldana sessilifolia</i> y <i>Roldana hartwegii</i> 77	
6	Evaluación de actividades biológicas .....	84
a	Evaluación de la actividad adaptogénica .....	84
b	Prueba de anoxia.....	84
c	Prueba de resistencia de nado forzado .....	88
d	Prueba de resistencia de nado en frío .....	90
e	Actividad antioxidante .....	95
f	Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i> .....	97
IX.	CONCLUSIONES.....	102
A	Conclusión general .....	102
B	Conclusiones específicas .....	102
X.	PERSPECTIVAS .....	104
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	105
XII.	ABREVIATURAS .....	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Relación entre el estrés, la función inmune y el resultado en la salud	10
2	Mecanismo hipotético de acción de los adaptógenos sobre el sistema de estrés a nivel celular	16
3	A. Flores de <i>Roldana hartwegii</i> . B. Capullos de <i>Roldana sessilifolia</i> . C. Capullos y tallos de <i>Roldana sessilifolia</i> . D. Hojas, capullos y tallos de <i>Roldana sessilifolia</i> . Fotos de Jennifer Miller (A), Ricardo Arredondo (B), María Eugenia Medina Mediola (C) y Laura Rojas (D)	25
4	Cromatogramas (HPLC-DAD, $\lambda = 320$ nm) de los extractos etanólicos de <i>Roldana sessilifolia</i> (RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (RH). La identificación de los picos se presenta en los <b>Cuadros 10 y 11</b>	62
5	Efecto de la administración de dosis única (2000 mg/kg p.c.) del extracto etanólico de <i>Roldana sessilifolia</i> . Ratón del grupo control ( <b>A</b> ), ratones del grupo de <i>R. sessilifolia</i> ( <b>B, C y D</b> )	81
6	Efecto del extracto etanólico (EE) de <i>R. sessilifolia</i> (RS) y <i>R. hartwegii</i> (RH) en la resistencia a la anoxia	86
7	Efecto del extracto etanólico (EE) de <i>Roldana sessilifolia</i> (RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (RH) en la resistencia de ratones al nado forzado	89
8	Efecto del extracto etanólico (EE) de <i>Roldana sessilifolia</i> (RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (RH) en la resistencia de ratones al nado en frío	91
9	Efecto del extracto etanólico (EE) de <i>Roldana sessilifolia</i> (RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (RH) en la proliferación de esplenocitos	98

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales plantas reportadas con actividad adaptogénica comprobada	18
2	Tribus de la familia Asteroideae y su número aproximado de géneros y especies	20
3	Clasificación taxonómica del género <i>Roldana</i> .	23
4	Pruebas empleadas en la caracterización fitoquímica de las especies de <i>Roldana</i>	34
5	Contenido de humedad y rendimientos de los extractos etanólicos (EEs) de <i>Roldana sessilifolia</i> y <i>Roldana hartwegii</i>	47
6	Análisis fitoquímico del extracto etanólico de <i>Roldana sessilifolia</i> y <i>Roldana hartwegii</i>	49
7	Contenido de metabolitos totales en los extractos etanólicos (EE) de <i>Roldana sessilifolia</i> y <i>Roldana hartwegii</i>	51
8	Compuestos identificados en los extractos etanólicos de <i>R. sessilifolia</i> (EE-RS) y <i>R. hartwegii</i> (EE-RH) por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	54
9	Compuestos identificados en los extractos etanólicos derivatizados de <i>R. sessilifolia</i> (EE-RS) y <i>R. hartwegii</i> (EE-RH) por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	56
10	Datos cromatográficos y espectrales utilizados en la identificación de los picos mayoritarios del extracto etanólico de <i>Roldana sessilifolia</i> (EE-RS)	63
11	Datos cromatográficos y espectrales utilizados en la identificación de los picos mayoritarios del extracto etanólico de <i>Roldana hartwegii</i> (EE-RH)	65
12	Toxicidad del extracto etanólico de <i>Roldana sessilifolia</i> (EE-RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (EE-RH) sobre <i>Artemia salina</i>	78

13	Efecto del tratamiento de ratones con el extracto etanólico de <i>Roldana sessilifolia</i> (EE-RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (EE-RH) en la ganancia de peso (%)	79
14	Porcentaje relativo de peso de órganos de los grupos sometidos al ensayo de toxicidad aguda <i>in vivo</i> del extracto etanólico (EE) de <i>Roldana sessilifolia</i> (EE-RS) y <i>Roldana hartwegii</i> (EE-RH)	82
15	Efecto del extracto etanólico de <i>Roldana sessilifolia</i> (EE-RS) y <i>Roldana hartwegii</i> en los parámetros hematológicos de los ratones sometidos a la prueba de toxicidad aguda.	83
16	Actividad antioxidante del extracto etanólicos (EE) de <i>Roldana sessilifolia</i> y <i>Roldana hartwegii</i>	96

## I. RESUMEN

El estrés es un problema de salud pública a nivel mundial que afecta múltiples procesos fisiológicos pudiendo provocar inmunosupresión, incremento de estrés oxidativo, afectaciones en el aparato cardiovascular y digestivo, así como trastornos del sueño que conllevan al desarrollo de enfermedades mentales. No existe un tratamiento específico para el estrés, y tradicionalmente se ha recurrido a la herbolaria como terapia alternativa utilizando preparaciones de plantas (e.g., infusiones, decocciones, ungüentos) con propiedades adaptogénicas los cuales promueven la adaptabilidad, resistencia y supervivencia. El género *Roldana* spp (Asteraceae), cuenta con una gran variedad de especies a las que se le han atribuido propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antinociceptivas y ansiolíticas. *Roldana sessilifolia* (RS) y *R. hartwegii* (RH) son dos especies nativas de Sinaloa; RS es utilizada para mantener la energía y estado de alerta, mientras que RH no cuenta con usos documentados. A la fecha no existe suficiente investigación científica que compruebe las propiedades biológicas del género *Roldana*. En este trabajo se realizó la caracterización química (fitoquímico, metabolitos totales y perfil de compuestos por GC-MS y HPLC-MS), toxicidad en *Artemia salina* e *in vivo* en ratones BALB/c; y se evaluaron las actividades: adaptogénica *in vivo* (anoxia, nado forzado y nado en frío), antioxidante *in vitro* (DPPH y ABTS) e inmunomoduladora *in vitro* en esplenocitos de ratón de extractos etanólicos de raíces de RS y RH. El análisis fitoquímico mostró la presencia de flavonoides, terpenos y cumarinas en ambas especies; RH presentó mayor contenido de fenólicos (149.70 µg EAG/mg EE), flavonoides (43.32 µg EQ/mg EE) y taninos (336.42 µg EC/mg EE) totales. En el análisis por GC-MS se detectaron lactonas sesquiterpénicas, ácidos grasos (e.g., linoleico) y fitoesteroles (e.g., sitosterol, estigmasterol), mientras que por HPLC se detectaron derivados de ácidos fenólicos (e.g., sirigico, cafeico), flavonoides (e.g., quercetina, kaempferol, isoramnetina) y taninos (e.g., galocatequina); RH presentó mayor diversidad de compuestos en ambos análisis. Ambas especies resultaron inocuas en *Artemia salina* y en modelo murino ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg). Las pruebas de actividad biológica de ambas especies mostraron actividad adaptogénica igual o superior al control Ginseng, destacando RS en las pruebas de anoxia y nado forzado; la actividad antioxidante ( $IC_{50}$ , µg/mL) de RH fue notablemente superior (DPPH: 279.73, ABTS: 126.96) que la de RS (DPPH: 9142.12, ABTS: 1463.75); en cuanto a la actividad inmunomoduladora RH indujo un incremento (23.88 – 57.31%) en la proliferación de esplenocitos mayor que LPS (21.11%), mientras que RS la disminuyó hasta un 84.85% a la mayor concentración evaluada (100 µg/mL). Los resultados encontrados aportan evidencia para apoyar el uso tradicional de RS, y evidencian el potencial de ambas especies para usarse como adaptógenos en la prevención y tratamiento de padecimientos asociados con el estrés.

**(Palabras clave: Actividad adaptogénica, *Roldana*, Asteraceae, Estrés)**

## II. INTRODUCCIÓN

El estrés es definido como “un estado de equilibrio homeodinámico amenazado por una amplia gama de desafíos o estímulos intrínsecos o extrínsecos, reales o percibidos, definidos como estresores” (Agorastos y Chrousos, 2021).

A lo largo de la evolución, los organismos han desarrollado un sistema altamente sofisticado que contribuye a la regulación y adaptabilidad ante estímulos estresantes, redirigiendo la energía de acuerdo con sus necesidades, lo que contribuye a la generación de respuestas adaptativas que resultan benéficas incrementando la capacidad homeodinámica del cuerpo (Selye, 1938). Sin embargo, cuando estos estresores se manifiestan de manera prolongada sobrepasan la capacidad reguladora del organismo, lo cual se manifiesta como efectos negativos en el cuerpo (McEwen, 1998). El estrés es un factor de riesgo común en el 75 al 90% de las enfermedades (Liu, Wang, y Jiang, 2017). Se ha encontrado que estrés prolongado conlleva al incremento del estrés oxidativo y la inmunosupresión lo cual es un factor muy importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (e.g., hipertensión y aterosclerosis), enfermedades metabólicas (e.g., diabetes e hígado graso) desordenes psicóticos y neurodegenerativos (e.g., depresión, Parkinson y Alzheimer), así como el cáncer (Cohen, Janicki-Deverts y Miller, 2007).

En la actualidad no existen terapias efectivas para el control del estrés crónico, como alternativa a esto, se ha encontrado que diversas plantas poseen propiedades para proveer resistencia frente a estímulos adversos, denominada como actividad adaptogénica y los componentes de estas se llaman adaptógenos (Todorova y col,

2021). Existen diversas familias botánicas con especies de plantas catalogadas como adaptogénicas, por ejemplo: Crassulaceae (e.g. *Rhodiola rosea*, *Rhodiola imbricata*, *Rhodiola heterodonta*), Araliaceae (*Eleutherococcus senticosus*) y Solanaceae (*Withania somnifera*) (Todorova y col, 2021). Adicionalmente a estas plantas se les han atribuido propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, neuroprotectoras, anticancerígenas, entre otras. Estas actividades han sido atribuidas a diversos fitoquímicos, como polifenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, acetilenos y triterpenos. (Khanum, Bawa y Singh, 2005; Wal y col, 2019; Graczyk y col, 2022).

El género *Roldana* (Asteraceae), cuenta con una gran variedad de especies a las que se le han atribuido propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antinociceptivas e insecticidas, y entre sus metabolitos secundarios predominan sesquiterpenos (eremofilanos) y compuestos fenólicos (Arciniegas y col, 2013; Rolnik y Olas, 2021).

*Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii* son dos especies nativas del estado de Sinaloa que se distribuyen a lo largo de la Sierra Madre Occidental, donde la primera es utilizada para mantener la energía y estado de alerta, mientras que de la segunda se desconocen sus posibles usos y propiedades. De ninguna de las dos especies se tienen suficientes estudios científicos para conocer su potencial biológico, por lo cual, la presente investigación tiene como objetivo demostrar que estas dos especies de *Roldana* presentan potencial farmacológico para el tratamiento del estrés, evaluando su potencial inmunomodulador, antioxidante y adaptogénico.

### III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### A Estrés

En 1865 Claude Bernard plasmó sus observaciones sobre la fisiología del hígado describiendo como este secretaba glucosa gracias a las reservas de glucógeno que almacenaba, lo cual genera un efecto en la regulación del calor corporal debido a un aumento en el flujo vascular por los nervios simpáticos. Debido a esta observación C. Bernard desarrolló el concepto que hoy conocemos como “homeostasis”, en el cual se explica cómo el organismo trata de mantener un equilibrio constante lo cual es esencial para la vida independientemente del ambiente externo (Goldstein y Kopin, 2007). Por otra parte, en 1929 Walter B. Cannon estipuló que el mantenimiento de esta homeostasis requería sensores que permitirán reconocer discrepancias entre los valores normales y anormales de un proceso fisiológico, acompañado de un sistema de retroalimentación negativa; por ejemplo, cuando la temperatura corporal incrementa, los sistemas termorreguladores emiten una señal para producir sudor, así como la redirección del flujo sanguíneo de las vísceras hacia la piel, lo que mejora la pérdida del calor (Cannon, 1926 a,b). Cannon llamó a esta respuesta “lucha y huida” extendiendo este concepto para incluir amenazas psicosociales a la homeostasis. El mecanismo fisiológico propuesto por Cannon sostiene que diferentes estímulos externos producían la activación del mismo sistema simpaticoadrenal, reconociendo al neurotransmisor noradrenalina como la primera hormona secretada en la presencia de tales estímulos. Años más tarde diversos investigadores reconocieron que las actividades realizadas por el sistema simpático nervioso y adrenomedular cambian dependiendo del estímulo percibido (Cannon, 1926 a,b).



No fue hasta décadas más tarde que el concepto de estrés se fue popularizando, gracias al trabajo realizado por el Dr. Hans Selye quien lo redefinió como “la respuesta no específica del cuerpo ante cualquier estímulo externo o interno”. Por “no específica” Selye se refería a un conjunto de elementos compartidos de respuestas, independientemente de la naturaleza del agente causal o factor estresante. Selye propuso tres etapas para explicar el mecanismo por el cual un organismo se enfrentaba a un agente causal, conocido actualmente como síndrome general de adaptación (SGA) (Selye, 1956; Goldstein y Kopin, 2007).

La primera etapa llamada fase de alarma es semejante a la reacción de lucha y huida propuesta por Cannon. Posteriormente le sigue la fase de adaptación la cual es asociada con crear resistencia ante el agente causal y si el agente causal persiste se llega a la tercera fase denominada de agotamiento donde se produce la muerte del organismo (Selye, 1956; Goldstein y Kopin, 2007).

Selye pudo desarrollar esto debido a sus investigaciones donde inyectaba formalina a ratones y observaba estas tres etapas una y otra vez, así como los efectos adversos provocados por el agente causal (inyección de formalina) que demostraron estar asociados con la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) (Selye, 1938).

Aunque en la actualidad el concepto de “estrés” ha sido modificado con el paso de los años, aún conserva las bases establecidas por Selye y Cannon, siendo definido como un estado de equilibrio homeodinámico amenazado por una amplia gama de

desafíos o estímulos intrínsecos o extrínsecos, reales o percibidos, definidos como factores estresantes (Agorastos y Chrousos, 2022).

## **1 El estrés: eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA)**

Como se mencionó anteriormente el estrés juega un papel muy importante en la regulación y desregulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), el cual está ligado a otros circuitos cerebrales. El eje HPA junto con el sistema nervioso autonómico (SNA) y el sistema inmunitario trabajan en conjunto tratando de mantener la homeostasis hormonal y la respuesta inflamatoria al estrés (Leistner y Menke, 2020).

La respuesta fisiológica del eje HPA frente un estresor garantiza la supervivencia cuando nos enfrentamos a situaciones que atentan contra nuestra vida. El cese de este estímulo es un requisito para nuestro bienestar, mientras que disfunciones en esta área conducirán a un proceso patológico y mayor vulnerabilidad al estrés (Leistner y Menke, 2020).

La activación de la respuesta no específica del eje HPA comienza con la activación del núcleo paraventricular (PVN) en el hipotálamo secretando la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), vasopresina arginina (AVP) y otros neuropéptidos que producen distintos efectos autonómicos, humorales y conductuales. La CRH es un neuroregulador que funciona en circuitos extra-hipotalámicos los cuales involucra funciones inmunes, cognitivas y regulación de las funciones vegetativas (*e.g.*, insomnio, libido, apetito y aumento de la ansiedad, motilidad del tracto gastrointestinal, desarrollo y regulación de la función cardíaca y el tono vascular). En la amígdala la CRH forma parte de la función reguladora de las respuestas conductuales y

autónomas al estrés, incluida la ansiedad relacionada con el estrés y la plasticidad estructural. La CRH se une a los receptores 1 y 2 de CRH en la parte anterior de la glándula pituitaria lo que induce la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) al sistema circulatorio. Esta cadena de eventos resulta en la síntesis y excreción de glucocorticoides (GCs) en la corteza adrenal. Los GCs comprenden múltiples funciones que involucran la regulación del metabolismo energético (e.g., gluconeogénesis, lipólisis, degradación de proteínas), diferenciación celular, así como neurogénesis y supervivencia neuronal; estos poseen efecto directo en las funciones inmunológicas y la inflamación. Por lo tanto, la homeostasis del eje HPA estará garantizada por los mecanismos de balance de retroalimentación, lo que permite la adaptación al estrés agudo y crónico. Los GCs endógenos funcionan como retroalimentación negativa en el eje HPA, la unión de GCs en el hipocampo, el PVN y en las células anteriores de la glándula pituitaria inhiben la síntesis y secreción de CRH en el PVN y ACTH en la glándula pituitaria, reduciendo la actividad del eje HPA (Leistner y Menke, 2020).

Los efectos generados por los GCs son inducidos principalmente por dos receptores, el receptor de mineralocorticoides (MR) y el receptor de glucocorticoides (GR). Los MRs se expresan en gran cantidad en las neuronas del hipocampo y el septum lateral, y de forma moderada en la amígdala, PVN y en el *locus coeruleus*. Los GRs se expresan en el cerebro en mayor proporción en el hipocampo, el septum lateral y el PVN. Ambos receptores permiten la unión principalmente al cortisol, pero con diferente afinidad. En situaciones normales el cortisol se une principalmente a los receptores de MRs, cuando se encuentra sobre expresado el eje HPA y se estimula

de forma constante la producción de GCs los GRs se activan progresivamente para modular esta sobreproducción. Cuando los GCs se unen a estos receptores, este es translocado hacia el núcleo donde de manera positiva o negativa regula la expresión de genes uniéndose de forma específica a ciertas regiones del ADN o interactúa con otros factores de transcripción. Esta unión provee al organismo de las respuestas adecuadas al estrés, así como la terminación de esta (Merkulov, Merkulova y Bondar, 2017). Sin embargo, en situaciones donde el estrés y el estímulo se vuelve crónico, los mecanismos de regulación se dañan ocasionando una hiperactivación del eje HPA lo cual genera una resistencia por parte de los GCs lo que atenúa su efecto inhibitorio (Merkulov, Merkulova y Bondar, 2017).

Se ha encontrado que la acumulación de GCs produce diferentes consecuencias, como la desregulación del metabolismo, hipertensión, aumento del estrés oxidativo, activación de macrófagos periféricos y centrales produciendo agentes proinflamatorios, así como afectación en la neuroplasticidad cerebral lo cual provoca el deterioro de las conexiones neuronales provocando desordenes psiquiátricos (Leistner y Menke, 2018).

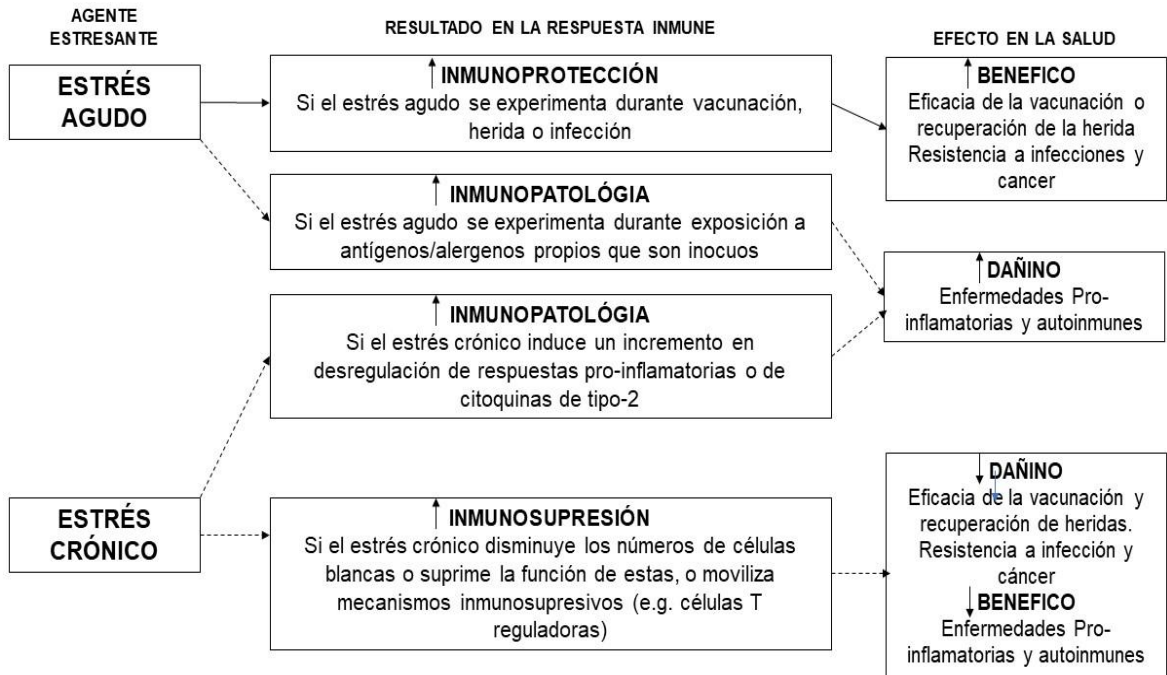
## **2 Estrés y sistema inmunitario**

Como se mencionó en el apartado anterior la respuesta ocasionada por un agente estresante activa ciertas vías fisiológicas que están interconectadas, trabajando en conjunto para hacer frente a la amenaza y posteriormente llegar a un estado de homeostasis, por lo que el estrés jugará un papel muy importante en la regulación del sistema inmune (Contrada y Baum, 2010). La respuesta inmune puede

categorizarse en tres tipos: inmunoprotectiva, inmunopatológica e inmunorreguladora/inhibitoria (**Figura 1**). La primera es definida como la respuesta que promueve de manera eficiente los estímulos para contrarrestar un problema o agente estresante (*e.g.*, eliminar infecciones virales, sanar una herida, inducir memoria inmunológica después de haber sido vacunado, eliminar células cancerosas). La respuesta inmunopatológica se define como aquella que se dirige contra antígenos propios (*e.g.*, enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis y lupus) o antígenos inocuos (*e.g.*, asma y alergias) y respuestas que involucran inflamación crónica que no se resuelve. Por último, la respuesta inmunorreguladora/inhibitoria es definida como aquella que involucra células y factores del sistema inmune que inhiben la función de otras células inmunes (Contrada y Baum, 2010).

La duración de la respuesta fisiológica al estrés será un determinante crítico para saber qué tipo de respuesta inmune se manifestará (Dhabhar, 2006). El estrés a corto plazo, es decir, que dura de minutos a horas, experimentado durante la activación inmune mejora las respuestas inmunes innatas/primarias y adaptativas/secundarias, estos mecanismos incluyen cambios en las células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y el movimiento, maduración y función de los linfocitos, así como la producción local de citocinas, lo que promueve la adaptación. En contraste el estrés a largo plazo suprime o desregula la respuesta adaptativa e innata alterando el balance de citocinas de tipo 1 y tipo 2, induciendo inflamación crónica y disminuyendo el número, tráfico y función de células inmunoprotectoras (Dhabhar, 2014).

El estrés crónico causa inmunosupresión lo que incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades infecciosas e inclusive prolongar la recuperación (Konstanti-



**Figura 1.** Relación entre el estrés, la función inmune y el resultado en la salud. (Contrada y col, 2010; Dhabhar, 2014).

nos y Sheridan, 2001), además se ha observado que en casos de inmunosupresión existe una alteración en la producción de citocinas proinflamatorias que son importantes para la cicatrización de heridas, lo que produce retrasos sustanciales en la reparación de estas (Kiecolt-Glaser y col, 1995). Por otra parte, esta alteración en las citocinas puede generar una sobreproducción de la citocina IL-6 inductora de la proteína C reactiva en el hígado, que en combinación desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Black, 2003). El incremento de citocinas proinflamatorias está asociado a condiciones y enfermedades relacionadas con la edad como la artritis, osteoporosis, diabetes tipo 2, así como ciertos tipos de cánceres (Harris y col, 1999). Por lo tanto, el estrés crónico tendrá implicaciones importantes en la salud.

### **3 Estrés oxidativo**

Otro aspecto muy importante que se tiene que tomar en consideración es el estrés oxidativo, el cual es definido como un desbalance entre especies oxidantes y antioxidantes a favor de las especies oxidantes, lo que causa una interrupción de la señalización y el control redox y/o daño molecular (Sies, 2015). En condiciones fisiológicas normales el balance redox permite controlar las demandas específicas en neutralización y producción de radicales libres, pero en situaciones donde hay estrés excesivo o crónico esta activación constante conducirá a procesos patológicos (Spiers, y col, 2015; Sies, 2019). Cuando ocurre la activación del eje HPA este desemboca en la secreción de glucocorticoides por parte de las células adrenales, lo que estimula ciertas rutas metabólicas para liberar glucosa, estas rutas (gluconeogénesis, glucogenólisis y la lipólisis) conllevan a la generación de especies reactivas de oxígeno

(ROS), en situaciones donde el estrés crónico y la producción de glucocorticoides esta desregulada estas rutas se siguen estimulando y la producción de ROS rebasa los mecanismos fisiológicos para su neutralización (Spiers y col, 2015). Se ha encontrado que los glucocorticoides inducen estrés oxidativo neuronal a través de la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa, haciendo más susceptibles a las neuronas a la muerte celular por estrés oxidativo ya que tienen una expresión relativamente pobre de antioxidantes endógenos (Du y col, 2009).

Esta incapacidad del cuerpo para neutralizar la acumulación de ROS genera mutaciones en las oxidasas NOX1 y DUOX2 de NADPH, lo cual se reporta como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad de Crohn's y colitis ulcerativa, por otra parte, altos niveles de selenoproteínas y bajas concentraciones de peróxido de hidrogeno han sido asociados con retrasos en la señalización de la insulina y por tanto mayor predisposición de desarrollo de diabetes (Steinbrenner y col, 2010; Lipinski y col, 2019). También se ha asociado que altos niveles de especies reactivas de oxígeno son un factor muy importante para el desarrollo de vitíligo (Laddha y col, 2013).

#### **4 Terapias utilizadas para tratar el estrés**

El manejo del estrés implica controlar y reducir la tensión que ocurre en situaciones estresantes, mediante cambios emocionales y físicos (Ávila, 2014).

En la actualidad es común que las terapias contra el estrés se inclinen al uso de fármacos del tipo ansiolítico, dentro de los medicamentos más comúnmente utilizados se encuentran las benzodiazepinas como el alprazolam, clonazepam y bromazepam por mencionar algunos. El inconveniente de este tipo medicamentos es que son



altamente adictivos, lo cual vuelve al consumidor farmacodependiente y su utilización contribuye a la desmotivación por parte del usuario para aprender otras técnicas para sobrellevar el estrés. Además, el uso prolongado de benzodiazepinas después de un factor estresante traumático puede predisponer a los pacientes a síndromes de estrés continuos (Larzelere y Jones, 2008).

Una alternativa al uso de medicamentos con potencial adictivo podría ser el uso de la fitoterapia, ya que algunas plantas medicinales poseen propiedades para producir relajación ejerciendo un efecto leve o moderado sobre el SNC, de tal forma que administradas de una manera adecuada pueden ayudar a calmar el estrés sin producir un daño o dependencia al organismo (Todorova y col, 2021). Las plantas que poseen esta propiedad se les considera adaptogénicas y comúnmente son utilizadas en forma de infusiones, ungüentos, jarabes y en otras presentaciones (Todorova y col, 2021).

## **B Adaptógenos y actividad adaptogénica**

Los adaptógenos son considerados como reguladores metabólicos, ya que poseen la habilidad de incrementar la adaptabilidad del organismo a factores ambientales y disminuir o eliminar el daño provocado (Panossian, Wilkman y Wagner, 1999). Han sido utilizados por varios siglos en la medicina tradicional China, con el objetivo de promover la salud física y mental, así como para mejorar los mecanismos de defensa del cuerpo para incrementar la longevidad (Panossian, 2017).

El mecanismo por el cual los adaptógenos ejercen sus múltiples efectos no puede resumirse en el mecanismo de acción que ejerce un fármaco que solo se dirige a una diana terapéutica, ya que se ha encontrado que los efectos ejercidos por los

adaptógenos son gracias a la interacción multinivel que estos tienen con varios receptores claves en la modulación de la respuesta al estrés, como: los receptores de corticosteroides, mineralocorticoides, progesterona, estrógeno, serotonina (5-HT), *N*-metil-D-aspartato, acetilcolina nicotínica, receptores de tirosina-quinasa y receptores acoplados a proteína G (Panossian, 2013). Por lo tanto, la farmacología de los adaptógenos es un ejemplo típico de una red de farmacología, confiriéndoles el potencial de ser empleados como tratamiento de enfermedades complejas y condiciones crónicas (Hopkins, 2008; Poornima y col, 2016).

Un rasgo característico de los adaptógenos es que actúan como *eustresores* (es decir, “buenos factores estresantes”) y como miméticos leves del estrés o “que inducen respuestas protectoras (Panossian y col, 1999; Panossian, Gabrielian y Wagner, 1999). El estrés leve induce una resistencia o “inmunidad” a una exposición posterior a un estrés más severo. Sin embargo, esta resistencia inducida no posee memoria funcional, por lo tanto, se necesita exposición repetida al adaptógeno para mantener este estado adaptativo. La administración repetida de los adaptógenos y la consiguiente respuesta adaptogénica o de protección contra el estrés surgen de una manera análoga al ejercicio físico repetido que conduce a un estado de resistencia no específica prolongado (Panossian, 2017).

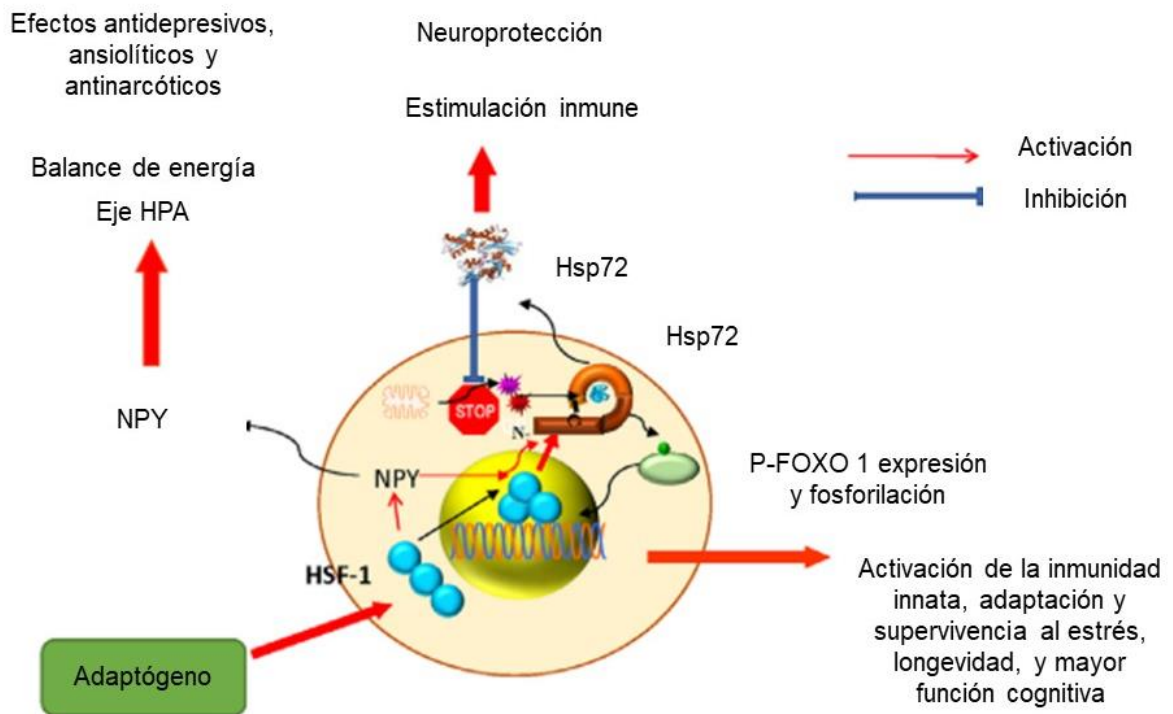
La eficacia farmacológica de los adaptógenos y sus efectos protectores contra el estrés son usualmente evaluadas mediante pruebas de función cognitiva y resistencia física bajo condiciones estresantes, como las pruebas de campo abierto (Katz, Roth y Carroll, 1981), antifatiga (Jung col, 2007) y de restricción repetida (Gamero y col,

1998); así como las utilizadas en esta investigación, anoxia (Aluko y col, 2015), nado forzado (West, 1990) y nado en frío (Hata col, 1999).

## **1 Plantas con actividad adaptogénica**

Durante muchos años, el hombre ha utilizado plantas con actividad adaptogénica en diferentes partes del mundo (Todorova y col, 2021). Los efectos biológicos de dichas plantas están relacionados con el conjunto de compuestos biológicamente activos que contienen (Panossian, 2017). Algunos de los fitoquímicos más importantes con propiedades adaptogénicas son: saponinas triterpénicas (e.g., ginsenósidos en *P. ginseng* y eleutherósidos en *E. senticosus*), fitoesteroles (e.g., ecdiesteroides en *Rhaponticum carthamoides*); lignanos (e.g., lignano dibenzo ciclooctadieno en *Schisandra chinensis*), así como alcaloides, flavonoides y algunas vitaminas (Kokoska y Janovska, 2008; Kopustinskiene y Bernatoniene, 2021; Panossian y col, 2021).

Se ha encontrado que los efectos adaptogénicos de extractos de plantas derivan de la modulación de múltiples mediadores de la respuesta adaptativa al estrés (**Figura 2**). Se ha demostrado que los adaptógenos activan la expresión y liberación de neuropéptido Y (NPY) y de la proteína de choque térmico 72 (Hsp72). Ambas desempeñan un papel muy importante en la regulación del eje HPA, confiriendo neuroprotección y estimulando la respuesta inmune innata (Panossian y col, 2012). A su vez la Hsp72 modula el factor de transcripción FOXO el cual está implicado en múltiples procesos metabólicos (e.g., proliferación celular, apoptosis, inflamación, inmunidad, expresión de citocinas y resistencia al estrés oxidativo) (Wang, Zhou y Graves, 2014). La modulación de estas vías contribuye al efecto antifatiga de los adap-



**Figura 2.** Mecanismo hipotético de acción de los adaptógenos sobre el sistema de estrés a nivel celular (Panossian y col, 2012).

tógenos, aumentando la atención y mejorando la función cognitiva (Panossian y col, 2012).

El número de plantas reportadas como adaptogénicas ha aumentado exponencialmente durante las últimas décadas (**Cuadro 1**). Sin embargo, se debe enfatizar que solo unos pocos cumplen con el criterio más importante: exhibir efectos de objetivos múltiples en el sistema neuroendocrino-inmune (Panossian y col, 2012).

### **C Familia Asteraceae**

La familia Asteraceae es una de las familias botánicas con más diversidad del mundo, con 1627 géneros y casi 25000 especies, distribuidas en prácticamente todo el planeta, aunque con mayor abundancia en las regiones áridas y semiáridas de los trópicos y subtropicos (Christenhusz y col, 2017). Su característica principal son sus inflorescencias en arreglos compactos en forma de cabezuelas (capítulos) que en muchas ocasiones dan la apariencia de ser una flor (pseudánticas), como en el caso del girasol. Poseen dos tipos de flores, una de arreglo simétrico (actinomorfa) y otra asimétrica (zigomorfa) debido a que uno de sus pétalos exteriores presenta un crecimiento superior al resto (lígula) y que suele ser la parte más vistosa de la flor (Christenhusz y col, 2017; Redonda-Martínez, 2022). Si bien aún se discuten los detalles de su taxonomía, se han reconocido 16 subfamilias y 50 tribus, de las cuales en México se tienen seis (Asteroideae, Carduoideae, Chicorioideae, Gochnatiodeae, Mutisioideae y Vernioideae) (Redonda-Martínez, 2022).

La familia contiene muchas especies de importancia alimenticia, medicinal, ornamental o de identidad a nivel mundial; algunos ejemplos son: el girasol, el diente

**Cuadro 1.** Principales plantas reportadas con actividad adaptogénica comprobada.

<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Ingredientes activos/ efectos</b>	<b>Cita</b>
<b><i>Withania somnifera</i></b>	Solanaceae	Witanólidos, alcaloides y sitoinosidos/ propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales, antiestrés, neuroprotectoras, inmunomoduladoras, cardioprotectoras y antidiabéticas.	Torodova y col, (2021)
<b><i>Rhodiola rosea</i></b>	Crassulaceae	Rosavina/ propiedades antidiabéticas, anticancerígenas, inmunomoduladora, cardioprotectivas y neuroprotectivas.	Perfumi y Mattioli, (2007) Pu, W. L. y col, (2020)
<b><i>Panax ginseng</i></b>	Araliaceae	Ginsenósidos/ actividad inmunomoduladora, antioxidante, cardioprotectiva, antiinflamatoria y anticancerígena.	Tian, M. y col, (2020)
<b><i>Echeveria spp</i></b>	Crassulaceae	Compuestos fenólicos y terpenos/ propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes, antimutagénicas y antibacteriana.	López-Angulo y col, (2022)

de león (*Taraxacum officinale*), cempasúchil (*Tagetes erecta*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), estafiate artemisa (*Ambrosia artemisiifolia*), artemisia (*Artemisia annua*), árnica (*Arnica montana*) y caléndula (*Calendula officinalis*) (Christenhusz y col, 2017).

Muchos miembros de la familia Asteraceae han demostrado ejercer actividad terapéutica, teniendo una larga historia en la medicina tradicional, por lo que algunas especies de esta familia han sido cultivadas por más de 3000 años para su ingesta con propósitos médicos (Rolnik y Olas, 2021). Entre sus usos tradicionales se encuentran para tratar el dolor abdominal (e.g., infusión de partes aéreas, flores y hojas de *Achillea millefolium*), para curar heridas y lesiones (e.g., infusiones de partes aéreas de *Chrysophthalmum montanum*) y para el tratamiento de afecciones respiratorias (e.g., infusiones de partes aéreas de *Matricaria aurea*) por mencionar algunos (Qnais, 2011; Akram, 2013; Ayaz y col, 2019).

En cuanto a sus actividades biológicas, un gran número de especies de la familia Asteraceae presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, así como propiedades diuréticas y cicatrizantes (Piątkowska y col, 2022). Dichos efectos farmacológicos han sido atribuidos a diversos fitoquímicos incluidos polifenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, acetilenos y triterpenos. La familia también es una fuente de lactonas sesquiterpénicas, metabolitos secundarios responsables del sabor amargo de muchas plantas (García-Oliveira y col, 2021; Rolnik y Olas, 2021).

## **1 Subfamilia Asteroideae**

La subfamilia Asteroideae cuenta actualmente con 20 tribus (**Cuadro 2**) distribuidas en todo el mundo, dentro de las cuales, las tribus Senecioneae, Astereae

**Cuadro 2.** Tribus de la familia Asteroideae y su número aproximado de géneros y especies

<b>Tribu</b>	<b>No. de géneros</b>	<b>No. de especies</b>	<b>Distribución</b>
Senecioneae	150	3000	En todo el mundo
Calenduleae	12	120	Comúnmente en África meridional
Gnaphalieae	185	1240	En todo el mundo
Astereae	222	3100	En todo el mundo
Anthemideae	111	1800	Principalmente en el viejo mundo
Inuleae	66	687	Principalmente en euroasiática y oriental y sudafricana
Athroismeae	5	59	Principalmente en el paleotrópico
Feddeae	1	1	Cuba
Heliantheae	477	5600	En todo el mundo

(Pelsers y Watson, 2009).



y Heliantheae cuentan con el mayor número de especies reconocidas (Pelser y Watson, 2009).

Dentro de la composición química de la subfamilia Asteroideae se encuentran principalmente lactonas sesquiterpénicas, así como benzopiranos y benzofuranos, esta subfamilia es rica en su contenido de flavonoides, también existen algunos constituyentes químicos propios del género pertenecientes a la familia Anteroideae, por ejemplo, derivados del timol son encontrados en todos los géneros de la familia con excepción del género Senecioneae (Pelser y Watson, 2009).

## **2 Tribu Senecioneae**

La tribu Senecioneae es conocida por su tamaño y diversidad. Con más de 3000 especies agrupadas en 150 géneros, es la tribu más grande de la familia Asteraceae y alberga uno de los géneros más grandes de plantas con flores: Senecio (Pelser y col, 2007).

Senecioneae tiene una distribución casi cosmopolita con sus principales centros de diversidad en el sur de África (700 especies) y América del Sur (1300 especies). Sus especies se encuentran en casi todos los ambientes. Crecen en hábitats acuáticos y desérticos, desde altitudes bajas hasta comunidades alpinas, y desde regiones árticas hasta áreas tropicales. Exhibe una enorme variación en su supervivencia y morfología, muchas especies son hierbas anuales o perennes; otras son arbustos, enredaderas, árboles o epífitas. La notable variación morfológica es especialmente evidente en la forma de la hoja, el indumento, el tipo de inflorescencia y el color de la flor (Pelser y col, 2007). A pesar de la enorme diversidad de esta tribu, la mayoría de los taxones pueden identificarse con relativa facilidad como miembros de Senecioneae

por la posesión de capítulos con un involucro generalmente uniseriado. Otras características de esta tribu son la presencia de sesquiterpenos eremófilos y furanoeremófilos y alcaloides de pirrolizidina del tipo senecionina macrocíclica (Pelser y col, 2007; Romo de Vivar y col, 2007).

### **3     *Roldana***

#### **a     Taxonomía y distribución**

El género *Roldana* pertenece a la subfamilia Asteroideae, tribu Senecioneae (**Cuadro 3**) (Arciniegas y col, 2015). Originalmente, las especies de *Roldana* fueron descritas dentro del género *Senecio*, sección Fruticossi, y algunas otras dentro de *Cacalia* (Funston, 2008). Actualmente se reconocen 65 especies, distribuidas desde el Sur de los Estados Unidos hasta Centroamérica (POWO 2024), principalmente en bosques templados o semi templados, entre 1000 y 4000 m de altitud (Funston, 2008).

#### **b     Descripción morfológica del género *Roldana***

Las especies de *Roldana* se dividen en tres grupos generales de acuerdo con su hábitat, aunque algunas presentan formas mixtas o intermedias. El primer grupo está compuesto por plantas perennes herbáceas escasamente ramificadas o acaulescentes que en su mayoría tienen menos de 1 m de altura. El segundo grupo incluye plantas perennes estrictas, erectas, de un solo tallo que pueden crecer hasta 4 m de altura y son herbáceas o débilmente leñosas hacia la base. Estas plantas a menudo son solitarias o se agrupan libremente en grupos de pocos tallos. Las plantas del tercer grupo son arbustivas o parecidas a árboles con tallos ramificados que son solitarios o en racimos abarrotados. La estructura de la raíz en el género consiste en

**Cuadro 3.** Clasificación taxonómica del género *Roldana*.

---

<b>Dominio</b>	Eucariontes
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Tracheophyta
<b>Subphylum</b>	Euphyllophytina
<b>Clase</b>	Equisetopsida
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Género</b>	Roldana

---

(POWO, 2024).

un caudex leñoso, típicamente lanado, con rizomas que se extienden. En las hierbas perennes, el caudex suele ser bulboso (Funston, 2008).

### **c Usos etnofarmacológicos del género *Roldana***

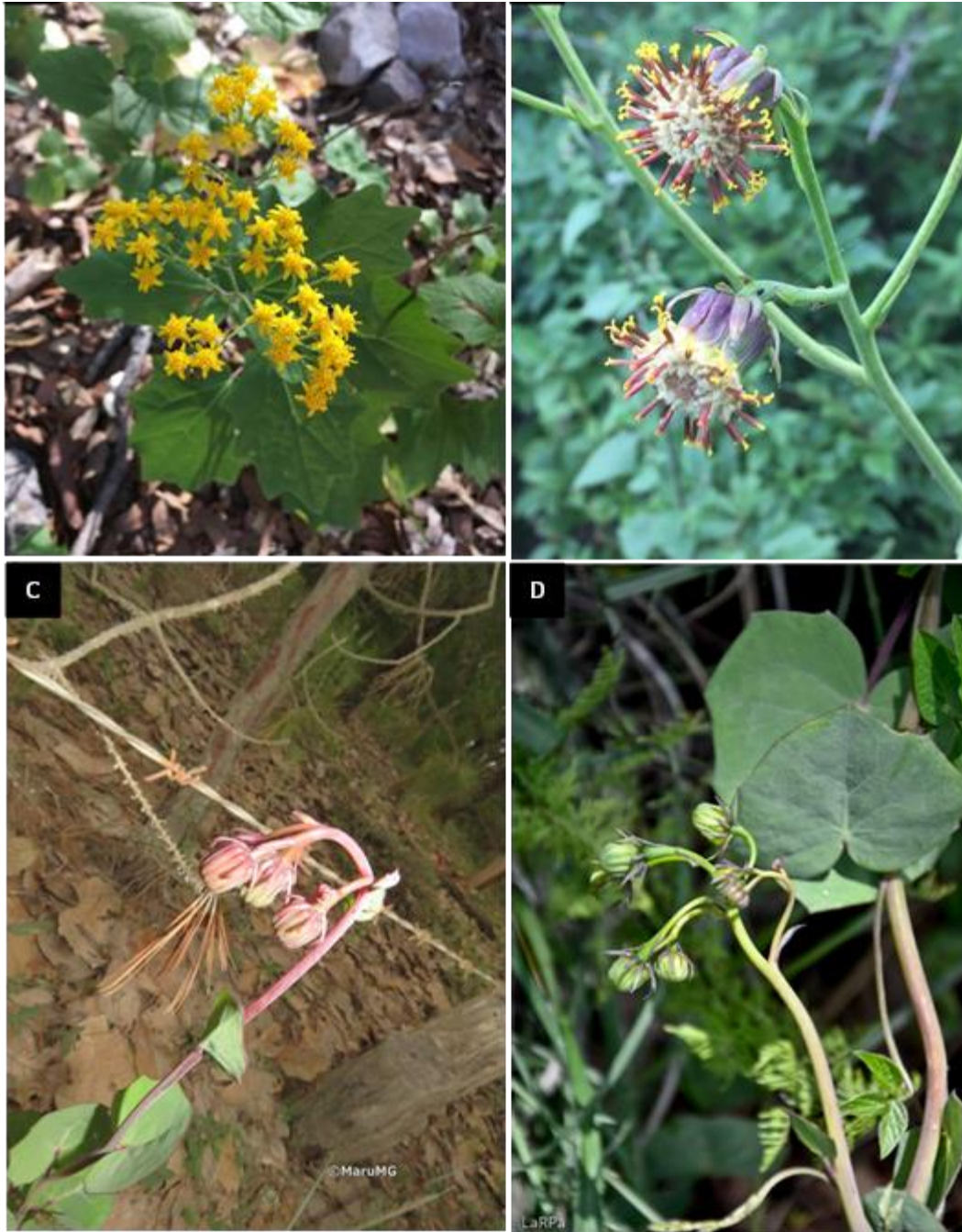
Algunas especies de *Roldana* se utilizan en la medicina popular mexicana; *R. ehrenbergiana* es empleada contra la lepra, mientras que *R. sessilifolia* se incluye en el “complejo cachani”, que es una mezcla de plantas tradicionalmente utilizadas para tratar la esterilidad femenina, hemorroides y enfermedades reumáticas. Por otra parte, se han encontrado metabolitos bioactivos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, insecticidas y antifúngicas en *R. barba-johannis*. *R. lineolata* posee propiedades antiparasitarias contra *Trichophyton mentagrophytes* (Linares y Bye, 1987; Céspedes y col, 2004; Pérez-Castorena y col, 2006; Arciniegas y col, 2008).

### **d Composición química del género *Roldana***

Los estudios químicos en especies del género *Roldana* muestran que la mayor parte de sus metabolitos secundarios son sesquiterpenos de tipo eremófilo, ya que han sido aislados en 12 de sus especies, entre ellas: *R. angulifolia*, *R. aschenborniana*, *R. ehrenbergiana*, *R. heterogama*, *R. lineolata*, *R. lobata*, *R. sessilifolia*, y *R. barba-johannis*, aunque en algunas de ellas también se han identificado oplopanes, plastoquinonas y flavonoides como en *R. mexicana* y *R. sundbergii* (Bohlmann y Zdero, 1978; Delgado y col, 1996; Arciniegas y col, 2004, 2006, 2008; Céspedes y col, 2004; Pérez-Castorena y col, 2006; Maldonado y col, 2008).

### **e *Roldana sessilifolia***

*Roldana sessilifolia* (sinónimo *Cacalia sessilifolia*) (**Figura 3b, c y d**) es una especie endémica de México con amplia distribución, desde Chihuahua y Sinaloa en



**Figura 3.** Flores de *Roldana hartwegii* (A), capullos de *Roldana sessilifolia* (B), capullos y tallos de *Roldana sessilifolia* (C) y hojas, capullos y tallos de *Roldana sessilifolia* (D). Fotos de Jennifer Miller (A), Ricardo Arredondo (B), María Eugenia Medina Mediola (C) y Laura Rojas (D).

el norte, hasta Michoacán y Morelos en el sur, a elevaciones de 1000–2900 m. Crece en bosques de pino y roble y su periodo de floración es de agosto a febrero (Funston, 2008). *Roldana sessilifolia*, como su nombre lo indica, puede tener láminas foliares sésiles; sin embargo, ésta no es la condición típica. La siguiente combinación de caracteres distingue a la especie: capítulos erradiados, capitulescencia terminal de pocas cabezas con brácteas lineales, de 2 a 4 cm de largo y aquenios glabros (Funston, 2008).

Se le conoce comúnmente como “peyote” o “peyote xohimilquensis”. Sus raíces tuberosas son utilizadas en medicina tradicional y diversas preparaciones como: infusiones para el tratamiento de desórdenes reproductivos (infertilidad femenina), tinturas o ungüentos para tratar reumatismos, la inhalación del humo de la quema de la planta se acostumbra a inhalar para curar el sangrado de la nariz; la raíz fresca se mastica para incrementar la resistencia al caminar, de manera similar al peyote (*Lophophora williamsii*) (Linares y Bye, 1987; Delgado y col, 1996; González-Elizondo y col, 2004).

En 1996, Delgado et al. Realizaron estudios en *R. sessilifolia* para evaluar su composición química, aislando en su mayor proporción como metabolitos secundarios sesquiterpenos del tipo eremófilo. Como ya se mencionó anteriormente los sesquiterpenos del tipo eremófilo son compuestos representativos del género *Roldana* a los cuales se les atribuye su la actividad biológica (Delgado y col, 1996; Pérez-Castorena y col, 2006; Maldonado y col, 2008). En la actualidad no existen estudios donde se evalúe la actividad adaptogénica, inmunomoduladora y antioxidante de *R. sessilifolia*; sin embargo, la especie se utiliza en las áreas donde florece por sus

amplias propiedades para tratar el dolor e inflamación, así como para mejorar la resistencia física y el estado de alerta, lo que sugiere posibles efectos adaptogénicos.

**f      *Roldana hartwegii***

*Roldana hartwegii* (*Senecio hartwegii*) (**Figura 3a**) es especie que se distribuye desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el sur de México (México: Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Sinaloa, Sonora; Estados Unidos: Arizona y Nuevo México) en elevaciones de 1200– 2700 m. Crece en bosques de pino-encino y matorrales cerca de arroyos florece de agosto a noviembre (Funston, 2008).

Bentham describió originalmente a *R. hartwegii* en 1839 con tallos flocosos a aracnoideos tomentosos, hojas glabras adaxialmente y pubescencia blanca en la parte inferior, 6 a 8 filarias, 3-4 flores del radio, 8-10 flores del disco y aquenios puberulentos (Funston, 2008).

En la actualidad no existen estudios donde examinen la composición química y las propiedades de *R. hartwegii*, aunque tampoco existen reportes sobre su uso en la medicina tradicional. No obstante, es de interés su análisis debido que al pertenecer al género *Roldana* podrían asociársele algunas de las actividades biológicas ya reportadas para este género.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La cifra de afecciones provocadas por estrés aumenta todos años. La utilización de medicamentos como las benzodiacepinas ayuda a disminuir o controlar los síntomas provocados por el estrés, sin embargo, estos poseen efectos indeseables en el ser humano como dependencia y mayor riesgo de padecimiento de depresión. Los adaptógenos son sustancias que confieren al cuerpo humano la habilidad de tolerar y aguantar en mayor proporción los estímulos estresantes al usuario que los ingiera sin generar dependencia ni otro tipo de afecciones indeseables, por lo que el uso de plantas que contengan actividad adaptogénica demostrada puede ser una buena alternativa para el manejo del estrés. Las especies de *Roldana* presentan gran endemismo en México y han sido utilizadas tradicionalmente con fines medicinales (e. g., usadas para dolores reumáticos, lepra, tratamiento de esterilidad, propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras) pero han sido escasamente estudiadas, de acuerdo con la literatura los componentes presentes en el género *Roldana* indican que puede tener un gran potencial como adaptógeno por lo tanto es de interés estudiar esta propiedad de importancia para la salud humana, que permitirá alcanzar hacia el desarrollo de alternativas terapéuticas contra enfermedades derivadas del estrés; estos conocimientos también contribuirán al aprovechamiento y conservación sustentable de las especies de *Roldana*.



## V. HIPÓTESIS

Extractos etanólicos de especies de *Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii*, colectadas en la Sierra Madre Occidental sinaloense, presentan similar actividad adaptogénica, antioxidante e inmunomoduladora.

## VI. OBJETIVOS

### A Objetivo General

Demostrar la actividad adaptogénica, antioxidante e inmunomoduladora de extractos etanólicos de dos especies de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) y establecer su relación con sus perfiles químicos.

### B Objetivos Específicos

- 1 Comparar la composición fitoquímica y el contenido de metabolitos totales (fenólicos, flavonoides, taninos) de *R. sessilifolia* y *R. hartwegii*.
- 2 Caracterizar los extractos etanólicos de *R. sessilifolia* y *R. hartwegii* mediante GC-MS y HPLC-ESI-MS.
- 3 Determinar la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de extractos etanólicos de *R. sessilifolia* y *R. hartwegii*.
- 4 Evaluar actividades biológicas (adaptogénica, antioxidante e inmunomoduladora) de extractos etanólicos de *R. sessilifolia* y *R. hartwegii*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A Materiales

#### 1 Material vegetal

Las especies de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) fueron recolectadas por los Doctores Rito Vega Aviña (FA-UAS), Francisco Delgado Vargas (FCQB-UAS) y Juan Fernando Pío León (CIIDIR-IPN, unidad Durango) en localidades de Sinaloa para ser transportadas al Laboratorio de Química de Productos Naturales donde fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. *Roldana sessilifolia* fue recolectada en la localidad de Concordia, Sinaloa, México, en noviembre del 2019 y *R. hartwegii* fue recolectada en la localidad Aves de Culiacán, Sinaloa, México, en septiembre de 2020.

#### 2 Material biológico

Para los ensayos de actividad adaptogénica, evaluación de la toxicidad aguda *in vivo* y evaluación de la actividad inmunomoduladora se utilizaron ratones BALB/c, los cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación se realizó de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999”.

#### 3 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. Se empleó extracto de raíz de *Panax ginseng* como control positivo en las pruebas de actividad adaptogénica. Los siguientes reactivos y materiales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.): 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-

6-sulfónico (ABTS), reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido 6-hidroxi-1,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (Ácido gálico), 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH), 3',6'-dihidroxispiro [isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona (Fluoresceína), Tween 80, benzal, medio de cultivo RPMI 1640, suero fetal bovino, antibiótico-antimicótico (Gibco), Concanalina A, Lipopolisacarido, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), extracto de raíz de *Panax ginseng*. Como solventes se utilizó metanol, hexano, acetato de etilo, etanol y cloroformo (CTR). Todos los solventes fueron destilados previo a su utilización.

## **B Métodos**

### **1 Elaboración de harinas**

Las raíces y tubérculos de las dos especies de *Roldana* se lavaron y congelaron a  $-70^\circ\text{C}$ , posteriormente fueron liofilizados (VirTis 25EI, VirTis Co. EE.UU.). Las raíces y tubérculos se trituraron hasta obtener el menor tamaño de partícula posible. Las harinas se almacenaron y etiquetaron en bolsas de plástico, manteniéndose a  $-20^\circ\text{C}$  protegidas de la luz hasta su utilización.

### **2 Obtención de extractos etanólicos (EEs)**

Las harinas de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) se maceraron con etanol (1:10 p/v, 24 h/extracción, 3 veces) con agitación constante. Los filtrados se juntaron y se eliminó el solvente en un rotovapor (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) a  $40^\circ\text{C}$ . El residuo correspondió al extracto etanólico (EE) de cada una de las dos especies, posteriormente fue liofilizado para eliminar restos de humedad y calcular los

rendimientos de extracción. Finalmente, ambos extractos fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y protegidos de la luz hasta su utilización.

### **3 Caracterización fitoquímica**

La caracterización fitoquímica de los EE de las dos especies de *Roldana*, fue determinada mediante reacciones en tubo, donde se observó un cambio de coloración, turbidez o formación de precipitados, las reacciones empleadas fueron: prueba de Salkowski para terpenos y esteroides; prueba de Shinoda para flavonoides; reacción con solución de gelatina, acetato de plomo, y sulfato de quinina con  $\text{FeCl}_3$  para taninos; prueba de la espuma para saponinas; reacción con  $\text{NaOH}$  para cumarinas; reacción de Bornträger para antracénicos libres; reactivos de Dragendorff y de Mayer-Wagner para alcaloides; y los reactivos de Baljet, Raymond-Marthoud, Keller-Killiani, Lieberman-Burchard, y Salkowski para cardiotónicos. Por último, la confirmación de cada prueba se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) (Harborne, 1998) (Cuadro 4).

### **4 Cuantificación de metabolitos totales**

#### **a Fenólicos totales**

El contenido de fenólicos totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu, con algunas modificaciones (Singleton y Rossi, 1965). Los EE de *Roldana* se disolvieron en metanol (20 mg/mL). De la solución stock de cada especie se obtuvieron 5 diluciones seriadas en metanol (25 – 400  $\mu\text{g/mL}$ ). En una microplaca de 96 pozos, se colocó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de solución de la muestra, estándar (ácido gálico) o agua destilada (control negativo) posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:10 v/v). La mezcla se agitó suavemente durante dos

**Cuadro 4.** Pruebas empleadas en la caracterización fitoquímica de las especies de *Roldana*.

<b>Metabolitos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Observaciones</b>
Terpenos/esteroides	Liebermann-Burchard Salkowski	Coloración rosa-azul, verde oscuro. Coloración rosada.
Flavonoides	Fragmentos de Mg y HCl diluido	Coloración roja intensa
Taninos	Solución de FeCl al 10%	Coloración azul indica taninos hidrolizables Coloración verde indica taninos condensados
Saponinas	Agua hirviendo	Al agitarse observar producción de espuma
Cumarinas	Impregnar papel filtro con solución de NaOH Llevar a baño María a 100°C	Observar el papel del tubo bajo luz UV y localizar fluorescencias amarillas.
Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	Precipitado rojo o naranja, banco crema o marrón.
Cardiotónicos	Baljet Kedde Raymond-Marthoud	Coloración roja-naranja Coloración rosa-violeta Coloración roja-naranja
Antracénicos	Solución de NaOH al 5%	Coloración rojiza

(Harborne, 1998).

minutos (Tamb/ oscuridad), por último, se adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10%. La mezcla se incubó a 40 °C durante 30 minutos y se midió su absorbancia a 765 nm en un lector de microplaca (Synergy HTX, Biotek, EE. UU.). La cuantificación se llevó a cabo usando una curva de calibración de ácido gálico (0–500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto etanólico ( $\mu\text{g}$  EAG/mg EE).

#### **b Flavonoides totales**

Los flavonoides se cuantificaron por la formación del complejo flavonoide- $\text{AlCl}_3$  en medio metanólico (Christ y col, 1960). Los EE de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) se disolvieron en MeOH (20 mg/mL) y se realizaron cinco diluciones seriadas (6 - 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de las muestras, del estándar (quercetina) o de MeOH (control negativo), posteriormente se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol. La placa se incubó durante 10 minutos a 27 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo se leyeron las absorbancias a 405 nm en un lector de microplaca (Synergy HTX, Biotek, EE. UU.). La cuantificación se llevó a cabo usando una curva de calibración de quercetina (0-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de quercetina por miligramo del extracto etanólico ( $\mu\text{g}$  EQ/mg EE).

#### **c Taninos totales**

El contenido de taninos se determinó usando el método de vainillina/HCl (Price y LG, 1978). El reactivo se preparó mezclando partes iguales (v/v) de vainillina al 1% en MeOH y HCl al 8% en MeOH. Los EE de *Roldana* se disolvieron en MeOH (20 mg/mL) y se realizaron cinco diluciones seriadas (6 - 375  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En una microplaca de 96

pozos de fondo plano se mezclaron 50  $\mu$ L de las muestras, del estándar (catequina) o de MeOH (control negativo), posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de vainillina/HCl y como corrector de color se utilizó una solución de HCl al 4% en MeOH. La placa se incubó durante 20 min a 30 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo se leyeron las absorbancias a 500 nm en un lector de microplaca (Synergy HTX, Biotek, EE. UU.). La cuantificación se llevó a cabo usando una curva de calibración de catequina (0-400  $\mu$ g/mL) y los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de catequina por miligramo del extracto etanólico ( $\mu$ g EQ/mg EE).

## **5 Análisis de los extractos etanólicos mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)**

El análisis por GC-MS se realizó en EEs derivatizados y sin derivatizar.

### **a Preparación de las muestras para el análisis**

Los EE de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) se disolvieron en etanol (3 mg/mL). Las soluciones se filtraron a través de un filtro de jeringa (17 mm x 0.45  $\mu$ m, PVDF, Titán) previo a su análisis por GC-MS.

### **b Derivatización de las muestras**

La derivatización se realizó de acuerdo con lo reportado por Wang y Zuo, (2011). A 1 mL de los extractos disueltos (3 mg/mL) se les evaporó el solvente mediante una corriente de N<sub>2</sub>, el residuo se resuspendió en 50  $\mu$ L de piridina y 50  $\mu$ L de BSFTA + 1% TMCS, las mezclas se calentaron a 70 °C durante 4 h bajo una atmósfera de nitrógeno, posteriormente las muestras se llevaron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de hexano para su análisis por GC-MS.



### **c Condiciones del análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)**

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (HP 6890 GC Instruments, 5973 Network, Agilen Technologies, Wilmington, EE.UU.). La separación se realizó en una columna capilar. QUADREX 007 CARBOWAX 20 M (30 m × 0.25 mm i.d., espesor de película de 0.25 µm) usando helio como gas de arrastre a un flujo de 0.9 mL/min. Las condiciones de temperatura fueron: puerto inyección a 250 °C; horno 60 °C por 1 min, gradiente de 5 °C/min hasta 200 °C y posteriormente de 10 °C/min hasta 275 °C, permaneciendo a 275 °C por el resto del análisis; fuente de iones 245 °C; y cuadrupolo 150 °C. Un volumen de 1 µL fue inyectado sin división de flujo. Los espectros fueron colectados en un rango de 50 a 800 u a 2 barridos/s. El espectrómetro de masas (EM) operó en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV. La identificación de los componentes se realizó por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST (NIST08.LIB) y el porcentaje relativo de área de cada componente se calculó por comparación del área del pico con las áreas totales.

### **6 Perfil de compuestos fenólicos**

Los extractos etanólicos (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii* 400 mg previamente desengrasados con hexano) se disolvieron en 20 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v) y se partitionaron con acetato de etilo (20 mL/3 veces), esta fase se llevó a sequedad, el residuo se redisolvió con 200 µL de MeOH para posteriormente pasarse por una columna C18 (CHROMAFIX, Macherey-Nagel EE. UU.) previamente acondicionada de acuerdo a las especificaciones del fabricante; una vez cargada la muestra se pasaron

5 mL de agua acidificada (2% ácido acético) para eliminar carbohidratos, posteriormente la fracción de compuestos fenólicos se eluyó con 5 mL de MeOH, se evaporó el solvente en un rotovapor (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza), se reconstituyó en MeOH (10 mg/mL), y finalmente se filtró en una membrana PVDF (17 mm × 0.45 µm, TITAN, EE.UU.) previo a su análisis por HPLC. El análisis se realizó en un HPLC modelo ACCELA (Thermo Scientific, EE.UU.) con detector de arreglo de diodos y acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica lineal LTQ-XL (Thermo Scientific, LTQ-XL, EE.UU.). La separación se llevó a cabo en una columna ACE EXCEL C18-Amide (1.50 × 30 mm × 3 µm). La fase móvil consistió en ácido fórmico al 1% (A) y acetonitrilo (B), con un gradiente inicial de 0.5 de B, incremento lineal a 30% de B a los 10 min, permaneciendo así durante 10 min, finalmente incremento lineal hasta 60% de B a los 30 min. El tiempo total de la corrida fue de 35 min. Flujo de 0.3 mL/min y volumen de inyección de 5 µL. La detección se realizó a 250, 320 y 355 nm, y los pesos moleculares de cada pico se analizaron en el espectrómetro de masas con una interfaz de electroasperjado (ESI) operando en modo negativo. El análisis se llevó a cabo en modo de escaneo completo de datos dependientes de MS<sup>n</sup> de m/z 115 a 2000. La identificación de los componentes se realizó a partir de los patrones de fragmentación y por comparación con lo reportado en la literatura.

## **7 Evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo***

### **a Ensayo de toxicidad *in vitro* en *Artemia salina***

El ensayo de toxicidad de *Artemia salina* se llevó a cabo de acuerdo con lo registrado en la literatura con algunas modificaciones (Meyer y col, 1982; Solis y col, 1993). Para obtener los nauplios del crustáceo, huevos *A. salina* (300 mg/300 mL) se

colocaron en un recipiente con medio de mar artificial (MMA) preparada con sal comercial y agua destilada (38 g/L) provisto de un sistema de oxigenación y bajo régimen continuo de luz. Después de 48 h a una temperatura de 22-29 °C, los nauplios fototrópicos eclosionados se colocaron en MMA fresco durante otras 24 h bajo las condiciones descritas. Los extractos etanólicos de las dos especies de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) fueron disueltos en Tween 80 (40 mg/mL). Cada tubo fue adicionado con 10 nauplios de *A. salina*, 200 µL de muestra y 800 µL de MMA (concentraciones finales de los extractos etanólicos de las especies de *Roldana*: 2000, 1000, 100 y 10 µg/mL), cada concentración se evaluó por triplicado. El control negativo se preparó adicionando 200 µL de Tween 80 al 50% (concentración final 5%). Los tubos se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente (22-29 °C) bajo luz continua. Después de este tiempo, se contó el número de larvas vivas en cada tubo. Los porcentajes de muerte a cada dosis y de los controles fueron determinados por la corrección en la fórmula de Abbott (Abbott, 1987):

$$\% M = (r/s') 100$$

En donde % *M* es el porcentaje de mortalidad; *r* las larvas muertas en el extracto y *s'* las larvas vivas en el blanco. Los valores de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se determinaron graficando la concentración de los extractos evaluados contra el porcentaje de letalidad del conteo de 24 h. La información se analizó utilizando el análisis Probit (Finney, 1971).

La escala de toxicidad en *Artemia salina* (CL<sub>50</sub>) es registrada como: elevada (0.1-100 µg/mL), moderada (100-300 µg/mL), baja (300-640 µg/mL), mínima (>640 µg/mL) (Sanabria-Glaindo y col 1997) y no tóxica si es >2000 µg/mL (Meyer y col 1982).

## **b Determinación de la toxicidad aguda en ratones por el método OECD**

La toxicidad de una droga puede medirse determinando la dosis letal media (LD<sub>50</sub>), dosis capaz de provocar la muerte del 50% de los animales de laboratorio y se determinó de acuerdo con los lineamientos establecidos en el protocolo de la OECD, (2022).

Se formaron tres grupos (n=3) de ratones BALB/c hembras (10 semanas, 25-35 g peso): GPO I, control (vehículo, aceite de maíz); GPO II, EE-RS (2000 mg/kg de peso) y GPO III, EE-RH (2000 mg/kg de peso). Los EE se disolvieron en aceite de maíz y se administraron vía intragástrica en dosis única, previo ayuno de 4 h. Después de la administración de la dosis, los ratones se mantuvieron en observación continua las primeras 8 h, a las 24 h y diariamente durante 14 días para determinar algún efecto tardío de los tratamientos. Finalmente, después del día 14, los grupos fueron pesados para calcular la ganancia de peso final, se tomó una muestra sanguínea por punción cardiaca para estimar parámetros hematológicos y posteriormente los ratones fueron sacrificados y sus órganos vitales extraídos (hígado, estomago, riñones y pulmones), estos se pesaron y observaron macroscópicamente.

## **8 Métodos de evaluación de la actividad biológica**

### **a Evaluación de la actividad adaptogénica**

En la evaluación de la actividad adaptogénica para cada una de las pruebas se formaron cuatro grupos de ratones BALB/c (ambos sexos, n=6, 5 a 6 semanas) seleccionados de manera aleatoria. GPO I: control estrés (Tween 80 al 10% en solución salina), GPO II: Ginseng (control positivo), GPO III: extracto etanólico de *R. sessilifolia* (EE-RS) y GPO IV: extracto etanólico de *R. hartwegii*. (EE-RH). A cada ratón

se le administró una dosis de 100 mg/kg de peso por vía intragástrica diariamente durante 15 días. Cada ratón fue utilizado exclusivamente en una prueba.

#### **b Prueba de anoxia**

La prueba de anoxia se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Giri, Rao y Javaveera (2011). Los tratamientos fueron administrados diariamente durante 15 días. Al final del tratamiento, los animales se colocaron en cámaras de vidrio herméticamente cerradas (300 mL) para inducir estrés por anoxia. La prueba de anoxia se expresó como el tiempo transcurrido (min) desde que el ratón fue colocado en una cámara hermética hasta que mostró los primeros signos de convulsión.

#### **c Prueba de nado forzado**

La prueba de nado forzado se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Pripdeevech y col, (2012). Los tratamientos se administraron diariamente durante un período de 15 días y se registró el peso diario de cada ratón. En el día 15, 30 min después de la administración de los tratamientos los ratones se colocaron en un recipiente cilíndrico (25 cm de alto × 10 cm de diámetro) con agua hasta una altura de 10 cm con una temperatura de 30 °C. Los ratones se pusieron a nadar durante 11 min, contando los episodios de inmovilidad a partir del minuto seis. El resultado se reportó como el tiempo medio de inmovilidad de cada grupo.

#### **d Prueba de resistencia de nado en frio**

La prueba de resistencia de nado en frio se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Dayanand y Kishanchandra, (2014). El tratamiento se administró diariamente durante un período de 15 días. En el día 15, 30 min después de la administración de la dosis cada ratón se colocó en un recipiente cilíndrico (25 cm de

alto × 10 cm de diámetro) con agua hasta una altura de 10 cm a una temperatura de 10 °C, y se dejaron nadar hasta agotamiento, tomando como punto final el tiempo en el que el ratón comenzó a hundirse. Inmediatamente los ratones fueron retirados del agua y auxiliados hasta recuperar su temperatura corporal.

#### **e Actividad antioxidante**

La capacidad antioxidante de los EEs de las dos especies de *Roldana* se determinó por dos métodos: DPPH y ABTS. Las metodologías de DPPH y ABTS miden la capacidad de una sustancia de donar electrones o átomos de hidrogeno lo que se representa como una pérdida de color de la solución del radical (Floegel y col, 2011).

#### **f Método DPPH**

Se utilizó la metodología desarrollada por Brand-Williams, Cuvelier y Berset, (1995) con algunas modificaciones. Los EEs de *Roldana* se disolvieron en MeOH (1-10 mg/mL). En una microplaca de 96 pozos de fondo claro, se adicionaron 20 µL de solución de la muestra, estándar (Trolox) o MeOH (control negativo), posteriormente se le adicionaron 180 µL de solución de DPPH en MeOH (150 mM) y la placa se incubó durante 30 min (37 °C/oscuridad) y la absorbancia se midió a 515 nm (Synergy HTX, Biotek, EE.UU.). Como corrector se utilizó una mezcla de 20 µL de la muestra y 180 µL de MeOH. Para la cuantificación se preparó una curva patrón de Trolox (400 – 12.5 µg/mL). Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo del extracto etanólico (µmol ET/g EE).

#### **g Método ABTS**

Se siguió la metodología desarrollada por Re y col, (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS•+ se preparó mezclando 5 mL del reactivo ABTS (7

mM) y 88  $\mu\text{L}$  de una solución de persulfato de potasio  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (140 mM), la mezcla se dejó reaccionar por 12 – 16 h a 25 °C en la oscuridad. El radical ABTS $^{•+}$  se diluyó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (7 mM, pH 7.4), hasta obtener una absorbancia de  $1.40 \text{ nm} \pm 0.020$  a 734 nm. En una microplaca de 96 pozos de fondo claro, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de los EEs diluidos en MeOH (1-10 mg/mL), posteriormente se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  del reactivo ABTS y la placa se puso a incubar durante 10 min (37 °C/oscuridad) absorbancia se midió a 734 nm. Para la cuantificación se preparó una curva patrón de Trolox (200 - 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) utilizando como corrector de color una mezcla de 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y 180  $\mu\text{L}$  de PBS. Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto etanólico ( $\mu\text{mol ET}/\text{g EE}$ ).

#### **h Evaluación de la actividad inmunomoduladora *in vitro***

La evaluación de la actividad inmunomoduladora *in vitro* se realizó de acuerdo con la metodología establecida por Lin y Tang, (2007) con algunas modificaciones. Se sacrificaron ratones BALB/c machos (5-6 semanas de edad) mediante dislocación y se sanitizaron con una disolución de benzal al 10% (v/v), se procedió a la obtención del bazo en condiciones asépticas, para posteriormente obtener los esplenocitos. El bazo se colocó en una caja Petri con medio para cultivos de tejido RPMI-1640 y se homogenizó en el medio usando el émbolo estéril de una jeringa; la suspensión celular se centrifugó a 200g (1500 rpm) /5 min (EBA 20 Hettich Zentrifugen, Alemania) y se eliminó el sobrenadante. Las células recuperadas se trataron con amortiguador de lisis para eliminar los eritrocitos; la suspensión se centrifugó a 200g /5 min y en la pastilla se recuperaron los esplenocitos. Estas células se resuspendieron en medio RPMI-

1640 complementado con suero fetal bovino al 10% v/v, antibiótico-antimicótico al 1% v/v y se llevaron a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL. En microplacas para cultivo celular de 96 pocillos con fondo plano se adicionaron 200  $\mu$ L de la suspensión celular y 50  $\mu$ L de los agentes mitógenos (5  $\mu$ g/mL Con A o 10  $\mu$ g/mL de LPS en medio RPMI.1640), de los EE de *Roldana* (25, 50 y 100  $\mu$ g de extracto/mL, concentración en el pozo) o del vehículo (control crecimiento). La placa se incubó durante 24 h a 37 °C en una incubadora con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y con 95% de humedad (Walter-Jacketed Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, NUAIRE, EE.UU.). Los mitógenos usados estimulan la proliferación de linfocitos T (Con A) o de linfocitos B (LPS). Después de las 24 h, a cada pocillo se le agregaron 10  $\mu$ L de una solución de MTT (5 mg/mL en PBS, pH 7.4), posteriormente la microplaca fue nuevamente incubada por 4 h a las mismas condiciones y posteriormente centrifugada a 2000 g/5 min. Después de esto, el medio de cultivo fue retirado de cada pocillo y se añadieron 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Por último, se homogenizó la microplaca por 30 minutos para disolver las sales de tetrazoilo formadas. La absorbancia se midió a 492 nm (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE.UU.) y los resultados fueron expresados como el porcentaje de proliferación celular respectivo al control.

## **9 Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos fueron evaluados utilizando la prueba de Shapiro-Wilks y Barlett para comprobar una distribución normal y varianza constante. Dependiendo de los resultados obtenidos se eligió el método de comparación entre grupos para evaluar la existencia o ausencia de diferencias significativas. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 95%.



Los datos obtenidos de la evaluación de metabolitos totales (fenólicos totales, flavonoides y taninos totales) y la medición del poder antioxidante (ABTS y DPPH) fueron evaluados mediante una prueba T de dos muestras asumiendo varianzas desiguales utilizando el software Excel.

Los ensayos de inmunomodulación, las pruebas de evaluación de actividad adaptogénica (nado forzado, nado en frío y anoxia), la ganancia de peso y los datos obtenidos del peso de los órganos en las diferentes pruebas fueron evaluados mediante un ANOVA de una vía; a las poblaciones con diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se les realizó un contraste de medias por el método de FISHER empleando el software estadístico Minitab 18.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A Contenido de humedad y rendimientos de extracción

El contenido de humedad en las raíces de las especies de *Roldana* mostró grandes diferencias (73.3% en *R. sessilifolia* y 32.01% en *R. hartwegii*) (**Cuadro 5**), al igual que los rendimientos de extracción (% b.s.) obtenidos por maceración con etanol (11.08% para EE-RS y 4.86% para EE-RH) (**Cuadro 5**). Esta diferencia puede estar asociada a la naturaleza física de ambas raíces, debido a que las de *R. sessilifolia* contienen abundantes tubérculos blandos; mientras que en *R. hartwegii* casi no se forman tubérculos y se compone principalmente de tejidos duros, aparentemente lignificados. Los tubérculos son estructuras que funcionan como órganos de almacenamiento de nutrientes destacando agua (70 a 80%) y azúcares (16 a 24%), además de trazas de proteínas y lípidos (<4%) (Hoover, 2001), lo cual facilita su trituración y la obtención de un tamaño de partícula más fino lo que permite un mayor rendimiento de extracción de sus componentes. En cambio, debido a sus estructuras endurecidas, la molienda de *R. hartwegii* es un proceso difícil y poco eficiente, además de que al almacenar pocos nutrientes y tener funciones principalmente estructurales, contiene una baja proporción de sustancias extraíbles con etanol,

Anteriormente en el Laboratorio de Química de Productos Naturales se obtuvo un extracto metanólico de *R. sessilifolia* con un rendimiento del 27.83%. En la literatura se reportan rendimientos similares a los nuestros para la extracción de raíces de diferentes plantas medicinales con mezclas hidroalcohólicas (etanol/agua): por ejemplo, cúrcuma (4.49 a 12.89%), jengibre (10.12 a 14.94%) y la Ashwagandha

**Cuadro 5.** Contenido de humedad y rendimientos de los extractos etanólicos (EEs) de *Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii*.<sup>1</sup>

Especie de <i>Roldana</i>	Porcentaje	
	Humedad	Extracción (b.s.)
<i>R. sessilifolia</i>	73.3 ± 3.96 <sup>a</sup>	11.1 ± 0.42 <sup>a</sup>
<i>R. hartwegii</i>	32.0 ± 2.88 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.41 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Los valores son la media ± desviación estándar de tres réplicas; b.s. en base seca. Letras superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ).

(*Whitania somnifera*) (9.08 a 13.02%) (Sogi y col, 2010; Dhanani y col, 2017; Cha, Kim y Cho, 2020) por citar algunos.

El etanol es un solvente que permite una mayor recuperación de fitoconstituyentes que los obtenidos con éter de petróleo, cloroformo y agua. Los solventes polares son más efectivos en la extracción de compuestos bioactivos en plantas, lo que ayuda a caracterizarlas mejor (Azwanida, 2015). Asimismo, debe considerarse que el rendimiento de extracción y el tipo de compuestos en el extracto dependerá de la parte de la planta empleada, el método de extracción, tamaño de partícula y el solvente utilizado (Azwanida, 2015; Dhanani y col, 2017).

## **B Caracterización química**

### **1 Análisis fitoquímico de los extractos etanólicos de *Roldana***

Los EEs de las dos especies de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) presentaron cuatro familias de compuestos (**Cuadro 6**): flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas. En el EE-RS se detectaron abundantes terpenos y esteroides y no se identificaron taninos. En contraste, el EE-RH se detectaron abundantes taninos, flavonoides y cumarinas.

Los estudios químicos para 12 especies del género *Roldana* han mostrado abundancia de terpenos y esteroides, identificándose como componentes principales a compuestos de tipo eremófilo, plastoquinonas y compuestos como el  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, a los cuales se les han atribuido diferentes propiedades biológicas como antitumorales, anticancerígenas, antibacterianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Hou y col, 2014; Bayrak y col, 2019; Khan y col, 2022; Bakrim, 2022). En segundo lugar, se encuentran los compuestos fenólicos y flavonoides; por ejemplo, en las especies de *Roldana* *R. aschenborniana*, *R. angulifolia*, *R. platanifolia*,

**Cuadro 6.** Análisis fitoquímico del extracto etanólico de *Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii*.

Metabolitos	Especie de <i>Roldana</i> <sup>1</sup>	
	<i>R. sessilifolia</i>	<i>R. hartwegii</i>
Flavonoides	+++	+++
Terpenos/Esteroles	+++	++
Taninos	-	+++
Cumarinas	++	+++
Saponinas	-	-
Alcaloides	-	-
Cardiotónicos	-	-
Antraquinonas libres	-	-

<sup>1</sup> La cantidad relativa de metabolito se establece como (+++) abundante, (++) moderada, (+) escasa presencia, y (-) ausencia del metabolito.

*R. lobata* y *R. reticulata* se han caracterizado derivados de kaempferol, ácido clorogénico, rutina, hidroquinonas y tirosol (salidrósido) (Arciniegas y col, 2004;2006; Maldonado y col, 2008; Arciniegas y col, 2013; Arciniegas y col, 2015).

A algunos de estos compuestos se le atribuyen propiedades antiparasitarias, antibacterianas, antioxidantes, inmunomoduladoras, ansiolíticas y antidepresivas (Zhong, 2018; Periferakis y col, 2022). Esta diversidad de metabolitos secundarios en *Roldana* sustenta los usos tradicionales para tratar una gran variedad de enfermedades.

## **2 Contenido de metabolitos totales**

El contenido de metabolitos totales en los EEs de las dos especies de *Roldana* evaluadas se muestra en el **Cuadro 7**. En las tres determinaciones (e.g., fenólicos, flavonoides y taninos), el EE-RH presentó el mayor contenido ( $p \leq 0.05$ ), destacando los taninos totales ( $336.4 \pm 9.54 \mu\text{g EC/mg de EE}$ ) que fueron indetectables en el EE-RS, lo que concuerda con el análisis fitoquímico (**Cuadro 6**). Se ha reportado que las plantas acumulan taninos particularmente en los tejidos leñosos como el duramen y la corteza (Hättenschwiler y Vitousek, 2000), lo que coincide con la naturaleza de la raíz de *R. hartwegii*.

Los datos obtenidos concuerdan con reportes fitoquímicos previos de otras especies de *Roldana*, indicando abundancia de flavonoides y fenólicos (Arciniegas y col, 2008); sin embargo, éstos compuestos no se han cuantificado.

Comparando nuestros resultados (**Cuadro 7**) con el de otras raíces de la familia Asteraceae, *Brakleyanthus salicifolius* posee menor contenido de compuestos fenólicos ( $17.22 \mu\text{g EAG/mg de EE}$ ), así como menor contenido de flavonoides totales

**Cuadro 7.** Contenido de metabolitos totales en los extractos etanólicos (EE) de *Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii*.<sup>1</sup>

Especie de <i>Roldana</i>	Fenólicos totales	Flavonoides totales	Taninos totales
	µg EAG/mg EE	µg EQ/mg EE	µg EC/mg EE
<i>R. sessilifolia</i>	66.10 ± 3.30 <sup>b</sup>	6.96 ± 0.90 <sup>b</sup>	ND
<i>R. hartwegii</i>	149.70 ± 4.68 <sup>a</sup>	43.32 ± 1.96 <sup>a</sup>	336.42 ± 9.54

<sup>1</sup> Los valores son la media ± DE de al menos tres réplicas. Letras superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ).

EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina y EC: equivalentes de catequina  
 ND: no detectables.

(9.15  $\mu\text{g}$  EQ/mg de EE) que *R. hartwegii* (43.32  $\mu\text{g}$  EQ/mg de EE). Esta planta presenta propiedades antiinflamatorias, antirreumáticas, nefroprotectoras y hepatoprotectoras (Joaquín-Ramos y col, 2020). *Artemisia absinthium*, conocida comúnmente como “ajenjo”, posee menor contenido de fenólicos (19.77  $\mu\text{g}$  EAG/mg de EM) y flavonoides totales (2.35  $\mu\text{g}$  EQ/mg de EM) (Trifan y col, 2022). En relación a los taninos totales, el contenido del EE-RH ( $336.42 \pm 9.54$   $\mu\text{g}$  EC/mg EE) fue mayor que el de otras especies de la familia Asteraceae: e.g., EM de la raíz de *Echinops spinosissimus* ( $8.30 \pm 0.65$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  EM), planta utilizada tradicionalmente como agente antihipertensivo y contra hemorroides (Zitouni-Nourine y col, 2022); extracto de acetato de etilo (EAE) de la raíz de *Scorzonera undulata* ( $3.25 \pm 0.06$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  EAE), utilizada para tratar enfermedades pulmonares, resfríos y desordenes gastrointestinales (Bellassouad, Feki y Ayadi, 2015).

De acuerdo con la literatura, los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos contribuyen a la actividad adaptogénica e inmunomoduladora de plantas usadas tradicionalmente con estos fines (Panossian, 2003; Todorova y col, 2021). A estos compuestos también se le han asociado propiedades antienvjecimiento, antiinflamatorias y moduladoras del estrés oxidativo (Minatel y col, 2017). Plantas adaptógenas como *Rhodiola rosea*, *Panax ginseng* y *Whitania somnifera* poseen altos contenidos de fenólicos y flavonoides, confiriéndoles propiedades cardioprotectoras, antiinflamatorias y neuroprotectoras. Estas plantas ayudan a mejorar la salud mental y física y pueden ser utilizadas en la prevención o tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas. Por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, arterosclerosis, cáncer, diabetes, cataratas, desordenes de la función cognitiva y enfermedades neurológicas (Arruda y col, 2020; Todorova y col, 2021).



### 3 Caracterización de los extractos etanólicos mediante GC-MS

Los EEs de las dos especies de *Roldana* fueron analizados por GC-MS sin derivatizar y derivatizados, esto último con la finalidad de lograr la identificación de un mayor número de componentes. Ambas especies presentaron terpenos, fitoesteroles, ácidos grasos, carbohidratos, compuestos fenólicos y cetonas (**Cuadros 8 y 9**).

Considerando el porcentaje de área relativo, en las muestras sin derivatizar los compuestos predominantes fueron terpenos (27.58 y 48%), ácidos grasos (26.69 y 16%) y flavonoides (17.24 y 12%) en el EE-RS y el EE-RH, respectivamente. Distintivamente, cetonas (3.44%) y alcaloides (6.89%) solo se detectaron en el EE-RS, mientras que compuestos tipo quinolonas (8%) solamente estuvieron presentes en el EE-RH (**Cuadro 8**).

La derivatización de los extractos evidenció la presencia de carbohidratos: 65% en EE-RS y 36.84% en EE-RH. Además, se identificaron aminoácidos en el EE-RS y compuestos fenólicos en el EE-RH, adicionales a los otros compuestos antes mencionados (**Cuadro 9**).

Ambas especies contienen como terpenos dominantes lactonas sesquiterpénicas: e.g., 3 $\beta$ -Hidroxycostunólido, 1,2,3,3a,8,8a-Hexahidro-2,2,8-trimetil-(3aá,8á,8aá)-5,6-azulenodicarboxaldehído, Acetato-1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3H-oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-ol, Ácido 2-Metil-1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3H-oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-il ester-2-butenoico, Hispitólido-A y 8,9-Dihidro-9-formilcicloisolongifoleno (**Cuadro 8**). Este tipo de lactonas son típicas en especies de la familia Asteraceae y están asociadas a importantes actividades biológicas tales como antiinflamatoria, anticancerígena, antifúngica, ansiolítica, analgésica y antitripanosomal (Moujir y col, 2020).

**Cuadro 8.** Compuestos identificados en el extracto etanólico de *Roldana sessilifolia* (EE-RS) y *Roldana hartwegii* (EE-RH) por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).<sup>1</sup>

Compuesto químico		EE-RS			EE-RH		
No.	Nombre	TR (min)	MM	Match	Área%	Match	Área%
1	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-ona	8.88	144	835	0.003	886	0.020
2	D-Germacrano	18.041	204	740	0.002	886	0.028
3	1,2,3,4,5,6,7,8-Octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metiletildeno)-azuleno (Guaieno)	18.192	204	838	0.005	735	0.002
4	β-Dihidroagarofurano	18.505	222	746	0.004	-	-
5	Espatuleno	20.097	220	-	-	662	0.009
6	1-Hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno	20.118	222	-	-	702	0.017
7	4-Metil-8-metoxi-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepin-2-ona	22.096	204	810	0.002	-	-
8	4,5,9,10-Tetrahidroisolongifoleno	23.1	200	720	0.046	-	-
9	2,4,7-Trimetil-1,8-naftiridina	23.533	172	-	-	729	0.003
10	1,2,3,3a,8,8a-Hexahidro-2,2,8-trimetil-(3aá,8á,8aá)-5,6-azulenodicarboxaldehido	24.237	232	-	-	734	0.291
11	Ácido pentadecanoico	25.459	242	886	0.438	889	0.091
12	Ácido tetradecanoico	25.51	300	-	-	855	0.062
13	Ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico	25.707	212	-	-	777	0.001
14	Trigonelina	25.758	137	611	0.015	-	-
15	Eudesma-5-11(13)-dien-8,12-ólido	25.882	232	714	-	714	<b>4.07</b>
16	2 <i>H</i> -1-Benzopiran-2-ona	27.466	146	665	0.025	-	-
17	9,10-Dimetil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidroantraceno	28.23	214	743	0.093	-	-
18	( <i>R</i> )-Ácido hexadecanoico	28.493	256	918	0.911	817	0.080
19	Propifenazona	30.296	230	754	0.005	696	0.066
20	6- <i>ter</i> -Butil-4-metilcumarina	30.627	216	706	0.043	-	-
21	2-(4-Clorofenil)-4-[(2-propin-1-il)tio]quinazolina	30.719	310	-	-	998	0.001
22	3,6,7,8-Tetrahidro-3,3,6,6-tetrametilindacen-1(2 <i>H</i> )-ona	31.337	228	729	0.128	-	-
23	3,6,9-Trimetil-3,3a,4,5,9a,9b-hexahidroazuleno[4,5- <i>b</i> ]furan-2,7-diona	31.594	246	534	0.192	579	0.018
24	3β-Hidroxicostunólido	33.215	248	680	<b>1.05</b>	-	-

25	2,3-Dihidro-5,8-dimetil-1,4-naftoquinona	33.626	188	600	<b>3.516</b>	-	-
26	Noretinodrel	34.099	298	-	-	516	0.652
27	Acetato-1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3 <i>H</i> -oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-ol	37.763	290	720	0.909	722	<b>1.02</b>
28	Ácido octadecanoico	38.533	352	990	<b>3.862</b>	-	-
29	Ácido oleico	39.046	354	-	-	864	0.234
30	Ácido <i>trans</i> -11- octadecanoico	39.11	354	940	<b>6.138</b>	-	-
31	Ácido-2-Metil-1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3 <i>H</i> -oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-il ester-2-butenico	39.611	330	720	<b>15.379</b>	-	-
32	2-Isopropenil-2,3-dihidrofuro[3,2-g]cromen-7-ona	41.913	228	660	0.235	-	-
33	Ácido linoleico	43.483	352	900	0.837	-	-
34	3,3,6-Trimetil-1,5-heptadien-4-ona	43.865	152	948	0.028	-	-
35	Mesterolona	45.06	304	-	-	658	0.038
36	Senecionina	45.049	335	820	0.013	-	-
37	Hispidolido-A	45.718	306	-	-	701	<b>1.09</b>
38	4-Metil-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol	46.098	83	917	0.042	-	-
39	8,9-Dihidro-9-formilcicloisolongifoleno	46.854	230	-	-	641	0.38
40	Ácido eicosanoico	47.388	384	950	0.591	-	-
41	Hispidolido-A	48.123	306	-	-	707	<b>1.79</b>
42	5,8-Dimetoxi-6-metil-2-nitroso-2-naftol	48.149	247	608	<b>3</b>	-	-
43	<i>Bis</i> (2-Etilhexil)ftalato	48.525	390	941	0.103	-	-
44	Estigmasta-3,5-dieno	57.332	396	-	-	752	0.013
45	22,23-Dihidroestigmasterol	62.584	414	765	0.0414	796	0.081
46	$\gamma$ -Sitosterol	62.615	414	940	<b>1.130</b>	-	-
47	$\alpha$ -Sitosterol	64.735	486	-	-	693	0.021

<sup>1</sup>Negritas indican compuestos con mayor área (>1%). Cantidad relativa de las familias de compuestos detectadas (%): en *R. sessilifolia* terpenos 27.58%, fitoesteroles 3.44%, ácidos grasos 20.69%, flavonoides 17.24%, cetonas 3.44% y alcaloides 6.89%; en *R. hartwegii* terpenos 48%, fitoesteroles 12%, ácidos grasos 16%, flavonoides 12% y quinolonas 8%.

**Cuadro 9.** Compuestos identificados en el extracto etanólico derivatizado de *Roldana sessilifolia* (EEd-RS) y *Roldana hartwegii* (EEd-RH) por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).<sup>1</sup>

Compuesto químico		EEd-RS			EEd-RH		
No.	Nombre	TR (min)	MM	Match	Área%	Match	Área%
1	2,2,8,8-Tetrametil-3,7-dioxa-2,8-disilanonan-5-ona	11.46	234	-	-	914	0.205
2	Éter de glicerol(TMS)	13.395	308	936	0.329	-	-
3	L-Prolina(TMS)	13.598	259	916	0.069		
4	D-Germacrano	18.03	204	-	-	851	0.012
5	2,4-bis(1,1-dimetil-etil)fenol	18.337	206	-	-	863	0.005
6	Espatulenol	20.09	220	-	-	711	0.010
7	$\alpha$ -D-1,2,3,5,6-pentakis-O-(TMS)galactofuranosa	24.244	540	-	-	856	0.039
8	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	24.375	468	-	-	709	0.176
9	Dímero de 1,2,3,4,5-pentakis-O-(TMS)xilitol	24.68	512	922	0.323	-	-
10	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	24.957	468	-	-	759	<b>2.27</b>
11	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	24.96	468	-	-	760	<b>2.8</b>
12	D-1,2,3,5-tetrakis-O-(TMS)xilofuranosa	24.994	438	-	-	709	<b>2.51</b>
13	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	24.957	468	-	-	759	<b>2.27</b>
14	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	24.96	468	-	-	760	<b>2.8</b>
15	$\alpha$ -D/L-2,3,5-tris-O-(TMS)-metilarabinofuranósido	25.17	380	-	-	671	<b>1.11</b>
16	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	25.394	468	-	-	716	<b>2.12</b>
17	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	25.403	468	-	-	710	<b>2.14</b>
18	L-2,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)altrosa	25.575	540	-	-	740	0.163
19	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa-O-metiloxima	25.647	540	-	-	781	<b>1.07</b>
20	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa-O-metiloxima	25.647	540	-	-	784	0.899
21	5,11(13)-Dien-8,12-eudesmaólido	25.846	232	-	-	718	<b>1.76</b>
22	5,11(13)-Dien-8,12-eudesmaólido	25.865	232	-	-	723	<b>2.09</b>
23	$\alpha$ -D-2,3,5,6-Tetrakis-O-(TMS)metilglucofuranósido	25.866	482	821	<b>1.03</b>	-	-
24	[4aR-(4aá,5á,8aá)]-4a,5,6,7,8,8a-hexahidro-3,4a,5-trimetil-nafto[2,3-b]furan-9(4H)-ona	25.874	232	-	-	645	<b>1.83</b>

25	Dímero de tetra(TMS)dihidroxiacetona	26.2	468	-	-	695	<b>5.57</b>
26	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa	26.459	540	787	<b>14.6</b>	-	-
27	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa	26.58	540	-	-	807	<b>1.03</b>
28	Ácido D-2-Pentakis(TMS)cetoglucónico	26.634	554	783	<b>21.59</b>	-	-
29	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa	26.732	540	-	-	800	0.42
30	Pentakis-O-(TMS)glucopiranososa	26.785	540	799	<b>2.39</b>	-	-
31	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa	26.811	540	900	<b>4.52</b>	-	-
32	D-1,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)fructosa	26.818	540	903	<b>4.36</b>	-	-
33	Pentakis-O-(TMS)glucofuranosa	27.036	540	-	-	824	0.199
34	$\alpha$ -D-2,3,5,6-Tetrakis-O-(TMS)metilglucofuranósido	27.055	482	824	<b>1.5</b>	-	-
35	L-2,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)altrosa	27.255	540	930	0.328	905	0.043
36	<i>n</i> -Pentadecanoato de TMS	27.653	314	-	-	774	0.345
37	1,2,3,4,5-Pentakis-O-(TMS)xilitol	27.773	512	-	-	731	0.203
38	1,2,3,4,5-Pentakis-O-(TMS)ribitol	27.781	512	-	-	733	0.153
39	$\alpha$ -D-1,2,3,4,6-Pentakis-O-(TMS)galactopiranososa	28.384	540	920	<b>3.28</b>	-	-
40	D-Tetrakis(TMS)xilosa	28.435	438	-	-	789	0.069
41	2,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-Talosa	28.791	540	932	0.2	-	-
42	2-(4-Metoxifenil)-4-[(2-propin-1-il)tio]quinazolina	29.48	306	782	<b>1.19</b>	-	-
43	2,3,4,5,6-Pentakis-O-(TMS)talosa	31.277	540	928	<b>2.37</b>	-	-
44	Acetato de 1a,2,4,4a,5,9-Hexahidro-4,4a,6-trimetil-3 <i>H</i> -oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-olilo	33.375	290	-	-	765	0.319
45	Acetato de 1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3 <i>H</i> -oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-olilo	34.042	290	-	-	719	0.615
46	Acetato de 1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3 <i>H</i> -oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-olilo	37.73	290	-	-	760	0.052
47	Acetato de 1a,2,4,4a,5,9-hexahidro-4,4a,6-trimetil-3 <i>H</i> -oxireno[8,8a]nafto[2,3-b]furan-5-olilo	39.565	290	-	-	720	<b>1.12</b>
48	( <i>Z,Z</i> )-9,12-Octadecadienoato de TMS	38.653	352	875	0.143	-	-
49	[3 <i>R</i> -(3á)]4-(Acetoxi)decahidro-8-hidroxi-,3,8a-dimetil-5-metilenafto[2,3-b]furan-2(3 <i>H</i> )-ona	44.355	308	561	0.078	-	-
50	Hispidolide-A	45.688	306	-	-	702	0.547

51	Hispidolide-A	48.104	306	-	-	701	0.966
52	3,6,9-Trimetil-3,3a,4,5,9a,9b-hexahidroazuleno[4,5-b]furan-2,7-diona	48.546	248	673	<b>1.3</b>	-	-
53	$\alpha$ -D-1,3,4,6-Tetrakis-O-(TMS)fructofuranosil- $\alpha$ -D-2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)glucopiranosido	50.102	918	888	0.669	-	-
54	$\alpha$ -D-1,3,4,6-Tetrakis-O-(TMS)fructofuranosil- $\alpha$ -D-2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)glucopiranosido	51.782	918	928	<b>1.94</b>	848	0.053

<sup>1</sup>Negritas indican compuestos con mayor área (>1%). Cantidad relativa de las familias de compuestos detectadas (%): para *R. sessilifolia* terpenos 10%, carbohidratos 65%, alcoholes 5%, ácidos grasos 5%, quinazolina 5%, cetonas 5% y aminoácidos 5%; y para *R. hartwegii* terpenos 28.94%, carbohidratos 36.84%, ácidos grasos 2.63%, cetonas 23.68% y compuestos fenólicos 2.63%.

Los compuestos que presentaron mayor área en EE-RS y EE-RH fueron derivados del azuleno (e.g., espatulenol, guaieno, 1,2,3,3a,8,8a-Hexahidro-2,2,8-Trimetil-(3aá,8á,8aá)-5,6-azulenodicarboxaldehido y 3,6,9-Trimetil-3,3a,4,5,9a,9b-hexahidroazuleno[4,5-b]furan-2,7-diona). Este tipo de compuestos se han reportado en *Matricaria chamomilla*, *Artemisia absinthium* y *Achillea millefolium*, entre otras, plantas utilizadas en medicina tradicional para terapias antiinflamatorias y antialérgicas (Ali, Gopalakrishnan y Venkatesalu, 2017; Batiha y col, 2020; El Mihyaoui y col, 2022). Mientras que los compuestos identificados tienen potencial para tratar neoplasias, diabetes, enfermedades virales y fúngicas, así como para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Bakun y col, 2021).

En cuanto a compuestos individuales, el EE-RS destacó en la presencia de ácido linoleico, así como de los esteroides estigmasterol y sitosterol. Al respecto, la microbiota intestinal transforma el ácido linoleico en conjugados del ácido linoleico, compuestos con diferentes propiedades biológicas y que se relacionan con la modulación de la inflamación, signo de la patogénesis de enfermedades concurrentes como la artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, obesidad, diabetes, asma, alergias, infecciones bacterianas y virales, así como el cáncer (Viladomiu, Hontecillas y Bassaganya-Riera, 2016). Por otra parte, se ha encontrado que el estigmasterol y sitosterol poseen propiedades inmunomoduladoras, antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antioxidantes y neuroprotectoras (Bakrim y col, 2022; Khan y col, 2022).

Otro compuesto de interés presente en el EE-RS fue el alcaloide senecionina, perteneciente a la familia de la pirrolizidina (PA). A la fecha, en el género *Roldana* no se habían identificado alcaloides; sin embargo, éstos son comunes en el género

*Senecio* de la cual el género *Roldana* fue segregado. Los alcaloides pueden tener efectos terapéuticos, en su estructura presentan grupos hidroxilados que les permite mimetizar la estructura de un monosacárido y les confiere propiedades antivirales, anticancerígenas y antidiabéticas (Romo de Vivar y col, 2007). Sin embargo, la mayoría de los PA son hepatotóxicos, algunos inclusive mutagénicos, causando hepatomegalia, desórdenes veno-oclusivos y otras afecciones (Romo de Vivar y col, 2007).

Por último, el EE-RH contiene el eremofilanólido Eudesma-5-11(13)-dien-8,12-ólido (4.07%), esto concuerda con los estudios realizados sobre la composición química del género *Roldana*, donde este tipo de compuestos han sido aislados en 12 especies hasta la fecha (Delgado y col, 1991; Delgado y col, 1996; Pérez-Castorena y col, 2006; Arciniegas y col, 2008; Maldonado y col, 2008; Arciniegas y col, 2013). Los reportes científicos sugieren que los eremofilanólidos contribuyen significativamente a las actividades biológicas de especies de *Roldana*. Los eremofilanólidos fueron aislados por primera vez de la madera de *Eremophila mitchelli*, ésta se utiliza como analgésico y para el tratamiento contra agentes patógenos (Massy-Westropp y Reynolds, 1966). Algunas de las propiedades farmacéuticas asociados a los eremofilanólidos incluyen citotoxicidad, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria y antialérgica (Hou y col, 2014).

#### **4 Caracterización de los extractos etanólicos mediante HPLC-ESI-MS**

La identificación de los compuestos se basó en sus espectros de absorción UV-vis, patrones de fragmentación obtenidos por ESI-MS/MS y comparación con información reportada en la literatura. En total se identificaron 15 compuestos en el EE-RS y 24



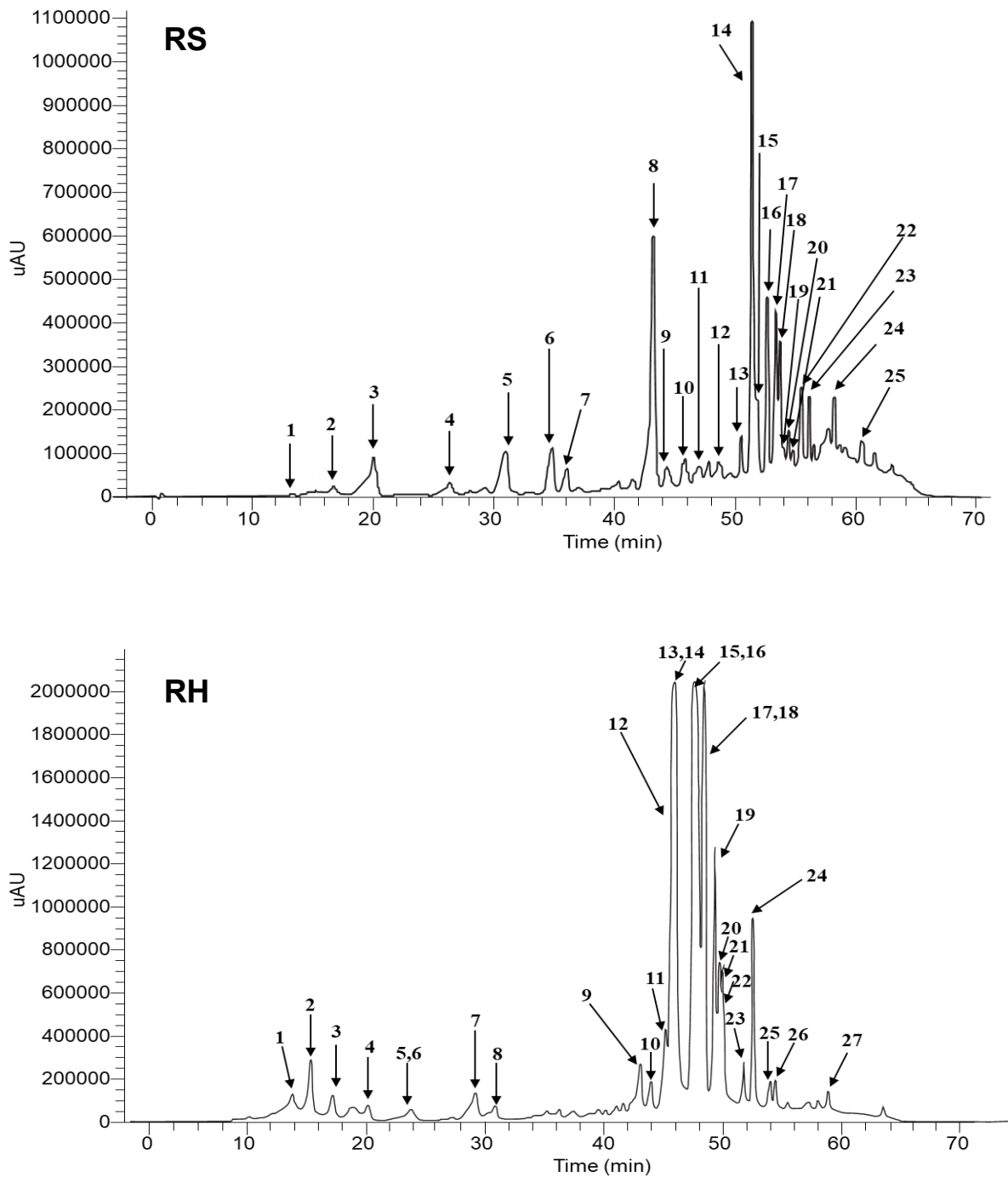
compuestos en el EE-RH (**Figura 4, Cuadro 10 y Cuadro 11**). Los espectros UV-vis indicaron la presencia de flavonoides ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 250, 360 \text{ nm}$ ), ácidos fenólicos ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 320 \text{ nm}$ ) y taninos condensados ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 240, 380, 650 \text{ nm}$ ). En general, el EE-RH destacó en la presencia de flavonoides, mientras que el EE-RS presentó mayor diversidad en su composición química.

Asimismo, los resultados de ESI-MS/MS permitieron identificar iones cuasimoleculares  $[M-H]^-$  y fragmentos característicos para compuestos derivados de kaempferol ( $m/z = 285$ ) (El Sayed y col, 2023), quercetina ( $m/z = 301$ ) (Pascale y col, 2020) e isoramnetina ( $m/z = 315$ ) (Mustafa y col, 2022), ácidos fenólicos derivados de ácido cafeico ( $m/z = 179$ ) (El-Shazly y col, 2022), cumárico ( $m/z = 163$ ) (Cheiran y col, 2019), siríngico ( $m/z = 197$ ) (Luo y col, 2020), ácido gálico ( $m/z = 169$ ) (Felegyi-Tóth y col, 2022), y monómeros de proantocianidinas como (epi)galocatequina ( $m/z = 305$ ) (Ambigaipalan y col, 2016). En cuanto a los sustituyentes, las pérdidas indicaron la presencia principalmente de los carbohidratos: pentosas (132 Da) (Karonen y Pihlava, 2022), metilpentosas (e.g., ramnosa) (146 Da) (Abdel-Moez y col, 2023) y hexosas (162 Da) (Karonen y Pihlava, 2022).

A continuación, se muestra la interpretación de los datos obtenidos por ESI-MS/MS para la identificación de compuestos en cada especie de *Roldana*.

#### **a** *Roldana sessilifolia*

El **pico 1** presentó un ion molecular  $[M - H]^-$  con  $m/z = 215$ , la pérdida de una molécula de  $H_2O$  generó el fragmento más abundante  $m/z = 197 [(M - H) - 18]^-$  y éste último produjo el fragmento  $m/z = 153 [(M - H) - 44]^-$ . Este patrón de fragmentación es característico del ácido siríngico, que podría estar formando aducto con agua como



**Figura 4.** Cromatogramas (HPLC-DAD,  $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) de los extractos etanólicos de *Roldana sessilifolia* (RS) y *Roldana hartwegii* (RH). La identificación de los picos se presenta en los **Cuadros 10** y **11**.

**Cuadro 10.** Datos cromatográficos y espectrales utilizados en la identificación de los picos mayoritarios del extracto etanólico de *Roldana sessilifolia* (EE-RS).

Pico	TR <sup>2</sup> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentación MS/MS [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Identidad asignada
1	11.72	270	215	MS <sup>2</sup> [215] <sup>-</sup> → <b>197</b> , 171, 153 MS <sup>3</sup> [197] <sup>-</sup> → <b>153</b> , 135, 97	Ácido siríngico hidratado
2	16.53	267	279	MS <sup>2</sup> [279] <sup>-</sup> → <b>235</b> , 191, 139, 87. MS <sup>3</sup> [235] <sup>-</sup> → <b>191</b> , 175, 123.	NI
3	20.36	320	179	MS <sup>2</sup> [179] <sup>-</sup> → <b>135</b> , 123.	Ácido cafeico
4	26.71	352	261	MS <sup>2</sup> [261] <sup>-</sup> → <b>217</b> , 176, 140, 123. MS <sup>3</sup> [217] <sup>-</sup> → 202, <b>189</b> , 173, 161, 96.	Ácido 9-hidroxi-fluoranteno-8-carboxílico
5	31.11	323	219	MS <sup>2</sup> [219] <sup>-</sup> → 201, <b>163</b> , 149, 121.	Espatulanol
6	34.88	260, 320	385	MS <sup>2</sup> [385] <sup>-</sup> → <b>367</b> , 339, 323, 297, 279, 223, 179. MS <sup>3</sup> [367] <sup>-</sup> → 349, <b>323</b> , 305. MS <sup>4</sup> [305] <sup>-</sup> → 289, 261, 197, 183, 175, 125, 110.	Sulfato de (epi)galocatequina
7	36.10	320	595	MS <sup>2</sup> [595] <sup>-</sup> → 577, 551, <b>433</b> , 393, 347, 315, 279, 247, 225, 179.	NI
8	43.18	320-350	537	MS <sup>2</sup> [537] <sup>-</sup> → 519, 493, <b>375</b> . MS <sup>3</sup> [375] <sup>-</sup> → 357, 331, 201, 179, 135.	Amentoflavona
9	44.52	320-350	515	MS <sup>2</sup> [515] <sup>-</sup> → <b>353</b> , 335, 299, 255, 179. MS <sup>3</sup> [353] <sup>-</sup> → <b>191</b> , <b>173</b> , 135.	Ácido 1,5-O-dicafeoilquínico
10	45.8	220	463	MS <sup>2</sup> [463] <sup>-</sup> → 445, 419, 383, <b>301</b> , 281, 269, 321, 205, 179.	Quercetín-O-hexósido
11	46.92	224	263	MS <sup>2</sup> [263] <sup>-</sup> → 245, 235, 219, 201, 175, 127, 97 MS <sup>3</sup> [219] <sup>-</sup> → 204, 191, 177, 163, 149, 121.	NI
12	49.05	230	377	MS <sup>2</sup> [377] <sup>-</sup> → 333, 289, 277, 245, 233, 203. MS <sup>3</sup> [277] <sup>-</sup> → 233, 215, 189, 171, 147. MS <sup>4</sup> [233] <sup>-</sup> → 177, 163, 149, 121.	NI
13	50.35	300	363	MS <sup>2</sup> [363] <sup>-</sup> → 319, 277, 233. MS <sup>3</sup> [277] <sup>-</sup> → 259, 233, 215, 189, 171, 87.	NI
14	51.21	245, 280, 330	317	MS <sup>2</sup> [317] <sup>-</sup> → 303, 279, 255, 231, 165. MS <sup>3</sup> [279] <sup>-</sup> → 261, 235, 217, 191, 173, 165, 140.	NI

15	51.7	297, 315	755	MS <sup>2</sup> [755] <sup>-</sup> → 737, 713, 593, 474, 295, <b>279</b>	Pentósido de verbascosido
16	52.49	288, 322	361	MS <sup>2</sup> [361] <sup>-</sup> → 343, 317, 275, <b>261</b> , 217, 199, 163. MS <sup>3</sup> [261] <sup>-</sup> → 217, 173, 161.	NI
17	53.19	220-340	265	MS <sup>2</sup> [265] <sup>-</sup> → <b>221</b> , 189, 165, 97.	Fuhalol
18	53.23	220-340	583	MS <sup>2</sup> [583] <sup>-</sup> → 539, 495, 409, <b>351</b> , 215, 191, 173. MS <sup>3</sup> [351] <sup>-</sup> → 307, 261, 215, 194.9, 177, 133.	NI
19	53.91	293-350	309	MS <sup>2</sup> [309] <sup>-</sup> → 291, <b>265</b> , 221, 203, 123, 97.	Indicaxantina
20	54.11	293-350	593	MS <sup>2</sup> [593] <sup>-</sup> → 575, 549, 517, 507, 493, 380, 352, 334, <b>285</b> , 257, 225, 179.	Kaempferol-O-(hexosil)ramnósido
21	54.78	293, 330	<b>353</b>	MS <sup>2</sup> [353] <sup>-</sup> → 335, 309, 281, 249, <b>191</b> , 179, 123.	Ácido cafeoilquínico
22	55.28	355	493	MS <sup>2</sup> [493] <sup>-</sup> → 474, 448, 412, <b>330</b> , 262, 232, 205, 153. MS <sup>3</sup> [447] <sup>-</sup> → 403, 280.	Patuletín-7-hexósido
23	55.9	315	521	MS <sup>2</sup> [521] <sup>-</sup> → 489, 477, 459, 433, 241, 191. MS <sup>3</sup> [477] <sup>-</sup> → 462, 433, 403, 377, 305, 281, 231, <b>179</b> .	Ácido hexosil-rosmarínico
24	57.95	287	599	MS <sup>2</sup> [599] <sup>-</sup> → 581, <b>555</b> , 511, 409, 367, 351, 319, 305, 275, 231, 191. MS <sup>3</sup> [555] <sup>-</sup> → 511, 499, 265, 189.	NI
25	60.19	280	483	MS <sup>2</sup> [483] <sup>-</sup> → 465, 439, 395, 377, 317, <b>255</b> , 227, 153. MS <sup>3</sup> [255] <sup>-</sup> → 237, 208, 149. 87.	NI

RT: tiempo de retención, NI: no identificado.

**Cuadro 11.** Datos cromatográficos y espectrales utilizados en la identificación de los picos mayoritarios del extracto etanólico de *Roldana hartwegii* (EE-RH).

Pico	TR <sup>2</sup> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentación MS/MS [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Identidad asignada
1	13.71	312	325	MS <sup>2</sup> [325] <sup>-</sup> → <b>183</b> , 169	Derivado de ácido metilgálico
2	15.28	315	355	MS <sup>2</sup> [355] <sup>-</sup> → 337, <b>309</b> , 265, 199, 183, 153, 125	NI
3	17.62	325	385	MS <sup>2</sup> [385] <sup>-</sup> → 367, 341, 267, <b>223</b> , 183, 137	Sinapoil-hexósido
4	20.01	320	179	MS <sup>2</sup> [179] <sup>-</sup> → 151, <b>135</b>	Ácido cafeico
5	23.67*	322	181	MS <sup>2</sup> [181] <sup>-</sup> → 166, <b>137</b> , 109, 99	Ácido dihidrocafeico
6	23.67	270-370	379	MS <sup>2</sup> [379] <sup>-</sup> → 361, <b>335</b> , 299, 249, 205, 181, 137, 153.	NI
7	29.10	308	487	MS <sup>2</sup> [487] <sup>-</sup> → 469, 455, 443, 425, <b>277</b> , 171, 153.	NI
8	30.68	286, 340	305	MS <sup>2</sup> [305] <sup>-</sup> → <b>287</b> , 273, <b>261</b> , 173, 138.	(Epi)galocatequina
9	42.78	271, 356	493	MS <sup>2</sup> [493] <sup>-</sup> → <b>331</b> MS <sup>3</sup> [331] <sup>-</sup> → <b>315</b> , 209, 181	Patuletín-O-hexósido
10	43.71	267, 350	447	MS <sup>2</sup> [447] <sup>-</sup> → <b>285</b> , <b>284</b> , 79	Kaempferol-O-hexósido
11	44.31	250-360	593	MS <sup>2</sup> [593] <sup>-</sup> → 447, 315, <b>300</b> , 285, 179.	Quercetín-O-(ramnosil)ramnósido
12	44.97	270, 350	477	MS <sup>2</sup> [477] <sup>-</sup> → 357, <b>314</b> , 299, 179, 151.	Isoramnetín-O-hexósido
13	45.72	254, 350	463	MS <sup>2</sup> [463] <sup>-</sup> → 343, <b>301</b> , 151	Quercetín-O-hexósido
14	46.35	271, 350	771	MS <sup>2</sup> [771] <sup>-</sup> → 753, <b>609</b> , 508, 490, 339, 301, 279, 255.	Quercetín-O-hexosilramnosil-hexósido
15	47.01	271, 350	609	MS <sup>2</sup> [609] <sup>-</sup> → 447, 429, <b>300</b> , 285, 255, 179.	Quercetín-O-(hexosil)ramnósido
16	47.45	271, 350	477	MS <sup>2</sup> [477] <sup>-</sup> → <b>314</b> , 300, 179, 151.	Isoramnetín-O-hexósido

17	47.5	255, 351	447	MS <sup>2</sup> [447] <sup>-</sup> → <b>301</b> , 279, 255.	Quercetín-O-ramnósido
18	47.8	253, 346	741	MS <sup>2</sup> [741] <sup>-</sup> → 723, 609, 591, <b>579</b> , 355, <b>301</b> , 279, 255. MS <sup>3</sup> [579] <sup>-</sup> → 447, 429, 355, <b>301</b> , 271, 255.	Quercetín-O-hexosil-O- (pentosil)ramnósido
19	48.16	255, 349	579	MS <sup>2</sup> [579] <sup>-</sup> → 475, 447, 429, 355, <b>300</b> , 271, 179.	Quercetín-O- (pentosil)ramnósido
20	49.06	265, 345	725	MS <sup>2</sup> [725] <sup>-</sup> → 688, 593, <b>563</b> , 413, 285, 255.	Kaempferol-O-hexosil-O- (pentosil)ramnósido
21	49.39	265, 350	489	MS <sup>2</sup> [489] <sup>-</sup> → 447, 343, <b>285</b> .	Kaempferol-O- (acetil)hexósido
22	49.56	256, 352	519	MS <sup>2</sup> [519] <sup>-</sup> → 459, 537, <b>315</b> , 300.	Isoramnetín-O- (acetil)hexósido
23	49.78	265, 349	563	MS <sup>2</sup> [563] <sup>-</sup> → 519, 447, 431, 413, <b>284</b> , 255, 179.	Kaempferol-O- (pentosil)ramnósido
24	52.69	255, 369	301	MS <sup>2</sup> [301] <sup>-</sup> → 257, <b>179</b> , <b>151</b> , <b>107</b> .	Quercetina
25	53.91	254, 350	285	MS <sup>2</sup> [285] <sup>-</sup> → <b>241</b> , 199, 175, 151.	Kaempferol
26	54.19	270, 358	315	MS <sup>2</sup> [315] <sup>-</sup> → <b>300</b> , 271, 197, 151.	Isoramnetina
27	58.48	272, 339	599	MS <sup>2</sup> [599] <sup>-</sup> → <b>581</b> , 437, 419, 283, 255, 241.	Derivado de fosfatidilinositol

TR: Tiempo de retención, NI: no identificado.

se ha reportado para otros compuestos fenólicos (Yeo y Shahidi, 2020). Basado en lo anterior el pico **1** se identificó como ácido siríngico hidratado.

El **pico 2** no fue identificado, presentó un ion molecular  $m/z = 279 [M - H]^-$  y fragmentos (MS/MS)  $m/z = 235 [(M - H) - 44]^-$  y  $m/z = 191 [(M - H) - 44 - 44]^-$  debido a pérdidas consecutivas de  $CO_2$ . Un ion a  $m/z = 191$  podría atribuirse a una molécula de ácido quínico o ácido cítrico; sin embargo, no se observaron sus fragmentos principales de  $m/z = 173$  y  $111$ , respectivamente.

El **pico 3** fue identificado como ácido cafeico al presentar el ion molecular  $m/z = 179 [M - H]^-$  y su fragmento  $m/z = 135 [(M - H) - 44]^-$  (100) atribuido a la pérdida de  $CO_2$  (Bastos y col, 2007).

El **pico 4** fue identificado como ácido 9-hidroxi-fluoranteno-8-carboxílico, basado en el ion molecular  $m/z = 261 [M - H]^-$  y su fragmento  $m/z = 217 [(M - H) - 44]^-$  representando la pérdida de una molécula de  $CO_2$ , este fragmento da origen al fragmento  $m/z = 189 [(M - H) - 28]^-$  debido a la pérdida de  $CO$  (Maeda y col, 2014).

El **pico 5** presentó un ion molecular  $m/z = 219 [M - H]^-$  y fragmentos  $m/z = 101 [(M - H) - 18]^-$ ,  $163 [(M - H) - 56]^-$  (100) y  $149 [(M - H) - 70]^-$ . Klau y col. (2023) asignaron esta fragmentación al espatulenol, este compuesto también fue identificado en el análisis por CG-MS.

El **pico 6** presentó un ion molecular  $m/z = 385 [M - H]^-$  y fragmentos característicos de (epi)galocatequina  $m/z = 305 [(M - H) - 80]^-$ ,  $289$  y  $110$  (fragmento de catecol). La pérdida de  $80 Da$  puede ser asociada a la presencia de sulfato, por lo que el compuesto fue identificado como sulfato de (epi)galocatequina (Dueñas y col, 2012).

El **pico 7** no fue identificado, presentó un ion molecular  $m/z = 595 [M - H]^-$  y un patrón de fragmentación complejo que incluye los fragmentos más abundantes  $m/z = 577 [(M - H) - 18]^-$ ,  $551 [(M - H) - 44]^-$ ,  $433 [(M - H) - 162]^-$ ,  $315[(M - H) - 280]^-$ , 279 y 179. Las pérdidas de 18 y 44 Da sugieren presencia de sustituyentes ácidos, la de 162 Da de hexosa y la de 179 Da de ácido cafeico; sin embargo, la información fue insuficiente para la identificación tentativa.

El **pico 8** fue identificado como amentoflavona, basado en el ion molecular  $m/z = 537 [M - H]^-$  y el fragmento  $m/z = 375 [(M - H) - 162]^-$  que representa la ruptura <sup>0,4</sup>A- de una de las apigeninas (Michler y col, 2011).

El **pico 9** fue identificado como ácido 1,5-O-dicafeoilquínico basado en el ion molecular  $m/z = 515 [M-H]^-$  y dos fragmentos, el primero con  $m/z = 353 [(M - H) - 162]^-$ , representando la pérdida de un residuo de ácido cafeico, y el segundo con  $m/z = 191 [(M - H) - 162]^-$ , representando la pérdida del segundo residuo de ácido cafeico, dando como resultado el esqueleto del ácido quínico, que tras sufrir una deshidratación genera el fragmento  $m/z = 173 [(M - H) - 18]^-$  (Gouveoa y Castilho, 2011).

El **pico 10** fue identificado como quercetín-O-hexósido basado en el ion molecular  $m/z = 463 [M - H]^-$  y la pérdida de 162 Da, correspondiente a un residuo de hexosa, generando así la aglicona quercetina con  $m/z = 301 [(M - H) - 162]^- (Y_0^-)$  (Gouveoa y Castilho, 2011).

Los **picos 11 – 14** presentaron iones moleculares  $[M - H]^-$   $m/z = 263, 377, 363$  y  $317$ , respectivamente, y no fue posible identificarlos (**Cuadro 10**).

El **pico 15** fue identificado como pentóxido de verbascósido basado en el ion molecular  $m/z = 755 [M - H]^-$  y un fragmento  $m/z = 593 [(M - H) - 162]^-$  debido a la



liberación de un fragmento de ácido cafeico de la estructura del verbascósido (Passon y col, 2021).

El **pico 16** no fue identificado, presentó un ion molecular  $m/z = 361 [M - H]^-$  y fragmentos principales de  $m/z = 261 [(M - H) - 100]^-$  (100%),  $217 [(M - H) - 144]^-$  y  $199 [(M - H) - 162]^-$ .

El **pico 17** fue identificado como fuhalol (florotanino) basado en el ion molecular  $m/z = 265 [M - H]^-$  y un fragmento  $m/z = 221 [(M - H) - 44]^-$ , representando la pérdida de  $CO_2$  (Chouh y col, 2022).

El **pico 18** no fue identificado, presentó un ion molecular  $m/z = 583 [M - H]^-$  y sus principales fragmentos fueron  $m/z = 495 [(M - H) - 88]^-$  ( $2CO_2$ ),  $351 [(M - H) - 232]^-$  (100%) y  $215 [(M - H) - 232 - 136]^-$ .

El **pico 19** fue identificado como indicaxantina basado en el ion molecular  $m/z = 309 [M - H]^-$  y un fragmento  $m/z = 265 [(M - H) - 44]^-$ , representando la pérdida de  $CO_2$  (Tran y Do, 2019).

El **pico 20** fue identificado tentativamente como kaempferol-O-(hexosil)ramnósido, presentó ion molecular  $m/z = 593 [M - H]^-$  y muchos fragmentos, el más abundante corresponde a la aglicona (kaempferol) con  $m/z = 285 [(M - H) - 308]^-$  ( $Y_0^-$ ) como resultado de la pérdida de hexosa y ramnosa (Marzouk y col, 2016).

El **pico 21** fue identificado como ácido cafeoilquínico basado en el ion molecular  $m/z = 353 [M - H]^-$  y un fragmento  $m/z = 191 [(M - H) - 162]^-$ , representando la pérdida de ácido cafeico, dando como resultado el esqueleto del ácido quínico (Gouveia y Castilho, 2011).

El **pico 22** fue identificado como patuletín-*O*-hexósido basado en el ion molecular  $m/z = 493 [M - H]^-$ , el cual presentó una pérdida de 162 Da, correspondiente a glucosa, generando así la aglicona (patuletina) con  $m/z = 330 [(M - H) - 162]^-$  (Marzouk y col, 2016).

El **pico 23** fue identificado como ácido hexosil-rosmarínico basado en el ion molecular  $m/z = 521 [M - H]^-$  y un fragmento  $m/z = 179 [(M - H) - 342]^-$ , representando la pérdida de hexosa y ácido cafeico (Sonmezdag, Kelebek y Selli, 2016).

Por último, el patrón de fragmentación de los **picos 24 y 25** no fue posible relacionarlos con alguna estructura y no fueron identificados.

#### **b** *Roldana hartwegii*

El **pico 1** presentó el ion molecular  $m/z = 325 [(M - H)]^-$  y fue identificado como derivado de ácido metil-gálico, presentó los fragmentos  $m/z = 183 [(M-H) - 142]^-$  y  $m/z = 169 [(M - H) - 142 - 14]^-$  (Sanz y col, 2010).

El **pico 2** no fue identificado, presentó un ion molecular  $m/z = 355 [M - H]^-$  y sus principales fragmentos fueron  $m/z = 337 [(M - H) - 18]^-$  ( $2CO_2$ ),  $309 [(M - H) - 46]^-$  (100%) y  $183 [(M - H) - 172]^-$ .

El **pico 3** fue identificado como sinapoil-hexósido, presentó el ion molecular  $m/z = 385 [M-H]^-$  y el fragmento  $m/z = 223 [(M - H) - 162]^-$ , el cual representa la pérdida de la hexosa de la estructura del ácido sinápico (Barros y col, 2011).

El **pico 4** corresponde al ácido cafeico al presentar el ion molecular  $m/z = 179 [M - H]^-$  y el fragmento  $m/z = 135 [(M - H) - 44]^-$  debido a la pérdida de  $CO_2$  (Bastos y col, 2007).

El **pico 5** fue identificado como ácido dihidrocafeico basado en su ion molecular  $m/z = 181 [M - H]^-$  y el fragmento  $m/z = 137 [(M - H) - 44]^-$ , representando la pérdida de  $CO_2$ .

Los iones moleculares  $[M - H]^-$  de los **picos 6** ( $m/z = 379$ ) y **7** ( $m/z = 487$ ) y sus fragmentos fue imposible asociarlos con una posible identidad.

El **pico 8** fue identificado como (epi)galocatequina basado en el ion molecular  $m/z = 305 [M - H]^-$  y dos fragmentos de la molécula, el primero con  $m/z = 287 [(M - H) - 18]^-$  representando la pérdida de agua; mientras que el segundo con  $m/z = 261 [(M - H) - 44]^-$  corresponde a la pérdida de  $CO_2$  (Chua y col, 2011).

El **pico 9** fue identificado como patuletín-O-hexósido basado en el ion molecular  $m/z = 493 [M - H]^-$  y el fragmento de la aglicona  $m/z = 331 [(M - H) - 162]^-$  ( $Y_0^-$ ), la pérdida característica de 162 Da corresponde a una molécula de hexosa (Han y col, 2008).

El **pico 10** fue identificado como kaempferol-O-hexósido, presentó un ion molecular  $m/z = 447 [M - H]^-$  y el fragmento principal  $m/z = 285 [(M - H) - 162]^-$  (hexosa).

El **pico 11** fue identificado como quercetín-O-(ramnosil)ramnósido basado en el ion molecular  $m/z = 593 [M - H]^-$  y sus dos fragmentos, el menos abundante  $m/z = 447 [(M - H) - 146]^-$  correspondiente a pérdida de ramnosa y el principal  $m/z = 300 [(M - H) - 146 - 146 - H]^-$  ( $Y_0^- - H$ ) atribuido a la aglicona quercetina (Marzouk y col, 2016).

El **pico 12** fue identificado como isoramnetín-O-hexósido basado en el ion molecular  $m/z = 477 [M - H]^-$  y el fragmento  $m/z = 314 [(M - H) - 162]^-$  ( $Y_0^- - 1$ ) resultante de la pérdida de 162 Da (hexosa) (Barros y col, 2013).

El **pico 13** fue identificado como quercetín-O-hexósido basado en el ion molecular  $m/z = 463 [M - H]^-$  y el fragmento de la quercetín aglicona  $m/z = 301 [(M - H) - 162]^- (Y_0^-)$ , asociado a la pérdida de una molécula de hexosa (162 Da) (Hvattum, 2002).

El **pico 14** fue identificado como quercetín-O-hexosil-ramnosil-hexósido basado en el ion molecular  $m/z = 771 [M - H]^-$ , el cual pierde 162 Da (hexosa) para generar el fragmento del quercetín-O-hexosil-ramnósido  $m/z = 609 [(M - H) - 162]^- (Y_2^-)$ . También se detectó el fragmento de quercetina, posterior a pérdida de los tres fragmentos de carbohidratos con  $m/z = 301 [(M - H) - 162 - 146 - 162]^- (Y_0^-)$  (Kelebek, 2016).

El **pico 15** fue identificado como quercetín-O-(hexosil)ramnósido basado en el ion molecular  $m/z = 609 [M - H]^-$  y los fragmentos menos abundante  $m/z = 447 [(M - H) - 162]^-$  (pérdida de hexosa) y más abundante  $m/z = 300 [(M - H) - 162 - 146 - H]^- (Y_0^- - H)$  (pérdida de hexosa y ramnosa). La ausencia de un fragmento de  $m/z = 463 [(M - H) - 146]^-$  indica que se trata del disacárido hexosa-ramnosa (Gouveia y Castilho, 2011).

El **pico 16** fue identificado como isómero del isoramnetín-O-hexósido, presentó el ion molecular  $m/z = 477 [M - H]^-$  y el fragmento de la isoramnetín aglicona  $m/z = 314 [(M - H) - 162]^- (Y_0^- - 1)$  debido a la pérdida de 162 Da (hexosa) (Barros y col, 2013).

El **pico 17** fue identificado como quercetín-O-ramnósido basado en el ion molecular  $m/z = 447 [M - H]^-$ , el cual pierde 146 Da (ramnosa) para generar el fragmento de la quercetín aglicona (quercetina)  $m/z = 301 [(M - H) - 146]^- (Y_0^-)$  (Hvattum, 2002).

El **pico 18** fue identificado como quercetín-O-hexosil-O-(pentosil)ramnósido, presentó el ion molecular  $[M - H]^-$  con  $m/z = 741$ , el fragmento  $m/z = 579 [(M - H) - 162]^-$  por la pérdida de una hexosa y el de la quercetina  $m/z = 301 [(M - H) - 162 - 278]^- (Y_0^-)$ ; adicionalmente, el ion  $m/z = 609 [(M - H) - 132]^-$  indica la presencia de una pentosa. El MS<sup>2</sup> de 579 generó el fragmento menos abundante  $m/z = 447 [(M - H) - 162 - 132]^-$  y el más abundante  $m/z = 301 [(M - H) - 162 - 132 - 146]^- (Y_0^-)$ , estos datos indican una hexosa en una posición y el disacárido pentosa-ramnosa en otra (Marzouk y col, 2016).

El **pico 19** fue identificado como quercetín-O-(pentosil)ramnósido. Entre sus picos mayoritarios tenemos el ion molecular  $m/z = 579 [M - H]^-$ , un fragmento de menor abundancia  $m/z = 447 [(M - H) - 132]^-$  y otro más abundante  $m/z = 300 [(M - H) - 132 - 146 - H]^- (Y_0 - H)$  (quercetina). Estos fragmentos corresponden a la pérdida de un disacárido formado por pentosa (-132 Da) y ramnosa (-146 Da) (Marzouk y col, 2016).

El **pico 20** fue identificado como Kaempferol-O-hexosil-O-(pentosil)ramnósido basado en el ion molecular  $m/z = 725 [M - H]^-$ , sus fragmentos más abundantes  $m/z = 563 [(M - H) - 162]^-$  (pérdida de hexosa) y  $m/z = 285 [(M - H) - 162 - 278]^- (Y_0)$  correspondiente a kaempferol. Adicionalmente, el ion  $m/z = 593 [(M - H) - 132]^-$  indica la presencia de una pentosa (Sobral y col, 2017).

El **pico 21** fue identificado como kaempferol-O-(acetil)hexósido, presentó el ion molecular  $m/z = 489 [M - H]^-$  y el fragmento principal  $m/z = 285 [(M - H) - 204]^-$  correspondiente a la aglicona kaempferol. La pérdida de 204 Da es atribuida a una acetil-hexosa (Pacheco y col, 2019).

El **pico 22** fue identificado como isoramnetín-O-(acetil)hexósido debido al ion molecular  $m/z = 519 [M - H]^-$  y su fragmento principal  $m/z = 315 [(M-H) - 204]^- (Y_0)$ , corresponde a isoramnetina por la pérdida de acetil-hexosa (Pacheco y col, 2019).

El **pico 23** corresponde al kaempferol-O-(pentosil)ramnósido, presentó un ion molecular  $m/z = 563 [M - H]^-$ , un fragmento menos abundante  $m/z = 431 [(M - H) - 132]^-$  y otro más abundante  $m/z = 384 [(M - H) - 132 - 146 - H]^- (Y_0 - H)$  correspondiente a kaempferol; las pérdidas se asignaron a un disacárido formado por pentosa (-132 Da) y ramnosa (-146 Da) (Stefanowicz-Hajduk y col, 2020).

También se identificaron tres agliconas de flavonoides (**picos 24, 25 y 26**): el **24** fue identificado como quercetina basado en el ion molecular  $m/z = 301 [M - H]^-$  y sus fragmentos  $m/z = 179 [(M - H) - 122]^-$ ,  $151 [(M - H) - 28]^-$  y  $107 [(M - H) - 44]^-$  (Hvattum, 2002); el **25** fue identificado como kaempferol basado en el ion molecular  $m/z = 285 [M - H]^-$  y sus fragmentos  $m/z = 241, 175$  y  $151$  u (Sanz et al, 2010); mientras que el **26** correspondió a la isoramnetina basado en el ion molecular  $m/z = 315 [M - H]^-$  y sus fragmentos  $m/z = 300 [(M - H) - 15]^-$ ,  $272 [(M - H) - 43]^-$  y  $151 [(M - H) - 121]^-$  (Chen y col, 2015).

El **pico 27** fue identificado como quercetin-galoil-ramnósido basado en el ion molecular  $m/z = 599 [M - H]^-$  y sus dos fragmentos:  $m/z = 447 [(M - H) - 152]^-$  debido a la pérdida del galoilo y  $m/z = 301 [(M - H) - 146]^-$  (quercetina,  $Y_0^-$ ), representando la pérdida del ramnósido (Aouadi y col, 2019).

Los resultados obtenidos son consistentes con las investigaciones realizadas hasta la fecha para este género. La presencia de derivados de kaempferol (kaempferol-3-O-galactósido, kaempferol-3-O-glucósido), quercetina (quercetín-3-O-rutinósido) y ácido clorogénico se han registrado en diferentes especies de *Roldana*:

*R. aschenborniana*, *R. angulifolia*, *R. platanifolia*, *R. lobata*, *R. lineolata* y *R. reticulata*. Al respecto, estos compuestos han sido asociados a algunas de las actividades farmacológicas de especies de *Roldana* (Arciniegas y col, 2004; 2006; 2008; 2013; 2015; Maldonado y col, 2008). *R. hartwegii* presentó una gran variedad de compuestos derivados de quercetina y kaempferol, incluyendo las agliconas y sus glicósidos. Estos flavonoides han sido detectados en raíces, tallos, hojas y flores de las plantas y se le han atribuido propiedades hepatoprotectoras, antimicrobianas, renoprotectoras, antidiabéticas, cardioprotectoras, antiartríticas, neuroprotectoras, gastroprotectoras, antimutagénicas, entre otras (Periferakis y col, 2022). En este sentido, la actividad más estudiada es la antioxidante por contribuir a neutralizar radicales libres y disminuir el estrés oxidativo (Cuyckens y Claeys, 2004). La quercetina inhibe la reacción de Fenton y la formación de radicales hidroxilos, por lo cual es utilizada para la prevención de cáncer, demencia, aterosclerosis y enfermedades coronarias (Ferrali y col, 1997). El mecanismo de acción de estos flavonoides también incluye su efecto en sistemas enzimáticos: por ejemplo, inhiben a ciclooxigenasas y lipooxigenasas, ejerciendo efectos antiinflamatorios, disminuyendo la activación y agregación plaquetaria y contribuyendo a la protección contra enfermedades cardiovasculares (Pelzer y col, 1998). Asimismo, el kaempferol y sus derivados han sido un foco de atención en décadas recientes, ya que su consumo se ha asociado con una disminución en la incidencia de diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentran: el cáncer de piel, hígado, colon, ovario, páncreas, estómago y vejiga (Neuhouser, 2004). Diferentes investigaciones han demostrado que el kaempferol actúa a múltiples niveles: estimula la apoptosis de células cancerígenas, arresta el ciclo celular en la fase G2/M y regula ciertas vías de señalización (PI3K/proteína quinasa B (AKT), *N*-caderina, *E*-caderina,

Snail, Slug, caspasas 3, 7 y 9) importantes para la patogénesis del cáncer (Marfe y col, 2009; Imran y col, 2019).

Por otra parte, el EE-RS no mostró una familia de compuestos característica. Sin embargo, se encontraron compuestos de interés como el ácido cafeico y derivados (Li et al, 2012), el ácido rosmarínico (Amoah y col, 2016) y flavonoides como quercetín-3-O-glucósido, patuletín-7-O-glucósido y derivados del kaempferol (Periferakis y col, 2022). Estos compuestos destacan por sus propiedades antioxidantes y las mencionadas anteriormente para el grupo de flavonoides. En *R. sessilifolia* también se identificó un glucósido de fenilpropanoide (pentósido de verbascósido); este polifenol se encuentra en una gran variedad de especies de plantas, tiene mayor capacidad de neutralización de radicales libres que otros compuestos fenólicos y es utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades que incluyen la antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antioxidante (Nigro y col, 2020).

Otro compuesto de interés fue la amentoflavona, un biflavonoide con las propiedades biológicas asociada a flavonoides y que presenta actividad contra diferentes virus: coxsackvirus B3 (Wilsky et al, 2012), dengue (Coulerie y col, 2013), hepatitis C (Lee y col, 2018), herpes (HSV-1) (Li et al, 2019) y SARS-CoV (Ghost y col, 2020). También se han demostrado sus propiedades neuroprotectoras contra enfermedades como la epilepsia (Zhang y col, 2015), Parkinson (Cao y col, 2017), y Alzheimer (Sabogal-Guáqueta y col, 2018). Por último, cabe mencionar que la amentoflavona ha sido evaluada en la prueba de nado forzado, donde se han comprobado sus efectos ansiolíticos y antidepresivos (Ishola y col, 2012).



## 5 Toxicidad de los extractos etanólicos de *Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii*

Las plantas contienen una gran variedad de compuestos que podrían incluir más de 400 especies químicas, y existe la posibilidad de que alguno de los metabolitos presentes en el material vegetal provoque efectos tóxicos. Por lo tanto, es de suma importancia determinar la toxicidad de los extractos de plantas y así asegurar la inocuidad de su consumo (George, 2011).

Los EEs de ambas especies de *Roldana* fueron evaluados *in vitro* en el ensayo con *A. salina*. El EE-RH resultó inocuo para los nauplios de *A. salina* hasta la concentración máxima evaluada (2000 µg/mL). La viabilidad en todas las concentraciones fue del 100% y no se observó alteración en la morfología y motilidad de las larvas. Por otro lado, el EE-RS provocó mortalidad a partir de la concentración de 500 µg/mL (10 – 40%); aun así, la CL<sub>50</sub> fue mayor que 2000 µg/mL (**Cuadro 12**) por lo que fue considerado como no tóxico de acuerdo con la escala establecida por Meyer y col. (1982).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Delgado y col. (1996), los autores demostraron que el extracto hexánico de *R. sessilifolia* se clasifica como no tóxico en el ensayo de *A. salina* (CL<sub>50</sub> > 1000 µg/mL) (Delgado y col, 1991).

Por otro lado, los EEs de las dos especies de *Roldana* (EE-RS y EE-RH) administrados a una sola dosis (2000 mg/kg de peso) a ratones, no indujeron mortalidad durante los catorce días posteriores a la administración. Adicionalmente, la ganancia de peso entre los grupos fue similar ( $p > 0.05$ ) (**Cuadro 13**); asimismo, los

**Cuadro 12.** Toxicidad del extracto etanólico de *Roldana sessilifolia* (EE-RS) y *Roldana hartwegii* (EE-RH) sobre *Artemia salina*.

Extracto etanólico	Concentración (µg/mL)	Letalidad (%) <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<b>EE-RS</b>	2000	40 ± 5.7	> 2000
	1000	30 ± 5.7	
	500	10 ± 5.7	
	100	0 ± 0.0	
	10	0 ± 0.0	
<b>EE-RH</b>	2000	0 ± 0.0	> 2000
	1000	0 ± 0.0	
	500	0 ± 0.0	
	100	0 ± 0.0	
	10	0 ± 0.0	

<sup>1</sup> Los valores de la letalidad (%) son la media ± DE (n = 3).

**Cuadro 13.** Efecto del tratamiento de ratones con el extracto etanólico de *Roldana sessilifolia* (EE-RS) y *Roldana hartwegii* (EE-RH) en la ganancia de peso (%).<sup>1</sup>

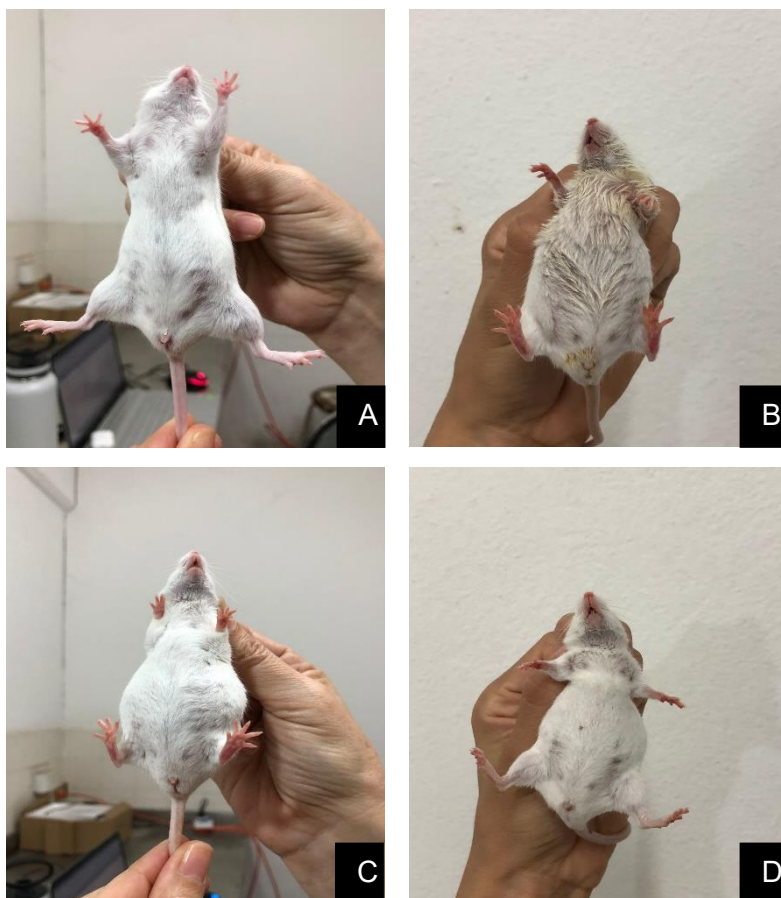
<b>Tratamiento</b>	<b>Ganancia de peso (%)</b>
<b>Control</b>	5.68 ± 3.72 <sup>a</sup>
<b>EE-RS</b>	7.03 ± 5.29 <sup>a</sup>
<b>EE-RH</b>	2.56 ± 1.15 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Los valores son la media ± DE de cada grupo (n=3). Letras superíndice diferentes en la columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). La evaluación se realizó 15 días después de la administración de una sola dosis de 2000 mg/kg p.c. de los extractos etanólicos.

ratones no presentaron falta de apetito o adipsia, síntomas de ataxia, agresividad, temblores, salivación, diarrea y/o coma durante el tiempo que duró la prueba.

Sin embargo, el grupo tratado con el EE-RS acumuló gas en el área abdominal un día posterior a la administración del extracto (**Figura 5**); tres días después de la administración, la pared abdominal de los ratones volvió a la normalidad. Durante los primeros tres días, los ratones de este grupo presentaron somnolencia e hipoactividad, recuperándose gradualmente una vez que estos eliminaron los gases acumulados. Además, este grupo no mostró la hiperactividad característica de los ratones en ningún día de la prueba, esto nos podría indicar que el EE-RS posee propiedades relajantes. Ninguno de los grupos presentó alteraciones morfológicas ni signos de toxicidad, los órganos presentaron pesos normales y sin diferencia entre grupos ( $p > 0.05$ ), excepto el hígado del grupo EE-RS (**Cuadro 14**). Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de glóbulos blancos, plaquetas, linfocitos y granulocitos (**Cuadro 15**); sin embargo, los parámetros entran dentro del intervalo de valores normales para ratones BALB/c hembras de 8-10 semanas de edad, lo cual nos sugiere la inocuidad de los extractos.

La ligera toxicidad presentada en el modelo de *A. salina*, así como la hinchazón y el crecimiento del hígado (hepatomegalia) presentado en los ratones a los que se les administró el EE-RS podría estar relacionado con el compuesto senecionina identificado en el análisis de GC-MS (**Cuadro 8**). La senecionina es un alcaloide tipo pirrolizidina (PA), los cuales son metabolitos secundarios encontrados en algunas plantas de la familia Asteraceae, Boraginaceae y Fabaceae (Romo de Vivar y col, 2007). La inducción de hepatomegalia ha sido reportada para extractos de la especie *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), especie que contiene alcaloides PA (Diallo y col,



**Figura 5.** Efecto de la administración de dosis única (2000 mg/kg p.c.) del extracto etanólico de *Roldana sessilifolia*. Ratón del grupo control (**A**) y ratones del grupo de *R. sessilifolia* (**B**, **C** y **D**).

**Cuadro 14.** Porcentaje relativo de peso de órganos de los grupos sometidos al ensayo de toxicidad aguda *in vivo* del extracto etanólico (EE) de *Roldana sessilifolia* (EE-RS) y *Roldana hartwegii* (EE-RH).<sup>1</sup>

Órganos	Grupos		
	Control	EE-RS	EE-RH
<b>Hígado</b>	4.87 ± 0.29 <sup>a</sup>	5.86 ± 0.93 <sup>b</sup>	4.53 ± 0.23 <sup>a</sup>
<b>Bazo</b>	0.47 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>Riñón</b>	1.16 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.11 <sup>a</sup>
<b>Pulmón</b>	0.70 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>Corazón</b>	0.58 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los valores son la media ± DE (n=3). Letras superíndice diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas.

LSD hígado= 0.888, LSD bazo= 0.263, LSD riñón= 0.144, LSD pulmón= 0.103 y LSD corazón= 0.119.

**Cuadro 15.** Efecto del extracto etanólico de *Roldana sessilifolia* (EE-RS) y *Roldana hartwegii* en los parámetros hematológicos de los ratones sometidos a la prueba de toxicidad aguda.<sup>1</sup>

Parámetros hematológicos	Grupos			Valores de referencia
	Control	EE-RS	EE-RH	
Hematocrito (%)	42.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	42.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	41.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	43.5 a 67.0
Hemoglobina (g/dL)	13.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	13.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	13.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	12.4 a 18.9
Glóbulos rojos (10 <sup>6</sup> /μL)	8.5 ± 0.4 <sup>a,b</sup>	8.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	8.16 a 11.7
Glóbulos blancos (10 <sup>3</sup> /μL)	2.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	5.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.69 a 14.8
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	628.7 ± 44.0 <sup>a</sup>	751.0 ± 10.1 <sup>b</sup>	716.3 ± 6.7 <sup>a,b</sup>	476 a 161
Linfocitos (%)	92.7 ± 4.9 <sup>a</sup>	72.7 ± 3.6 <sup>b</sup>	79.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	55.06 a 83.8
Granulocitos (%)	11.4 ± 5.3 <sup>a</sup>	23.8 ± 10.2 <sup>b</sup>	18.8 ± 14.6 <sup>a,b</sup>	10.9 a 27.9

<sup>1</sup> Los valores son la media ± DE (n=3). Las medias con letras superíndice diferente en un renglón indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>2</sup> Estandar hace referencia al intervalo de valores típicos para parámetros hematológicos para ratones Balb/c de 8 a 10 semanas de edad.

Valores *LSD*: hematocrito = 1.9149, hemoglobina = 1.1463, glóbulos rojos = 0.5489, glóbulos blancos = 0.8119, plaquetas = 71.034, linfocitos = 6.1664, granulocitos = 5.7209.

2014). Las plantas producen estos alcaloides para protegerse de herbívoros y otros depredadores (Kopp y col, 2020). Adicionalmente, se ha reportado que las PAs penetran el núcleo de las células y modifican el ADN, alterando la expresión de los genes y el funcionamiento de las células; en particular dañan hepatocitos y las paredes de las venas hepáticas, conduciendo al desarrollo de enfermedad veno-oclusiva (VOD) y hepatomegalia (Prakash y col, 1999). La dosis empleada en este experimento (2000 mg/kg) probablemente sobrepasó la cantidad máxima que puede ser consumida de este alcaloide en un día, lo que conllevó al desarrollo de los efectos anteriormente mencionados. Debido a la alta toxicidad de los PAs, el consumo debe ser inferior a 0.007 µg/kg (Kopp y col, 2020).

## **6 Evaluación de actividades biológicas**

### **a Evaluación de la actividad adaptogénica**

El efecto adaptogénico de un extracto se mide mediante pruebas en modelo animal, los cuales son sometidos a diferentes condiciones de estrés (Panossian, Wikman y Sarris, 2010). En la presente investigación se realizaron tres pruebas: anoxia, resistencia de nado forzado y nado en frío.

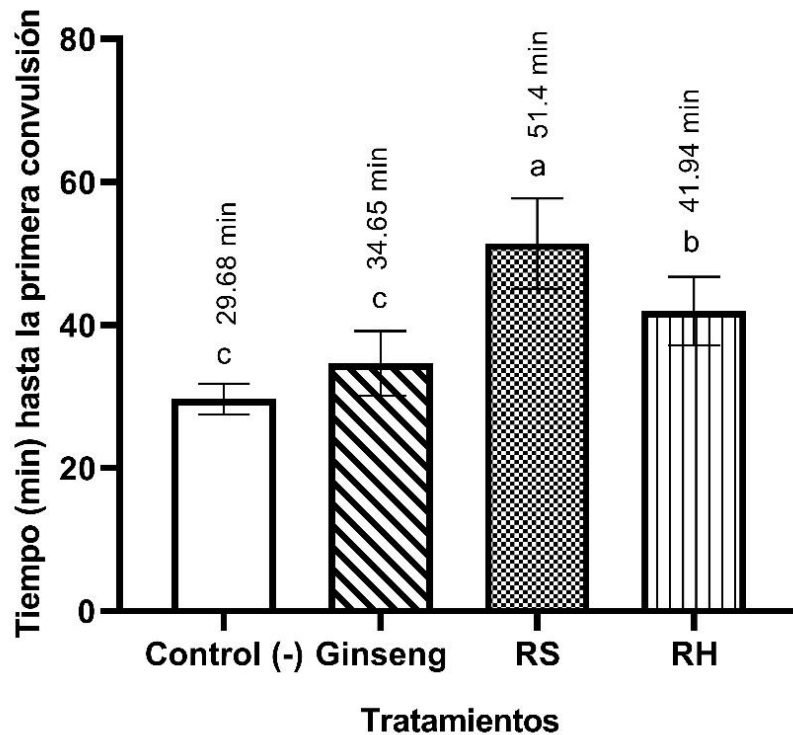
### **b Prueba de anoxia**

La evaluación de preparaciones de extractos de plantas medicinales que permitan la adaptación ante episodios de anoxia es de gran interés farmacológico, ya que promoverán la resistencia física y mental ante situaciones de alta demanda de oxígeno, como a las que se enfrentan atletas de alto rendimiento (Panossian y col 2021).



En comparación con el tiempo del grupo sin tratar (29.68 min), todos los tratamientos aumentaron los tiempos; sin embargo, los cambios sólo fueron significativos ( $p \leq 0.05$ ) para los grupos tratados con EE-RS (51.4 min) y EE-RH (41.94 min) (**Figura 6**). Los resultados para las dos especies de *Roldana* sugieren que sus EEs poseen propiedades antiestrés, aumentando la resistencia a la anoxia de 1.41 a 1.73 veces en comparación al grupo control. Al comparar nuestros resultados con lo reportado para especies con actividad adaptogénica, el incremento presentado por el EE-RS (1.83) fue similar al observado con *Rhodiola heterodonta* (1.92) (Grace y col, 2009). La resistencia a la anoxia de los grupos tratados con el EE-RS (1.60) fue superior y con EE-RH (1.30) fue similar a lo reportado para extractos hidroalcohólicos de tres especies de *Echeveria* (*E. craigiana* 1.12, *E. kimnachii* 1.27 y *E. subrigida* 1.36) (López-Angulo y col, 2022).

El efecto contra la anoxia reportado para el extracto hidroalcohólico de raíces de *Whitania somnifera* (1.77) fue asociado con su capacidad para modular la resistencia cerebral a la hipoxia, contribuyendo a que el cerebro utilice eficientemente el oxígeno (Hochachka y Lutz, 2001; Singh y col, 2001; Nilsson y Lutz, 2004). El cerebro tiene una alta demanda de oxígeno y es el primer órgano afectado por la anoxia, provocando que múltiples funciones metabólicas se vean comprometidas, incluyendo la fosforilación oxidativa y el metabolismo energético. Condiciones que provocan un redireccionamiento hacia vías metabólicas alternas para generar ATP como la glucólisis y glucogenólisis, esto conduce a la formación de subproductos que generan un desbalance en el sistema REDOX debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Zepeda y col, 2013; Terraneo y col, 2017). Asimismo, el estrés oxidativo



**Figura 6.** Efecto del extracto etanólico (EE) de *R. sessilifolia* (RS) y *R. hartwegii* (RH) en la resistencia a la anoxia.

Los valores son la media  $\pm$  DE (n=6). Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadística por la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) (LSD = 370.48). Los EEs y el control positivo ginseng se evaluaron a 100 mg/kg p.c. El control negativo fue el vehículo de disolución.

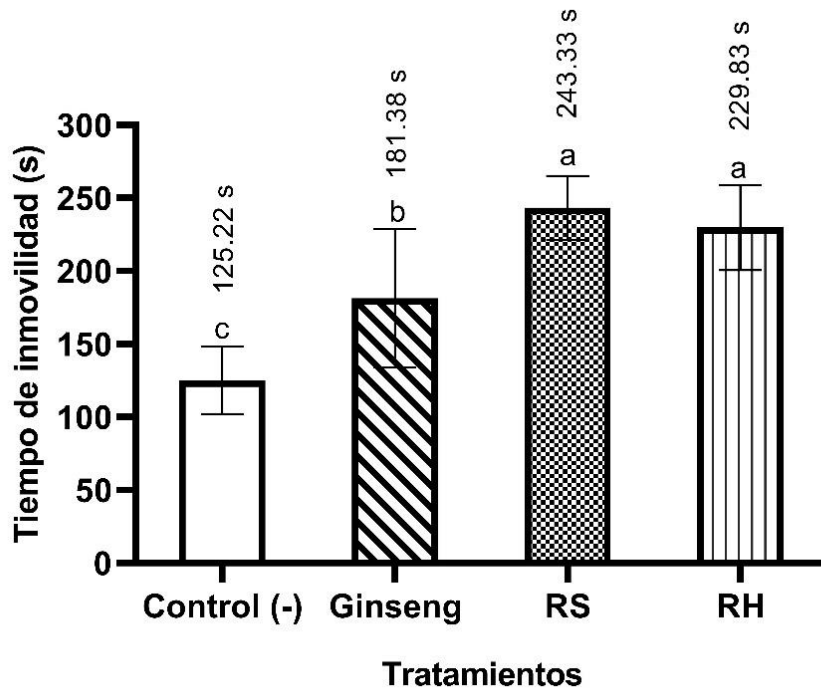
conlleva a la aparición de daños que comprometen la viabilidad del organismo, afectando la estructura de las células, incluyendo lípidos, proteínas y ADN (Zepeda y col, 2013). Las plantas con propiedades adaptogénicas (e.g., *R. heterodonta*, *E. subrigida*, *E. kimnachii*, *E. craigiana*, *W. somnifera*) han mostrado una gran capacidad antioxidante, que podría ser responsable de la recuperación del balance REDOX del organismo. Al respecto, los EEs de ambas especies de *Roldana* contienen compuestos con capacidad antioxidante (e.g., Quercetín-O-hexósido, Quercetín-O-ramnosido, Kaempferol-O-hexósido, derivados del Ácido cafeico, gálico, siríngico y rosmarínico) que podrían estar contribuyendo a su actividad adaptogénica (**Cuadro 10 y 11**).

Uno de los mecanismos propuestos por Panossian y col (2009) sobre el efecto adaptogénico de las plantas es a través de la activación de la expresión de los genes de proteínas de choque térmico como respuesta a estímulos estresantes o desafiantes. Lo anterior basado en que ciertas especies animales (e.g., *Carassius carassius* y *Trachemys scripta*) se han adaptado evolutivamente a ambientes con privación de oxígeno (Nilsson y Lutz, 2004). Al respecto, Prentice y col (2004) revelaron que la exposición a ambientes con bajos niveles de oxígeno activa la transcripción de la proteína de choque térmico 72 (Hsp72), considerándolo como una forma de adaptación a este estímulo estresante (Lipton, 1999). Las proteínas Hsp son chaperonas moleculares que participan en la prevención de la desnaturalización de proteínas, así como en su reparación, ayudando a mantener la homeostasis ante un estímulo estresante (Lanneau y col, 2010). Los extractos de *Roldana* pudieran ejercer su efecto por este mecanismo.

### **c Prueba de resistencia de nado forzado**

Todos los tratamientos tuvieron un aumento significativo en la resistencia al nado forzado (**Figura 7**). Comparado con el tiempo del grupo ginseng (180.89 s), los grupos tratados con EEs de *Roldana* tuvieron resultados estadísticamente superiores, aunque fueron similares entre ellos: EE-RS (246.33 s) y EE-RH (229.83 s).

Anteriormente la prueba de resistencia de nado forzado había sido utilizada para la evaluación de antidepresivos, donde se comparaban las diferencias entre los tiempos de movilidad y nado contra los tiempos de inmovilidad. La inmovilidad era asociada a un comportamiento depresivo y de desesperación, en cambio el tiempo de nado activo se asociaba con una actitud positiva lo que demostraba la efectividad del antidepresivo (Porsolt, Le Pichon y Jalfre, 1977). Sin embargo, la efectividad de los antidepresivos se consigue después de varias semanas de tratamiento y las investigaciones que emplean la prueba de nado forzado para evaluar su eficacia carecen del tiempo necesario de administración del fármaco (Anyan y Amir, 2018). En la actualidad, múltiples investigaciones han propuesto una nueva interpretación que vincula la inmovilidad observada en ratones durante esta prueba con una respuesta adaptativa aprendida (De Kloet y Molendijk, 2016). A su vez, el movimiento activo se ha asociado a un mecanismo de escape directo, sugiriendo una conexión con la ansiedad (Nishimura y col, 1989). Existe evidencia científica que respalda la idea de que algunos antidepresivos como la fluoxetina pueden inducir efectos ansiogénicos tanto en animales como en seres humanos (Anyan y Amir, 2018). Por lo tanto, los mejores tiempos de inmovilidad producidos por los tratamientos con EE-RS y EE-RH podrían relacionarse con un proceso de aprendizaje adaptativo, reflejándose en una mejor adaptación al estrés (nado forzado). La mejor respuesta se debe a un mejor



**Figura 7.** Efecto del extracto etanólico (EE) de *Roldana sessilifolia* (RS) y *Roldana hartwegii* (RH) en la resistencia de ratones al nado forzado.

Los valores son la media  $\pm$  DE (n=6). Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadística por la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) (LSD = 38.82). Los EEs y el control positivo ginseng se evaluaron a 100 mg/kg p.c. El control negativo fue el vehículo de disolución.

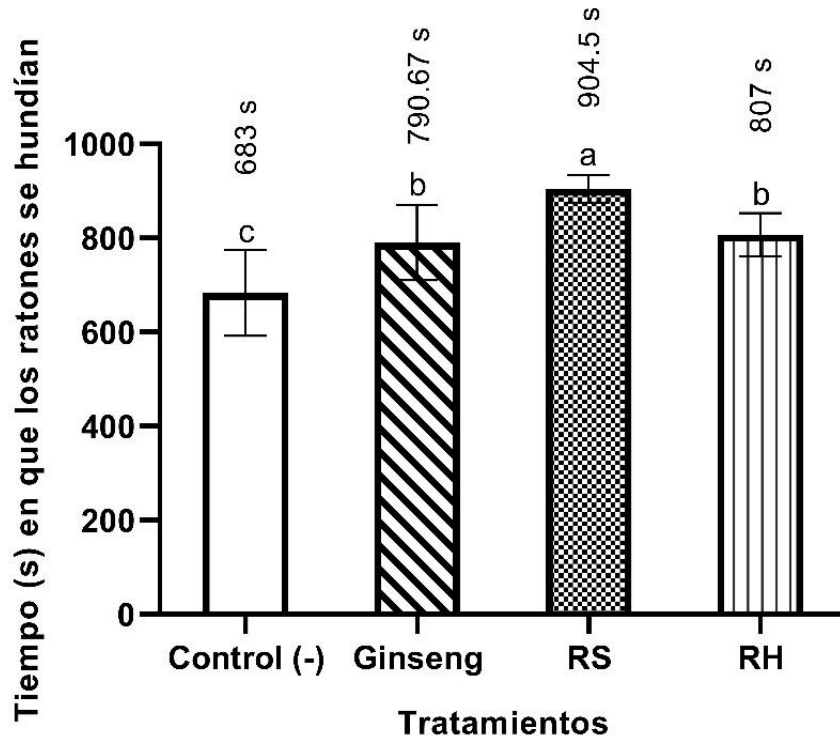
manejo de la energía y sus reservas (De Kloet y Molendijk, 2016). Al respecto, la prueba de nado forzado induce una respuesta profunda en el sistema nervioso simpático, el eje Hipotálamo, Hipófisis y Adrenales (HPA) y también de una variedad de circuitos de neurotransmisores (e.g., dopamina, serotonina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico) en el cerebro (De Kloet y Molendijk, 2016). Por lo tanto, los efectos de relajación (inmovilidad) producidos por los fármacos ansiolíticos o extractos de plantas medicinales podrían estar asociados a la modulación de estas vías.

#### **d Prueba de resistencia de nado en frío**

Comparado con el tiempo del control negativo (683.0 s), los tiempos de todos los tratamientos fueron estadísticamente superiores ( $p \leq 0.05$ ), resultando mejor el del EE-RS (904.5 s) (**Figura 8**).

La capacidad de adaptación de los ratones tratados con *Roldana* fue de 1.18 a 1.32 veces mejor que el control. Los EEs de *Roldana* (EE-RS 3.34 y EE-RH 2.98) fueron más eficientes que extractos hidroalcohólicos de tres especies de *Echeveria* (1.70 – 2.03 veces mejor que el control) evaluados a la misma dosis (López-Angulo y col, 2022). Asimismo, el valor obtenido para el EE-RS (1.96) fue similar a lo reportado para el EE de la fruta de higo (*Ficus carica*) (2.11) a dosis de 500 mg/kg (Dayanand y Kishanchandra, 2014). lo que indica una menor actividad que los para los EEs de *Roldana* (100 mg/kg p.c), es posible afirmar que la actividad adaptogénica de EE-RS y EE-RH es alta.

El efecto positivo del tratamiento con los EEs de *Roldana* sugiere que los ratones tienen un mejor manejo de la temperatura corporal y una redistribución eficiente de la energía y sus reservas. La tiroides participa en la regulación de la temperatura corporal



**Figura 8.** Efecto del extracto etanólico (EE) de *Roldana sessilifolia* (RS) y *Roldana hartwegii* (RH) en la resistencia de ratones al nado en frío.

Los valores son la media  $\pm$  DE ( $n = 6$ ). Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadística por la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) (LSD = 79.96). Los EEs y el control positivo ginseng se evaluaron a 100 mg/kg p.c. El control negativo fue el vehículo de disolución.

(Iwen, Oelkrug y Brabant, 2018). La hipotermia estimula la tiroides e incrementa los niveles de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y tirotrópina (TSH), condición que conduce al aumento de la tasa metabólica y producción de calor (Iwen, Oelkrug y Brabant, 2018). La TSH actúa sobre el sistema nervioso simpático para incrementar la producción de glucosa (Iwen, Oelkrug y Brabant, 2018). En estudios previos se demostró que el tratamiento de ratones con el EE de *F. carica* y los extractos hidroalcohólicos de tres especies de *Echeveria* contribuye a mantener niveles normales de glucosa; las investigaciones mencionadas sugieren que los ratones tratados tienen una mejor redistribución de las reservas energéticas. Por lo tanto, este mecanismo podría explicar la actividad de EE-RS y EE-RH (Dayanand y Kishanchandra, 2014; López-Angulo y col, 2022).

Si bien, los mecanismos y vías moleculares que los adaptógenos emplean para ejercer sus funciones no están del todo comprendidas, se ha sugerido que su efecto protector contra el estrés está relacionado principalmente con la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y de ciertos mediadores de la respuesta al estrés, incluyendo la secreción de cortisol, la síntesis de óxido nítrico (NO), la activación de la proteína quinasa activada por estrés (c-Jun N-terminal) (Panossian y col, 2007), el factor de transcripción FOXO y el factor de transcripción DAF-16 (Wiegant y col, 2009). Asimismo, se ha encontrado que el complejo de plantas adaptógenas llamado ADAPT-232 (mezcla de *E. senticosus*, *Schisandra chinensis* y *R. rosea*) que contiene salidroside, patentado por Panossian y col (2009), estimula la síntesis y liberación del neuropéptido Y (NPY); NPY es producido en respuesta a agentes estresores como el ejercicio extremo (Karamouzis y col, 2002), desórdenes de pánico (Boulenger y col, 1996), exposición al frío (Kellog, 2006) y el síndrome de fatiga crónica (Fletcher y col,



2010). NPY actúa en sinergia con glucocorticoides y catecolaminas para potenciar la respuesta al estrés. NPY produce efectos ansiolíticos en el sistema nervioso central, contribuyendo a disminuir la presión sanguínea y el ritmo cardiaco (Morris y col, 1986; Kuo y col, 2007). También se ha reportado que NPY regula la expresión del sistema inmunitario, promueve la función mitocondrial para la generación de ATP, reduce la secreción de cortisol durante la noche en sujetos sanos y juega un rol importante en la fisiopatología de la depresión. Al respecto, bajos niveles de NPY se han asociado a comportamientos depresivos, lo cual ha sido demostrado en la prueba de nado forzado en ratones (Heilig y col, 1988; Stogner y Holmes, 2000; Redrobe y col, 2002; Ferreira y col, 2010).

Posteriormente, Panossian y col. (2012) demostraron que el complejo ADAP-232 estimula la producción de NPY y la síntesis y liberación de proteínas de choque térmico (e.g., Hsp72). El efecto combinado de estos dos agentes incrementa la resistencia y adaptación a diferentes agentes estresantes, involucrando múltiples componentes del sistema endocrino, inmune, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso central y simpático.

Los extractos de plantas con actividad adaptogénica pueden activar diferentes mecanismos debido a su contenido de una gran diversidad de fitoquímicos. Algunos de los compuestos relacionados con esta actividad son saponinas triterpenoides, fitoesteroles, lignanos, alcaloides, flavonoides y vitaminas (Todorova y col, 2021). Por ejemplo, *R. rosea* (e.g., feniletanoides, fenilpropanoides, flavonoides, protoantocianidinas y derivados de ácido gálico) (Panossian, Wilkman y Sarris, 2010), *E. senticosus* (e.g., eleuterósidos, sitosterol, ácido cafeico) (Davydov y Krikorian, 2000), *Whitania somnifera* (e.g., whitanólidos, alcaloides, saponinas) (Wal y col, 2019),

*Rhaponticum carthamoides* (e.g., ecdiesteroides, flavonoides y ácidos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas, terpenos y glucósidos triterpenoides) (Kokoska y Janovska, 2009), *S. chinensis* (e.g., lignanos, flavonoides y ácidos fenólicos) (Kopustinskiene y Bernatoniene, 2021) y *Panax ginseng* (e.g. ginsenósidos) (Hou, 1977). Al respecto, *R. sessilifolia* y *R. hartwegii* tienen componentes químicos con actividad adaptogénica, conteniendo una gran variedad de compuestos de naturaleza terpénica (e.g., eremofilanos, derivados del azuleno, espatulenol), esteroidea (e.g.,  $\alpha$ -sitosterol,  $\gamma$ -sitosterol) y compuestos fenólicos (e.g., ácido cafeico y derivados, ácido siríngico, derivados de quercetina, kaempferol e isoramnetina), entre otros. Por lo tanto, estos compuestos podrían estar asociados a la actividad adaptogénica de los extractos de *Roldana* (EE-RS y EE-RH).

*Panax ginseng* es un adaptógeno ampliamente utilizado en medicina tradicional, sin embargo, su uso prolongado en altas concentraciones ocasiona el “síndrome de abuso al Ginseng”, caracterizado por hipertensión, diarrea, erupciones cutáneas, ataques nerviosos y sedativos (Deng y col, 2023). Por lo tanto, es importante la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que puedan brindarnos del efecto deseado, sin ocasionar daño al consumidor. Al respecto, en cada una de las pruebas de actividad adaptogénica utilizadas, ambos EEs mostraron actividad similar o mayor que el control ginseng. Sin embargo, futuras investigaciones deberán identificar los compuestos específicos de *Roldana* que inducen la actividad adaptogénica, así como los mecanismos moleculares por los que actúan y posibles efectos adversos.

## e Actividad antioxidante

La mayor actividad antioxidante de los EEs de las especies de *Roldana* correspondió a *R. hartwegii* ( $p \leq 0.05$ ) (**Cuadro 16**). La mayor diferencia se registró por el método DPPH, donde el EE-RH ( $IC_{50} = 279.73 \mu\text{g/mL}$ ) fue 32 veces más activo que el EE-RS ( $IC_{50} = 9142.12 \mu\text{g/mL}$ ).

La actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) de EE-RS y EE-RH fue menor a la reportada para otras especies de *Roldana*. Los extractos de hojas y tallos de *Roldana barba-johannis* presentan gran poder antioxidante (DPPH) con una  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 6.14 a 8.92, respectivamente; el estudio reportó como componentes principales al sargacromenol, ácido sargahidroquinico y ácido sargaquinico, metabolitos de naturaleza lipofílica con capacidad insecticida (Céspedes y col, 2004). Sin embargo, estudios donde se evaluó la actividad antioxidante de raíces y tubérculos de plantas del género *Roldana* son inexistentes. En cuanto a la familia Asteraceae, ésta ha sido ampliamente estudiada y gran parte de las propiedades biológicas que presentan las especies de esta familia han sido atribuidas a su capacidad antioxidante (Piatkowska y col, 2022). Al respecto, algunas plantas de la familia Asteraceae son más activas que nuestras especies de *Roldana*. Por ejemplo, el extracto hidroalcohólico de raíces de *Cichorium intybus*. presenta una  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 31.3 por DPPH y 49.9 por ABTS (Denev y col, 2014), esta especie es utilizada para la producción de bebidas estimulantes y ha sido empleada para el tratamiento de la diabetes (Denev y col, 2014). Por otra parte, el EE de *Scorzonera hieracifolia* presenta una  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 0.454 por DPPH y 1.21 por ABTS, planta empleada en la medicina tradicional como antirreumático, analgésico y antipirético (Sarı y col, 2019).

**Cuadro 16.** Actividad antioxidante del extracto etanólicos (EE) de *Roldana sessilifolia* y *Roldana hartwegii*.<sup>1</sup>

Especie de <i>Roldana</i>	Método de evaluación			
	DPPH		ABTS	
	$\mu\text{mol ET/g EE}$	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{mol ET/g EE}$	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>R. sessilifolia</i>	$79.6 \pm 2.43^b$	9142.12	$598.0 \pm 29.65^b$	1463.8
<i>R. hartwegii</i>	$2596.0 \pm 69.85^a$	279.73	$2887.6 \pm 211.89^a$	127.0

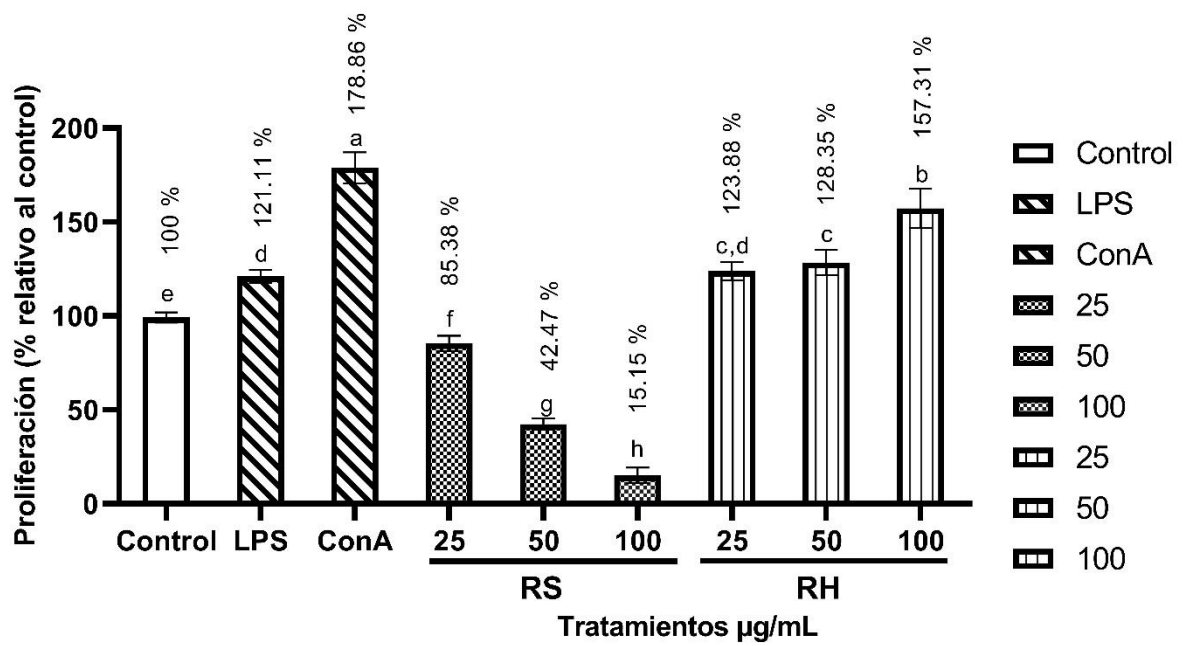
<sup>1</sup> Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres réplicas. Letras superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ).  
 $\mu\text{mol ET}$ : micromoles equivalentes de Trolox.

El potencial antioxidante del EE-RH podría estar asociado con el contenido de metabolitos totales, al presentar mayor contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos que el EE-RS (**Cuadro 7**). En los resultados obtenidos por HPLC-MS, el EE-RH destacó por la presencia de flavonoides derivados de quercetina (**Cuadro 11**). Los flavonoides, especialmente los derivados de quercetina se caracterizan por su alta actividad antioxidante (Lakhanpal y Rai, 2007) y podrían ser lo que hacen que el EE-RH sea más activo.

#### **f Actividad inmunomoduladora *in vitro***

Extractos de plantas con actividad adaptogénica también actúan como inmunomoduladores (Wagner, Nörr y Winterhoff, 1994). La inmunomodulación se refiere a la alteración de la respuesta inmune, la cual puede incrementarse (inmunoestimulación) o disminuirse (inmunosupresión) dependiendo del estímulo (García-Hernández y col, 2009).

En relación con la proliferación del control (100%), todos los tratamientos tuvieron un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ). El EE-RS mostró un efecto inmunosupresor que aumenta con la concentración (15.15% - 85.38%). En contraste, el EE-RH fue un inmunoestimulador que aumenta con la concentración (157.31% a 100  $\mu\text{g/mL}$ ); evaluado a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , el EE-RH tuvo un efecto mayor que el LPS (121.11%) pero inferior al obtenido con ConA (178.86%) (**Figura 9**). Los mitógenos ConA y LPS son utilizados tanto en humanos como en roedores debido a su capacidad de estimular la síntesis y diferenciación de células T (ConA) y células B (LPS) (Jacobs, 1981; Dwyer y Johnson, 1981).



**Figura 9.** Efecto del extracto etanólico (EE) de *Roldana sessilifolia* (RS) y *Roldana hartwegii* (RH) en la proliferación de esplenocitos.

Los valores son la media  $\pm$  DE de dos experimentos independientes por triplicado. Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadística por la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) (LSD = 6.76). Los controles positivos son concavalina A (Con A) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y lipopolisacárido (LPS) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Diferentes estudios reportan que sustancias con actividad inmunomoduladora inducen la proliferación de esplenocitos en ratones (Seo y col, 2005; Lin y Tang, 2007). El incremento en la proliferación inducido por el EE-RH fue superior a lo reportado para tres especies de *Echeveria* (*E. subrigida* 134%, *E. kimnachii* 120%, *E. craigiana* 109%) (López-Angulo y col. 2022). En cuanto a plantas con actividad adaptogénica, el tratamiento de ratones BALB/c con el extracto metanólico de *W. somnifera* estimuló la producción de leucocitos y la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales (Davis y Kuttan, 2000). Por otro lado, el extracto acuoso de la raíz de ginseng estimuló la proliferación y función de los macrófagos peritoneales, así como la liberación de mediadores citotóxicos (Lim y col, 2004).

En cuanto a especies de *Roldana*, en la actualidad no existen reportes sobre su actividad inmunomoduladora *in vitro*. Sin embargo, extractos de *R. platanifolia* y *R. barba-johannis* presentan propiedades antiinflamatorias relacionadas con la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios por los monocitos (Céspedes y col, 2004; Arciniegas y col, 2015).

Por otra parte, plantas de la familia Asteraceae modulan el sistema inmunitario y algunos de los géneros más representativos son *Echinacea*, *Artemisia* y *Matricaria*. Especies de *Echinacea* (e.g. *E. purpurea*, *E. angustifolia* y *E. pallida*) poseen propiedades inmunoestimuladoras: activan la producción de citoquinas (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\beta$ ), incrementan la movilidad de leucocitos, activación de las células “natural killer” (NK) y promoción de la maduración de células dendríticas (Catanzaro col, 2018). Especies de *Artemisia* destacan por sus propiedades antiinflamatorias, se han comprobado que inhiben las rutas iNOS y COX-2, suprimen la señalización de ERK, NF- $\kappa\beta$  y la activación de producción de anticuerpos de células B, además inhibe la

activación patogénica de células T (Qin, 2020). Plantas del género *Matricaria* actúan como antiinflamatorios al reducir la producción de PGE2, NF- $\kappa$ B, IL-6 y otros mediadores inflamatorios (Menghini y col, 2016). La inmunomodulación mencionada para esta familia de plantas ha sido asociada a la variedad de compuestos de origen fenólico y terpénico. En particular, el género *Echinacea* destaca en su contenido de *N*-alkamidas, polifenoles y polisacáridos; el *Artemisia* en su contenido de ácidos cafeolquínicos, esteroides, cumarinas, flavonoides y terpenoides (e.g., artemisininas); y el género *Matricaria* destaca en su contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas y terpenoides (e.g.,  $\beta$ -farneseno, chamazuleno) (Catanzaro y col, 2018; Kshirsagar y Rao, 2021; El Mihaoui y col, 2022).

Dicho esto, el EE-RS y EE-RH contienen compuestos que podrían estar relacionados con los resultados aquí obtenidos. En ambas especies encontramos la presencia de fenólicos (**Cuadro 10** y **Cuadro 11**) (e.g., ácido cafeico, quercetina, isoramnetina y kaempferol), terpenos con propiedades antiinflamatorias (espatulenol, 1,2,3,3a,8,8a-Hexahidro-2,2,8-trimetil-(3aá,8á,8aá)-5,6-azulenodicarboxaldehído, 2,3-dihidro-5,8-dimetil-1,4-naftoquinona) (Dos Santos y col, 2020; Bakun y col, 2021; Kapoor y col, 2021) y esteroides como el  $\gamma$ -sitosterol y el  $\alpha$ -sitosterol que han demostrado poseer efectos antiinflamatorios y citotóxicos en diferentes líneas celulares (e.g., línea celular de cáncer pancreático, línea celular HT-29, línea celular LNCap, línea celular MDA-MB-231) (Bakrim y col, 2022; Khan y col, 2022)

Por otra parte, el efecto inmunosupresor del EE-RS podría estar relacionado con la diferencia obtenida en la composición química evaluada por GC-MS (**Cuadro 8**), donde encontramos la presencia del alcaloide senecionina, el cual no estuvo presente en el EE-RH. Los alcaloides de pirrolizidina (PA) son altamente hepatotóxicos y han



demostrado inducir inmunosupresión al alterar la celularidad del timo y el bazo. (Deyo y Kerkvliet, 1990). Como podemos observar en la **Figura 5**, la inhibición aumenta al incrementar la dosis del EE-RS y como se comentó la sección de toxicidad, la dosis máxima para evitar la aparición de efectos adversos es de 0.007 µg/kg p.c. (Kopp y col, 2020). Sin embargo, los mecanismos por los cuales este tipo de compuestos ejercen inmunosupresión aún son desconocidos.

## IX. CONCLUSIONES

### A Conclusión general

Los extractos etanólicos de raíces de dos especies de *Roldana* (*R. sessilifolia* y *R. hartwegii*) presentaron actividades adaptogénica *in vivo*, antioxidante *in vitro* e inmunomoduladora en esplenocitos de ratón, posiblemente asociadas a la presencia de compuestos fenólicos y terpenos. Ambos extractos son inocuos en los modelos de *Artemia salina* y de toxicidad aguda en ratones.

### B Conclusiones específicas

1. La composición fitoquímica de los EE-RS y EE-RH coincide con los compuestos identificados en otras especies de *Roldana*; ambos extractos presentaron compuestos fenólicos, terpenos y cumarinas; adicionalmente, *R. hartwegii* presentó alto contenido de taninos.
2. El contenido de metabolitos totales (fenólicos, flavonoides y taninos) del EE-RH fue superior a lo presentado para el EE-RS.
3. El análisis por GC-MS de los extractos etanólicos muestra la presencia de lactonas sesquiterpénicas (3 $\beta$ -hidroxycostunólido, hispitólido-A), ácidos grasos (linoleico) y carbohidratos. Adicionalmente, el EE-RS muestra presencia de cetonas y alcaloides, mientras que el EE-RH contiene compuestos tipo quinolonas.
4. El perfil de compuestos fenólicos de los EE de *Roldana* mostró diferencias entre las especies. El extracto de *R. sessilifolia* presentó ácidos fenólicos (ácido siríngico, ácido cafeico, ácido 1,5-O-dicafeoilquínico), flavonoides (quercetín-O-hexósido), así como otros polifenoles (galocatequina, amentoflavona), sin

destacar una familia de compuestos fenólicos por su abundancia. En contraste, el extracto de *R. hartwegii* destacó a los flavonoides (kaempferol-*O*-hexósido, quercetín-*O*-(ramnosil)ramnósido, isoramnetín-*O*-hexósido, quercetín-*O*-hexósido) como los fenólicos mayoritarios.

5. Los extractos etanólicos de las especies de *Roldana* fueron inocuos en el ensayo de *Artemia salina* ( $CL_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$ ) y en el ensayo de toxicidad aguda en modelo murino ( $DL_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$ ).
- 6 Los extractos etanólicos de *R. sessilifolia* y *R. hartwegii* mostraron actividad adaptogénica, antioxidante e inmunomoduladora. El extracto de *R. sessilifolia* fue un mejor adaptógeno, mientras que el extracto de *R. hartwegii* presentó mayor capacidad antioxidante *in vitro*. En la actividad inmunomoduladora, el extracto de *R. sessilifolia* fue un inmunosupresor y el de *R. hartwegii* un inmunoestimulador de la proliferación de esplenocitos.

## X. PERSPECTIVAS

Se requiere evaluar la toxicidad aguda *in vivo* de la especie de *Roldana sessilifolia* en ausencia de alcaloides, para así atribuirle completamente los efectos adversos a este tipo de compuestos.

Considerando las actividades biológicas presentadas por ambas especies (adaptogénica, antioxidante e inmunomoduladora), resulta de interés ver que compuestos están realizando la acción y por qué vías están ejerciendo su efecto, si es una acción en conjunto o existen familias de compuestos que sean responsables, para esto se requiere evaluar fracciones de ambas especies.

Dependiendo la actividad presentada sería pertinente caracterizar químicamente por técnicas espectroscópicas y de RMN las fracciones biológicamente más activas.

Por último, resulta de interés evaluar la capacidad inmunomoduladora *in vivo* de ambas especies, así como la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro*.

i

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbot, WS. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, (3), 302-303.
- Abdel-Moez, G., Avula, B., Sayed, H., Khalifa, A., Ross, S., Katragunta, K., Khan, I., y Mohamed, S. (2023). Phytochemical profiling of three *Amaranthus* species using LC-MS/MS metabolomic approach and chemometric tools. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 236, 115722.
- Agorastos, A., y Chrousos, G. P. (2022). The neuroendocrinology of stress: the stress-related continuum of chronic disease development. *Molecular Psychiatry*, 27(1), 502-513.
- Akram, M. (2013). Minireview on *Achillea millefolium* Linn. *Journal of Membrane Biology*, 246(9), 661-663.
- Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., y Venkatesalu, V. (2017). Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: a review. *Phytotherapy Research*, 31(8), 1140-1161.
- Aluko, O. M., Umukoro, S., Annafi, O. S., Adewole, F. A., y Omorogbe, O. (2015). Effects of methyl jasmonate on acute stress responses in mice subjected to forced swim and anoxic tests. *Scientia Pharmaceutica*, 83(4), 635-644.
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., y Shahidi, F. (2016). Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(34), 6584-6604.
- Amoah, S. K., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., y Biavatti, M. W. (2016). Rosmarinic acid—pharmaceutical and clinical aspects. *Planta medica*, 82(05), 388-406.
- Anyan, J., y Amir, S. (2018). Too depressed to swim or too afraid to stop? A reinterpretation of the forced swim test as a measure of anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 931-933.
- Aouadi, M., Escribano-Bailón, M. T., Guenni, K., Salhi Hannachi, A., y Dueñas, M. (2019). Qualitative and quantitative analyses of phenolic compounds by HPLC–DAD–ESI/MS in *Tunisian Pistacia vera* L. Leaves unveiled a rich source of phenolic compounds with a significant antioxidant potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2448-2460.
- Arciniegas, A., Maldonado, J. I., González, K., Pérez-Castorena, A., Villaseñor, J. L., y Romo de Vivar, A. (2013). Sesquiterpenes and Other Natural Products from *Roldana reticulata*. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 57(1), 16-18.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Maldonado, J., Avila, G., Villaseñor, J. L., y de Vivar, A. R. (2008). Chemical constituents of *Roldana lineolata*. *Fitoterapia*, 79(1), 47-52.

- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Nieto-Camacho, A., Maldonado, J. I., Villaseñor, J. L., y Vivar, A. R. D. (2015). Chemical composition and anti-inflammatory activity of *Roldana platanifolia*. *Quimica Nova*, 38, 1172-1175.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Villaseñor, J. L., y de Vivar, A. R. (2004). Chemical constituents of *Roldana aschenborniana*. *Biochemical systematics and ecology*, 6(32), 615-618.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Villaseñor, J. L., y Romo de Vivar, A. (2006). Cacalol derivatives from *Roldana angulifolia*. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1826-1829.
- Arruda, H. S., Neri-Numa, I. A., Kido, L. A., Júnior, M. R. M., y Pastore, G. M. (2020). Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. *Journal of Functional Foods*, 75, 104203.
- Ávila, J. (2014). El estrés un problema de salud del mundo actual. *Revista Con-Ciencia*, 2(1), 117-125.
- Ayaz, F., Akkol, E. K., Gören, N., Çalış, İ., Dereli, F. T. G., Duman, H., Choudhary, M., y I., Küçükboyacı, N. (2020). Anti-inflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones from *Chrysophthalmum montanum* (DC.) Boiss. *Records of Natural Products*, 14(1), 48-56.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.
- Bakrim, S., Benkhaira, N., Bourais, I., Benali, T., Lee, L. H., El Omari, N., Sheikh, R, A., Wen Goh, K., Ming, L, C., y Bouyahya, A. (2022). Health benefits and pharmacological properties of stigmasterol. *Antioxidants*, 11(10), 1912.
- Bakun, P., Czarczynska-Goslinska, B., Goslinski, T., y Lijewski, S. (2021). *In vitro* and *in vivo* biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Medicinal Chemistry Research*, 30, 834-846.
- Barros, L., Alves, C. T., Dueñas, M., Silva, S., Oliveira, R., Carvalho, A. M., Henriques, M., Santos-Buelga, C., y Ferreira, I. C. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Industrial Crops and Products*, 44, 104-110.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C., Carvalho, A. M., y Santos-Buelga, C. (2011). Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chemistry*, 127(1), 169-173.
- Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., y Eberlin, M. N. (2007). Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*, 12(3), 423-432.

- Batiha, G. E. S., Olatunde, A., El-Mleeh, A., Hetta, H. F., Al-Rejaie, S., Alghamdi, S., Zahoor, M., Beshbishy, M., Murata, T., Zaragoza-Bastida, A., y Rivero-Perez, N. (2020). Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of wormwood (*Artemisia absinthium*). *Antibiotics*, 9(6), 353.
- Bayrak, N., Yildirim, H., Yıldız, M., Radwan, M. O., Otsuka, M., Fujita, M., Tuyum, A, F., y Ciftci, H. I. (2019). Design, synthesis, and biological activity of Plastoquinone analogs as a new class of anticancer agents. *Bioorganic chemistry*, 92, 103255.
- Bellassouad, K., Feki, A. E., y Ayadi, H. (2015). Effect of extraction solvents on the biomolecules and antioxidant properties of *Scorzonera undulata* (Asteraceae): Application of factorial design optimization phenolic extraction. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(4), 313-330.
- Black, P. H. (2003). The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17(5), 350-364.
- Bohlmann, F., y Zdero, C. (1978). New cacalol derivatives from *Roldana heterogama*. *Phytochemistry*, 17(3), 565-566.
- Boulenger, J. P., Jerabek, I., Jolicoeur, F. B., Lavallee, Y. J., Leduc, R., y Cadieux, A. (1996). Elevated plasma levels of neuropeptide Y in patients with panic disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 153(1), 114-116.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cannon, W. B. (1926a). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*. 9, 399-431.
- Cannon, W. B. (1929b). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. New York: D. Appleton and Co.
- Cao, Q., Qin, L., Huang, F., Wang, X., Yang, L., Shi, H., Wu, H., Zhang, B., Chen, Z., y Wu, X. (2017). Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 319, 80-90.
- Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., y Lanni, C. (2018). Immunomodulators inspired by nature: a review on curcumin and echinacea. *Molecules*, 23(11), 2778.
- Céspedes, C. L., Torres, P., Marín, J. C., Arciniegas, A., de Vivar, A. R., Pérez-Castorena, A. L., y Aranda, E. (2004). Insect growth inhibition by

- tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. *Phytochemistry*, 65(13), 1963-1975.
- Cha, J., Kim, C. T., y Cho, Y. J. (2020). Optimizing extraction conditions for functional compounds from ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) using response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 29, 379-385.
- Cheiran, K. P., Raimundo, V. P., Manfroi, V., Anzanello, M. J., Kahmann, A., Rodrigues, E., y Frazzon, J. (2019). Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 286, 113-122.
- Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., y Zhang, C. (2015). Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in *Pollen typhae* for transformation rule exploration. *Molecules*, 20(10), 18352-18366.
- Chouh, A., Nouadri, T., Catarino, M. D., Silva, A. M., y Cardoso, S. M. (2022). Phlorotannins of the Brown algae *Sargassum vulgare* from the Mediterranean Sea coast. *Antioxidants*, 11(6), 1055.
- Christ, B., y Müller, K. H. (1960). Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Archiv der Pharmazie*, 293(12), 1033-1042.
- Chua, L. S., Latiff, N. A., Lee, S. Y., Lee, C. T., Sarmidi, M. R., y Aziz, R. A. (2011). Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). *Food Chemistry*, 127(3), 1186-1192.
- Christenhusz, M. J., Fay, M. F., & Chase, M. W. (2020). *Plants of the world: an illustrated encyclopedia of vascular plants*. University of Chicago Press.
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., y Miller, G. E. (2007). Psychological stress and disease. *American Medical Association* 298, 1685–1687.
- Contrada, R., y Baum, A. (2010). Effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. En F. S. Dhabhar. (1st). *The Handbook of Stress Science: Biology, Psychology, and Health*, 47–63.
- Coulerie, P., Nour, M., Maciuk, A., Eydoux, C., Guillemot, J. C., Lebouvier, N., Hnawia, E., Leblanc, K., Lewin, G., Canard, B., y Figadère, B. (2013). Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. *Planta Medica*, 79(14), 1313-1318.
- Cuyckens, F., y Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
- Davis, L., y Kuttan, G. (2000). Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2), 193-200.



- Davydov, M., y Krikorian, A. D. (2000). *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.(Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(3), 345-393.
- Dayanand, K., y Kishanchandra, K. (2014). Pharmacognostical investigation and evaluation of *Ficus carica* fruit extract for adaptogenic activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 2022-2032.
- De Kloet, E. R., y Molendijk, M. L. (2016). Coping with the forced swim stressor: towards understanding an adaptive mechanism. *Neural Plasticity*, 2016.
- Delgado, G., García, P. E., Bye, R. A., y Linares, E. (1991). Eremophilanolides from *Roldana sessilifolia*. *Phytochemistry*, 30(5), 1716.
- Delgado, G., García, P. E., Roldan, R. I., Bye, R., y Linares, E. (1996). New eremophilane sesquiterpene lactones from the roots of the medicinal plant *Roldana sessilifolia* (Asteraceae). *Natural Product Letters*, 8(2), 145-150.
- Denev, P., Petkova, N., Ivanov, I., Sirakov, B., Vrancheva, R., y Pavlov, A. (2014). Determination of biologically active substances in taproot of common chicory (*Cichorium intybus* L.). *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18, 124-129.
- Deng, W., Liu, H., Guo, L., Liu, Y., y Ma, Z. (2023). *Panax ginseng* abuse exhibits a pro-inflammatory effect by activating the NF- $\kappa$ B pathway. *Food Science and Nutrition*, 11(5), 2130-2140.
- Deyo, J. A., y Kerkvliet, N. I. (1990). Immunotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline following subchronic administration to C57B16 mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 14(4), 842-849.
- Dhabhar, F. S. (2006). Stress-induced changes in immune cell distribution and trafficking: implications for immunoprotection versus immunopathology. *Neural and Neuroendocrine Mechanisms in Host Defense and Autoimmunity*, 7-25..
- Dhabhar, F. S. (2014). Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58, 193-210.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., y Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193-S1199.
- Diallo, A., Eklu-Gadegbeku, K., Amegbor, K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Creppy, E., y Gbeassor, M. (2014). *In vivo* and *in vitro* toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), 1214-1218.
- Dos Santos, E., Radai, J. A. S., do Nascimento, K. F., Formagio, A. S. N., de Matos Balsalobre, N., Ziff, E. B., Konkiewitz, E. C., y Kassuya, C. A. L. (2022). Contribution of spathulenol to the anti-nociceptive effects of *Psidium guineense*. *Nutritional Neuroscience*, 25(4), 812-822.

- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Viera, R., McEwen, B., y Manji, H. K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3543-3548.
- Dueñas, M., González-Manzano, S., Surco-Laos, F., González-Paramas, A., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of sulfated quercetin and epicatechin metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3592-3598.
- Dwyer, J. M., y Johnson, C. (1981). The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 46(2), 237.
- El Mihyaoui, A., Esteves da Silva, J. C., Charfi, S., Candela Castillo, M. E., Lamarti, A., y Arnao, M. B. (2022). *Chamomile (Matricaria chamomilla L.)*: a review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. *Life*, 12(4), 479.
- El Sayed, A. M., El Hawary, S., Elimam, H., Saleh, A. M., Zokalih, A. H., Mohyeldin, M. M., y Bassam, S. M. (2023). ESI-LC-MS/MS based comparative multivariate metabolomic and biological profiling with dynamic molecular docking of *Gmelina arborea* Roxb different organs. *Fitoterapia*, 168, 105540.
- El-Shazly, M. A. M., Hamed, A. A., Kabary, H. A., y Ghareeb, M. A. (2022). LC-MS/MS profiling, antibiofilm, antimicrobial and bacterial growth kinetic studies of *Pluchea dioscoridis* extracts. *Acta Chromatographica*, 34(3), 338-350.
- Felegyi-Tóth, C. A., Garádi, Z., Darcsi, A., Csernák, O., Boldizsár, I., Béni, S., y Alberti, Á. (2022). Isolation and quantification of diarylheptanoids from European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and HPLC-ESI-MS/MS characterization of its antioxidative phenolics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 210, 114554.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., y Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416(2), 123-129.
- Ferreira, R., Xapelli, S., Santos, T., Silva, A. P., Cristóvão, A., Cortes, L., y Malva, J. O. (2010). Neuropeptide Y modulation of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced nitric oxide production in microglia. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41921-41934.
- Finney DJ. (1971). Probit Analysis, 3 ed. Press Cambridge, *Cambridge University*.
- Fletcher, M. A., Rosenthal, M., Antoni, M., Ironsonm G., Zengm X. R., Barnes, Z., Harvey, J., Hurwitz, B., Levis, S., Broderick, G., y Klimas, N. G.. (2010).

Plasma neuropeptide Y: a biomarker for symptom severity in chronic fatigue syndrome. *Behavioural Brain Functions*. 6, 76.

- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Funston, A. M. (2008). Taxonomic revision of *Roldana* (Asteraceae: Senecioneae), a genus of the southwestern USA, Mexico, and Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95(2), 282-337.
- Gamaro, G. D., Xavier, M. H., Denardin, J. D., Pilger, J. A., Ely, D. R., Ferreira, M. B. C., y Dalmaz, C. (1998). The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiology and Behavior*, 63(4), 693-697.
- García Hernández, M., Guerrero Ramírez, G., Castro Corona, M. D. L. Á., y Medina de la Garza, C. E. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Medicina Universitaria*, 11(45), 247-259.
- García-Oliveira, P., Barral, M., Carpena, M., Gullón, P., Fraga-Corral, M., Otero, P., Prieto, M. A., y Simal-Gandara, J. (2021). Traditional plants from Asteraceae family as potential candidates for functional food industry. *Food and Function*, 12(7), 2850-2873.
- George, P. (2011). Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants- An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 40-44.
- Ghosh, R., Chakraborty, A., Biswas, A., and Chowdhuri, S. (2020). Computer Aided Identification of Potential SARS CoV-2 Main Protease Inhibitors from Diterpenoids and Biflavonoids of *Torreya Nucifera* Leaves. *Journal of Biomolecular Structures*. 1 1–16.
- Giri, M., Rao, P. M., y Jayaveera, K. N. (2011). Evaluation of adaptogenic activity of *Prunella vulgaris*. *International Journal of Pharmaceutic Science Research*, 8(1), 62-65.
- Goldstein D.S., y Kopin I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*. 10(2), 109-120.
- González-Elizondo, M., López-Enríquez, L. I., González-Elizondo, M. S., Tena-Flores, J. A. (2004). Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas, México, Durango: Instituto Politécnico Nacional.
- Gouveia, S., y Castilho, P. C. (2011). Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. *Food Research International*, 44(6), 1620-1631.
- Grace, M. H., Yousef, G. G., Kurmukov, A. G., Raskin, I., y Lila, M. A. (2009). Phytochemical characterization of an adaptogenic preparation from

*Rhodiola heterodonta*. *Natural Product Communications*, 4(8), 1934578X0900400807.

- Graczyk, F., Gębalski, J., Makuch-Kocka, A., Gawenda-Kempczyńska, D., Ptaspżyńska, A.A., Grzyb, S., Bogucka-Kocka, A., y Załuski, D. (2022) Phenolic Profile, Antioxidant, Anti-Enzymatic and Cytotoxic Activity of the Fruits and Roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Molecules*, 27, 5579-5595.
- Han, J., Ye, M., Qiao, X., Xu, M., Wang, B. R., y Guo, D. A. (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(3), 516-525.
- Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science and Business Media.
- Harris, T. B., Ferrucci, L., Tracy, R. P., Corti, M. C., Wacholder, S., Ettinger Jr, W. H., y Wallace, R. (1999). Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *The American Journal of Medicine*, 106(5), 506-512.
- Hata, T., Nishikawa, H., Itoh, E., y Watanabe, A. (1999). Depressive state with anxiety in repeated cold-stressed mice in forced swimming tests. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 79(2), 243-249.
- Hättenschwiler, S., y Vitousek, P. M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(6), 238-243.
- Heilig, M., Wahlestedt, C., Ekman, R., y Widerlöv, E. (1988). Antidepressant drugs increase the concentration of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 147(3), 465-467.
- Hochachka, P. W., y Lutz, P. L. (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 130(4), 435-459
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 253-267.
- Hou, C., Kulka, M., Zhang, J., Li, Y., y Guo, F. (2014). Occurrence and biological activities of eremophilane-type sesquiterpenes. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(8), 664-677.
- Hou, J. P. (1977). The chemical constituents of ginseng plants. *The American Journal of Chinese Medicine*, 5(02), 123-145.
- Hvattum, E. (2002). Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionization

- tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(7), 655-662.
- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Tsouh-Fokou, P. V., Arshad, U. M., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., y Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*, 24(12), 2277.
- Ishola, I. O., Chatterjee, M., Tota, S., Tadigopulla, N., Adeyemi, O. O., Palit, G., y Shukla, R. (2012). Antidepressant and anxiolytic effects of amentoflavone isolated from *Cnestis ferruginea* in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2), 322-331.
- Iwen, K. A., Oelkrug, R., y Brabant, G. (2018). Effects of thyroid hormones on thermogenesis and energy partitioning. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(3), R157-R170.
- Jacobs, D. M. (1981). Immunomodulatory effects of bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunopharmacology*, 3(2), 119-132.
- Joaquín-Ramos, A. D. J., López-Palestina, C. U., Pinedo-Espinoza, J. M., Altamirano-Romo, S. E., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L., y Gutiérrez-Tlahque, J. (2020). Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 80(3), 352-360.
- Jung, K. A., Han, D., Kwon, E. K., Lee, C. H., y Kim, Y. E. (2007). Antifatigue effect of *Rubus coreanus* Miquel extract in mice. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 689-693.
- Kapoor, N., Kandwal, P., Sharma, G., y Gambhir, L. (2021). Redox ticklers and beyond: Naphthoquinone repository in the spotlight against inflammation and associated maladies. *Pharmacological Research*, 174, 105968.
- Karamouzis, I., Karamouzis, M., Vrabas, I., Christoulas, K., Kyriazis, N., Giannoulis, E. y Mandroukas, K. (2002). The Effects of Marathon Swimming on Serum Leptin and Plasma Neuropeptide Y Levels., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 40(2), 132-136.
- Karonen, M., y Pihlava, J. M. (2022). Identification of Oxindoleacetic Acid Conjugates in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds by High-Resolution UHPLC-MS/MS. *Molecules*, 27(17), 5629.
- Katz, R. J., Roth, K. A., y Carroll, B. J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5(2), 247-251.
- Kelebek, H. (2016). LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature. *Food Chemistry*, 204, 227-238.

- Kellogg Jr, D. L. (2006). In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *Journal of Applied Physiology*, 100(5), 1709-1718.
- Khan, Z., Nath, N., Rauf, A., Emran, T. B., Mitra, S., Islam, F., Chandran, D., Barua, J., Uddin Khandaker, M., Idris, A. M., Wilairatana, P. y Thiruvengadam, M. (2022). Multifunctional roles and pharmacological potential of  $\beta$ -sitosterol: Emerging evidence toward clinical applications. *Chemico-biological Interactions*, 365, 110117.
- Khanum, F., Bawa, S. A., y Singh, B. (2005). *Rhodiola rosea*: A versatile Adaptogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4, 55-62.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Marucha, P. T., Mercado, A. M., Malarkey, W. B., y Glaser, R. (1995). Slowing of wound healing by psychological stress. *The Lancet*, 346(8984), 1194-1196.
- Klau, M. E., Rohaeti, E., Rafi, M., Artika, I. M., Ambarsari, L., y Nurcholis, W. (2023). Metabolite profiling of *Curcuma xanthorrhiza* varieties grown in different regions using UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS and chemometrics analysis. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13, 1-13.
- Kokoska, L., y Janovska, D. (2009). Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review. *Phytochemistry*, 70(7), 842-855.
- Konstantinos, A. P., y Sheridan, J. F. (2001). Stress and influenza viral infection: modulation of proinflammatory cytokine responses in the lung. *Respiration Physiology*, 128(1), 71-77.
- Kopp, T., Salzer, L., Abdel-Tawab, M., y Mizaikoff, B. (2020). Efficient Extraction of Pyrrolizidine Alkaloids from Plants by Pressurised Liquid Extraction—A Preliminary Study. *Planta Medica*, 86(01), 85-90.
- Kopustinskiene, D. M., y Bernatoniene, J. (2021). Antioxidant effects of *Schisandra chinensis* fruits and their active constituents. *Antioxidants*, 10(4), 620.
- Kshirsagar SG y Rao. RV. (2021). Antiviral and Immunomodulation Effects of *Artemisia*. *Medicina*,;57(3):217.
- Kuo, L. E., Kitlinska, J. B., Tilan, J. U., Li, L., Baker, S. B., Johnson, M. D., Lee, E. W., Burnett, M. S., Fricke, S. T., Kvetnansky, R., Herzog, H., y Zukowska, Z. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature Medicine*, 13(7), 803-811.
- Laddha, N. C., Dwivedi, M., Mansuri, M. S., Gani, A. R., Ansarullah, M., Ramachandran, A. V., Dalai, S., y Begum, R. (2013). Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. *Experimental Dermatology*, 22(4), 245-250.

- Lakhanpal, P., y Rai, D. K. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37.
- Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., y Garrido, C. (2010). Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *The Scientific World Journal*, 10, 1543-1552.
- Larzelere, M. M., y Jones, G. N. (2008). Stress and health. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 35(4), 839-856.
- Lee, W. P., Lan, K. L., Liao, S. X., Huang, Y. H., Hou, M. C., y Lan, K. H. (2018). Inhibitory effects of amentoflavone and orobol on daclatasvir-induced resistance-associated variants of hepatitis C virus. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46(04), 835-852.
- Leistner, C., y Menke, A. (2018). How to measure glucocorticoid receptor's sensitivity in patients with stress-related psychiatric disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 91, 235-260.
- Leistner, C., y Menke, A. (2020). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis and stress. *Handbook of Clinical Neurology*, 175, 55-64.
- Li, F., Song, X., Su, G., Wang, Y., Wang, Z., Jia, J., Qing, S., Huang, L., Wang, Y., Zheng, K., y Wang, Y. (2019). Amentoflavone inhibits HSV-1 and ACV-resistant strain infection by suppressing viral early infection. *Viruses*, 11(5), 466.
- Lim, T. S., Na, K., Choi, E. M., Chung, J. Y., y Hwang, J. K. (2004). Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng*. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 1-6.
- Lin, J. Y., y Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101(1), 140-147.
- Linares, E., y Bye Jr, R. A. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(2), 153-183.
- Lipinski, S., Petersen, B. S., Barann, M., Piecyk, A., Tran, F., Mayr, G., Jentsch, M., Aden, K., Stengel, S. T., Klostermeier, U. C., Sheth, V., Ellinghaus, D., Rausch, T., Korb, J. O., Nothnagel, M., Krawczak, M., Gilssen, C., Veltman, J. A., Forster, M., Forster, P., Lee, C. C., Fritscher-Ravens, A., Schreiber, S., Franke, A., y Rosenstiel, P. (2019). Missense variants in NOX1 and p22phox in a case of very-early-onset inflammatory bowel disease are functionally linked to NOD2. *Molecular Case Studies*, 5(1), a002428.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79(4), 1431-1568.

- Liu Y-Z., Wang Y-X., y Jiang C-L. (2017) Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience* ,11, 316.
- López-Angulo, G., Díaz-Camacho, S. P., Heredia-Mercado, B., Montes-Avila, J., y Delgado-Vargas, F. (2022). Adaptogenic, immunomodulatory, and antioxidant activities of three *Echeveria* species (Crassulaceae). *South African Journal of Botany*, 151, 255-262.
- Luo, M., Hou, F., Dong, L., Huang, F., Zhang, R., y Su, D. (2020). Comparison of microwave and high-pressure processing on bound phenolic composition and antioxidant activities of sorghum hull. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3190-3202.
- Maeda, A. H., Nishi, S., Hatada, Y., Ozeki, Y., y Kanaly, R. A. (2014). Biotransformation of the high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) benzo [k] fluoranthene by *S. phingobium* sp. strain KK 22 and identification of new products of non-alternant PAH biodegradation by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Microbial Biotechnology*, 7(2), 114-129.
- Maldonado, J., Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, M., y Villaseñor, J. L. (2008). Eremophilanolides from *Roldana lobata*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 63(3), 331-334.
- Marfe, G., Tafani, M., Indelicato, M., Sinibaldi-Salimei, P., Reali, V., Pucci, B., Fini, M., y Russo, M. A. (2009). Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(4), 643-650.
- Marzouk, M. M., Hussein, S. R., Elkhateeb, A., Farid, M. M., Ibrahim, L. F., y Abdel-Hameed, E. S. S. (2016). Phenolic profiling of *Rorippa palustris* (L.) Besser (Brassicaceae) by LC-ESI-MS: Chemosystematic significance and cytotoxic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(8), 633-637.
- Massy-Westropp, R. A., y Reynolds, G. D. (1966). Eremophilane sesquiterpenes from *Eremophila mitchelli*. *Australian Journal of Chemistry*, 19(2), 303-307.
- McEwen, BS. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *The New England Journal of Medicine*. 338, 171-179.
- Menghini, L., Ferrante, C., Leporini, L., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., Pintore, G., Vacca, M., Orlando, G., y Brunetti, L. (2016). An hydroalcoholic chamomile extract modulates inflammatory and immune response in HT29 cells and isolated rat colon. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1513-1518.
- Merkulov, V. M., Merkulova, T. I., y Bondar, N. P. (2017). Mechanisms of brain glucocorticoid resistance in stress-induced psychopathologies. *Biochemistry (Moscow)*, 82, 351-365.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. J., y McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(05), 31-34.



- Michler, H., Laakmann, G., y Wagner, H. (2011). Development of an LC-MS method for simultaneous quantitation of amentoflavone and biapigenin, the minor and major biflavones from *Hypericum perforatum* L., in human plasma and its application to real blood. *Phytochemical Analysis*, 22(1), 42-50.
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., y Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds of Biological Activity*, 8, 1-24.
- Morris, M. J., Russell, A. E., Kapoor, V., Cain, M. D., Elliott, J. M., West, M. J., Wing, L, M, H., y Chalmers, J. P. (1986). Increases in plasma neuropeptide Y concentrations during sympathetic activation in man. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 17(2), 143-149.
- Moujir, L., Callies, O., Sousa, P. M., Sharopov, F., y Seca, A. M. (2020). Applications of sesquiterpene lactones: a review of some potential success cases. *Applied Sciences*, 10(9), 3001.
- Mustafa, A. M., Abouelenein, D., Angeloni, S., Maggi, F., Navarini, L., Sagratini, G., Santanatoglia, A., Torregiani, E., Vittori, S., y Caprioli, G. (2022). A New HPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Quercetin and Its Derivatives in Green Coffee Beans. *Foods*, 11(19), 3033.
- Neuhouser, M. L. (2004). Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50(1), 1-7.
- Nigro, O., Tuzi, A., Tartaro, T., Giaquinto, A., Vallini, I., y Pinotti, G. (2020). Biological effects of verbascoside and its anti-inflammatory activity on oral mucositis: A review of the literature. *Anti-cancer Drugs*, 31(1), 1-5.
- Nilsson, G. E., y Lutz, P. L. (2004). Anoxia tolerant brains. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(5), 475-486.
- Nishimura, H., Ida, Y., Tsuda, A., y Tanaka, M. (1989). Opposite effects of diazepam and  $\beta$ -CCE on immobility and straw-climbing behavior of rats in a modified forced-swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 33(1), 227-231.
- OECD. (2022). Test Guideline No. 425 "Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure.
- Pacheco, M. T., Escribano-Bailón, M. T., Moreno, F. J., Villamiel, M., y Dueñas, M. (2019). Determination by HPLC-DAD-ESI/MSn of phenolic compounds in Andean tubers grown in Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84, 103258.
- Panossian, A. (2017). Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 49-64.

- Panossian, A. G. (2003). Adaptogens: Tonic herbs for fatigue and stress. *Alternative and Complementary Therapies*, 9(6), 327-33.
- Panossian, A. G. (2013). Adaptogens in mental and behavioral disorders. *Psychiatric Clinics*, 36(1), 49-64.
- Panossian, A. G., Efferth, T., Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Kuchta, K., Mukherjee, P. K., Banerjee, S., Heinrich, M., Wu, W., Guo D., y Wagner, H. (2021). Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress-and aging-related diseases. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 630-703.
- Panossian, A., Gabrielian, E., y Wagner, H. (1999). On the mechanism of action of plant adaptogens with particular reference to cucurbitacin R diglucoside. *Phytomedicine*, 6(3), 147-155.
- Panossian, A., Hambardzumyan, M., Hovhanissyan, A., y Wikman, G. (2007). The adaptogens rhodiola and schizandra modify the response to immobilization stress in rabbits by suppressing the increase of phosphorylated stress-activated protein kinase, nitric oxide and cortisol. *Drug target insights*, 2, 117739280700200011.
- Panossian, A., Wikman, G., y Sarris, J. (2010). Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*, 17(7), 481-493.
- Panossian, A., Wikman, G., Kaur, P., y Asea, A. (2009). Adaptogens exert a stress-protective effect by modulation of expression of molecular chaperones. *Phytomedicine*, 16(6-7), 617-622.
- Panossian, A., Wikman, G., Kaur, P., y Asea, A. (2012). Adaptogens stimulate neuropeptide Y and Hsp72 expression and release in neuroglia cells. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 6.
- Panossian, A., Wikman, G., y Wagner, H. (1999). Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine*, 6(4), 287-300.
- Pascale, R., Acquavia, M. A., Cataldi, T. R., Onzo, A., Coviello, D., Bufo, S. A., Scrano, L., Ciriello, R., Guerrieri, A., y Bianco, G. (2020). Profiling of quercetin glycosides and acyl glycosides in sun-dried peperoni di Senise peppers (*Capsicum annuum* L.) by a combination of LC-ESI (-)-MS/MS and polarity prediction in reversed-phase separations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 3005-3015.
- Passon, M., Weber, F., Jung, N. U., y Bartels, D. (2021). Profiling of phenolic compounds in desiccation-tolerant and non-desiccation-tolerant Linderniaceae. *Phytochemical Analysis*, 32(4), 521-529.
- Pelser, P. B., Nordenstam, B., Kadereit, J. W., y Watson, L. E. (2007). An ITS phylogeny of tribe *Senecioneae* (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. *Taxon*, 56(4), 1077-1104.

- Pelser, P. B., y Watson, L. (2009). Introduction to Asteroideae. *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*, 495, 502.
- Pelzer, L. E., Guardia, T., Juárez, A. O., y Guerreiro, E. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *II Farmaco*, 53(6), 421-424.
- Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Hernández, M. L., Toscano, R. A., Contreras, J. L., y Romo de Vivar, A. (2006). 8, 9-seco-Eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50(4), 157-159.
- Periferakis, A., Periferakis, K., Badarau, I. A., Petran, E. M., Popa, D. C., Caruntu, A., Costache, R. S., Scheau, C., Carantu, C., y Costache, D. O. (2022). Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15054.
- Perfumi, M., y Mattioli, L. (2007). Adaptogenic and central nervous system effects of single doses of 3% rosavin and 1% salidroside *Rhodiola rosea* L. extract in mice. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(1), 37-43.
- Piątkowska, E., Biel, W., Witkowicz, R., y Kępińska-Pacelik, J. (2022). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Asteraceae Family Plants. *Applied Sciences*, 12(23), 12293.
- Poornima, P., Kumar, J. D., Zhao, Q., Blunder, M., y Efferth, T. (2016). Network pharmacology of cancer: From understanding of complex interactomes to the design of multi-target specific therapeutics from nature. *Pharmacological Research*, 111, 290-302.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., y Jalfre, M. L. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732.
- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E., y Seawright, A. A. (1999). Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1-2), 53-67.
- Prentice, H. M., Milton, S. L., Scheurle, D., y Lutz, P. L. (2004). The upregulation of cognate and inducible heat shock proteins in the anoxic turtle brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(7), 826-828.
- Price, M. L., y LG, B. (1978). Detoxification of high tannin sorghum grain. *Metabolism and Nutrition*, 17(2), 229-236.
- Pripdeevech, P., Pitija, K., Rujjanawate, C., Pojanagaroon, S., Kittakoop, P., y Wongpornchai, S. (2012). Adaptogenic-active components from *Kaempferia parviflora* rhizomes. *Food chemistry*, 132(3), 1150-1155.
- POWO. (2024). *Plants of the World online*. Royal Botanic Gardens, Kew. <https://powo.science.kew.org/>.

- Pu, W. L., Zhang, M. Y., Bai, R. Y., Sun, L. K., Li, W. H., Yu, Y. L., Zhang, Y., Song, L., Wang, Z. X., Pengm Y, F., Shi, H., Zhou, K., y Li, T. X. (2020). Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121, 109552.
- Qnais, E. (2011). The analgesic effect of the ethanolic extract of *Matricaria aurea*. *Turkish Journal of Biology*, 35(3), 347-352.
- Qin, D.P.; Li, H.B.; Pang, Q.Q.; Huang, Y.X.; Pan, D.B.; Su, Z.Z.; Yao, X.J.; Yao, X.S.; Xiao, W.; y Yu, Y. (2020). Structurally diverse sesquiterpenoids from the aerial parts of *Artemisia annua* (Qinghao) and their striking systemically anti-inflammatory activities. *Bioorganic Chemistry*. 103, 104221.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Redonda-Martínez, R. (2022). Tribus de Asteraceae en México, morfología y clave de identificación. *Acta Botánica Mexicana*, 129.
- Redrobe, J. P., Dumont, Y., y Quirion, R. (2002). Neuropeptide Y (NPY) and depression: from animal studies to the human condition. *Life Sciences*, 71(25), 2921-2937.
- Rolnik, A., y Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 3009-3019.
- Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., y Villaseñor, J. L. (2007). Secondary metabolites from Mexican species of the tribe *Senecioneae* (Asteraceae). *Journal of the Mexican Chemical Society*, 51(3), 160-172.
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Carrillo-Hormaza, L., Osorio, E., y Cardona-Gómez, G. P. (2018). Effects of biflavonoids from *Garcinia madruno* on a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 129, 128-138.
- Sanz, M., Cadahia, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Fernandez de Simon, B., Hernandez, T., y Estrella, I. (2010). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9631-9640.
- Sarı, A., Şahin, H., Özsoy, N., y Çelik, B. Ö. (2019). Phenolic compounds and in vitro antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activities of *Scorzonera hieraciifolia* Hayek roots. *South African Journal of Botany*, 125, 116-119.
- Selye, H. (1938). Experimental evidence supporting the conception of "adaptation energy". *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 123(3), 758-765.

- Selye, H. (1956). The stress of life. *New york*, Mc gran-hill book company.
- Seo, Y., Lee, H. J., Kim, Y. A., Youn, H. J., y Lee, B. J. (2005). Effects of several salt marsh plants on mouse spleen and thymus cell proliferation using MTT assay. *Ocean Science Journal*, 40, 209-212.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183.
- Sies, H. (2019). Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. En H. Sies. (1<sup>st</sup>) *Oxidative stress: eustress and distress*. (pp: 3-12). United Kingdom. Academic Press.
- Singh, B., Saxena, A. K., Chandan, B. K., Gupta, D. K., Bhutani, K. K., y Anand, K. K. (2001). Adaptogenic activity of a novel, withanolide-free aqueous fraction from the roots of *Withania somnifera* Dun. *Phytotherapy Research*, 15(4), 311-318.
- Singleton VL y Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Sobral, F., Calhelha, R. C., Barros, L., Dueñas, M., Tomás, A., Santos-Buelga, C., Vilas-Boas, M., y Ferreira, I. C. (2017). Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast Portugal. *Molecules*, 22(2), 248.
- Sogi, D. S., Sharma, S., Oberoi, D. P. S., y Wani, I. A. (2010). Effect of extraction parameters on curcumin yield from turmeric. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 300-304.
- Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P., y Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica*, 59(03), 250-252.
- Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., y Selli, S. (2016). Characterization of aroma-active and phenolic profiles of wild thyme (*Thymus serpyllum*) by GC-MS-Olfactometry and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1957-1965.
- Spiers, J. G., Chen, H. J. C., Sernia, C., y Lavidis, N. A. (2015). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 456.
- Stefanowicz-Hajduk, J., Asztemborska, M., Krauze-Baranowska, M., Godlewska, S., Gucwa, M., Moniuszko-Szajwaj, B., Stochmal, A., y Ochocka, J. R. (2020). Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of *Kalanchoe daigremontiana* extracts on human cancer cell lines. *Planta Medica*, 86(04), 239-246.
- Steinbrenner, H., Speckmann, B., Pinto, A., y Sies, H. (2010). High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay

- between selenium and carbohydrate metabolism. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(1), 40-45.
- Stogner, K. A., y Holmes, P. V. (2000). Neuropeptide-Y exerts antidepressant-like effects in the forced swim test in rats. *European Journal of Pharmacology*, 387(2), R9-R10.
- Terraneo, L., Paroni, R., Bianciardi, P., Giallongo, T., Carelli, S., Gorio, A., y Samaja, M. (2017). Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox Biology*, 11, 12-20.
- Tian, X., Lv, S., Tian, H., Wang, R., & Wang, H. (2020). Development of an accurate and reliable DNA method for botanical origin authentication of ginseng food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 87, 103419.
- Todorova, V., Ivanov, K., Delattre, C., Nalbantova, V., Karcheva-Bahchevanska, D., y Ivanova S. (2021) Plant Adaptogens—History and Future Perspectives. *Nutrients*. 13, 2861.
- Tran, T. M. T., y Do, V. Q. (2019). Studies on betalains chemistry from the Vietnamese red dragon fruits (*Hylocereus polyrhizus*) by LC-ESI-MS/MS. *Can Tho University Journal of Science*, 11(1), 87-94.
- Trifan, A., Zengin, G., Sinan, K. I., Sieniawska, E., Sawicki, R., Maciejewska-Turska, M., Skalikca-Wozniak, K., y Luca, S. V. (2022). Unveiling the phytochemical profile and biological potential of five artemisia species. *Antioxidants*, 11(5), 1017.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., y Bassaganya-Riera, J. (2016). Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*, 785, 87-95.
- Wagner, H., Nörr, H., y Winterhoff, H. (1994). Plant adaptogens. *Phytomedicine*, 1(1), 63-76.
- Wal, A., Wal, P., Rai, A. K., Tiwari, R., y Prajapati, S. K. (2019). Adaptogens with a Special Emphasis on *Withania somnifera* and *Rhodiola rosea*. *Nutrition and Enhanced Sports Performance*, 407-418.
- Wang C y Zuo Y. (2011). Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry*, 128, 562-568.
- Wang, Y., Zhou, Y., y Graves, D. T. (2014). FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*, 2014.
- West, A. P. (1990). Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 14(6), 863-877.

- Wiegant, F. A. C., Surinova, S., Ytsma, E., Langelaar-Makkinje, M., Wikman, G., y Post, J. A. (2009). Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogerontology*, *10*, 27-42.
- Wilsky, S., Sobotta, K., Wiesener, N., Pilas, J., Althof, N., Munder, T., Wutzler, P., y Henke, A. (2012). Inhibition of fatty acid synthase by amentoflavone reduces coxsackievirus B3 replication. *Archives of Virology*, *157*, 259-269.
- Yeo, J., y Shahidi, F. (2020). Identification and quantification of soluble and insoluble-bound phenolics in lentil hulls using HPLC-ESI-MS/MS and their antioxidant potential. *Food Chemistry*, *315*, 126202.
- Zepeda, A. B., Pessoa Jr, A., Castillo, R. L., Figueroa, C. A., Pulgar, V. M., y Farías, J. G. (2013). Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochemistry and Function*, *31*(6), 451-459.
- Zhang, Z., Sun, T., Niu, J. G., He, Z. Q., Liu, Y., y Wang, F. (2015). Amentoflavone protects hippocampal neurons: anti-inflammatory, antioxidative, and antiapoptotic effects. *Neural Regeneration Research*, *10*(7), 1125.
- Zhong, Z., Han, J., Zhang, J., Xiao, Q., Hu, J., y Chen, L. (2018). Pharmacological activities, mechanisms of action, and safety of salidroside in the central nervous system. *Drug Design, Development and Therapy*, 1479-1489.
- Zitouni-Nourine, S. H., Belyagoubi-Benhammou, N., El-Houaria Zitouni-Haouar, F., Douahi, O., Chenafi, F., Fetati, H., Sari. S. C., Benmahieddine, A., Zauoi, C., Mekaouche, F. Z. N., Bekkara, F. A., Kambouche, N., Gismondi, A., y Toumi, H. (2022). *Echinops spinosissimus* Turra Root Methanolic Extract: Characterization of the Bioactive Components and Relative Wound Healing, Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Plants*, *11*(24), 3440.

## XII. ABREVIATURAS

‰: Por ciento

ABTS: Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

ANOVA: Análisis de varianza

AOX: Actividad antioxidante

b.f.: Base fresca

b.s: Base seca

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media

DL50: Dosis letal media

ConA: Concanavalina A

CONAHCYT: Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología

D.E.: Desviación estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

Da: Daltons

DAD: Detector de arreglo de diodos

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

e.g.: Exempli gratia (por ejemplo)

EAG: Equivalente de ácido gálico

EC: Equivalente de catequina

EE. UU: Estados Unidos de América FT: Fenólicos totales

EE: Extracto etanólico

EQ: Equivalente de quercetina

ESI: Ionización por electroasperjado (electrospray)



ET: Equivalente de Trolox

FVT: Flavonoides totales

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

h: Hora

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media

kg: Kilogramo

L: Litro

LPS: Lipopolisacárido

LSD: Contraste de la mínima diferencia significativa

m/z: Relación masa/carga

mg: Miligramo

Min: Minuto

mL: Mililitro

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio

°C: Grados Celsius

p/v: Peso/volumen

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

ROS: Especies reactivas del oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

S: Segundos

SFB: Suero fetal bovino

SS: Solución salina

$\lambda_{\text{max}}$ : Longitud de onda máxima

$\mu\text{L}$ : Microlitro

$\mu\text{g}$ : Microgramo

$\mu\text{M}$ : micromolar

$\mu\text{mol}$ : Micromol