



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS  
DE TRES ESPECIES DE *Graptopetalum* NATIVAS DE  
SINALOA”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**QFB. RICARDO ANDREÉ MEDINA MENDOZA**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTOR(ES)

**DRA. GABRIELA LÓPEZ ANGULO**

**DR. FRANCISCO DELGADO VARGAS**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A ENERO DE 2024.



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 de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”. Ambos laboratorios pertenecen a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Gabriela López Angulo y del Dr. Francisco Delgado Vargas, además de contar con la asesoría del Dr. Julio Montes Avila, de la Dra. María Elena Báez Flores y del Dr. Ricardo Parra Unda. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de maestría otorgada por CONACYT.

## **DEDICATORIA**

*"A mi querida familia, gracias por estar siempre ahí. Esta tesis es un logro que comparto con ustedes. Su apoyo y amor incondicional son mi mayor motivación. Con amor e infinita gratitud, Ricardo."*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por ser mi *alma mater* y a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas por cimentar mi formación académica y permitirme alcanzar mis metas.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas por aceptarme como estudiante en su programa.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico entregado durante este proyecto.

A mis directores de tesis les expreso un profundo agradecimiento por confiar en mí y aceptarme como su alumno y brindar un excelente ambiente para realizar este proyecto. A la Doctora Gabriela, por trasmitirme sus conocimientos, habilidades y confianza para desenvolverme en el laboratorio. Al Doctor Francisco por su gran disposición, conocimiento y paciencia para resolver mis dudas y siempre estar al pendiente del proyecto. No tengo más que palabras buenas para ustedes y se que no pude haber elegido mejores directores de tesis, se los agradezco infinitamente.

Al Doctor Rito Vega Aviña por su importante ayuda en la identificación, recolección y cultivo de las especies utilizadas en este proyecto.

Al Doctor Julio Montes Ávila, por su interés en mi formación, por sus consejos, disposición, ayuda y por adoptarme como uno más de sus hijos.

A la Doctora María Elena Báez Cota y al Doctor Ricardo Parra Unda, por el tiempo invertido en la revisión, y por las sugerencias para mejorar el escrito de esta tesis.

A la Maestra en ciencias Yesmi Patricia Ahumada Santos por su asesoramiento y ayuda en los ensayos realizados en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra Kaethe Willms”.

A mis mejores amigos a los cuales considero como hermanos, que me han acompañado por muchos años y con los que he compartido bastantes experiencias importantes, y siempre han estado ahí para apoyarnos, en las buenas y en las malas. Gracias por siempre estar ahí Edgar, Leslie y Minerva.

A mis grandes amigos (y maestros) de la zona VIP, Mario y Katia por su excelente amistad, la paciencia, por compartir sus conocimientos y por estar tan pendiente de mí y darme su ayuda sin pedir nada a cambio.

Al Doctor Eleazar Alcantar, mi mejor primo. Por su gran amistad, compañía y apoyo durante este proceso.

A mis queridos amigos del Laboratorio de Química de Productos Naturales; Antonio, Fabricio, Kimberly, Yudith, Agustín, Abraham, Maritza, Alejandra, Fabiola, Belinda, Enrique, Damaris, Alma, Yadira y Pabela, por los buenos momentos, y más que nada por compartir su experiencia y prestarme su ayuda cuando lo necesité.

A mis amigos de la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra Kaethe Willms” por recibirme como un integrante más, y su ayuda durante mis ensayos; Angeina, Arely, Ana María, Antonio, Esmeralda.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE CUADROS .....	VI
I. RESUMEN .....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN .....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
4.1. Enfermedades crónico-degenerativas .....	6
4.1.1. Estrés oxidativo .....	7
4.1.2. Antioxidantes .....	8
4.2. Enfermedades infecciosas .....	8
4.3. El potencial biológico de los productos naturales .....	11
4.4. Familia Crassulaceae .....	14
4.5. Antecedentes .....	20
4.5.1. Género <i>Graptopetalum</i> .....	20
4.5.1.1. Actividad biológica del género .....	22
4.5.2. Especies de <i>Graptopetalum</i> nativas de Sinaloa .....	24
4.5.2.1. <i>Graptopetalum sinaloensis</i> .....	24
4.5.2.2. <i>Graptopetalum rusbyi</i> .....	24
4.5.2.3. <i>Graptopetalum occidentale</i> .....	25
V. JUSTIFICACIÓN .....	27
VI. HIPÓTESIS .....	28
VII. OBJETIVOS .....	29
7.1. Objetivo general .....	29
7.2. Objetivos específicos .....	29
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
8.1. Materiales .....	30
8.1.1. Material vegetal .....	30
8.1.2. Material biológico .....	30
8.1.2.1. Microorganismos .....	30

8.1.2.2. Animales de laboratorio.....	32
<b>8.1.3. Reactivos .....</b>	<b>32</b>
<b>8.2. Metodología .....</b>	<b>33</b>
<b>8.2.1. Elaboración de la harina de hojas de <i>Graptopetalum</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>8.2.2. Obtención de los extractos metanólicos de <i>Graptopetalum</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>8.2.3. Caracterización fitoquímica .....</b>	<b>33</b>
8.2.3.1. Análisis fitoquímico cualitativo.....	33
8.2.3.2. Cuantificación de metabolitos totales .....	35
8.2.3.2.1. Fenólicos totales .....	35
8.2.3.2.2. Flavonoides totales.....	36
8.2.3.2.3. Taninos totales .....	36
<b>8.3. Identificación de componentes individuales en <i>Graptopetalum</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>8.3.1. Perfil de compuestos lipofílicos .....</b>	<b>37</b>
<b>8.3.2. Perfil de compuestos fenólicos .....</b>	<b>38</b>
<b>8.3.3. Métodos de evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> .....</b>	<b>39</b>
8.3.3.1. Actividad antioxidante .....	39
8.3.3.1.1. Método DPPH .....	39
8.3.3.1.2. Método ABTS .....	40
8.3.3.1.3. Método ORAC .....	41
8.3.3.2. Actividad inhibitoria de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	42
8.3.3.3. Actividad inmunomoduladora .....	42
8.3.3.4. Actividad antibacteriana .....	44
8.3.3.5. Actividad antiparasitaria contra <i>Giardia duodenalis</i> .....	45
8.3.3.5.1. Criopreservación de la cepa.....	45
8.3.3.5.2. Descongelamiento y recuperación de los trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	45
8.3.3.5.3. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> contra <i>Giardia duodenalis</i> .....	46
<b>8.4. Análisis de toxicidad de los extractos metanólicos de <i>Graptopetalum</i> ..</b>	<b>47</b>
<b>8.4.1. Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> contra nauplios de <i>Artemia salina</i> .....</b>	<b>47</b>
8.4.1.1. Obtención de las larvas de <i>Artemia salina</i> .....	48
8.4.1.2. Preparación de los extractos metanólicos para el ensayo de toxicidad	48



8.4.1.3.	Evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos .....	48
8.4.2.	Evaluación de toxicidad aguda en ratones BALB/c.....	49
8.5.	Análisis estadístico .....	51
IX.	RESULTADOS .....	53
9.1.	Humedad y rendimiento de extracción.....	53
9.2.	Caracterización fitoquímica.....	53
9.2.1.	Análisis fitoquímico cualitativo .....	53
9.2.2.	Cuantificación de metabolitos totales.....	53
9.2.2.1.	Fenólicos totales .....	53
9.2.2.2.	Flavonoides totales .....	57
9.2.2.3.	Taninos totales.....	57
9.3.	Identificación de componentes individuales .....	57
9.3.1.	Perfil de compuestos lipofílicos .....	57
9.3.2.	Perfil de compuestos fenólicos .....	62
9.3.2.1.	Análisis por HPLC-MS.....	62
9.3.2.2.	Identificación de compuestos individuales .....	69
9.3.2.2.1.	Ácidos fenólicos .....	69
9.3.2.2.2.	Flavonoides .....	72
9.3.2.2.3.	Taninos.....	75
9.3.2.2.4.	Otros compuestos .....	77
9.4.	Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> .....	78
9.4.1.	Actividad antioxidante.....	78
9.4.2.	Actividad inhibitoria de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	81
9.4.3.	Actividad inmunomoduladora.....	81
9.4.4.	Actividad antibacteriana.....	81
9.4.5.	Actividad antiparasitaria contra <i>G. duodenalis</i> .....	85
9.5.	Evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos.....	85
9.5.1.	Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> frente a nauplios de <i>Artemia salina</i> .....	85
9.5.2.	Evaluación de toxicidad aguda en ratones BALB/c.....	85
9.6.	Análisis de correlación entre componentes químicos y actividades biológicas de los extractos metanólicos.....	87
X.	DISCUSIÓN .....	91
10.1.	Humedad y rendimiento de extracción.....	91

<b>10.2. Caracterización fitoquímica.....</b>	<b>92</b>
<b>10.2.1. Análisis fitoquímico cualitativo.....</b>	<b>92</b>
<b>10.2.2. Cuantificación de metabolitos totales .....</b>	<b>93</b>
10.2.2.1. Fenólicos totales .....	93
10.2.2.2. Flavonoides totales .....	94
10.2.2.3. Taninos totales.....	95
<b>10.3. Identificación y cuantificación de componentes individuales .....</b>	<b>96</b>
<b>10.3.1. Perfil de compuestos lipofílicos.....</b>	<b>96</b>
<b>10.3.2. Perfil de compuestos fenólicos.....</b>	<b>101</b>
<b>10.4. Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> .....</b>	<b>105</b>
10.4.1. Actividad antioxidante .....	105
10.4.2. Actividad inhibitoria de la enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	108
10.4.3. Actividad inmunomoduladora.....	111
10.4.4. Actividad antibacteriana .....	115
10.4.5. Actividad antiparasitaria.....	119
<b>10.5. Evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos.....</b>	<b>121</b>
10.5.1. Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> frente a nauplios de <i>Artemia salina</i> ...	121
10.5.2. Evaluación de toxicidad aguda en ratones BALB/c .....	122
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>124</b>
11.1. Conclusión general .....	124
11.2. Conclusiones específicas.....	124
<b>XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO .....</b>	<b>127</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>128</b>
<b>XIV. SIGLAS Y ABREVIACIONES.....</b>	<b>175</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Especies de <i>Graptopetalum</i> de Sinaloa.	26
<b>2</b>	Hojas de <i>Graptopetalum</i> spp.	31
<b>3</b>	Efecto de los extractos metanólicos (EM) de las tres especies de <i>Graptopetalum</i> en la proliferación de esplenocitos de ratón.	83

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Patógenos prioritarios para los programas de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (OMS).	10
2	Actividades biológicas de algunos compuestos aislados de fuentes naturales.	13
3	Clasificación taxonómica del género <i>Graptopetalum</i> .	21
4	Técnicas colorimétricas y de precipitación para la identificación de metabolitos secundarios.	34
5	Clasificación de toxicidad (CYTED).	50
6	Tipo de prueba, factores de respuesta y variables de respuesta que se usaron en el análisis estadístico.	52
7	Contenido de humedad y rendimiento de extracción de los extractos metanólicos de hojas de especies de <i>Graptopetalum</i> .	54
8	Composición fitoquímica de los extractos metanólicos de hojas de las especies de <i>Graptopetalum</i> .	55
9	Contenido de metabolitos totales en los extractos metanólicos de hojas de especies de <i>Graptopetalum</i> .	56
10	Compuestos identificados en los extractos metanólicos de las especies de <i>Graptopetalum</i> por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).	58
11	Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos detectados en los extractos metanólicos de especies de <i>Graptopetalum</i> .	63

<b>12</b>	Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas de las especies de <i>Graptopetalum</i> .	79
<b>13</b>	Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas de las especies de <i>Graptopetalum</i> expresada como concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ).	80
<b>14</b>	Concentración de los extractos metanólicos de las especies de <i>Graptopetalum</i> que inhibe el 50% de la actividad de la enzima $\alpha$ -glucosidasa (IC <sub>50</sub> ).	82
<b>15</b>	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, $\mu\text{g/mL}$ ) y Mínima Bactericida (CMB, $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos metanólicos de hojas de las especies de <i>Graptopetalum</i> .	84
<b>16</b>	Toxicidad de los extractos metanólicos de hojas de las especies de <i>Graptopetalum</i> sobre nauplios de <i>Artemia salina</i> .	86
<b>17</b>	Efecto de la administración oral a ratones BALB-c de 2000 mg/kg de extractos metanólicos de <i>Graptopetalum</i> .	88
<b>18</b>	Efecto en los parámetros hematológicos de ratones BALB-c después de la administración oral de 2000 mg/kg de extractos metanólicos de <i>Graptopetalum</i> .	89
<b>19</b>	Correlación de Pearson entre las actividades biológicas y los compuestos químicos de los EMs de las especies de <i>Graptopetalum</i> .	90

## I. RESUMEN

Las enfermedades crónico-degenerativas (ECD) presentan una alta morbilidad y mortalidad y son un grave problema de salud pública en el mundo. Las causas de las ECD resultan de la combinación de factores genéticos y ambientales. Paralelamente, las enfermedades infecciosas están ganando relevancia debido a la adaptación y resistencia de patógenos a los antimicrobianos, en parte debido al uso excesivo de estos agentes y a las condiciones de higiene en algunos países. El tratamiento de estas enfermedades se vuelve cada vez más complejo y menos efectivo. Por lo tanto, la búsqueda de terapias alternativas eficaces, accesibles y con menos efectos secundarios es una prioridad global. En este contexto, las plantas son una fuente valiosa de compuestos bioactivos con potencial terapéutico y México posee una rica diversidad de plantas. La familia Crassulaceae, en particular el género *Graptopetalum*, ha sido poco estudiada, pero se ha demostrado que algunas de sus especies, como *G. paraguayense*, tienen propiedades benéficas contra las ECD y las enfermedades infecciosas. Con base a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la composición química (fitoquímico, GC-MS y HPLC-ESI-MS) y las actividades biológicas (antioxidante, inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, inmunomoduladora, antimicrobiana, antiparasitaria contra *Giardia duodenalis* y toxicidad) de tres especies de *Graptopetalum* nativas de Sinaloa (*G. sinaloensis*, *G. rusbyi*, *G. occidentale*). Las especies de *Graptopetalum* mostraron un contenido elevado de compuestos fenólicos (88.2-133.3 mg EAG/g EM). El análisis por GC-MS indicó la presencia de  $\gamma$ -sitosterol y  $\alpha$ -tocoferol como compuestos mayoritarios, mientras que en el análisis por HPLC-MS mostró como componentes principales a flavonoides (derivados de quercetina, kaempferol, miricetina, luteolina), ácidos fenólicos (derivados de ácidos cumárico, cafeico y siríngico), y taninos (hidrolizables y condensados). Las especies mostraron una alta actividad antioxidante ( $\mu\text{mol ET/g b.f.}$ ) por los métodos DPPH (39.9-71.2) y ABTS (57.7-119.7). Los EMs presentaron actividad inmunomoduladora sobre la proliferación de esplenocitos de ratón, resultando superior al mitógeno LPS. Además, la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) de los EMs ( $\text{IC}_{50}$  72.3-126.9) fue mejor que el de acarbosa (968.9). Los EMs de *Graptopetalum* mostraron actividad antibacteriana únicamente contra cepas Gram positivas (CIMs  $< 250 \mu\text{g/mL}$ ). Sin embargo, fueron inactivas contra trofozoítos de *G. duodenalis* a la concentración máxima evaluada (500  $\mu\text{g/mL}$ ). Las especies fueron inocuas en el ensayo de *Artemia salina* ( $\text{CL}_{50} > 2000 \text{ ppm}$ ) y de toxicidad aguda en ratón ( $\text{DL}_{50} > 2 \text{ g/kg p.c.}$ ). La composición química y actividades biológicas de las tres especies de *Graptopetalum* de Sinaloa sugieren su potencial para tratar ECD y enfermedades infecciosas. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales para demostrar dicho potencial y establecer e implementar estrategias de aprovechamiento sustentable para las especies de *Graptopetalum* de Sinaloa.

**(Palabras clave:** *Enfermedades crónico-degenerativas e infecciosas, alternativa terapéutica, compuestos bioactivos*)

## II. ABSTRACT

Chronic-degenerative diseases (CDD) pose a high morbidity and mortality rate, representing a significant public health challenge globally. The causes of CDD result from a combination of genetic and environmental factors. Concurrently, infectious diseases are gaining prominence due to the adaptation and resistance of pathogens to antimicrobials, partly attributed to their excessive use and hygiene conditions in certain countries. The treatment of these diseases is becoming increasingly complex and less effective. Therefore, the quest for effective, accessible, and less side-effect-prone alternative therapies is a global priority. In this context, plants are a valuable source of bioactive compounds with therapeutic potential, and Mexico is rich in plant biodiversity. The Crassulaceae family, including the genus *Graptopetalum*, has been scarcely studied. However, some of its species, such as *G. paraguayense*, have demonstrated beneficial properties against CDD and infectious diseases. Based on this, the objective of this research was to assess the chemical composition (phytochemical, GC-MS, and HPLC-ESI-MS) and biological activities (antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, immunomodulatory, antimicrobial, antiparasitic against *Giardia duodenalis*, and toxicity) of three *Graptopetalum* species native to Sinaloa (*G. sinaloensis*, *G. rusbyi*, *G. occidentale*). The *Graptopetalum* species exhibited a high content of phenolic compounds (88.2-133.3 mg GAE/g DW). GC-MS analysis indicated the presence of  $\gamma$ -sitosterol and  $\alpha$ -tocopherol as the main compounds, and HPLC-MS analysis revealed flavonoids (quercetin, kaempferol, myricetin, luteolin derivatives), phenolic acids (coumaric, caffeic, and syringic acid derivatives), and tannins (hydrolyzable and condensed) as principal components. The species displayed high antioxidant activity ( $\mu\text{mol ET/g FW}$ ) evaluated by DPPH (39.9-71.2) and ABTS (57.7-119.7) methods. The *Graptopetalum* extracts showed immunomodulatory activity in the mouse splenocyte proliferation assay, higher than that of the LPS mitogen. Moreover, the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) of the extracts ( $\text{IC}_{50}$  72.3-126.9) was superior to that of acarbose (968.9). *Graptopetalum* extracts exhibited antibacterial activity only against Gram-positive strains (MICs < 250  $\mu\text{g/mL}$ ) but were inactive against *G. duodenalis* trophozoites at the maximum evaluated concentration (500  $\mu\text{g/mL}$ ). The *Graptopetalum* species were innocuous in the *Artemia salina* assay ( $\text{LC}_{50}$  > 2000 ppm) and acute toxicity test in mice ( $\text{LD}_{50}$  > 2 g/kg b.w.). The chemical composition and biological activities of the three *Graptopetalum* species from Sinaloa suggest their potential in treating CDD and infectious diseases. Therefore, further studies are warranted to validate this potential and establish sustainable utilization strategies for the Sinaloa's *Graptopetalum* species.

**(Keywords:** *Chronic degenerative and infectious diseases, therapeutic alternatives, bioactive compounds*)

### III. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas (ECD) son trastornos multifactoriales de duración prolongada que están íntimamente relacionadas con un estado de estrés oxidativo (EO). El EO se deriva de factores ambientales, conductuales, genéticos y fisiológicos. Las ECD son un problema de salud pública en el mundo por su alto porcentaje de morbilidad y mortalidad, siendo responsables de más de 43 millones de muertes por año. Las estrategias de prevención incluyen hábitos personales como realizar ejercicio, consumir dietas saludables, habitar espacios limpios y saludables, entre otros. Al respecto, algunos estudios han relacionado una dieta basada en productos naturales con una disminución del riesgo de dichas enfermedades, sugiriendo que el consumo de productos ricos en fibra, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos como fenoles y terpenos puede proporcionar un efecto protector sobre el organismo (Di Renzo., 2019; OMS, 2021). Por otro lado, al igual que las ECD, las enfermedades infecciosas son un importante problema de salud pública. En particular, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema estrechamente relacionado a la mortalidad de estas infecciones, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la RAM es uno de los diez principales problemas de salud pública en el mundo y representan una amenaza creciente para la salud humana (de Carvalho y col., 2021; OMS, 2020, Puerta, 2019).

El tratamiento para muchas de estas enfermedades está basado en esquemas farmacológicos cada vez más complejos que con el tiempo pierden eficacia y presentan efectos adversos; características que complican la adherencia a los tratamientos. Consecuentemente, es de suma importancia buscar alternativas



terapéuticas que sean eficaces y presenten menos desventajas que los agentes terapéuticos actuales. El estudio etnobotánico resulta de gran utilidad en el ámbito científico para el desarrollo de nuevas sustancias con potencial farmacológico; al respecto, aproximadamente el 50% de los medicamentos en uso clínico se han originado de plantas (Koo y col. 2018). En México existe una gran tradición en el uso de plantas con fines medicinales. Se estima que el país cuenta con un 12% de la diversidad florística del planeta con  $\cong$  23,400 especies vasculares y  $\cong$  5,000 de éstas poseen propiedades biológicas (Esquivel-Gutiérrez y col., 2012; Rodríguez y col., 2020). La familia Crassulaceae es una de las más representativas de México, considerando su gran diversidad (> 400 especies) y endemismo (Villaseñor, 2016). Los usos comunes de las crasuláceas incluyen fines ornamentales y algunos usos en medicina tradicional. Estudios científicos se han realizado para un número reducido de especies y se han establecido diversas actividades biológicas: antiinflamatorias, antimicrobiana, antioxidante, anticonvulsivante, anticancerígena y antidiabética (Hassan y col., 2021.). Las plantas del género *Graptopetalum* (Crassulaceae) han sido escasamente estudiadas, enfocándose principalmente en *G. paraguayense*, especie para la que se han demostrado propiedades antioxidantes y anticancerígenas, entre otras. En Sinaloa están reportadas cuatro especies de *Graptopetalum*: *G. filiferum*, *G. occidentale*, *G. rusbyi* y *G. sinaloensis*. Los estudios sobre las propiedades químico/biológicas de estas especies son inexistentes; asimismo, debido a su limitada distribución y características de desarrollo en condiciones extremas, su subsistencia se encuentra en riesgo. Por lo anteriormente expuesto, en este estudio se realizó la caracterización química/biológica de tres especies de *Graptopetalum* (*G. occidentale*,

*G. rusbyi* y *G. sinaloensis*) nativas de Sinaloa. Para ello, se realizó un tamizaje fitoquímico, se determinaron metabolitos totales (e.g., fenólicos, taninos, flavonoides) mediante métodos colorimétricos (e.g., Folin Ciocalteu y  $\text{AlCl}_3$ , Vainillina-HCl) y se identificaron compuestos lipofílicos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) e hidrofílicos por cromatografía de líquidos acoplada a masas (HPLC-MS). Asimismo, se evaluaron actividades biológicas *in vitro* de extractos metanólicos de las tres especies de *Graptopetalum*: antioxidante (DPPH, ABTS y ORAC), antibacteriana contra patógenos humanos, antiparasitaria contra *Giardia duodenalis*, inmunomoduladora e inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, así como la evaluación de toxicidad *in vitro* en *Artemia salina* y aguda *in vivo* en modelo murino.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Enfermedades crónico-degenerativas

Las enfermedades crónico-degenerativas (ECD) son trastornos de carácter complejo, de aparición y duración prolongada y multifactoriales. La etiología implica factores genéticos, ambientales, conductuales y fisiológicos (Di Renzo y col., 2019). Considerando los índices de mortalidad, las ECD más relevantes son el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades respiratorias crónicas. Enfermedades que en conjunto provocan aproximadamente 43 millones de muertes anuales, representando el 80% de mortalidad mundial (Di Renzo y col., 2019; Tapia-Hernández y col., 2018). Comportamientos poco saludables como el consumo de tabaco, inactividad física, ingesta excesiva de sal/sodio, uso nocivo de alcohol y otros factores asociados a presión arterial alta, sobrepeso, obesidad, hiperglucemia e hiperlipidemia aumentan en gran medida el riesgo de desarrollar ECD. La eficacia en la prevención de estas condiciones radica parcialmente en el autocuidado y en mantener hábitos y una dieta saludable. Respecto a esto, algunos estudios epidemiológicos describen una relación entre una dieta basada en productos naturales con una disminución potencial del riesgo de dichas enfermedades, sugiriendo así, que el consumo de alimentos ricos en fibra, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos como terpenos y fenoles proporcionan un efecto protector sobre el organismo. Con base en esto, los productos de origen natural y en concreto, sus compuestos bioactivos, están en el foco de la atención debido a sus propiedades a favor de la salud (Di Renzo y col., 2019; OMS, 2021).

#### 4.1.1. Estrés oxidativo

Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) pueden provenir de reacciones endógenas oxidativas en el metabolismo celular y de factores exógenos (e.g., radiación, componentes alimenticios, humo del tabaco y contaminantes ambientales). Estas moléculas son altamente reactivas y pueden dañar a macromoléculas (e.g., proteínas, carbohidratos, lípidos, ARN y ADN) y estructuras celulares. Con el fin de prevenir o revertir el daño a biomoléculas y estructuras, el organismo cuenta con sistemas antioxidantes. Sies (1985) introdujo el término de estrés oxidativo (EO) para describir una alteración en los sistemas oxidantes/antioxidantes a favor de las moléculas oxidantes. El EO está estrechamente relacionado con la patología de muchas ECD, pues los radicales libres no sólo dañan directamente biomoléculas y estructuras celulares de importancia en el organismo, sino que también pueden afectar vías de señalización celular claves en el desarrollo de estas enfermedades (Sies, 2020; Tapia-Hernandez y col., 2018).

Las especies oxidantes producidas por algunas estirpes celulares (e.g., células inmunitarias) son benéficas para la salud, puesto que participan en prevenir la invasión de agentes patógenos externos, la proliferación de células malignas y en los procesos de cicatrización. Sin embargo, la persistencia a largo plazo de especies reactivas puede generar daños irreversibles. Asimismo, estas especies pueden desempeñar un papel esencial en diversas fases del desarrollo y progresión de ECD, en especial del cáncer y la diabetes *mellitus* (Zhang y Tsao, 2016).

#### **4.1.2. Antioxidantes**

Un antioxidante es un compuesto con capacidad redox para mitigar el EO. En este sentido, los organismos aeróbicos poseen defensas antioxidantes primarias que incluyen reacciones enzimáticas y no enzimáticas y compuestos endógenos y exógenos que los protegen del desequilibrio oxidativo. Algunas de las enzimas implicadas son superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas/reductasas y catalasas. Asimismo, entre los compuestos se encuentran vitaminas (C y E), carotenoides, glutatión, proteínas (ferritina, ceruloplasmina, ubiquinona) y otros compuestos naturales como flavonoides, terpenos, taninos, cumarinas y lignanos. La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos, presentes en casi todas las materias naturales, incluidos productos alimenticios de origen vegetal, por lo que son parte integral de la dieta humana. Su característica aromática, sistema altamente conjugado y múltiples grupos hidroxilo hacen de estos compuestos excelentes donantes de electrones o átomos de hidrogeno, neutralizando así radicales libres, ROS o RNS. Los fenólicos han sido los compuestos más estudiados y se consideran potentes antioxidantes exógenos, cuyo consumo contribuye al mantenimiento de la salud humana al prevenir/disminuir el daño asociado con las ECD (Gulcin, 2020; Perveen y col., 2021; Tapia-Hernandez y col., 2018).

#### **4.2. Enfermedades infecciosas**

A la par con las ECD, las enfermedades infecciosas representan un importante problema de salud. Al respecto, los antimicrobianos han sido la principal herramienta para combatir las enfermedades infecciosas. No obstante, desde la introducción de los antibióticos se tenía previsto un aumento alarmante en la resistencia a estos

compuestos, lo que actualmente ha limitado considerablemente las opciones terapéuticas disponibles; este problema afecta a países de todos los niveles económicos pero su impacto es mucho mayor en los países en vías de desarrollo. La RAM se deriva de la presión evolutiva que experimentan estos microorganismos y es potenciado por el empleo inadecuado y desmedido de los antibióticos. La OMS ha declarado que la RAM es una de las diez principales amenazas de salud pública en el mundo, puesto que supone una amenaza creciente de infecciones por bacterias multiresistentes (**Cuadro 1**). La pérdida de eficacia de los antibióticos dificulta el tratamiento de los pacientes, aumenta los costos médicos e incrementa la mortalidad, alcanzando más de 700 mil defunciones por año. En enfermedades comunes como la neumonía, tuberculosis, gonorrea o salmonelosis ya se han identificado agentes etiológicos resistentes a los antimicrobianos, situación que la población en general prácticamente desconoce, lo que dificulta la prevención y tratamiento de estos padecimientos (de Carvalho y col., 2021; OMS, 2020, Puerta, 2019).

Por otro lado, las infecciones parasitarias intestinales causadas por protozoarios y helmintos también representan uno de los principales problemas de salud pública, en especial, en los países en desarrollo, donde las condiciones sanitarias y las instalaciones de distribución de agua son inadecuadas. En el mundo se estima que hay aproximadamente 3,500 millones de personas infectadas por parásitos, de los cuales 450 millones enfermaron como resultado de una infección parasitaria intestinal. Al respecto, anualmente se notifican más de 10.5 millones de casos nuevos por parásitos intestinales comunes como *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Ancylostoma* spp., *Schistosoma* spp., *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*.

**Cuadro 1.** Patógenos prioritarios para los programas de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (OMS).

<b>Patógeno</b>	<b>Antibiótico al que es resistente</b>
<b>Prioridad Global</b>	
Tuberculosis ( <i>Mycobacterium</i> spp.)	MDR-TB <sup>1</sup> y XDR-TB <sup>2</sup>
<b>Prioridad Crítica</b>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a carbapenémicos
<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente a carbapenémicos, resistente a la 3 <sup>o</sup> generación de cefalosporinas
<b>Prioridad Alta</b>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente a vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente a claritromicina
<i>Salmonella</i> spp.	Resistente a fluoroquinolonas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente a meticilina, vancomicina
<i>Campylobacter</i> spp.	Resistente a fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a la 3 <sup>o</sup> generación cefalosporinas, resistente a fluoroquinolonas
<b>Prioridad Media</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No susceptible a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente a ampicilina
<i>Shigella</i> spp.	Resistente a fluoroquinolonas

Adaptado de Puerta (2019). <sup>1</sup>MDR-TB (tuberculosis resistente a múltiples fármacos): Se define así la TB que no responde al menos a isoniacida y rifampicina. <sup>2</sup>XDR-TB (tuberculosis extensamente resistente a los medicamentos): Se define así la MDR-TB que, también, es resistente a fluoroquinolonas y medicamentos inyectables de segunda línea contra la TB.

Estas infecciones pueden no llegar a ser mortales, sin embargo, representan importantes problemas sociales y de salud, al provocar desde una simple obstrucción intestinal, hasta desnutrición e incluso anemia, especialmente en poblaciones con escasos recursos (Feleke y col., 2021; Fürnkranz y Walochnik, 2021).

En Latinoamérica, las enfermedades infecciosas son prevalentes debido a causas multifactoriales que contribuyen a su presencia. *G. duodenalis* es un protozoo de importancia clínica y es responsable de infecciones intestinales persistentes. Personas con giardiasis pueden presentar síntomas significativos que alteran su calidad de vida. El tratamiento de la parasitosis está basado en terapia farmacológica, empleándose medicamentos como el albendazol, tinidazol, mebendazol y en la mayoría de los casos metronidazol. Sin embargo, independientemente del régimen y tratamiento utilizado, rara vez se logra un 100% de efectividad en la erradicación de la infección. Por tanto, es necesario encontrar nuevos fármacos más efectivos y que estimulen las defensas naturales del cuerpo (Lalle y Hanevik, 2018; Vivancos y col., 2018; Elizondo-Luévano y col., 2021). Para ello, es importante explorar el uso de plantas medicinales y productos naturales, ya que representan una fuente importante de compuestos con propiedades biológicas diversas (Eid y Gonaid, 2018). Los compuestos identificados en los extractos de plantas pueden servir como base para descubrir y desarrollar nuevas moléculas activas en el tratamiento de enfermedades (Elizondo-Luévano y col., 2021).

#### **4.3. El potencial biológico de los productos naturales**

El uso de plantas, hierbas o componentes con fines medicinales tiene una larga historia. Hoy en día la OMS estima que cerca de 80% de las personas en países



desarrollados y subdesarrollados utilizan productos naturales con fines curativos, aunado a que un gran número de personas consideran a los productos naturales como inocuos y eficientes. Actualmente, los estudios etnobotánicos son importantes en investigación científica para identificar plantas con potencial farmacológico en la prevención y tratamiento de los principales problemas de salud pública, con el consecuente impacto social y económico (Esquivel-Gutiérrez y col., 2012). El desarrollo de fármacos está basado en un modelo de monoterapia; éste implica la identificación de compuestos biológicamente activos, síntesis química de los compuestos identificados y modificación química para mejorar su seguridad y eficacia (Mustafa y col., 2022; Yao y col., 2017). Al respecto, aproximadamente el 50% de los productos farmacéuticos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) se han originado a partir de plantas (Koo y col., 2018). Este enfoque ha tenido éxito contra enfermedades infecciosas y ECD. Al respecto, numerosos estudios reportan efectos biológicos atribuidos a compuestos bioactivos y derivados de productos naturales contra varias enfermedades incluyendo las ECD (**Cuadro 2**) (Fierascu y col., 2021; Santana-Gálvez y col., 2019).

Además de su uso como materias primas en la industria farmacéutica (Koo y col., 2018), los compuestos bioactivos derivados de fuentes naturales también se han usado en la industria cosmética, alimenticia y en protección ambiental (Fierascu y col., 2021).

**Cuadro 2.** Actividades biológicas de algunos compuestos aislados de fuentes naturales.

<b>Fuente</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>Capsicum annuum</i>	Quercetina y luteolina	Antioxidante	(Thuphairo y col., 2019)
Raíz de <i>cúrcuma</i> y <i>Rhizoma coptidis</i>	Curcumina y berberina	Antineoplásica (inhibición de la proliferación celular)	(Wang y col., 2016)
<i>Viburnum opulus</i>	Procianidinas de ácido clorogénico, glucósidos de cianidina y quercetina	Antidiabética (inhibición de absorción de carbohidratos a nivel intestinal)	(Zaklos-Szyda y col., 2019)
<i>Psoralea corylifolia</i>	Bakuchiol	Antiinflamatoria (Cardiovascular)	(Xu y col., 2021)
<i>Salvia officinalis</i> (aceite esencial)	<i>p</i> -Cimeno	Antibacteriana ( <i>E. coli</i> ATCC 8739, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>C. albicans</i> ATCC 10231)	(Cutillas y col., 2017)
<i>Tanacetum parthenium</i>	Lactonas terpénicas (parténolido)	Antiparasitario (protozoarios intestinales)	(Castaño Osorio y Giraldo García, 2019)

En México existe una gran tradición en el uso de plantas con fines medicinales (Esquivel-Gutiérrez y col., 2012). Se estima que en el país se encuentra el 12% de la diversidad terrestre del planeta, que cuenta con 23,400 especímenes vasculares y que entre 3,000 y 5,000 especies presentan propiedades medicinales. Sin embargo, solo cerca del 1% de estas han sido estudiadas con profundidad (Esquivel-Gutiérrez y col., 2012; Rodríguez y col., 2020), por lo que aún quedan especies vegetales que deben estudiarse.

En la mayoría de las terapias con plantas, el uso de preparados vegetales (e.g., extractos, decocciones, infusiones) posee efectos benéficos mayores al de sus compuestos aislados y con la aparición de pocos o ningún efecto adverso. Por lo tanto, la OMS ha propuesto que su uso puede ser de gran utilidad en la aplicación primaria en el sistema de salud, siempre y cuando este sustentado por bases científicas que aseguren parámetros de calidad, seguridad y efectividad para su uso en el ser humano (Luján y col., 2009).

#### **4.4. Familia Crassulaceae**

La familia Crassulaceae presenta una distribución cosmopolita; las especies ( $\approx 1,500$ ) agrupadas en 35 géneros se distribuyen en regiones áridas, templadas y templadas-cálidas. La mayoría de las especies poseen características florales atractivas. Los géneros más representativos por el número de especies son *Sedum* (400-500), *Crassula* (150), *Kalanchoe* (144) y *Echeveria* (139 especies); también están altamente representados *Sempervivum* (63), *Rhodiola* (58), *Dudleya* (47), *Tylecodon* (46) y *Aeonium* (40); mientras que otros tienen un número relativamente pequeño de especies como el género *Graptopetalum* con 20 especies (Hassan y col., 2021).

En México, la familia Crassulaceae es una de las que posee mayor diversidad y endemismo, e incluye 372 especies (Villaseñor, 2016). Las crasuláceas tienen gran importancia histórico-cultural y juegan un papel ecológico esencial en la estructura y función de los ecosistemas áridos del país (Andrade-Rodríguez y col., 2019). Las crasuláceas se caracterizan por su alta diversidad genética caracterizada por su alta variabilidad fenotípica: altura, tamaño, forma, grosor y color de las hojas; tamaño y forma de la inflorescencia; entre otras características (Andrade-Rodríguez y col., 2019). Las plantas de esta familia son herbáceas con tallo y hojas suculentas, pequeños arbustos que se describen con hojas enteras, opuestas o verticiladas, no estipuladas, presentan flores de entre tres y seis divisiones actinomorfas, con sépalos que pueden estar libres o soldados a la corola, con carpelos en número igual a los pétalos, libres o soldados a la base, nectarios generalmente escamosos entre los estambres y carpelos y fruto en polifolículo. Poseen un hábito suculento que se asocia a su metabolismo CAM (por sus siglas en inglés, Crassulacean Acid Metabolism) que les permite adaptarse a hábitat secos donde la disponibilidad de agua y CO<sub>2</sub> escasea, aunque muchas especies habitan donde no se presentan estas condiciones (Andrade y col., 2007; Ortiz y col., 2009).

Las plantas de esta familia se usan comúnmente con fines ornamentales; sin embargo, algunas tienen usos en medicina tradicional y existen reportes científicos de una variedad de actividades biológicas como antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticonvulsivante y anticancerígena. También se han reportado compuestos químicos de algunas especies, destacando por su frecuencia los compuestos fenólicos (Eid y Gonaid, 2018; Hassan y col., 2021).

Bensouici y col. (2016) estudiaron la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto metanólico y fracciones en *Sedum caeruleum*. Se encontró que la fracción butanólica presentó la mayor actividad antioxidante (DPPH IC<sub>50</sub> = 28.35 µg/mL; quelación de iones ferrosos IC<sub>50</sub> = 40.83 µg/L; CUPRAC IC<sub>50</sub> = 23.52 µg/L). Por otro lado, la fracción clorofórmica (concentración = 128 µg/mL) inhibió el crecimiento en cepas bacterianas ATCC (CIM = 80 µg/mL) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300) y aislados clínicos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus enterococcus*). Por su parte, Kosakowska y col. (2018) estudiaron la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos acuosos y etanólicos de raíces de *Rhodiola rosea*, reportando la actividad antioxidante del extracto etanólico a una concentración de 50 mg/mL (DPPH, 240.50 µmol ET/g; ABTS, 45.80 µmol ET/g; FRAP, 1198.20 Fe<sup>2+</sup> µmol/g y 574.50 µmol ET/g). Esta actividad fue atribuida a compuestos fenólicos (e.g., ácidos clorogénicos, hidroxicinámico y gálico; rodionidina, rodiolgina, rodalidina, rodionina y rodalina; derivados de kaempferol y tricina), proantocianidinas y aceites esenciales (e.g., *n*-decanol, geraniol, rosiridol, rosiridín, 1,4-mentadien-7-ol, acetato de geranilo, alcohol bencílico y alcohol feniletílico). Los autores también evaluaron la actividad antibacteriana por el método de microdilución en caldo contra ocho cepas Gram positivas y 11 cepas Gram negativas, encontrando que el extracto etanólico presentó actividad bacteriostática y bactericida contra todas las bacterias de prueba en un rango de 1 a 64 mg/mL, siendo las bacterias más susceptibles *S. aureus* ATCC 25923 (CMI = 1 mg/mL, CMB = 4 mg/mL) y *K. pneumoniae* ATCC 13883 (CMI = 1 mg/mL, CMB = 1 mg/mL).

Recientemente, Osman y col. (2022) reportaron la actividad antioxidante, antidiabética y antibiopelícula de los extractos de flores de *Kalanchoe laxiflora*. Los análisis realizados por los métodos de Folin-Ciocalteu y tricloruro de aluminio mostraron que la fracción butanólica presentó el mayor contenido de fenoles totales ( $397.25 \pm 1.18$  mg EAG /g extracto) y flavonoides ( $99.71 \pm 0.24$  mg ER/g extracto). Asimismo, esta fracción presentó la mayor actividad antioxidante (DPPH,  $IC_{50} = 18.7$   $\mu$ g/mL; RPA (“Reducing Power Assay”), 78.26 mg AAE/g; TAC (“Total Antioxidant Capacity”), 446.37 mg AAE/g), exhibiendo también actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa ( $IC_{50} = 54.72 \pm 0.96$   $\mu$ g/mL) y  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50} = 89.02 \pm 0.99$   $\mu$ g /mL). Por otro lado, el extracto metanólico al 85% mostró una buena actividad antibiopelícula contra *Escherichia coli* ( $CMIB_{100} = 15.63$   $\mu$ g/mL). En el análisis de los extractos de *K. laxiflora* se identificaron 35 compuestos mayoritarios los cuales se agruparon en glucósidos de flavonoides, galotaninos, alcaloides y ácidos grasos. En este sentido, Alfeqy y col. (2023) analizaron la actividad antioxidante y antidiabética de *Aeonium arboreum* y registraron una gran actividad antioxidante en la fracción metanólica al 50% (DPPH, 984.71  $\mu$ M AAE/mg; ORAC, 46.781  $\mu$ M ET/mg) y en la fracción metanólica al 100% (ABTS, 1126.82  $\mu$ M AAE/mg; FRAP, 669.08  $\mu$ M ET/mg; quelación de iones ferrosos, 331.12  $\mu$ M EDTAE/mg). Además, las fracciones en MeOH inhibieron la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50} = 44.26 - 48.24$   $\mu$ g/mL), siendo más potentes que la acarbosa ( $IC_{50} = 161.40$   $\mu$ M). Adicionalmente se aislaron compuestos como el  $\beta$ -sitosterol, glucósidos de  $\beta$ -sitosterol y glucósidos de quercetina, kaempferol y miricetina.

En otros estudios, Martínez Ruiz y col. (2013) analizaron el potencial antibacteriano, antifúngico y antiparasitario de extractos y fracciones de *Echeveria*

*leucotricha*. Se encontró que el extracto metanólico y sus fracciones inhibieron el crecimiento de la mayoría de las cepas bacterianas evaluadas. Además, se observó una buena actividad antifúngica por parte de las fracciones clorofórmica y metanólica, afectando el crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Trichophyton rubrum*. Con respecto a la actividad antiparasitaria, los extractos clorofórmico y metanólico redujeron significativamente el número de parásitos de *Leishmania donovani* en un del 64% y 52%, respectivamente. Mientras que de Oliveira y col. (2017) demostraron el potencial inmunomodulador y antiinflamatorio de infusiones de *S. dendroideum* ricas en polisacáridos pécticos (RSBAL-H<sub>2</sub>O y RSBAL-0.5), los cuales influyeron en la secreción de citocinas pro (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y antiinflamatorias (IL-10) por parte de macrófagos (THP-1).

En nuestro grupo de trabajo en el laboratorio de Química de Productos Naturales y la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, se ha trabajado con la caracterización química y actividad biológica de plantas del género *Echeveria* (Crassulaceae). López-Angulo y col. (2019) trabajaron con extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* (*E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida*) de Sinaloa. El análisis fitoquímico mostró la presencia de taninos, terpenos, flavonoides, saponinas y cumarinas; así como la ausencia de alcaloides y cardiotónicos. Los extractos mostraron actividad antioxidante similar a la de algunos frutos reconocidos por su capacidad antioxidante (e.g., *Fragaria x. ananassa*, *Rubus idaeus*, *Vitis vitis-idea*, *V. corymbosum*). La actividad más alta la presentaron los EM de *E. craigiana* (DDPH = 26.19  $\mu\text{mol ET/g b.f.}$ ; ABTS = 65.91  $\mu\text{mol ET/g b.f.}$  y *E. subrigida* (ORAC = 37.58  $\mu\text{mol ET/g b.f.}$ ;  $\beta$ -CBM = 79.3%), mientras

que *E. kimnachii* presentó una actividad similar a *E. subrigida* por el método  $\beta$ -CBM (76.7%). También se encontró que los tres extractos presentaron actividad antibacteriana (CMI  $\leq$  1000  $\mu\text{g/mL}$ ), con mayor actividad contra cepas Gram positivas como *S. aureus* (*E. subrigida*, CMI = 15.63  $\mu\text{g/mL}$ ; *E. kimnachii*, CMI = 31.25  $\mu\text{g/mL}$ ; *E. craigiana*, CMI = 125  $\mu\text{g/mL}$ ). Adicionalmente, el EM de *E. subrigida* presentó sinergismo contra cepas de *S. aureus* (multirresistente y ATCC 29213) en combinación con antibióticos como carbenicilina (FICI = 0.28) y meticilina (FICI = 0.5) (Ahumada-Santos y col., 2016). Por otra parte, extractos etanólicos de las tres especies presentaron actividad adaptogénica (anoxia, nado frío, nado forzado) e inmunomoduladora *in vitro* sobre la proliferación de esplenocitos de ratón y antioxidante *in vivo* sobre *Saccharomyces cerevisiae* (López-Angulo y col., 2022). En cuanto a la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, los valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) fueron 25.21 (*E. subrigida*), 56.67 (*E. craigiana*) y 50.57 (*E. kimnachii*), mostrando que la actividad inhibitoria de los tres EMs de *Echeveria* fue de 63 a 143 veces superior a la del hipoglucemiante comercial acarbossa ( $\text{IC}_{50}$  = 3.59 mg/mL), lo que puede suponer su uso potencial para tratar la DM2 (López-Angulo y col., 2022).

Estudios posteriores evaluaron la actividad antioxidante, antimutagénica, antibacteriana e inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de los EMs de 17 especies de *Echeveria* de México (*E. Acutifolia*, *E. agavoides*, *E. amoena*, *E. colorata*, *E. derenbergii*, *E. diffractens*, *E. elegans*, *E. gibbiflora*, *E. gigantea*, *E. longissima*, *E. penduliflora*, *E. procera*, *E. pulvinata*, *E. racemosa*, *E. secunda*, *E. shaviana*, *E. tencho*). En la actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y ORAC, el EM de *E. secunda* mostró la mayor actividad por ABTS (4126.5  $\mu\text{mol ET/g EM}$ ) y DPPH (3607.6  $\mu\text{mol ET/g EM}$ ),



mientras que *E. gigantea* fue la más activa por el método de ORAC (1069.3  $\mu\text{mol ET/g EM}$ ). Por otro lado, en la evaluación de la actividad antimutagénica, los EMs de 16 de las 17 especies fueron antimutágenos fuertes, presentando valores de inhibición de la mutagenicidad desde 72.20 a 87.69% y el EM de *E. acutifolia* fue el más activo. Además, los EMs de *Echeveria* fueron hasta 230 veces más activos que la acarbosa en el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, donde destacó *E. secunda* como la especie más activa ( $\text{IC}_{50} = 16.9 \mu\text{g/mL}$ ). Respecto a la actividad antibacteriana, 16 EMs de estas especies presentaron actividad al menos contra seis de las diez cepas evaluadas con MICs entre 62.5 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ , siendo *E. secunda* activa contra todas las cepas. En general, las especies de *Echeveria* fueron más activas contra bacterias Gram positivas, destacando *E. agavoides* y *E. amoena* con MICs de 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Dicha actividad podría ser atribuida a la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, taninos y cumarinas (Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021).

Ante estas evidencias, la familia Crassulaceae supone una fuente de recursos para estudios fitoquímicos y biológicos, con el fin de encontrar nuevas aplicaciones biomédicas de sus especies.

## **4.5. Antecedentes**

### **4.5.1. Género *Graptopetalum***

*Graptopetalum* Rose es un género de plantas suculentas de la familia Crassulaceae (**Cuadro 3**). El nombre del género se origina de las palabras “*graptos*” que significa marca o grabado y “*petalum*” que significa pétalo, en referencia a las marcas en la flor de muchas especies. Es un género relativamente pequeño, incluye

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

---

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	Tracheophyla
Subfilo	<i>Angiospermae</i>
Clase	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae
Subfamilia	<i>Sempervivoideae</i>
Tribu	<i>Sedeae</i>
Género	<i>Graptopetalum</i>

---

Adaptado de Naturalista, 2021.

aproximadamente 20 especies y se distribuye desde el sur de Arizona (EUA) hasta Oaxaca (México) en ambientes semiáridos, enclaves rocosos, zonas montañosas. Considerando la morfología de la familia Graptopetalum, son plantas rosetoides semejantes a las del género *Echeveria*, pero poseen inflorescencias y flores similares a las plantas del género *Sedum*. Por otra parte, difieren de las plantas del género *Sedum* por poseer pétalos unidos con marcas o puntos, aspecto que se considera característico de *Graptopetalum*. (Vega-Aviña y col., 2020).

#### 4.5.1.1. Actividad biológica del género

Prácticamente todos los estudios de actividad biológica se han enfocado a *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. Lee y col. (2013) demostraron el efecto protector del extracto etanólico (95%) de *G. paraguayense* contra el daño pancreático inducido por carboximetil-lisina en ratones C57BL/6, encontrando que compuestos presentes en el extracto (resveratrol y ácido gálico) aumentan la síntesis de insulina mediante la activación del factor proliferador de peroxisomas pancreáticos (PPAR $\gamma$ ) y la homeobox-1 pancreático-duodenal (PDX-1) y la supresión de la expresión de la proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP $\beta$ ), el cual es un regulador negativo de la producción de insulina.

Además, el extracto etanólico de *G. paraguayense* activó el factor 2, mejoró la sensibilidad a la insulina en hígado y músculo y disminuyó los niveles de glucosa en sangre de los ratones. Posteriormente, Hsu y col. (2015) demostraron que el extracto metanólico de *G. paraguayense* reguló los niveles de expresión de varias oncoproteínas (e.g., AURKA, AURKB y FLJ10540) en células de hepatocarcinoma de ratones HCC, reportando que una de sus fracciones (HH-F3) inducía la apoptosis al

promover la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, los autores demostraron que HH-F3 combinado con sorafenib inhibe sinérgicamente la proliferación de células Huh7, además se encontró que la estructura del principal compuesto activo en HH-F3 era similar a la de los compuestos de proantocianidina derivados de *Rhodiola rosea*.

Por su parte, Chao y col. (2019) reportaron la actividad hepatoprotectora y antioxidante de un extracto etanólico al 50% de *G. paraguayense* en un modelo de daño hepático co-inducido por etanol y tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en ratas Sprague-Dawley. El extracto incrementó la actividad de algunos sistemas antioxidantes contra la peroxidación de lípidos y aumentó los niveles de glutatión, vitaminas C y E, el estado antioxidante total (TAS) y las actividades de algunas enzimas (e.g., superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión S-transferasas). Además, los autores asociaron la actividad a ácido gálico, genisteína, daidzeína y quercetina, proponiendo a la especie como una terapia alternativa o complementaria sobre el daño hepático inducido por alcohol. Asimismo, Zaharieva y col. (2019) registraron que el extracto hidroalcohólico de *G. paraguayense* presentó actividad inhibitoria selectiva sobre bacterias Gram positivas, siendo *S. aureus* la más sensible (CIM = 2.5 mg/mL). El extracto también evitó la formación de biopelícula MRSA hasta en un 50% a una concentración de 1.6 mg/mL y hasta en un 90% a una concentración de 2.5 mg/mL, relacionando la actividad a compuestos fenólicos como el ácido gálico.

#### **4.5.2. Especies de *Graptopetalum* nativas de Sinaloa**

##### *4.5.2.1. Graptopetalum sinaloensis*

*Graptopetalum sinaloensis* es endémica del estado de Sinaloa, México. Ésta crece en paredes o taludes ígneos de arroyos, pie de cerros y pequeñas cañadas sombreadas, formando colonias densas o aisladas, en poblaciones pequeñas, creciendo a nivel del suelo o en la mayoría de los casos a uno o más metros de altura. Se describe como una planta herbácea rizomatosa, perenne, cespitosa de hasta 20 plantas por colonia, con rosetas acaules, de 2 a 10 cm de diámetro: posee de 10 a 40 hojas por planta, de color verde azul, glaucas verde rosa o púrpura de 1 a 5 cm de largo y de 5 a 20 mm de ancho en su parte más amplia, oblanceoladas a espatuladas, y ápice con mucrón, de 1 a 2 mm de largo. Presenta inflorescencia en panícula, de 1 a 3 por planta, de 2 a 26 flores agrupadas de 2 a 6 ramificaciones con 2-4(5) flores cada, escapos florales de 4 a 22 cm de alto y de 1.5 a 2 mm de grosor y sépalos suculentos, de color verde a purpúreos de 2 a 6 mm de largo, presentándose los más grandes en las flores superiores. Esta planta fue descubierta por nuestro grupo de investigación (Vega-Aviña y col., 2020).

##### *4.5.2.2. Graptopetalum rusbyi*

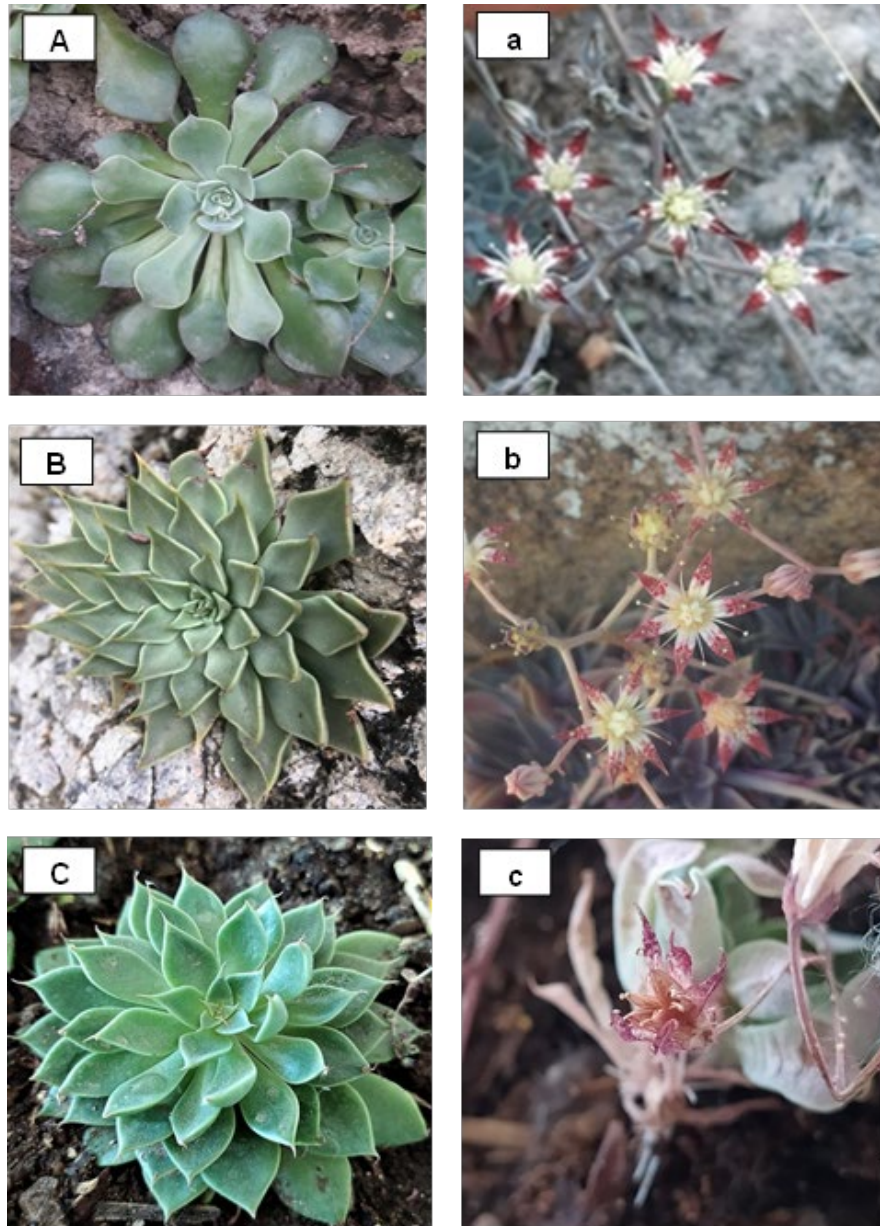
*Graptopetalum rusbyi* es una suculenta pequeña que se distribuye comúnmente en grietas rocosas, especialmente en laderas y acantilados sombreados, en elevaciones de hasta 5,250 pies (1,600 m) al centro y al sur de Arizona (EUA), Sonora, Oeste de Chihuahua y Sinaloa. Se describen con varias rosetas sin tallo o de tallo corto, hojas de color verde pálido o rojizo a violeta. Las rosetas pueden crecer hasta 10 cm de diámetro y las hojas medir hasta 5 cm de largo y 1, 5 cm de ancho. Presenta

flores de color blanco amarillento con bandas cruzadas con puntos de color rojo oscuro y amarillo hacia el centro de los pétalos. Aparecen en espigas de flores de hasta 15 cm de altura (World of Succulents, 2013-2022).

#### 4.5.2.3. *Graptopetalum occidentale*

*Graptopetalum occidentale* es una planta suculenta de la familia de los cultivos de piedra originaria del estado de Sinaloa. Esta planta se encuentra en el municipio de Culiacán, comúnmente en un área limitada cerca de la sierra de Tacuichamona, en un hábitat de bosque subcaducifolio tropical. Crece en habito cespitoso y se describe con tallos cortos y rosetas de aproximadamente 4, 5 cm de ancho. Presenta hojas oblanceoladas y obtusas, mucronadas, glabras y de color verde azulado a verde. Sus sépalos son ascendentes, adprimidos, ovados y de color verde oliva con una corola tubular campanulada de 6 a 7 mm de largo y 4 mm de ancho en su base. Los pétalos son ascendentes, imbricados y oblanceolados, que presentan de tres a cinco venas rojizas tenues (CONABIO, 2021).

A la fecha no existe información sobre la composición química y/o actividades biológicas de las especies de *Graptopetalum* de Sinaloa. Sin embargo, considerando lo reportado para *G. paraguayense* y para otros géneros de crasuláceas, estas especies podrían ser fuente potencial de compuestos biológicamente activos.



**Figura 1. Especies de *Graptopetalum* de Sinaloa.** Espécimen (A) y flor (a) de *Graptopetalum sinaloensis*, Tomada de Naturalista, 2021 (ID 965178) por Gerardo Machado y J. Fernando Pio León. Espécimen (B) y flor (b) de *Graptopetalum rusbyi*, Tomada de Naturalista 2019 (ID 163362) por California\_naturalist y Carlos Lim. Espécimen (C) y flor (c) de *Graptopetalum occidentale*.

## V. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas e infecciosas son importantes problemas de salud pública. Algunas de estas enfermedades presentan alta morbilidad y mortalidad. De manera general, los tratamientos se vuelven cada vez menos eficientes, más costosos y muchos tienen asociados efectos adversos. Con base en lo anterior, es fundamental encontrar alternativas terapéuticas más eficaces y que representen menor riesgo en su uso. Al respecto, los productos naturales representan una fuente importante de compuestos bioactivos con potencial terapéutico. México es un país con una gran diversidad de especies naturales, muchas de ellas con potencial biológico. La familia Crassulaceae es una de las más representativas del país por su diversidad y endemismo, algunas de sus especies han sido usadas en medicina tradicional y presentan actividades biológicas que han llevado a su comercialización. Sin embargo, la mayoría de las especies permanecen sin haberse estudiado y su crecimiento en ambientes extremos las pone en riesgo. Por lo tanto, la conservación sustentable de estas plantas requiere de profundizar en lo conocimiento de su composición química y actividades biológicas. En este contexto, este proyecto tiene como objetivo investigar el potencial antioxidante, antibacteriano, antiparasitario contra *Giardia duodenalis*, inmunomodulador e inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, así como el análisis e identificación de componentes fitoquímicos empleando métodos colorimétricos y cromatográficos de tres especies de *Graptopetalum* (*G. sinaloensis*, *G. rusbyi*, *G. occidentale*) nativas de Sinaloa.



## VI. HIPÓTESIS

Tres especies de *Graptopetalum* nativas de Sinaloa (*G. sinaloensis*, *G. rusbyi*, *G. occidentale*) poseen componentes fitoquímicos con actividad antioxidante, antibacteriana, antiparasitaria contra *Giardia duodenalis*, inmunomoduladora e inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*.

## VII.OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

Analizar la composición química y actividades biológicas de tres especies de *Graptopetalum* (*G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale*) nativas de Sinaloa.

### 7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Establecer la composición fitoquímica y el contenido de metabolitos totales (fenólicos, flavonoides, taninos) de los extractos metanólicos de tres especies de *Graptopetalum* (*G. sinaloensis*, *G. occidentale* y *G. rusbyi*).

7.2.2. Determinar el perfil de compuestos lipofílicos (GC-MS) y compuestos fenólicos (HPLC-ESI/MS/MS) de tres especies de *Graptopetalum*.

7.2.3. Analizar las actividades biológicas (antioxidante, antibacteriana, antiparasitaria contra *G. duodenalis*, inmunomoduladora e inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa) de extractos metanólicos de tres especies de *Graptopetalum*.

7.2.4. Evaluar la toxicidad *in vitro* en *Artemia salina* y la toxicidad aguda en modelo murino de extractos metanólicos de tres especies de *Graptopetalum*.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Materiales

#### 8.1.1. Material vegetal

Las tres especies de *Graptopetalum* fueron cultivadas e identificadas por el Dr. Rito Vega Aviña, Profesor Investigador de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Plantas completas fueron recolectadas y manualmente se obtuvieron sus hojas (Figura 2).

#### 8.1.2. Material biológico

##### 8.1.2.1. Microorganismos

En la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron cepas de bacterias patógenas humanas obtenidas del “American Type Culture Collection” (ATCC) (*Staphylococcus aureus* 29213, *Enterococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Escherichia coli* 25922) y aisladas de pacientes (*Streptococcus* grupo A-4, *Staphylococcus aureus* 3, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*). Los aislados de pacientes fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud, México, D.F.

La cepa de *Giardia duodenalis* WB se obtuvo del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

El ensayo de toxicidad *in vitro* se realizó con larvas de *Artemia salina* cultivadas a partir de quistes (Brine shrimp eggs, BIO-MARINE INC, EE. UU.).



**Figura 2. Hojas de especies de *Graptopetalum*. *Graptopetalum sinaloensis* (A) *Graptopetalum rusbyi* (B) y *Graptopetalum occidentale* (C).**

### 8.1.2.2. Animales de laboratorio

Para el ensayo de toxicidad *in vivo* se utilizaron ratones BALB/c hembras (Bioinvert, SA de CV, México). Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la FCQB a  $24 \pm 2$  °C, 50% de humedad relativa y ciclos de 12 h de luz/oscuridad, con acceso a agua y alimento a libre demanda. La investigación se realizó de conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

### 8.1.3. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en la investigación fueron de grado analítico. Se emplearon los siguientes medios de cultivo: Agar de Tripticaseína y Soya (TSA), Caldo Mueller Hinton, Agar McConkey, Agar Manitol salado (Becton Dickinson de México), peptona tripticasa (BD Bioxon) y medio TYI-S-33. Los siguientes reactivos 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), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico), 2,2'-azo-*bis*(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona (quercetina), catequina, carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), vainillina, ácido clorhídrico, reactivo de Folin-Ciocalteu, 3',6'-dihidroxispiro[isobenzofuran-1[3H]-9'-[9H]-xanten]-3-ona) (fluoresceína), Tween 80, suero fetal bovino (SFB), azul de tripano,  $\alpha$ -colestano, butilhidroxitolueno (BHT), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Los solventes orgánicos grado HPLC se obtuvieron de Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, EE. UU.).

## **8.2. Metodología**

### **8.2.1. Elaboración de la harina de hojas de *Graptopetalum***

Las hojas frescas de las tres especies de *Graptopetalum* (*G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale*) fueron colectadas, cortadas, congeladas ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y liofilizadas (VirTis 25EL, VirTis Co. EE. UU.). Las muestras secas se molieron y se tamizaron a través de una malla (no. 40) para obtener una haría fina por cada especie. Las harinas obtenidas se almacenaron en bolsas de plástico, manteniéndose a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  protegidas de la luz hasta su uso.

### **8.2.2. Obtención de los extractos metanólicos de *Graptopetalum***

Los EMs de *Graptopetalum* se obtuvieron por maceración. La harina de las hojas previamente liofilizadas de cada especie se maceró con metanol (MeOH) (1:30 p/v) durante tres días ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}/160\text{ rpm}$ ); el solvente se cambió cada 24 h y los filtrados se mezclaron y almacenaron para ser concentrados posteriormente. El MeOH se eliminó bajo presión reducida a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un evaporador rotativo (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) y finalmente fueron liofilizados para eliminar el resto de humedad. Los extractos secos de cada especie se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad hasta su uso.

### **8.2.3. Caracterización fitoquímica**

#### *8.2.3.1. Análisis fitoquímico cualitativo*

La composición fitoquímica cualitativa de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* se determinó mediante pruebas en tubo basadas en cambios físicos y precipitación (**Cuadro 4**) y se confirmó mediante cromatografía en capa fina (TLC). Las pruebas utilizadas fueron las siguientes: reacción de Salkowski para terpenos y

**Cuadro 4.** Técnicas colorimétricas y de precipitación para la identificación de metabolitos secundarios.

Metabolito secundario	Reacción en tubo		
	Reactivo		Observación
Alcaloides	Wagner, Dragendorff	Mayer y	Leve turbidez o precipitado (rojo a naranja, blanco a crema y marrón)
Antracénicos libres	Bornträger y acetato de magnesio al 0.5%		Coloración rojiza
Azúcares reductores	Solución de Fehling		Coloración naranja-rojiza
Cardiotónicos	Keller-Kiliani		Formación de un anillo. Coloración marrón, violeta y verde
Cumarinas	Hidróxido de sodio 1 N		Prueba de fluorescencia (papel filtro): Fluorescencia amarilla (UV-365 nm)
Flavonoides	Prueba de Shinoda: fragmento de magnesio y ácido clorhídrico (2 N)		Cambios de coloración a naranja, rojo, azul, violeta o rosa
Saponinas	Prueba de espuma: agua		Formación y altura de espuma
Taninos	Cloruro férrico, gelatina y sal		Coloración azul para taninos hidrolizables y color verde para taninos condensados
Terpenos/Esteroles	Lieberman-Burchard Salkowski	y	Coloración rojiza-rosado en triterpenos y amarillo para esteroides

Harbone (1984).

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 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 (Harborne, 1984).

### *8.2.3.2. Cuantificación de metabolitos totales*

#### *8.2.3.2.1. Fenólicos totales*

El contenido de fenólicos totales (FT) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con lo reportado por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. La determinación se realizó en microplaca de 96 pozos de fondo plano. Diez microlitros del EM (2 mg/mL), estándar (ácido gálico) o agua destilada (control negativo) se mezclarán con 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:10 v/v). La microplaca se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 2 min (40 °C/ oscuridad), posteriormente se adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 10%. La mezcla se incubó a 40 °C durante 30 min en oscuridad y posteriormente se midió la 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 (0–400  $\mu\text{g/mL}$ ) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto metanólico (mg EAG/g EM).



#### 8.2.3.2.2. *Flavonoides totales*

El contenido de flavonoides totales (FVT) se cuantificó por la formación del complejo flavonoide- $\text{AlCl}_3$  en MeOH (Quettier-Deleu y col., 2000). Los extractos de *Graptopetalum* se disolvieron en MeOH (20 mg/mL), una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  se mezcló con 900  $\mu\text{L}$  de MeOH. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de EM o estándar (quercetina) con 150  $\mu\text{L}$  de una solución al 2% de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en MeOH. La placa se incubó durante 10 min (27 °C/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 miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto metanólico (mg EQ/g EM).

#### 8.2.3.2.3. *Taninos totales*

El contenido de taninos totales (TT) se determinó usando el método de vainillina/HCl (Price y col., 1978; Palacios y col., 2021). El reactivo se preparó mezclando partes iguales (v/v) de vainillina al 1% en MeOH y HCl al 8% en MeOH. Los extractos de *Graptopetalum* se disolvieron en MeOH (20 mg/mL), de esta solución stock se hicieron diluciones para obtener concentraciones seriadas de 0.3125 a 5 mg/mL. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de EM o del estándar con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de vainillina/HCl, como corrector de color; los 50  $\mu\text{L}$  de muestra se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de HCl al 4% en MeOH. La microplaca se incubó a 30 °C durante 20 min. Finalmente, se leyeron las absorbancias a 500 nm en un lector de microplaca (Synergy HTX, Biotek, EE. UU.). La cuantificación se llevó a

cabo mediante una curva de calibración de catequina en MeOH (0-2000 µg/mL) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto metanólico (mg EC/g EM).

### **8.3. Identificación de componentes individuales en *Graptopetalum***

#### **8.3.1. Perfil de compuestos lipofílicos**

El perfil de compuestos lipofílicos se determinó siguiendo la metodología descrita por Conforti y col. (2008). Los EMs de *Graptopetalum* (50-150 mg) se disolvieron en 5 mL de una solución de MeOH: H<sub>2</sub>O (9:1 v/v) y se mezclaron con 20 µL de una solución del estándar interno  $\alpha$ -colestano (3 mg/mL) y 15 µL de una solución de BHT (1 mg/mL) como antioxidante. La mezcla se homogenizó y particionó con hexano (5 mL/3 veces). Las fases hexánicas se juntaron y evaporaron. El residuo se redisolvió en 1 mL de hexano y se pasó a través de un filtro PVDF (17 mm  $\times$  0.45 µL, TINTAN); el filtrado se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (HP 6890 GC Instruments, 5973 Network, Agilent Technologies, EE. UU.). La separación se realizó en una columna capilar QUADREX 007 CABOWAX 20 (30 m  $\times$  0.25 mm i. d., espesor de película 0.25 µm) usando helio como gas de arrastre a un flujo de 0.9 mL/min. Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: inyector a 250 °C; temperatura inicial del horno 60 °C por 1 min, gradiente de 5 °C/min hasta 200 °C, gradiente de 10 °C/min hasta 275 °C y 275 °C por el resto del análisis; temperatura de la fuente de iones a 245 °C. Al cromatógrafo se inyectaron 5 µL de muestra sin división de flujo. El espectrómetro de masas (EM) operó en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV. Los espectros fueron colectados en un intervalo de 50 a 800 u a 2 barridos/s. Los componentes en los extractos se identificaron por comparación

de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST (NIST08 LIB) y se cuantificaron por el método de factor de respuesta usando la siguiente ecuación.

$$Cs = \frac{(As \times Cei)}{Aei}$$

Donde Cs es la concentración del esteroide, As es el área del esteroide, Cei es la concentración del estándar interno y Aei es el área del estándar interno.

### **8.3.2. Perfil de compuestos fenólicos**

Los EMS se disolvieron en 5 mL de H<sub>2</sub>O: MeOH (9:1 v/v) y se particionaron con acetato de etilo (5 mL/3 veces). La fase en acetato de etilo se recuperó, el solvente se eliminó, el residuo se disolvió en MeOH y se filtró a través de una membrana PVDF (17 mm × 0.45 µm, TITAN) previo a su análisis por HPLC.

La identificación de los fenólicos se realizó en un HPLC 1100 (Agilent Technologies, EE. UU.) con detector de arreglo de diodos. La separación se llevó a cabo en una columna ACE EXCEL C18-Amide (150 × 30 mm × 3 µm). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico al 1% (A) y acetonitrilo (B): inició con 0.5% de B, incremento lineal a 30% de B a los 10 min, 30% de B durante 10 min e incremento lineal hasta 60% de B a los 30 min. El tiempo total de la corrida fue de 35 min. El flujo fue de 0.4 mL/min y el volumen de inyección de 15 µL. La detección se realizó a 250, 320 y 355 nm. Para la identificación de los componentes, una alícuota de 5 µL fue inyectada en un equipo 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 cromatográfica se realizó utilizando las condiciones descritas anteriormente y los

pesos moleculares de cada pico se analizaron en el espectrómetro de masas con una interfase 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, así como los datos generados a partir de los estándares comerciales disponibles (e.g., ácido gálico, quercetina, isoramnetina y kaempferol).

### **8.3.3. Métodos de evaluación de la actividad biológica *in vitro***

#### **8.3.3.1. Actividad antioxidante**

La capacidad antioxidante de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* se determinó por los métodos colorimétricos DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y ABTS (ácido 2,2'-azino-*bis*[3-etilbenzotiazolin]-6-sulfónico); así como por el método fluorométrico ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno). Estos métodos son utilizados para medir la inactivación de radicales libres por transferencia de hidrógenos o electrones en el caso de los métodos DPPH y ABTS y de hidrógenos por ORAC. DPPH, ABTS y ORAC presentan diferencias para medir antioxidantes de diferente polaridad. Los métodos DPPH y ORAC (en la versión aplicada) miden principalmente la actividad de compuestos hidrofílicos; mientras que en ABTS se miden la actividad de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos.

##### **8.3.3.1.1. Método DPPH**

El método DPPH determina la capacidad de una sustancia de donar electrones o átomos de hidrógeno y se mide como la pérdida de color púrpura de la solución del radical DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidracilo) (Brand-Williams y col., 1995). La evaluación se realizó en microplaca de 96 pozos de fondo plano. Los EMs de *Graptopetalum* se

disolvieron en MeOH (50-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); en cada pocillo se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  del EM o de una solución de Trolox (0-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con 180  $\mu\text{L}$  de DPPH (150 mM). La mezcla se homogenizó y se dejó en reposo por 30 min a 27 °C en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 530 nm. Como blanco se utilizó MeOH y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto metanólico ( $\mu\text{mol ET}/\text{g EM}$ ).

#### 8.3.3.1.2. Método ABTS

En el método de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolin]-6-sulfónico), el reactivo es oxidado a su correspondiente radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  que presenta un color azul-verde intenso. Las sustancias antioxidantes transfieren electrones o átomos de hidrógeno al radical provocando su decoloración, permitiendo monitorear la pérdida de absorbancia dependiente del tiempo de reacción (Re y col., 1999). El radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  se preparó mezclando 5 mL del reactivo ABTS (7 mM) y 88  $\mu\text{L}$  de una solución de persulfato de potasio (140 mM), la mezcla se dejó reaccionar por 12 – 16 h a 25 °C en la oscuridad. El radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  se diluyó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (7 mM, pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de  $1.400 \pm 0.020$  a 734 nm. La evaluación se realizó en microplaca de 96 pozos de fondo plano. Los EMs de *Graptopetalum* se disolvieron en MeOH (50-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y en cada pocillo se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  del EM o de una solución de Trolox y 180  $\mu\text{L}$  del radical ABTS (7 mM); la mezcla se dejó reposar durante 10 min a 37 °C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. Para la cuantificación se preparó una curva patrón de Trolox (0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), evaluando la actividad antioxidante como se describió para la muestra. Como blanco

se utilizó MeOH y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto metanólico ( $\mu\text{mol ET/g EM}$ ).

#### 8.3.3.1.3. Método ORAC

El ensayo de ORAC mide la capacidad de un antioxidante de inhibir, mediante un mecanismo de transferencia de hidrógenos, la oxidación de la fluoresceína inducida por los radicales peroxilo generados por APPH (2,2'-azobis[2-metilpropionamidina] dihidrocloruro). A diferencia de los métodos antes descritos, el método ORAC presenta relevancia biológica, puesto que posee la ventaja de evaluar la inactivación de radicales libres que se presentan en organismos vivos (Prior y col., 2005). Los EMs de *Graptopetalum* se disolvieron en MeOH (10 mg/mL) y se diluyeron (1:500 v/v) con PBS (75 mM, pH 7.4). En microplacas oscuras de 96 pozos con fondo plano se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de la muestra, 25  $\mu\text{L}$  de PBS (blanco) o 25  $\mu\text{L}$  de Trolox (25 - 125  $\mu\text{M}$ ) (curva estándar). La placa llena se colocó en el equipo de lectura de fluorescencia (Synergy 2 SL, BioTek Instruments, EE. UU.) que añadió automáticamente, a cada pozo, 200  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (0.96  $\mu\text{M}$ ) y 75  $\mu\text{L}$  de AAPH (95.8 mM). La intensidad de fluorescencia (485 nm (ex)/525 nm (em)) se midió por un periodo de 75 min (37 °C) en intervalos de 1 min (Huang y col., 2002). La capacidad antioxidante se obtuvo calculando la diferencia entre la disminución en la intensidad de fluorescencia de la muestra y del control Trolox, comparando las áreas bajo la curva generada por el equipo. Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto metanólico ( $\mu\text{mol ET/g EM}$ ).

### 8.3.3.2. Actividad inhibitoria de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

El ensayo de actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $I\alpha G$ ) se realizó de acuerdo con lo reportado por da Silva Pinto y col. (2008) con algunas modificaciones. En una microplaca de 96 pozos se mezclaron 50  $\mu$ L de los EMs de *Graptopetalum* (12.5-400  $\mu$ g/mL) con 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -glucosidasa (0.5 U/mL) (de *Saccharomyces cerevisiae*) en PBS (0.1 M, pH 6.9). La placa se incubó por 10 min a 37 °C (Stat Fax-2200, AWARENESS TECHNOLOGY, EE. UU.). Después de la incubación, 50  $\mu$ L de una solución de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (5 mM) en PBS se adicionaron en cada pozo. La placa se incubó nuevamente por 10 min a 37 °C. Después de la incubación se registró la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplaca (Labsystems Multiskan RC, Fisher Scientific, Finlandia). Una solución sin la muestra se utilizó como control, mientras que una solución sin el sustrato se utilizó como blanco. Como estándar de referencia se utilizó el fármaco comercial acarbosa (0.312-5 mg/mL). El experimento se realizó por triplicado y el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%I\alpha G = \left( \frac{(AbsC - AbsM)}{AbsC} \right) 100$$

Donde **AbsC** es la Absorbancia del Control, y **AbsM** la Absorbancia de la Muestra.

### 8.3.3.3. Actividad inmunomoduladora

La actividad inmunomoduladora se evaluó de acuerdo con la metodología establecida por Lin y Tang (2007) con algunas modificaciones. Los ratones BALB/c se sacrificaron por dislocación, se sanitizaron en una disolución de benzal al 10% (v/v) y

el bazo se les extrajo en condiciones asépticas. 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 200 g por 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 200 g por 5 min y en la pastilla se recuperaron los esplenocitos. Estas células se suspendieron en medio RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10% v/v y una mezcla de antibiótico y antimicótico al 1% v/v (Sigma). La suspensión se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL, se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión y se depositaron en placas de ELISA de 96 pocillos fondo plano. Las placas se incubaron con 50  $\mu$ L de los agentes mitogénicos (5  $\mu$ g/mL Con A o 10  $\mu$ g/mL de LPS) o 50  $\mu$ L de los EMs de *Graptopetalum* (25, 50 y 100  $\mu$ g/mL de extracto). Las soluciones de los mitógenos y extractos se hicieron en medio RPMI-1640. 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 estimularon la proliferación de linfocitos T (Con A) o de linfocitos B (LPS). La proliferación celular se determinó usando el colorante vital 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeniltetrazolio (MTT), las células viables indujeron la formación de sales de tetrazolio (Fernandez-Botran y Vetvicka, 2000). A cada pozo se añadieron 10  $\mu$ L de una disolución de 5 mg/mL de MTT en PBS. La placa se incubó nuevamente por 4 h a 37 °C. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placas ELISA (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de proliferación celular relativo al control.



#### 8.3.3.4. *Actividad antibacteriana*

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo las directrices descritas por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó como la concentración de extracto que es capaz de inhibir al 100% el crecimiento bacteriano. Para esto, las cepas bacterianas fueron sembradas en medio TSA e incubadas hasta fase logarítmica (37 °C/18-20 h), se preparó una suspensión del inóculo en solución salina (0.85% p/v) y se ajustó su turbidez a 0.5 del estándar de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL;  $T = 62.7 \pm 0.5$ ). En un vial con 9.9 mL de caldo Mueller Hinton se agregaron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana para obtener así el inóculo a emplear ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). El ensayo de actividad antibacteriana se realizó en placas estériles tipo ELISA de 96 pozos, fondo en U con tapa; en las columnas 2A a la 12G se adicionaron 50  $\mu$ L del tratamiento (extracto) y 50  $\mu$ L del inóculo bacteriano; mientras que, a partir de la fila 1A a la 1G se añadieron 50  $\mu$ L de los extractos a evaluar en una serie de diluciones (15.625-1000  $\mu$ g/mL), empleando DMSO al 5% como disolvente. La columna 1 sin inóculo y la fila H sin extracto, se tomaron como controles negativo y positivo (gentamicina) (0.25-16  $\mu$ g/mL), respectivamente. La placa se selló con parafilm y se incubó (37 °C/18-20 h). La CMI se determinó de manera visual basándose en la ausencia de un botón de crecimiento en el fondo del pozo o de turbidez en el medio después de incubar las placas. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se determinó tomando con un asa inóculo de cada pozo donde no se observó crecimiento bacteriano, incluyendo al de la CMI, y fue sembrado en cajas Petri con medio TSA. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C por 18 - 20 h. La concentración mínima de extracto en la que no se observó crecimiento en placa se tomó como el valor de CMB.

#### 8.3.3.5. Actividad antiparasitaria contra *Giardia duodenalis*

Los trofozoítos de *G. duodenalis* se cultivaron en medio TYI-S-33 adicionado con antibiótico (0.5% v/v) y suero fetal bovino inactivado (SFB). El medio para descongelar los parásitos contiene SFB al 15% v/v, mientras que el medio para cultivarlos contiene 10% de SFB. Los componentes utilizados para preparar el medio se disolvieron en agua tridestilada estéril, ajustando el pH a 7 con NaOH 1 N, y posteriormente se esterilizaron por filtración (Keister, 1983).

##### 8.3.3.5.1. Criopreservación de la cepa

La cepa de *G. duodenalis* se preservó en medio TYI-S-33 suplementado con SFB al 20% v/v y DMSO (dimetil sulfóxido) al 10% v/v. Un concentrado de trofozoítos de *G. duodenalis* se preparó a partir de un cultivo de 48 h de incubación; para tal fin, los tubos con el cultivo fueron introducidos en hielo por 40 min para desprender los parásitos de las paredes, se centrifugaron a 2,500 rpm/5 min (BECKMAN, GS-6, EE.UU.), el sobrenadante fue decantado y el concentrado se resuspendió en 1 mL de medio con las características antes descritas. Las muestras se colocaron en crioviales, se congelaron de inmediato con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

##### 8.3.3.5.2. Descongelamiento y recuperación de los trofozoítos de *G. duodenalis*

La cepa de *G. duodenalis* fue descongelada de manera gradual de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta  $37^{\circ}\text{C}$ . La suspensión (1 mL) de trofozoítos de *G. duodenalis* en solución criopreservadora (medio TYI-S-33 suplementado con SFB al 20% v/v y DMSO al 10% v/v) fue transferida del criovial a un tubo de vidrio de 15 mL con tapa de rosca con 9 mL de medio TYI-S-33 suplementado con SFB (15% v/v), la mezcla se agitó

suavemente y fue centrifugada a 2,500 rpm por 5 min (BECKMAN, GS-6, EE. UU.) para eliminar los restos de DMSO presentes. El sobrenadante se decantó, la pastilla se resuspendió en 13 mL de medio TYI-S-33 suplementado con SFB (15% v/v) y la mezcla se incubó por 24 h/37 °C en una incubadora con corriente de CO<sub>2</sub> al 5% (Fischer Scientific EE. UU.). Este procedimiento se repitió cada 24 h durante dos días. Al tercer día, se realizaron subcultivos (dos tubos con 5 mL de cultivo). A cada tubo se le adicionó medio nuevo suplementado con SFB ahora al 10%, hasta un volumen final de 13 mL. Los tubos fueron incubados por 48 h a 37 °C y se prosiguió a la evaluación de actividad antiparasitaria de los EMs. Se requirieron un máximo de ocho tubos con cultivo para cada ensayo.

#### *8.3.3.5.3. Evaluación de la actividad in vitro contra Giardia duodenalis*

La determinación de la viabilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* se realizó usando el colorante azul de tripano al 4%. Se tomaron 100 µL del cultivo perfectamente homogenizado y se mezclaron con 10 µL de colorante; la mezcla se homogenizó y se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer para realizar la observación microscópica y el recuento celular. Los criterios de viabilidad evaluados se basaron en la movilidad, cambios morfológicos y la retención del colorante por los trofozoítos (Montes-Ávila y col., 2009). Después del recuento de células, se preparó una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Una vez preparado el cultivo se procedió a la evaluación de las muestras. El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos fondo plano donde se colocaron 200 µL del cultivo (250,000 giardias/mL, 50,000 giardias/pozo) y 100 µL de EM (31.25-500 µg/mL al 0.5% de DMSO) en medio TYI-S-33. Como control negativo se utilizó

solvente DMSO al 0.5% en medio TYI-S-33 (sin extracto) y en el positivo se añadió metronidazol (5 µg/mL). La microplaca se incubó a 37 °C durante 24 h (5% de CO<sub>2</sub>), se centrifugó (2,500 rpm/5 min) (BECKMAN, GS-6, EE.UU.) y se hicieron dos lavados con PBS 10 mM (pH 7.4) para eliminar los restos de medio TYI-S-33. Los trofozoítos se resuspendieron en 200 µL de PBS, se les adicionaron 20 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubaron nuevamente durante 3 h. Pasado este tiempo, la microplaca se centrifugó (4,000 rpm/5 min), se eliminó el sobrenadante y las sales de formazán formadas por las células vivas se disolvieron añadiendo 200 µL de DMSO y agitando durante 20 min. Finalmente, la absorbancia fue medida a 560 nm (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE.UU.). El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula:

$$\%Inh = \left( \frac{(AbsC - AbsM)}{AbsC} \right) 100$$

Donde **AbsC** es la Absorbancia del control, y **AbsM** la Absorbancia de la muestra.

#### **8.4. Análisis de toxicidad de los extractos metanólicos de *Graptopetalum***

##### **8.4.1. Ensayo de toxicidad *in vitro* contra nauplios de *Artemia salina***

El ensayo de toxicidad de *A. salina* se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento registrado por Meyer y col. (1982) y Solís y col. (1993). Para la determinación de toxicidad de compuestos con actividad biológica se utilizaron larvas (nauplios) de *A. salina*, que son microcrustáceos con alta sensibilidad a sustancias exógenas, por lo cual son considerados como organismos indicadores de toxicidad. Este ensayo es eficaz, sencillo, rápido y confiable (Michael y col., 1956; Vanhaecke y Persoone, 1981).

#### *8.4.1.1. Obtención de las larvas de Artemia salina*

Para obtener las larvas, quistes de *A. salina* se incubaron en medio salino. El medio salino se preparó mezclando, en un vaso de precipitado, 38 g de sal comercial (sales para pecera tropical®) y 1 L de agua desionizada; a la solución se añadieron 300 mg de los quistes y se oxigenó mediante una bomba para pecera; la temperatura se mantuvo en un rango óptimo de 25-30 °C y bajo una fuente de luz. A las 24 h, los nauplios fototrópicos fueron recuperados con ayuda de una pipeta Pasteur y se transfirieron a otro recipiente con medio fresco (solución salina), donde se mantuvieron por otras 24 h para obtener nauplios estadio II.

#### *8.4.1.2. Preparación de los extractos metanólicos para el ensayo de toxicidad*

Los EMs fueron disueltos en Tween 80 al 5% (40 mg/10 mL de solución salina v/v), la concentración máxima a evaluar fue de 2000 ppm de la cual se prepararon diluciones de 1000, 500, 100 y 10 ppm.

#### *8.4.1.3. Evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos*

La evaluación se llevó a cabo en tubos de ensayo de 5 mL y cada concentración fue evaluada por triplicado. En cada tubo y utilizando una pipeta Pasteur de vidrio, 10 nauplios se colocaron en un volumen no mayor a 0.5 mL. A cada tubo con nauplios se le agregó 1 mL de la disolución de los compuestos a evaluar a diferentes concentraciones (2000, 1000, 500, 100 y 10 ppm) y se aforó a un volumen final de 2 mL con solución salina. Se utilizó Tween 80 al 5% v/v como control negativo. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente (25-30 °C) bajo luz continúa durante 24 h. Después de la incubación se realizó el conteo de nauplios muertos en cada tubo, así

como los vivos en los blancos. Los resultados se reportaron como porcentajes de mortalidad, determinados por la corrección de la fórmula de Abbott (Abbott, 1987):

$$\%M = \left( \frac{r}{s'} \right) 100$$

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

La escala de toxicidad del ensayo con *A. salina* se estableció siguiendo lo descrito por Meyer y col. (1982), Sanabria-Galindo y col. (1997) y el CYTED (Pinzón y Sánchez, 1995) y en base a los valores de CL<sub>50</sub> (**Cuadro 5**): elevada (0.1-100 µg/mL), moderada (100-300 µg/mL), baja (300 – 640 µg/mL), mínima (mayor a 640 µg/mL) y no toxica (> 2000 µg/mL).

#### **8.4.2. Evaluación de toxicidad aguda en ratones BALB/c**

El ensayo se realizó de acuerdo con las directrices para pruebas de productos químicos establecidas por la “Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico” (OECD, por sus siglas en inglés) (OECD, 2022).

En el ensayo se utilizaron grupos conformados por tres ratones BALB/c hembras de 50 a 60 días de edad (25 a 30 g de peso corporal). Los ratones se mantuvieron en jaulas con 12 h luz/oscuridad, 24 ± 1 °C y 30 – 70 % de humedad relativa. El agua y alimento se proporcionaron a libre demanda. Los EMS de *Graptopetalum* se disolvieron en aceite de maíz como vehículo y a los ratones, con ayuno previo de 4 h, se les

**Cuadro 5.** Clasificación de toxicidad (CYTED).<sup>1</sup>

<b>Grado de toxicidad</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>
Extremadamente tóxico	0-10
Altamente tóxico	10-100
Moderadamente tóxico	100-500
Ligeramente tóxico	500-1000
Prácticamente no tóxico	1000-1500
Relativamente inocuo	>1500

<sup>1</sup>Clasificación de toxicidad de acuerdo con el Manual de Técnicas de Investigación del CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo).

administró una dosis de 2000 mg/kg de peso por vía intragástrica (1 mL/100 g p.c.). Los ratones fueron observados por 24 h posteriores a la administración de las dosis y se registró la mortalidad. Los ratones sobrevivientes se mantuvieron en observación durante 14 días (bajo las condiciones antes descritas) para determinar algún efecto tardío de los EMs. Posteriormente, los ratones se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical. Muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca para determinar parámetros hematológicos y se extrajeron los órganos vitales para registrar peso y características macroscópicas.

### **8.5. Análisis estadístico**

Las mediciones se realizaron por triplicado y se registraron como la media  $\pm$  la desviación estándar. La normalidad de los datos se determinó mediante la prueba Shapiro–Wilk ( $n < 50$ ). Los datos normales se analizaron por ANOVA de una vía y el contraste de medias se realizó por la prueba de Fisher (LSD,  $P \leq 0.05$ ). Adicionalmente se determinó la relación entre la actividad biológica y los componentes químicos mediante una prueba de correlación de Pearson. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando los programas Microsoft Excel 365, GraphPad Prism v. 8.1 (software GraphPad Prism®, Inc., EE. UU.), STATGRAPHICS Centurión XVI (Statistical Graphics Corporation, EE. UU.) y Minitab 19® (**Cuadro 6**).



**Cuadro 6.** Tipo de prueba, factores de respuesta y variables de respuesta que se usaron en el análisis estadístico.<sup>1</sup>

<b>Análisis estadístico</b>	<b>Prueba</b>	<b>Factor</b>	<b>Variable de respuesta</b>
	Humedad y rendimiento de extracción	Especie	Porcentajes
	Contenido de metabolitos totales	Especie	mg EEs/g EM
	Actividad antioxidante	Tratamiento	µmol ET/g EM
Análisis de varianza (ANOVA) de una vía	Actividad anti-giardia	Tratamiento	IC <sub>50</sub>
	Actividad inmunomoduladora	Tratamiento	Porcentaje de proliferación
	Actividad inhibitoria de α-glucosidasa	Tratamiento	IC <sub>50</sub>
	Toxicidad aguda en ratones BALB/c	Tratamiento	Cambio de peso y peso relativo de órgano, valores hematológicos

<sup>1</sup>Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se registran como la media ± desviación estándar. El contraste de medias se determinó mediante la prueba de Fisher (LSD) y Dunnett para comparaciones con el tratamiento control. La diferencia se considera significativa para  $P \leq 0.05$ . **IC<sub>50</sub>**: concentración inhibitoria media; **mg EEs/g EM**: miligramos equivalentes del estándar por gramo de extracto metanólico; **µmol ET/g EM**: micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto metanólico.

## IX. RESULTADOS

### 9.1. Humedad y rendimiento de extracción

El contenido de humedad en las hojas de las tres especies de *Graptopetalum* estuvo entre 90.40% y 92.88%. Los rendimientos de los EMs variaron de 20.65 a 26.13%, siendo *G. sinaloensis* la especie con el mayor valor (**Cuadro 7**).

### 9.2. Caracterización fitoquímica

#### 9.2.1. Análisis fitoquímico cualitativo

El análisis fitoquímico cualitativo de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* reveló la presencia de cuatro de los ocho grupos de metabolitos estudiados (flavonoides, taninos, terpenos/esteroles, saponinas) (**Cuadro 8**). Los metabolitos secundarios identificados se presentaron en una proporción similar en las tres especies. Sin embargo, los taninos hidrolizables tuvieron mayor representación en *G. sinaloensis*, registrando en la prueba colorimétrica un color azul oscuro, en contraste con un mayor contenido de taninos condensados (coloración verde oscura) en *G. rusbyi* y *G. occidentale*. En las especies estudiadas no se encontraron cumarinas, alcaloides, cardiotónicos y antracénicos libres.

#### 9.2.2. Cuantificación de metabolitos totales

##### 9.2.2.1. Fenólicos totales

El contenido de fenólicos totales (FT) en los EMs de las especies de *Graptopetalum* estuvo en el rango de 88.19 a 133.34 mg EAG/g EM (**Cuadro 9**), presentando *G. rusbyi* la mayor concentración (133.34 mg EAG/g EM).

**Cuadro 7.** Contenido de humedad y rendimiento de extracción de los extractos metanólicos de hojas de especies de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

Especie de <i>Graptopetalum</i>	Porcentajes (% b.s.)	
	Humedad	Rendimiento EM
<i>G. sinaloensis</i>	90.4±0.003 <sup>a</sup>	26.1±5.43 <sup>a</sup>
<i>G. rusbyi</i>	92.5±0.001 <sup>b</sup>	20.7±11.17 <sup>a</sup>
<i>G. occidentale</i>	92.9±0.006 <sup>b</sup>	25.5±1.23 <sup>a</sup>
LSD	0.80	22.949

<sup>1</sup>Los valores son la media ± desviación estándar de al menos dos réplicas. b.s.: base seca. Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 8.** Composición fitoquímica de los extractos metanólicos de hojas de las especies de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

Metabolito	Especie de <i>Graptopetalum</i>		
	<i>G. sinaloensis</i>	<i>G. rusbyi</i>	<i>G. occidentale</i>
Flavonoides	++	++	++
Taninos	+++	+++	+++
Terpenos/esteroles	+++	+++	+++
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	+	+	+
Alcaloides	-	-	-
Cardiotónicos	-	-	-
Antracénicos libres	-	-	-

<sup>1</sup>Indica (+++) fuerte, (++) media, (+) poca presencia o (-) ausencia completa del metabolito.

**Cuadro 9.** Contenido de metabolitos totales en los extractos metanólicos de hojas de especies de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

<b>Especie de <i>Graptopetalum</i></b>	<b>Fenólicos totales mg EAG/g EM</b>	<b>Flavonoides totales mg EQ/g EM</b>	<b>Taninos totales mg EC/g EM</b>
<i>G. sinaloensis</i>	120.9±10.14 <sup>a</sup>	22.1±0.80 <sup>a</sup>	924.8 ±51.28 <sup>b</sup>
<i>G. rusbyi</i>	133.3±12.09 <sup>a</sup>	15.5±0.72 <sup>b</sup>	1159.5 ±31.67 <sup>a</sup>
<i>G. occidentale</i>	88.2±12.67 <sup>b</sup>	20.5±0.25 <sup>a</sup>	482.1±9.05 <sup>c</sup>
LSD	31.195	2.108	111.471

<sup>1</sup>Los valores son la media ± desviación estándar de dos ensayos independientes cada uno por triplicado. Letras superíndices diferentes en una misma columna indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq 0.05$ ). EM, extracto metanólico. El contenido de los metabolitos está expresado como Equivalentes del estándar por gramo de EM: **AG**, ácido gálico; **Q**, quercetina; y **C**, catequina.

#### 9.2.2.2. Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales (FVT) de los EMs de las especies de *Graptopetalum* estuvo entre 15.51 y 22.12 mg EQ/g EM (**Cuadro 9**), destacando *G. sinaloensis* (22.12 mg EQ/g EM).

#### 9.2.2.3. Taninos totales

El contenido de taninos totales (TT) de las especies de *Graptopetalum* estuvo en el rango de 482.13 a 1159.46 mg EC/g EM (**Cuadro 9**), resultando mayor para *G. rusbyi* (1159.46 mg EC/g EM).

### 9.3. Identificación de componentes individuales

#### 9.3.1. Perfil de compuestos lipofílicos

El análisis por GC-MS de las especies de *Graptopetalum* indicó la presencia de compuestos de diversa naturaleza como hidrocarburos, alcoholes, amidas, salicilatos, hidroxiácidos, ácidos grasos y sus ésteres, así como terpenos y fitoesteroles (**Cuadro 10**). Las tres especies coincidieron en la presencia de ciertos compuestos como el fitol, campesterol, fucosterol,  $\gamma$ -sitosterol y D- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), siendo estos dos últimos los compuestos mayoritarios. También se identificaron ácidos grasos como el ácido palmítico, oleico y mirístico. Algunos componentes fueron específicos de las especies, por ejemplo,  $\alpha$ -amirina y ácido mirístico en *G. sinaloensis* y *G. rusbyi*, hopenona B y lupeol en *G. occidentale*, baurenol en *G. sinaloensis* y simiarenol en *G. rusbyi*.

**Cuadro 10.** Compuestos identificados en los extractos metanólicos de las especies de *Graptopetalum* por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).

No.	Compuesto identificado <sup>1</sup>	TR <sup>2</sup>	MM <sup>3</sup>	G. sinaloensis		G. rusbyi		G. occidentale	
				Match	% Área <sup>4</sup>	Match	% Área	Match	% Área
1	Bromociclohexano	7.165	162	876	0.0921	876	0.129	883	0.14
2	(1s)-1,2,3,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)naftaleno	22.023	204	874	0.0293	-	-	-	-
3	Ácido mirístico	27.250	228	859	0.059	797	0.0289	-	-
4	2-hidroxibenzoato de pentilo	28.116	208	779	0.0173	752	0.0159	-	-
5	Octadecano	28.43	254	926	0.0365	889	0.0184	-	-
6	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)	28.188	296	894	0.524	892	0.455	884	0.773
7	(E)-(7R,11R)-3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadeceno	29.392	280	801	0.00674	-	-	758	0.0104
8	Salicilato de homomentilo	29.773	262	864	0.0292	867	0.0214	-	-
9	Palmitato de metilo	30.808	270	906	0.0519	883	0.0357	850	0.0252
10	Ácido palmítico	31.677	256	904	0.13	905	0.0959	930	0.146
11	Oleato de metilo	36.158	296	804	0.0313	-	-	-	-
12	1,15-Pentadecanodiol	37.656	244	-	-	739	0.0143	-	-
13	Ciclotridecano	37.638	182	663	0.0104	-	-	-	-
14	Ácido oleico	37.659	282	718	0.0277	763	0.0367	756	0.0296
15	2,5-bis-O-trimetilsililpirazina	44.644	256	-	-	527	0.305	-	-

<sup>1</sup>Los componentes se encuentran listados en orden de elución. <sup>2</sup>TR, tiempo de retención. <sup>3</sup>MM, masa molecular. <sup>4</sup>Porcentaje de área relativa.

**Cuadro 10.** Continuación.

No.	Compuesto identificado	TR <sup>2</sup>	MM <sup>3</sup>	G. sinaloensis		G. rusbyi		G. occidentale	
				Match	% Área <sup>4</sup>	Match	% Área	Match	% Área
16	2-Propilhexadecanoato de metilo	45.579	312	-	-	545	0.0371	-	-
17	3-Oxooctadecanoato de metilo	45.581	312	529	0.0317	507	0.0219	563	0.0457
18	Tetracosano	49.176	338	904	0.0574	-	-	-	-
19	Linoleato de etilo	49.666	308	655	0.00809	669	0.0142	724	0.0174
20	2-Clorolinoleato de etilo	49.670	342	-	-	643	0.0122	-	-
21	(9E,12E)-9,12-Octadecadienoato de metilo	49.674	294	-	-	-	-	717	0.0353
22	Dodecanol	49.674	182	629	0.0118	-	-	-	-
23	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrien-1-ol	49.752	264	-	-	680	0.00555	-	-
24	(Z)-9-Octadecenoato de 2,3-dihidroxi-3-propilo (á-Monooleina)	49.821	356	604	0.0352	620	0.0294	545	0.0258
25	2,2'-Metilén-bis[6-(1,1-dimetil-4-etil)fenol]	50.129	368	-	-	-	-	837	0.0198
26	Pentadecanal	50.916	226	-	-	666	0.00425	759	0.0057
27	Docosanoato de metilo	50.926	354	573	0.00534	-	-	-	-
28	1-Formil-2-hidroxi-6-metoxi-9,10-dimetilantraceno	51.089	280	-	-	616	0.0166	-	-
29	1-(4-Clorofenil)-3-metil-1-pentanona	51.762	210	-	-	721	0.00679	-	-
30	Hexacosano	52.062	366	904	0.102	-	-	-	-

<sup>1</sup>Los componentes se encuentran listados en orden de elución. <sup>2</sup>TR, tiempo de retención. <sup>3</sup>MM, masa molecular. <sup>4</sup>Porcentaje de área relativa.



**Cuadro 10.** Continuación.

No.	Compuesto identificado	TR <sup>2</sup>	MM <sup>3</sup>	G. sinaloensis		G. rusbyi		G. occidentale	
				Match	% Área <sup>4</sup>	Match	% Área	Match	% Área
31	3-(3-Tienil)-2-(2-indolil)acrilonitrilo	52.123	250	509	0.00545	518	0.0131	457	0.00302
32	Heptacosano	53.393	380	886	0.0718	-	-	-	-
33	Erucamida	53.809	337	646	0.00612	680	0.00633	628	0.00672
34	Octacosano	54.881	394	888	0.0645	-	-	-	-
35	Escualeno	55.037	410	835	0.128	870	0.0803	659	0.196
36	Dietil éster del ketoprofeno	55.272	282	-	-	743	0.00771	-	-
37	Nonacosano	56.614	408	855	0.0321	-	-	-	-
38	2-[(2-Clorofenil)amino]-3-metilbenzoilo	57.43	365	672	0.127	-	-	-	-
39	Vitamina E	61.11	430	911	1.5	904	4.02	903	2.27
40	(3 $\alpha$ ,22E,24S)- Ergosta-5,22-dien-3-ol	63.063	398	683	0.0337	-	-	-	-
41	24-Etilcoprostanol TMS	63.1	488	-	-	507	0.00634	-	-
42	Campesterol	63.657	400	840	0.102	864	0.223	868	0.188
43	2-(4-Clorometil)-1H-isoindol-1,3-(2H)diona	63.853	257	-	-	629	0.126	-	-
44	(3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ )- Stigmasta-7,25-dien-3-ol	66.121	412	-	-	587	0.0147	-	-
45	$\gamma$ -Sitosterol	66.828	414	903	1.31	905	3.37	903	2.18

<sup>1</sup>Los componentes se encuentran listados en orden de elución. <sup>2</sup>TR, tiempo de retención. <sup>3</sup>MM, masa molecular.

<sup>4</sup>Porcentaje de área relativa.

**Cuadro 10.** Continuación.

No.	Compuesto identificado	TR <sup>2</sup>	MM <sup>3</sup>	G. sinaloensis		G. rusbyi		G. occidentale	
				Match	% Área <sup>4</sup>	Match	% Área	Match	% Área
46	Fucoesterol	67.233	412	660	0.0599	796	0.179	676	0.148
47	24-Propiliden-(3 $\alpha$ )-colest-5-en-3-ol	67.298	426	-	-	809	0.353	-	-
48	Simiarenol	68.297	426	-	-	710	0.204	-	-
49	Lupeol	69.244	426	-	-	-	-	834	0.0985
50	Hopenona B	71.041	424	-	-	-	-	887	0.0594
51	(5 $\alpha$ )-Androstán-15-ona	71.915	274	-	-	551	0.0146	-	-
52	$\alpha$ -Amirina	72.38	426	822	0.571	722	0.0271	-	-
53	Baurenol	73.844	426	632	0.000764	-	-	-	-

<sup>1</sup>Los componentes se encuentran listados en orden de elución. <sup>2</sup>TR, tiempo de retención. <sup>3</sup>MM, masa molecular.

<sup>4</sup>Porcentaje de área relativa.

### 9.3.2. Perfil de compuestos fenólicos

#### 9.3.2.1. Análisis por HPLC-MS

La identificación de compuestos en las tres especies de *Graptopetalum* se realizó a partir de los espectros de absorción UV-Vis y de los patrones de fragmentación obtenidos mediante espectrometría de masas por ionización de electroasperjado en modo negativo (ESI-MS). Los espectros de UV-Vis evidenciaron principalmente la presencia de compuestos fenólicos de tipo taninos hidrolizables ( $\lambda_{\text{máx}} = 250$  y  $270$  nm) y condensados ( $\lambda_{\text{máx}} = 240, 380$  y  $650$  nm), flavonoides ( $\lambda_{\text{máx}} = 250$  y  $350$  nm) y ácidos fenólicos ( $\lambda_{\text{máx}} = 320$  nm) (**Cuadro 11**).

El análisis ESI-MS/MS mostró los iones cuasimoleculares  $[M-H]^-$  y fragmentos característicos para compuestos derivados de quercetina ( $m/z = 301$ ) (Pascale y col., 2020), kaempferol ( $m/z = 285$ ) (El Sayed y col., 2023) y miricetina ( $m/z = 317$ ) (Odah y col., 2020); ácidos fenólicos derivados de ácido cumárico ( $m/z = 163$ ) (Cheiran y col., 2019), cafeico ( $m/z = 179$ ) (El-Shazly y col., 2022) y siríngico ( $m/z = 197$ ) (Luo y col., 2020); así como taninos conteniendo ácido gálico ( $m/z = 169$ ) (Felegyi-Tóth y col., 2022), ácido elágico ( $m/z = 301$ ) (Fischer y col., 2011; Gu y col., 2013), (epi)catequina ( $m/z = 289-287$ ) (Ambigaipalan y col., 2016; Pacifico y col., 2014), (epi)galocatequina ( $m/z = 305$ ) (Ambigaipalan y col., 2016) y galato de (epi)catequina ( $m/z = 441$ ) (Ambigaipalan y col., 2016). Por otra parte, las pérdidas indicaron la presencia de grupos sustituyentes como carbohidratos: pentosas (132 Da) (Karonen y Pihlava, 2022), metilpentosas (e.g., ramnosa) (146 Da) (Abdel-Moez y col., 2023), hexosas (162 Da) (Karonen y Pihlava, 2022), acetilhexosas (204 Da) (Cuyckens y Claeys, 2004) y derivados acetilo (42 Da) (Wang y col., 2023),

**Cuadro 11.** Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos detectados en los extractos metanólicos de las especies de *Graptopetalum*.

No. <sup>1</sup>	TR <sup>2</sup> (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentación MS/MS [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Identidad tentativa
1 <sup>RS</sup>	3.0	274	245	MS <sup>2</sup> [245] <sup>-</sup> → 209, <b>203</b> , 191, 149, 116. MS <sup>3</sup> [203] <sup>-</sup> → 186, 159, 142, 116, 73.	No identificado
2 <sup>RS</sup>	6.26	270	169	MS <sup>2</sup> [169] <sup>-</sup> → 151, <b>125</b> , 97.	Ácido gálico
3 <sup>R</sup>	6.26	274	197	MS <sup>2</sup> [197] <sup>-</sup> → 182, <b>153</b> , 97.	Ácido siríngico
4 <sup>RS</sup>	13.33	273	215	MS <sup>2</sup> [215] <sup>-</sup> → 197, 179, <b>171</b> , 153.	Derivado de ácido siríngico
5 <sup>SR</sup>	15.07	274	313	MS <sup>2</sup> [313] <sup>-</sup> → 269, 251, <b>197</b> , 185, 148. MS <sup>3</sup> [197] <sup>-</sup> → 182, <b>153</b> .	Ácido siríngicoil-málico
6 <sup>SRO</sup>	17.24	321	279	MS <sup>2</sup> [279] <sup>-</sup> → 261, 235, <b>163</b> , 133, 97.	Ácido cumaroil-málico
7 <sup>OS</sup>	30.33	276	475	MS <sup>2</sup> [475] <sup>-</sup> → 457, <b>431</b> , 413, 359, 313, 295, 197, 179, 153.	Ácido siríngicoil-cafeoil-málico
8 <sup>S</sup>	19.82	252	391	MS <sup>2</sup> [391] <sup>-</sup> → 347, 283, <b>229</b> , 169. MS <sup>3</sup> [229] <sup>-</sup> → 185, <b>151</b> .	Shanzhisido
9 <sup>SR</sup>	31.61	270	457	MS <sup>2</sup> [457] <sup>-</sup> → 413, <b>331</b> , 305, 287, 193, 169.	Galato de (epi)galocatequina

<sup>1</sup> Los componentes se encuentran listados en orden de elución. Letras S, R y O corresponden a presencia en *G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale* respectivamente. <sup>2</sup> Tiempo de retención.

**Cuadro 11.** Continuación.

No. <sup>1</sup>	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 tentativa
10 <sup>S</sup>	37.31	270	441	MS <sup>2</sup> [441] <sup>-</sup> → 397, 331, 303, <b>289</b> , 271, 193, 169.	Galato de (epi)catequina
11 <sup>S</sup>	39.16	218, 300	287	MS <sup>2</sup> [287] <sup>-</sup> → <b>272</b> , 243, 215, 161, 151.	Shikonina
12 <sup>O</sup>	39.33	289, 311	335	MS <sup>2</sup> [335] <sup>-</sup> → <b>317</b> , 291, 247, 231, 179, 161, 135. MS <sup>3</sup> [317] <sup>-</sup> → 273, <b>231</b> , 213, 179, 161.	Ácido cafeoil-shikímico
13 <sup>S</sup>	40.91	221-315	429	MS <sup>2</sup> [429] <sup>-</sup> → 385, 367, <b>249</b> , 205, 161, 143.	No identificado
14 <sup>SRO</sup>	42.67	249, 357	479	MS <sup>2</sup> [479] <sup>-</sup> → 461, 435, <b>317</b> , 179. MS <sup>3</sup> [317] <sup>-</sup> → 299, 255, 195, <b>179</b> , 151.	Miricetín-O-hexósido
15 <sup>S</sup>	44.43	251, 353	637	MS <sup>2</sup> [637] <sup>-</sup> → <b>505</b> , 433, 311, 179. MS <sup>3</sup> [505] <sup>-</sup> → 445, 385, 329, <b>300</b> , 285, 254, 179.	Quercetín-O-pentosil-O-(acetil)hexósido
16 <sup>R</sup>	44.88	245, 355	521	MS <sup>2</sup> [521] <sup>-</sup> → 503, 477, 459, <b>317</b> , 179, 151.	Miricetín-O-(acetil)hexósido
17 <sup>SRO</sup>	45.75	251, 353	463	MS <sup>2</sup> [463] <sup>-</sup> → 419, <b>301</b> , 247, 179. MS <sup>3</sup> [301] <sup>-</sup> → 257, <b>179</b> , 151.	Quercetín-O-hexósido

<sup>1</sup> Los componentes se encuentran listados en orden de elución. Letras S, R y O corresponden a presencia en *G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale* respectivamente. <sup>2</sup> Tiempo de retención.

**Cuadro 11.** Continuación.

No. <sup>1</sup>	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 tentativa
18 <sup>SR</sup>	46.04	268	303	MS <sup>2</sup> [303] <sup>-</sup> → 275, 257, 169, <b>151</b> .	Ácido galoil-cresótico
19 <sup>S</sup>	47.01	321	735	MS <sup>2</sup> [735] <sup>-</sup> → 699, 573, 475, 457, 413, <b>277</b> . MS <sup>3</sup> [457] <sup>-</sup> → 325, 321, <b>153</b> . MS <sup>3</sup> [277] <sup>-</sup> → 233, <b>179</b> . MS <sup>3</sup> [699] <sup>-</sup> → 491.	Ácido cafeoil-(metanoil-dihidroxibenzoil-pentosil)ramnosil-fumárico
20 <sup>O</sup>	47.32	280	895	MS <sup>2</sup> [895] <sup>-</sup> → <b>857</b> , 695, 453, 279. MS <sup>3</sup> [857] <sup>-</sup> → 695, <b>453</b> , 397, 277.	Dímero (Tipo A) GEC-GEGC
21 <sup>SRO</sup>	47.40	263, 365	447	MS <sup>2</sup> [447] <sup>-</sup> → 429, 403, <b>285</b> , 179. MS <sup>3</sup> [285] <sup>-</sup> → 257, <b>241</b> , 175, 151.	Kaempferol-O-hexósido
22 <sup>O</sup>	48.31	274	879	MS <sup>2</sup> [879] <sup>-</sup> → <b>843</b> , 681, 439. MS <sup>3</sup> [843] <sup>-</sup> → 681, 562, <b>439</b> . MS <sup>3</sup> [439] <sup>-</sup> → 383, 337, <b>277</b> , 253.	Dímero (Tipo A) GEC-GEC
23 <sup>S</sup>	48.54	265, 365	591	MS <sup>2</sup> [591] <sup>-</sup> → 573, 547, 489, <b>447</b> , 301, 285, 257. MS <sup>3</sup> [350] <sup>-</sup> → <b>333</b> , 251, 225. MS <sup>3</sup> [447] <sup>-</sup> → <b>285</b> . MS <sup>4</sup> [285] <sup>-</sup> → <b>267</b> , 175.	Luteoil-O-(HMG)-hexósido

<sup>1</sup> Los componentes se encuentran listados en orden de elución. Letras S, R y O corresponden a presencia en *G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale* respectivamente. <sup>2</sup> Tiempo de retención. **GEC**: galato de (epi)catequina; **GEGC**: galato de (epi)galocatequina.

**Cuadro 11.** Continuación.

No. <sup>1</sup>	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 tentativa
24 <sup>R</sup>	48.81	250, 370	505	MS <sup>2</sup> [505] <sup>-</sup> → 487, 461, 445, <b>301</b> , 277, 255, 179. MS <sup>3</sup> [301] <sup>-</sup> → 257, <b>179</b> , 151.	Quercetín-O-acetilhexósido
25 <sup>O</sup>	49.38	265, 364	677	MS <sup>2</sup> [677] <sup>-</sup> → 617, <b>531</b> , 479, 431, 285. MS <sup>3</sup> [531] <sup>-</sup> → <b>471</b> , 411, 284, 255.	Kaempferol-O-ramnosil-O-(diacetil)hexósido
26 <sup>S</sup>	49.91	265, 365	633	MS <sup>2</sup> [633] <sup>-</sup> → 571, 531, <b>489</b> , 285. MS <sup>3</sup> [489] <sup>-</sup> → 447, 429, <b>285</b> , 257, 197.	Kaempferol-O-(HMG)-acetilhexósido
27 <sup>SO</sup>	50.35	265, 365	489	MS <sup>2</sup> [489] <sup>-</sup> → 471, 445, 427, <b>285</b> , 255, 229, 205.	Kaempferol-O-acetilhexósido
28 <sup>S</sup>	50.35	264, 365	777	MS <sup>2</sup> [777] <sup>-</sup> → 717, 573, 531, 489, 285.	Kaempferol-O-(triacetil)hexosil-O-(acetil)hexósido
29 <sup>S</sup>	51.07	265, 355	531	MS <sup>2</sup> [531] <sup>-</sup> → 513, 487, 471, 411, <b>285</b> , 255.	Kaempferol-O-(diacetil)hexósido
30 <sup>S</sup>	51.07	278	589	MS <sup>2</sup> [589] <sup>-</sup> → 479, 437, <b>300</b> , 271, 169. MS <sup>3</sup> [300] <sup>-</sup> → 271, 255, 243, 227, 151.	Dímero (Tipo A) cMER-EC
31 <sup>O</sup>	51.54	278	863	MS <sup>2</sup> [863] <sup>-</sup> → <b>827</b> , 551, 466, 415, 299, 279, 255. MS <sup>3</sup> [827] <sup>-</sup> → 665, <b>647</b> , 533, 425, 338. MS <sup>4</sup> [647] <sup>-</sup> → 619, 531, 437, <b>337</b> , 307, 279.	Dímero (Tipo A) GEC-GEA

<sup>1</sup> Los componentes se encuentran listados en orden de elución. Letras S, R y O corresponden a presencia en *G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale* respectivamente. <sup>2</sup> Tiempo de retención. **cMER**: C-metil-(epi)robinetinidol; **EC**: (epi)catequina; **GEC**: galato de (epi)catequina; **GEA**: Galato de (epi)azfelequina.

**Cuadro 11.** Continuación.

No. <sup>1</sup>	TR <sup>2</sup> (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentación MS/MS [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Identidad tentativa
32 <sup>S</sup>	51.07	257, 371	921	MS <sup>2</sup> [921] <sup>-</sup> → 879, 632, <b>590</b> , 531, 491, 408, 301.	HHDP-(epi)catequín-galoiil-glucósido
33 <sup>S</sup>	51.50	280, 360	877	MS <sup>2</sup> [877] <sup>-</sup> → 835, 817, 631, <b>588</b> , 547, 299. MS <sup>3</sup> [588] <sup>-</sup> → 299, 271, 227.	Trímero (Tipo B) EC-Quercetina-EC
34 <sup>O</sup>	52.07	278	819	MS <sup>2</sup> [819] <sup>-</sup> → 787, <b>563</b> , 538, 377, 255. MS <sup>3</sup> [563] <sup>-</sup> → 506, 285, <b>225</b> .	Dímero (Tipo B) TF-DT
35 <sup>SR</sup>	52.35	265, 365	285	MS <sup>2</sup> [285] <sup>-</sup> → 267, <b>241</b> , 199, 175, 151.	Kaempferol
36 <sup>S</sup>	52.50	275, 380	861	MS <sup>2</sup> [861] <sup>-</sup> → 825, 801, <b>572</b> , 283. MS <sup>3</sup> [572] <sup>-</sup> → 283, 255, 211.	Trímero (Tipo B) EC-kaempferol-EC
37 <sup>R</sup>	54.11	275	441	MS <sup>2</sup> [441] <sup>-</sup> → 397, 331, <b>289</b> , 271, 169, 153. MS <sup>3</sup> [289] <sup>-</sup> → 271, <b>245</b> , 205, 179.	Galato de (epi)catequina
38 <sup>R</sup>	53.38	275	361	MS <sup>2</sup> [361] <sup>-</sup> → <b>343</b> , 299, 261, 209, 191, 169, 151.	Ácido galoiil-múico
39 <sup>S</sup>	54.32	270	337	MS <sup>2</sup> [337] <sup>-</sup> → 293, 249, 123, <b>97</b> . MS <sup>3</sup> [293] <sup>-</sup> → 275, 249, 165.	No identificado

<sup>1</sup> Los componentes se encuentran listados en orden de elución. Letras S, R y O corresponden a presencia en *G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale* respectivamente. <sup>2</sup> Tiempo de retención. **EC**: (epi)catequina; **DT**: distenidina; **TF**: teafiavina.



**Cuadro 11.** Continuación.

No. <sup>1</sup>	TR <sup>2</sup> (min)	λmax (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentación MS/MS [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Identidad tentativa
40 <sup>SRO</sup>	56.40	275	603	MS <sup>2</sup> [603] <sup>-</sup> → 559, 477, <b>451</b> , 357, 289, 169. MS <sup>3</sup> [451] <sup>-</sup> → 433, <b>357</b> , 311, 289, 217.	(Epi)catequin-(galoiil)-hexósido
41 <sup>RS</sup>	57.54	245, 350	381	MS <sup>2</sup> [381] <sup>-</sup> → 363, <b>337</b> , 319, 301, 253, 239, 181, 123.	Ácido sulfoxielálgico
42 <sup>SRO</sup>	57.10		473	MS <sup>2</sup> [473] <sup>-</sup> → 455, <b>429</b> , 411, 311, 267, 205, 149. MS <sup>3</sup> [429] <sup>-</sup> → <b>385</b> , 357, 331, 261, 179, 151, 149. MS <sup>3</sup> [311] <sup>-</sup> → 269, 186, 149, 133.	Ácido dicafeoil tartárico (ácido cicórico)
43 <sup>o</sup>	59.09	267	475	MS <sup>2</sup> [475] <sup>-</sup> → 457, 431, 413, 313, 295, 267, 197, 153.	Siringoil-maloil-hexósido
44 <sup>R</sup>	59.91	321	427	MS <sup>2</sup> [427] <sup>-</sup> → 409, <b>383</b> , 364, 341, 265, 179.	Ácido dicafeoil-malónico
45 <sup>o</sup>	60.23	322	241	MS <sup>2</sup> [241] <sup>-</sup> → <b>226</b> , 213, <b>197</b> , 179, 153, 110.	Pinostilbeno
46 <sup>o</sup>	60.56	320	255	MS <sup>2</sup> [255] <sup>-</sup> → <b>237</b> , 227, 211, 193, 183, 82.	Pinocembrina

<sup>1</sup> Los componentes se encuentran listados en orden de elución. Letras S, R y O corresponden a presencia en *G. sinaloensis*, *G. rusbyi* y *G. occidentale* respectivamente. <sup>2</sup> Tiempo de retención.

ácido málico (116 Da) (Ávila y col., 2022), ácido malónico (86 Da) (Cuyckens y Claeys, 2004; Wang y col., 2023), ácido shikímico (156 Da) (Buzgaia y col., 2021) e hidroximetilglutarilo (HMG) (144 Da) (Ling y col., 2013; Rodríguez-Rivera y col., 2014) entre otros.

### 9.3.2.2. Identificación de compuestos individuales

La identificación se realizó analizando los espectros de masas de cada pico y comparándolos con lo reportado en la literatura.

#### 9.3.2.2.1. Ácidos fenólicos

En *Graptopetalum* se identificaron 14 ácidos fenólicos o derivados de los mismos, la mayoría en forma de ésteres de ácidos orgánicos, el patrón de fragmentación de la mayoría de estos compuestos presentó iones característicos correspondientes a la pérdida de agua ( $- 18$ ),  $\text{CO}_2$  ( $- 44$ ) y agua +  $\text{CO}_2$  ( $- 62$ ). El pico **2** presentó el ion cuasimolecular  $m/z = 169$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  y un fragmento abundante de  $m/z = 125$ , patrón característico del ácido gálico. Asimismo, en los picos **18** y **38** se identificó el fragmento  $m/z = 169$ . El pico **18** con ion cuasimolecular  $m/z = 303$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  y fragmento mayoritario de  $m/z = 151$   $[(\text{M}-\text{H}) - 152]^-$  ( $-$  ácido gálico) asignado al ácido cresótico, por lo que fue identificado como ácido galoil-cresótico. El pico **38** fue identificado de forma tentativa como ácido galoil-múxico basado en lo reportado por Yang y col. (2012), quienes lo asignan basado en el ion cuasimolecular  $m/z = 361$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  y el patrón de fragmentación  $m/z = 209$   $[(\text{M}-\text{H}) - 152]^-$  con una pérdida de 152 Da y  $m/z = 191$   $[(\text{M}-\text{H}) - 152-18]^-$ , correspondientes a un grupo galoil y una molécula de agua respectivamente.

Los picos **3**, **4**, **5**, **7** y **43** presentaron el ion de  $m/z = 197 [M-H]^-$  que fue asignado a ácido siríngico. El pico **3** fue identificado como ácido siríngico al presentar un ion cuasimolecular característico  $m/z = 197 [M-H]^-$  y un fragmento abundante de  $m/z = 153 [(M-H) -44]^-$  asociado a la pérdida de un grupo carboxilo ( $CO_2$ ). El pico **4** con  $m/z = 215 [M-H]^-$  presentó fragmentos de  $m/z = 197 [(M-H) -18]^-$ , debido de la liberación de  $H_2O$ , y de  $m/z = 153 [(M-H) -18-44]^-$  por la posterior liberación de  $CO_2$ ; al respecto, los datos fueron insuficientes para la identificación de **4** y sólo quedó como derivado de ácido siríngico. El pico **5** presentó un ion cuasimolecular de  $m/z = 313 [M-H]^-$  del cual derivaron los fragmentos  $m/z = 269 [(M-H) -44]^-$ , debido a la pérdida de  $CO_2$ , y el fragmento mayoritario de  $m/z = 197 [(M-H) -116]^-$  característico de ácido siríngico, donde la pérdida de 116 Da podría corresponder al ácido málico, por lo cual **5** fue identificado como ácido siringoil-málico. Los picos **7** y **43** presentaron el ion cuasimolecular de  $m/z = 475 [M-H]^-$  y con fragmentos importantes a  $m/z = 313 [(M-H) -162]^-$  y  $197 [(M-H) -162-116]^-$  previamente analizado para el ácido siringoil-málico, la pérdida de 162 podría atribuirse a glucosa o ácido cafeico; el pico **7** presentó el fragmento de  $m/z = 179$  Da confirmando la presencia de ácido cafeico, mientras que en el compuesto **43** no se observó dicho fragmento por lo que los compuestos fueron identificados como ácido siringoil-cafeoil málico (**7**) y siringoil-maloil-hexósido (**43**).

El pico **6** generó el ion cuasimolecular  $m/z = 279 [M-H]^-$  y un fragmento abundante de  $m/z = 163$ , correspondiente al ácido cumárico con una pérdida de 116 Da, y un fragmento de  $m/z = 133$  (ácido málico), por lo que se sugiere que **6** es el ácido cumaroil-málico.

Los picos **12**, **19**, **42** y **44** fueron identificados como derivados de ácido cafeico al presentar el fragmento  $m/z = 179$  u. El pico **12** fue identificado como ácido cafeoilshikimico debido al ion cuasimolecular  $m/z = 335$  u  $[M-H]^-$  y su fragmentos principales derivados de la parte cafeoil  $m/z = 179$   $[(M-H) - 156]^-$ ,  $m/z = 161$   $[(M-H) - 174]^-$  y  $m/z = 135$   $[(M-H) - 200]^-$ , según lo descrito previamente en la literatura (Ahmed y col. 2019). La fragmentación del ion cuasimolecular  $m/z = 735$  u  $[M-H]^-$  del pico **19** originó numerosos iones de  $m/z = 699$ ,  $573$ ,  $475$ ,  $457$ ,  $413$  y el mayoritario de  $277$   $[(M-H) - 458]^-$ . El MS<sup>3</sup> de  $277$  u originó los fragmentos de  $m/z = 233$  u por pérdida de CO<sub>2</sub> y  $179$  u  $[(M-H) - 458 - 98]^-$ , la pérdida de  $98$  Da podría atribuirse a la presencia de ácido fumárico; adicionalmente, el MS<sup>3</sup> de  $457$  originó los iones de  $m/z = 325$   $[(M-H) - 278 - 132]^-$  y  $321$   $[(M-H) - 278 - 136]^-$  asociados con pérdida de fragmentos de pentosa y ácido dihidroxibenzoico (ácido gentísico) reportado previamente en *Graptopetalum* (Todorova y col., 2022), este último confirmado por la presencia del ion  $m/z = 153$   $[(M-H) - 278 - 132 - 172]^-$  derivado de la pérdida de pentosa y metanoilramnosa, el pico **19** fue identificado como ácido cafeoil-(metanoil-dihidroxibenzoil-pentosil)ramnosil-fumárico. El pico **42** se identificó tentativamente como ácido cicórico (ácido dicafeoil tartárico) ya que presentó el ion cuasimolecular  $m/z = 473$   $[(M-H)]^-$  y su fragmento  $m/z = 311$   $[(M-H) - 162]^-$  (ácido cafeoil tartárico), resultante de la pérdida individual de ácido cafeico ( $162$  Da); además se observó otro ion a  $m/z = 149$   $[(M-H) - 304]^-$  correspondiente al ácido tartárico, que fue confirmado por la fragmentación del ion  $m/z = 311$  que produjo un ion abundante a  $149$   $[(M-H) - 162]^-$ , correspondiente a la pérdida de ácido cafeico (Khoza y col., 2016). Por último, el pico **44** de  $m/z = 427$   $[(M-H)]^-$  fue identificado como ácido dicafeoil-malónico debido a la presencia de los fragmentos de  $m/z = 265$   $[(M-H) - 162]^-$  y  $179$   $[(M-H) - 162 - 86]^-$ .

Por último, dentro de este grupo de metabolitos, el pico **41** presentó un ion cuasimolecular de  $m/z = 381$  u  $[(M-H)]^-$  que al fragmentarse produjo un ion abundante a  $m/z = 337$  u  $[(M-H) - 44]^-$  asociado a la pérdida de un grupo carboxilo ( $CO_2$ ) (44 Da). Por otra parte, el ion  $m/z = 301$  u  $[(M-H) - 80]^-$  podría asociarse a la presencia de ácido elágico, posiblemente por la pérdida de un residuo sulfato (80 Da), por lo cual **41** fue identificado tentativamente como ácido sulfoxielágico.

#### 9.3.2.2.2. *Flavonoides*

Entre los compuestos identificados, 12 fueron derivados de flavonoides (**14**, **15**, **16**, **17**, **21**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27**, **28**, **29**) y la aglicona kaempferol (**35**). El kaempferol se identificó por su ion cuasimolecular  $m/z = 285$   $[M-H]^-$  y patrón de fragmentación característico conformado por el fragmento principal de  $m/z = 241$  y los iones  $m/z = 199$ ,  $m/z = 175$ ,  $m/z = 165$  y  $m/z = 151$ . Asimismo, seis de los 12 compuestos restantes fueron derivados de kaempferol el pico **21** presentó un ion cuasimolecular  $m/z = 447$  u  $[M-H]^-$  con un fragmento abundante  $m/z = 285$   $[(M-H) - 162]^-$  característico de kaempferol, mientras que la pérdida correspondiente a 162 Da podría asociarse con una molécula de hexosa. Por lo que **21** fue identificado como kaempferol-O-hexósido. El resto de los derivados de kaempferol presentaron entre sus sustituyentes mono, di y/o triacetilhexosas asociadas con la liberación de los fragmentos 204, 246 y 288 Da, respectivamente. El pico **25** mostró un ion cuasimolecular de 667  $[M-H]^-$  y fragmentos de  $m/z = 531$   $[(M-H) - 146]^-$ , 431  $[(M-H) - 246]^-$  y 285 (kaempferol)  $[(M-H) - 146 - 246]^-$ , por pérdida de ramnosa y diacetil-hexosa, indicando un compuesto disustituido identificado como kaempferol-O-ramnosil-O-(diacetil)hexósido. El pico **26** generó un ion cuasimolecular  $m/z = 633$   $[M-H]^-$  que al romperse produjo un fragmento abundante

de  $m/z = 489 [(M-H) - 144]^-$ , que a su vez generó el ion  $m/z = 285$  (kaempferol)  $[(M-H) - 144 - 204]^-$  por la posible pérdida de una molécula de HMG y acetyl-hexosa. Por lo que **26** se identificó como kaempferol-O-HMG-O-acetylhexósido. El ion cuasimolecular de **27** fue  $m/z = 489 [M-H]^-$  y el de **29** fue  $531 [M-H]^-$ ; la fragmentación de éstos produjo el ion asociado a  $m/z = 285 [(M-H) - 204]^-$  (**27**) y  $[(M-H) - 246]^-$  (**29**), lo cuales correspondieron a la pérdida de acetyl-hexosa y diacetyl-hexosa, respectivamente. Por lo que los compuestos fueron identificados como kaempferol-O-acetylhexósido (**27**) y kaempferol-O-(diacetyl)hexósido (**29**). Por otro lado, el ion cuasimolecular de **28** fue de  $m/z = 777$  u  $[M-H]^-$  y sus fragmentos  $m/z = 573 [(M-H) - 204]^-$  y  $489$  u  $[(M-H) - 288]^-$  pueden asociarse a la pérdida de fragmentos de acetyl-hexosa y triacetyl-hexosa, respectivamente, además del ion  $m/z = 285$  (kaempferol). Por lo tanto, **29** podría identificarse como kaempferol-O-(triacetyl)hexosil-O-(acetyl)hexósido.

El pico **23** mostró un ion cuasimolecular  $m/z = 591$  u  $[M-H]^-$  y generó el fragmento  $m/z = 447 [(M-H) - 144]^-$ , que podría corresponder a la pérdida de una molécula de HMG; mientras que el ion  $m/z = 285 [(M-H) - 162]^-$  podría deberse a la pérdida de una hexosa. El MS/MS del fragmento 285 u presentó como fragmento principal un ion de  $m/z = 267$  u característico de luteolina. Con base en esto, **23** fue identificado tentativamente como luteolín-O-(HMG)hexósido.

Por otro lado, dos compuestos derivados de miricetina (**14** y **16**) fueron identificados. El pico **14** generó un ion cuasimolecular  $m/z = 479$  u  $[M-H]^-$  y un fragmento abundante de  $m/z = 317 [(M-H) - 162]^-$  por pérdida de hexosa, el cual a su vez produjo los fragmentos característicos de miricetina  $m/z = 299$  y  $179$  u. Consecuentemente, **14** fue identificado tentativamente como miricetín-O-hexósido;

mientras que **16** fue identificado como miricetín-O-(acetil)hexósido, con base al ion cuasimolecular de  $m/z = 521$  u  $[M-H]^-$  y el fragmento principal de  $m/z = 317$   $[(M-H) - 204]^-$  por pérdida de acetil-hexosa.

Los compuestos **15**, **17** y **24** generaron el fragmento  $m/z = 301$ , que a su vez generó fragmentos característicos de quercetina  $m/z = 257$ , 179 y 151. El patrón de fragmentación del pico **15** presentó los iones de  $m/z = 637$  u  $[M-H]^-$ , 505  $[(M-H) - 132]^-$  y 433  $[(M-H) - 204]^-$ ; la fragmentación del ion de 505 u generó el fragmento principal de  $m/z = 300$  u  $[Quercetina - 2H]^-$  y **15** fue identificado como quercetín-O-pentosil-O-(acetil)hexósido. El compuesto **17** mostró un ion cuasimolecular de  $m/z = 463$   $[M-H]^-$  y un fragmento abundante de  $m/z = 301$   $[(M-H) - 162]^-$  correspondiente a la pérdida de una hexosa, por lo que **17** se identificó como quercetín-O-hexósido. Por su parte, **24** fue identificado tentativamente como quercetín-O-acetilhexósido basado en la formación de un ion cuasimolecular de  $m/z = 505$  u  $[M-H]^-$  y su fragmento principal  $m/z = 301$  u  $[(M-H) - 204]^-$  derivado de la pérdida de un residuo de acetil-hexosa.

Por otra parte, **40** generó un ion cuasimolecular  $m/z = 603$  u  $[M-H]^-$  y formó un ion abundante  $m/z = 451$  u  $[(M-H) - 152]^-$ , posiblemente asociado a la pérdida de un grupo galoilo (152 Da), que a su vez produjo el ion abundante  $m/z = 289$   $[(M-H) - 162]^-$  que podría corresponder al flavan-3-ol (epi)catequina y la pérdida de una hexosa (162 Da); por lo tanto, **40** fue identificado tentativamente como (epi)catequín-(galoil)-hexósido. El compuesto **46** fue identificado tentativamente como pinocembrina, flavanona previamente asociada con un ion cuasimolecular  $m/z = 255$  u  $[(M-H)]^-$  y un

fragmento abundante característico a  $m/z = 237$  u, además de la presencia de los iones  $m/z = 211$  y  $m/z = 193$  (Bibi y col., 2019; Huang y col., 2015).

#### 9.3.2.2.3. *Taninos*

Once compuestos tipo tanino fueron identificados, la mayoría taninos condensados con excepción de **32** que fue un elagitanino. El compuesto **32** presentó un ion cuasimolecular de  $m/z = 921$  u  $[M-H]^-$  y sus fragmentos principales fueron los iones  $m/z = 879$   $[(M-H)-42]^-$ ,  $632$  u  $[(M-H)-289]^-$ ,  $590$  u  $[(M-H)-331]^-$  y  $301$  u  $[(M-H)-289-331]^-$ ; las pérdidas de  $289$  Da y  $331$  Da se asignaron a moléculas de (epi)catequina y galoil-glucosa, respectivamente, mientras que el fragmento de  $301$  u se atribuye al anión de ácido elágico generado por reordenamiento de un residuo de HHDP (hexahidroxidifenoilo) (Cerulli y col., 2020), por lo que el compuesto fue identificado como HHDP-(epi)catequín-galoil-glucósido.

Entre los taninos condensados se identificaron dímeros (**20**, **22**, **30**, **31** y **34**), trímeros (**33** y **36**) y unidades monoméricas de proantocianidinas (**9**, **10** y **37**). Los dímeros y trímeros involucraron las unidades monoméricas: (epi)catequina (EC), (epi)galocatequina (EGC), galato de (epi)galocatequina (GEGC), C-metil (epi)robinetinidol (cMER), (epi)azfelequina (EA), galato de (epi)azfelequina (GEA), distenidina (DT) y teaflavina (TF).

El compuesto **9** presentó un ion cuasimolecular de  $m/z = 457$  u  $[M-H]^-$  y fragmentos  $m/z = 305$   $[(M-H) -152]^-$  y  $169$   $[(M-H)-288]^-$  correspondientes a galocatequina y ácido gálico, respectivamente. Por lo cual, **9** se identificó tentativamente como galato de (epi)galocatequina. Los compuestos **10** y **37** generaron el ion cuasimolecular  $m/z = 441$   $[M-H]^-$  y fragmentos principales de  $m/z = 289$  u  $[(M-H)$



-152]<sup>-</sup> ((epi)catequina) y  $m/z = 169$  u [(M-H) -272]<sup>-</sup> (ácido gálico), pudiendo tratarse de isómeros de galato de (epi)catequina (Pacífico y col., 2014).

En cuanto a los dímeros, **20** presentó el ion cuasimolecular  $m/z = 895$  u [M-H]<sup>-</sup> y un fragmento importante  $m/z = 453$  u [(M-H) -442]<sup>-</sup> (GEGC - 5H); la pérdida de 442 sugiere la presencia de GEC, la cual se confirma con el MS<sup>3</sup> de 857 u, donde se detectó un ion de  $m/z = 277$  [GEC-162]<sup>-</sup>; estos datos indican un dímero tipo A de GEC y GEGC. **22** fue identificado como un dímero tipo A de GEC debido a que su ion cuasimolecular  $m/z = 879$  u [M-H]<sup>-</sup> originó los iones de  $m/z = 843$  [(M-H)-36]<sup>-</sup> y 439 [(M-H)-440]<sup>-</sup> (GEC - 2H), la pérdida de 440 sugiere la presencia de GEC, que se confirma con el ion de  $m/z = 277$  [GEC-162]<sup>-</sup>. El compuesto **30** fue tentativamente identificado como dímero tipo A de cMER y EC por su ion cuasimolecular de  $m/z = 589$  u [M-H]<sup>-</sup> y el fragmento  $m/z = 300$  u [(M-H)-289]<sup>-</sup> (cMER - 4H), la pérdida de 289 fue atribuida a EC. Por su parte, **31** presentó un ion cuasimolecular de  $m/z = 863$  u [M-H]<sup>-</sup> y su MS/MS (863<sup>-</sup> → 827<sup>-</sup> → 647<sup>-</sup>) originó iones importantes de  $m/z = 425$  u [(M-H)-438]<sup>-</sup> (GEA-H), y 437 u [(M-H)-426]<sup>-</sup> (GEC - 5H), pérdidas que confirman los monómeros; por lo que **31** fue identificado como un dímero tipo A de GEC y GEA. Por otro lado, el ion cuasimolecular de **34**  $m/z = 819$  u [M-H]<sup>-</sup> y su fragmento mayoritario de  $m/z = 563$  u [(M-H) -256]<sup>-</sup> (TF - H), pérdida de 256 Da sugiere la presencia de DT, permiten identificar tentativamente a **34** como dímero tipo B de TF y DT.

Respecto a los trímeros, éstos fueron identificados como taninos condensados complejos que involucran una unidad de flavonol (Ma y col., 2014). El ion cuasimolecular de **33**  $m/z = 877$  u [M-H]<sup>-</sup> originó los iones  $m/z = 835$  [(M-H) -42]<sup>-</sup>,

588 u [(M-H) -289]<sup>-</sup> y 299 u [(M-H) -578]<sup>-</sup> (Quercetina - 3H); asimismo, el MS/MS del fragmento más abundante (588 u) originó el fragmento de  $m/z$  299 u [(M-H) -289-289]<sup>-</sup> por pérdidas atribuidas a EC; consecuentemente, **33** se identificó como trímero tipo B de EC-quercetina-EC. En cuanto a **36**, éste se identificó como un trímero tipo B de EC-kaempferol-EC, su patrón de fragmentación mostró el ion cuasimolecular de  $m/z$  = 861 u [M-H]<sup>-</sup> y fragmentos  $m/z$  = 572 u [(M-H) -289]<sup>-</sup> y 283 u [(M-H) -289-289]<sup>-</sup> (kaempferol - 3H); las pérdidas de 289 Da indican la presencia de dos moléculas de EC.

#### 9.3.2.2.4. Otros compuestos

El compuesto **8** fue identificado como el compuesto “shanzhiside”, un terpeno glicosilado previamente reportado en la literatura, que presentó el ion cuasimolecular  $m/z$  = 391 u [M-H]<sup>-</sup> y un fragmento de  $m/z$  = 229 u [(M-H) -162]<sup>-</sup> correspondiente a la pérdida de una hexosa (Wang y Feng, 2009; Xu y col., 2022; Zhou y col., 2010).

El compuesto **11** se identificó como shikonina (naftoquinona) basado en el ion cuasimolecular  $m/z$  = 287 u [M-H]<sup>-</sup> que produjo los iones prominentes  $m/z$  = 272 u [(M-H) -15]<sup>-</sup>, debido a la pérdida de un metilo (CH<sub>3</sub>), y  $m/z$  = 243 u [(M-H) -44]<sup>-</sup> por la pérdida de un grupo carboxilo (CO<sub>2</sub>) (Rui y col., 2020).

El compuesto **45** se identificó tentativamente como pinoestilbeno (estilbenoide) por el ion cuasimolecular  $m/z$  = 241 u [(M-H)]<sup>-</sup> y sus fragmentos  $m/z$  = 226 u [(M-H) -15]<sup>-</sup>, pérdida de un grupo metilo (15 Da), y  $m/z$  = 197 u [(M-H) -44]<sup>-</sup> que puede representar la pérdida de un grupo carboxilo (Alperth y col., 2023; Wang y col., 2022).

Los compuestos **1**, **13** y **39** no fueron identificados. El ion cuasimolecular de **1**  $m/z$  = 245 u [M-H]<sup>-</sup> originó los iones  $m/z$  = 209 u [(M-H)-36]<sup>-</sup>, 203 u [(M-H)-42]<sup>-</sup>, 191

u [(M-H)-54]<sup>-</sup> y 149 u [(M-H)-96]<sup>-</sup>; la pérdida de 42 Da puede estar asociada a un fragmento acetilo y los iones a 191 Da y 149 Da podrían atribuirse a los ácidos quínico y tartárico, respectivamente. El compuesto **13** presentó el ion cuasimolecular  $m/z = 429$  u [M-H]<sup>-</sup> y fragmentos de  $m/z = 385$  u [(M-H) -44]<sup>-</sup>, 367 u [(M-H) -18-44]<sup>-</sup>, 249 u [(M-H) -180]<sup>-</sup>, 205 u [(M-H) -224]<sup>-</sup> y 161 u [(M-H) -268]<sup>-</sup>; compuesto que tampoco pudo ser identificado por El-Hawary y col. (2020). De igual manera, el ion cuasimolecular de **39**  $m/z = 337$  u [M-H]<sup>-</sup> originó los iones  $m/z = 293$  u [(M-H) -44]<sup>-</sup>, 249 u [(M-H) -88]<sup>-</sup>, 129 u [(M-H) -214]<sup>-</sup> y 97 u [(M-H) -240]<sup>-</sup>; si bien se detectó la presencia de grupos carboxilos, la mayoría de los iones generados no fue posibles asociarlos con alguna estructura.

#### **9.4. Evaluación de la actividad biológica *in vitro***

##### **9.4.1. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los EM de las tres especies de *Graptopetalum* fue determinada por tres métodos distintos. La mayor actividad antioxidante ( $\mu\text{mol ET/g EM}$ ) la presentaron los EM de *G. rusbyi* (DPPH y ABTS) y *G. sinaloensis* (ORAC) (**Cuadro 12**), donde no se observó diferencia significativa entre dichas especies en ninguno de los métodos ( $P \leq 0.05$ ). En cuanto a la actividad antioxidante reportada como  $\text{IC}_{50}$ , el orden de actividad fue  $G. rusbyi \geq G. sinaloensis > G. occidentale$  (DPPH) y  $G. sinaloensis \approx G. rusbyi > G. occidentale$  (ABTS) (**Cuadro 13**).

**Cuadro 12.** Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas de las especies de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

Especie de <i>Graptopetalum</i>	Métodos de evaluación							
	DPPH		ABTS		ORAC			
	μmol ET/g EM	μmol ET/g b.f. <sup>2</sup>	μmol ET/g EM	μmol ET/g b.f.	μmol ET/g EM	μmol ET/g b.f.	μmol ET/g EM	μmol ET/g b.f.
<i>G. sinaloensis</i>	2838.5±49.32 <sup>a</sup>	71.2±1.23 <sup>a</sup>	4773.2±293.13 <sup>a</sup>	119.7±7.35 <sup>a</sup>	750.4±7.05 <sup>a</sup>	18.9±0.15 <sup>a</sup>		
<i>G. rusbyi</i>	2940.5±121.06 <sup>a</sup>	45.5±1.87 <sup>b</sup>	5307.2±122.34 <sup>a</sup>	82.2±1.89 <sup>b</sup>	730.1±39.06 <sup>a</sup>	11.7±0.07 <sup>b</sup>		
<i>G. occidentale</i>	2199.6±20.11 <sup>b</sup>	39.9±0.36 <sup>c</sup>	3179.8±0.22 <sup>b</sup>	57.7±0.004 <sup>c</sup>	553.1±44.32 <sup>b</sup>	10.4±0.50 <sup>c</sup>		
LSD	243.02	4.182	583.636	13.952	68.638	1.179		

<sup>1</sup>Los valores son la media ± desviación estándar de dos experimentos independientes por triplicado. Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq 0.05$ ). μmol ET/g b.f., micromoles equivalentes de Trolox en base fresca.

**Cuadro 13.** Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas de las especies de *Graptopetalum* expresada como concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>).<sup>1</sup>

Especie de <i>Graptopetalum</i>	DPPH	ABTS
	IC <sub>50</sub> (µg EM/mL)	
<i>G. sinaloensis</i>	237.2±3.46 <sup>a</sup>	117.4±0.07 <sup>b</sup>
<i>G. rusbyi</i>	234.4±4.50 <sup>a</sup>	107.2±3.67 <sup>c</sup>
<i>G. occidentale</i>	304.7±7.87 <sup>b</sup>	167.5±2.71 <sup>a</sup>
LSD	17.839	8.395

<sup>1</sup>Los valores son la media ± desviación estándar de dos experimentos independientes. Letras superíndices diferentes en una misma columna indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq 0.05$ ).

#### 9.4.2. Actividad inhibitoria de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* inhibieron la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con valores  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el rango de 126.85 a 72.30; *G. rusbyi* y *G. sinaloensis* fueron las especies más activas ( $P \leq 0.05$ ) (**Cuadro 14**). De manera importante, los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* presentaron valores significativamente menores (Dunnett,  $P < 0.05$ ) que el fármaco comercial acarbosa ( $IC_{50} = 968.9 \mu\text{g/mL}$ ) utilizado como control positivo.

#### 9.4.3. Actividad inmunomoduladora

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* incrementaron la proliferación de esplenocitos de ratón, excepto *G. occidentale* a 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 3**). Los EMs de *G. sinaloensis* y *G. rusbyi* a las tres concentraciones presentaron actividad similar ( $P > 0.05$ ) o superior ( $P \leq 0.05$ ) que LPS (21%). El mayor efecto se observó a 100  $\mu\text{g/mL}$  en *G. rusbyi* (55%) y *G. sinaloensis* (43%); sin embargo, la actividad fue menor que la presentada por ConA (78%) ( $P \leq 0.05$ ).

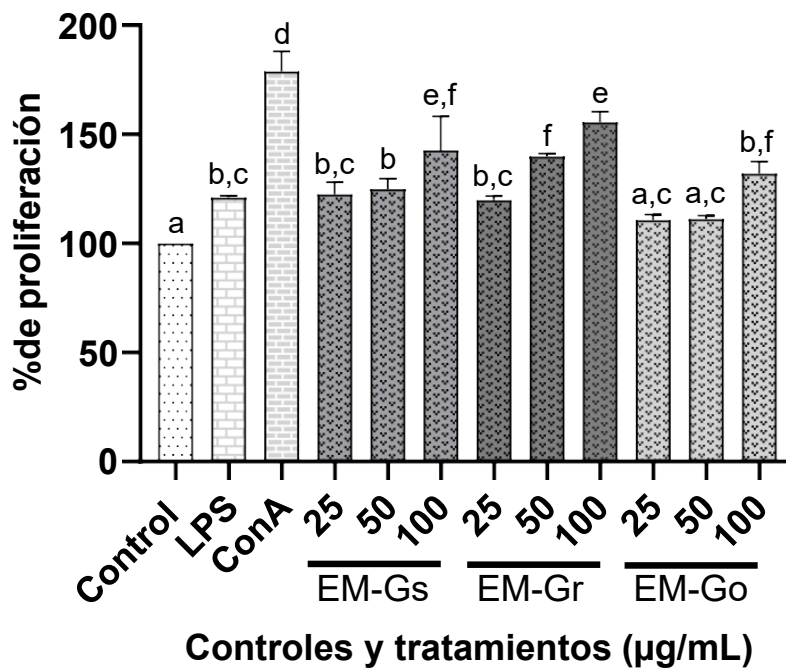
#### 9.4.4. Actividad antibacteriana

Las especies de *Graptopetalum* presentaron actividad antibacteriana al menos contra cuatro de las ocho cepas evaluadas en el ensayo por microdilución en caldo, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) estuvieron entre 1000 y 62.5  $\mu\text{g/mL}$  (**Cuadro 15**). Los EMs fueron activos únicamente contra cepas Gram positivas y el orden de actividad fue *G. sinaloensis*  $\cong$  *G. rusbyi*  $>$  *G. occidentale*. Los aislados clínicos *Streptococcus* grupo A4 y *S. aureus* 3 fueron las cepas más sensibles (CMI = 62.5 – 125  $\mu\text{g/mL}$ ), sin registrarse la CMB (CMB  $>$  1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Al respecto, el EM de

**Cuadro 14.** Concentración de los extractos metanólicos de las especies de *Graptopetalum* que inhibe el 50% de la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50}$ ).<sup>1</sup>

<b>Especie de <i>Graptopetalum</i></b>	<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>G. sinaloensis</i>	100.0 $\pm$ 11.45 <sup>ab</sup>
<i>G. rusbyi</i>	72.3 $\pm$ 2.56 <sup>a</sup>
<i>G. occidentale</i>	126.9 $\pm$ 13.78 <sup>b</sup>
LSD	33.2731

<sup>1</sup>Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar de dos ensayos independientes cada uno por triplicado. Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq 0.05$ ). Control positivo: acarbosa,  $IC_{50} = 968.9 \pm 76.57$   $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 3.** Efecto de los extractos metan3licos (EM) de las tres especies de *Graptopetalum* en la proliferaci3n de esplenocitos de rat3n. Los valores son la media de dos ensayos independientes  $\pm$  desviaci3n est3ndar cada uno por triplicado. Super3ndices diferentes indican diferencia significativa (Fisher,  $P < 0.05$ ) (LSD: 13.272). Los extractos metan3licos utilizados: *G. sinaloensis* (EM-Gs), *G. rusbyi* (EM-Gr) y *G. occidentale* (EM-Go). Los controles positivos lipopolisac3rido (LPS) (10 µg/mL) y Concanavalina A (ConA) (5µg/mL).



**Cuadro 15.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, µg/mL) y Mínima Bactericida (CMB, µg/mL) de los extractos metanólicos de hojas de las especies de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

Bacterias	Especie de <i>Graptopetalum</i>										
	<i>G. sinaloensis</i>		<i>G. rusbyi</i>		<i>G. occidentale</i>		Gentamicina <sup>2</sup>				
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
<b>Gram positivas (+)</b>											
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	250	1000	250	-	250	-	250	-	1	2	
<i>Streptococcus</i> grupo A-4	62.5	-	62.5	-	125	-	125	-	0.5	1	
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	62.5	-	62.5	-	125	-	125	-	0.5	1	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	125	-	125	-	250	-	250	-	4	4	
<b>Gram negativas (-)</b>											
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	1	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	

<sup>1</sup>La actividad antibacteriana fue evaluada hasta 1000 µg/mL y una concentración mínima de 15.62 µg/mL.

“-” Indica que el extracto no fue activo hasta la concentración máxima evaluada. <sup>2</sup>Se empleo gentamicina (16 a 0.25 µg/mL) como control positivo.

*G. sinaloensis* fue el único que mostró actividad bactericida a la máxima concentración evaluada (1000 µg/mL) contra *S. aureus* ATCC 29213. Los valores de CMI y CMB de los EMs de *Graptopetalum* fueron mayores al del control positivo gentamicina (CMI = 4 - 0.5 µg/mL; CMB = 1 – 4 µg/mL).

#### **9.4.5. Actividad antiparasitaria contra *G. duodenalis***

Los EMs de las tres especies, evaluados hasta 500 µg/mL, no afectaron la viabilidad y reproducción de los trofozoítos de *G. duodenalis*.

### **9.5. Evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos**

#### **9.5.1. Ensayo de toxicidad *in vitro* frente a nauplios de *Artemia salina***

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* resultaron no tóxicos hasta la máxima concentración evaluada (2000 ppm) en el ensayo de *A. salina* (**Cuadro 16**), registrándose ausencia de letalidad, cambios morfológicos y alteraciones en la motilidad de los nauplios. De acuerdo con lo establecido por Meyer y col. (1982), Sanabria-Galindo y col. (1997) y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Pinzón y Sánchez, 1995), los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* pueden clasificarse en la categoría de inocuos.

#### **9.5.2. Evaluación de toxicidad aguda en ratones BALB/c**

Todos los ratones tratados con los EMs (2 g/kg) de las tres especies de *Graptopetalum* se mantuvieron vivos hasta los 15 días posteriores a la administración de la dosis. En el periodo de observación, los ratones presentaron comportamiento normal y no mostraron indicios de reacciones adversas al tratamiento; únicamente se

**Cuadro 16.** Toxicidad de los extractos metanólicos de hojas de las especies de *Graptopetalum* sobre nauplios de *Artemia salina*.<sup>1, 2</sup>

Especie	Concentración (µg/mL)	Número de nauplios por pozo		Letalidad (%)
		Muertas	Totales	
<i>G. sinaloensis</i>	2000	0	10	0
	1000	0	10	0
	500	0	10	0
	100	0	10	0
	10	0	10	0
<i>G. rusbyi</i>	2000	0	10	0
	1000	0	10	0
	500	0	10	0
	100	0	10	0
	10	0	10	0
<i>G. occidentale</i>	2000	0	10	0
	1000	0	10	0
	500	0	10	0
	100	0	10	0
	10	0	10	0

<sup>1</sup>Los valores son el resultado de tres determinaciones. Blanco: Tween 80 (5%).

observó somnolencia en los primeros 30 min después de la administración de la dosis. El aumento de peso corporal, desde el inicio de la prueba hasta el final de la evaluación, fue similar entre los grupos tratados y el grupo control. En el mismo sentido, el peso de órganos vitales de animales tratados y sin tratar fue similar ( $P \leq 0.05$ ) (**Cuadro 17**). De manera similar, los parámetros hematológicos fueron similares entre los grupos (**Cuadro 18**).

#### **9.6. Análisis de correlación entre componentes químicos y actividades biológicas de los extractos metanólicos**

El análisis de Pearson mostró correlación entre componentes fitoquímicos y las actividades biológicas evaluadas (**Cuadro 19**). El contenido de fenólicos totales mostró correlación significativa y positiva fuerte con el contenido de taninos totales ( $r > 0.9902$ ;  $P = 0.0892$ ) y actividad antioxidante por los métodos DPPH ( $r > 0.9944$ ;  $P = 0.0676$ ) y ABTS ( $r > 0.9999$ ;  $P = 0.0064$ ). Por otro lado, la actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ( $\alpha$ G) mostró correlación negativa con el contenido de fenólicos totales ( $r > -0.9556$ ;  $P = 0.1904$ ). En concreto, los fenólicos totales mostraron la mayor correlación con las actividades biológicas evaluadas.

**Cuadro 17.** Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de 2000 mg/kg de extractos metanólicos de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

Tratamiento	Variación de peso (%) <sup>2</sup>	Peso de órgano en g/ 100 g de peso corporal				
		Hígado	Pulmones	Corazón	Riñones	Bazo
Control negativo	3.24±5.74	5.20±0.73 <sup>a</sup>	0.59±0.059 <sup>a</sup>	0.55±0.09 <sup>a</sup>	1.21±0.19 <sup>a</sup>	0.40±0.14 <sup>a</sup>
<i>G. sinaloensis</i>	-0.5±6.74	5.65±0.24 <sup>a</sup>	0.72±0.10 <sup>a</sup>	0.52±0.12 <sup>a</sup>	1.30±0.03 <sup>a</sup>	0.39±0.13 <sup>a</sup>
<i>G. rusbyi</i>	-2±3.49	4.86±0.29 <sup>a</sup>	0.68±0.08 <sup>a</sup>	0.49±0.08 <sup>a</sup>	1.23±0.12 <sup>a</sup>	0.41±0.10 <sup>a</sup>
<i>G. occidentale</i>	2.75±7.0	5.01±0.05 <sup>a</sup>	0.68±0.05 <sup>a</sup>	0.52±0.01 <sup>a</sup>	1.19±0.07 <sup>a</sup>	0.47±0.09 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Los valores son la media ± desviación estándar (n = 3). Superíndices diferentes indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq 0.05$ ). <sup>2</sup>Variación de peso de los grupos tratados con respecto al primer y último día después de la administración.

**Cuadro 18.** Efecto en los parámetros hematológicos de ratones BALB/c después de la administración oral de 2000 mg/kg de extractos metanólicos de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

Parámetros hematológicos	Tratamiento			
	Control	<i>G. sinaloensis</i>	<i>G. rusbyi</i>	<i>G. occidentale</i>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13.76±0.94 <sup>a</sup>	13.56±0.75 <sup>a</sup>	13.6±0.55 <sup>a</sup>	13.43±0.55 <sup>a</sup>
<b>Hematocrito (%)</b>	42.83±1.30 <sup>a</sup>	42.80±1.90 <sup>a</sup>	42.2±2.40 <sup>a</sup>	43.06±2.65 <sup>a</sup>
<b>Glóbulos rojos (10<sup>6</sup>/uL)</b>	8.44±1.56 <sup>a</sup>	7.59±0.57 <sup>a</sup>	8.13±0.25 <sup>a</sup>	8.58±0.56 <sup>a</sup>
<b>Glóbulos blancos (10<sup>3</sup>/uL)</b>	5.57±1.70 <sup>a</sup>	5.35±1.55 <sup>a</sup>	5.29±0.80 <sup>a</sup>	4.24±0.99 <sup>a</sup>
<b>Linfocitos (%)</b>	80.66±2.51 <sup>a</sup>	92±9.53 <sup>a</sup>	80±7.211 <sup>a</sup>	85.33±4.93 <sup>a</sup>
<b>Granulocitos (%)</b>	17.66±2.51 <sup>ab</sup>	7.33±8.38 <sup>a</sup>	19.33±7.02 <sup>b</sup>	13.33± 4.61 <sup>ab</sup>
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/uL)</b>	708.66±32.59 <sup>a</sup>	767.66±123.71 <sup>a</sup>	786.33±137.62 <sup>a</sup>	785±124.43 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Los valores son la media ± desviación estándar (n = 3). Superíndices diferentes indican diferencia significativa (Fisher, P ≤ 0.05).

**Cuadro 19.** Correlación de Pearson entre las actividades biológicas y los compuestos químicos de los extractos metanólicos de las especies de *Graptopetalum*.<sup>1</sup>

	FT	FlaT	TT	DPPH	DPPH(IC <sub>50</sub> )	ABTS	ABTS(IC <sub>50</sub> )	ORAC	INM	IαG
FT	1	-0.5087 (0.6603)	0.9902 <b>(0.0892)</b>	0.9944 <b>(0.0676)</b>	-0.9803 (0.1265)	0.9999 <b>(0.0064)</b>	-0.9972 <b>(0.0474)</b>	0.9471 (0.2080)	0.9432 (0.2157)	-0.9556 (0.1904)
FlaT	-0.5087 (0.6603)	1	-0.6240 (0.5711)	-0.4145 (0.7279)	0.3287 (0.7868)	-0.5173 (0.6538)	0.4432 (0.7077)	-0.2055 (0.8683)	-0.7659 (0.4446)	0.7398 (0.4699)
TT	0.9902 <b>(0.0892)</b>	-0.6240 (0.5711)	1	0.9698 (0.1568)	-0.9431 (0.2157)	0.9916 <b>(0.0828)</b>	-0.9771 (0.1366)	0.8930 (0.2972)	0.9803 (0.1265)	-0.9874 <b>(0.1012)</b>
DPPH	0.9944 <b>(0.0676)</b>	-0.4145 (0.7279)	0.9698 (0.1568)	1	-0.9957 <b>(0.0589)</b>	0.9932 <b>(0.0740)</b>	-0.9995 <b>(0.0202)</b>	0.9758 (0.1404)	0.9026 (0.2833)	-0.9190 (0.2580)
DPPH(IC <sub>50</sub> )	-0.9803 (0.1265)	0.3287 (0.7868)	-0.9431 (0.2157)	-0.9957 <b>(0.0589)</b>	1	-0.9783 (0.1329)	0.9923 <b>(0.0791)</b>	-0.9918 <b>(0.0815)</b>	-0.8590 (0.3422)	0.8786 (0.3169)
ABTS	0.9999 <b>(0.0064)</b>	-0.5173 (0.6538)	0.9916 <b>(0.0828)</b>	0.9932 <b>(0.0740)</b>	-0.9783 (0.1329)	1	-0.9964 <b>(0.0538)</b>	0.9438 (0.2144)	0.9465 (0.2092)	-0.9585 (0.1840)
ABTS(IC <sub>50</sub> )	-0.9972 <b>(0.0474)</b>	0.4432 (0.7077)	-0.9771 (0.1366)	-0.9995 <b>(0.0202)</b>	0.9923 <b>(0.0791)</b>	-0.9964 <b>(0.0538)</b>	1	-0.9684 (0.1606)	-0.9158 (0.2631)	0.9310 (0.2378)
ORAC	0.9471 (0.2080)	-0.2055 (0.8683)	0.8930 (0.2972)	0.9758 (0.1404)	-0.9918 <b>(0.0815)</b>	0.9438 (0.2144)	-0.9684 (0.1606)	1	0.7866 (0.4237)	-0.8105 (0.3984)
INM	0.9432 (0.2157)	-0.7659 (0.4446)	0.9803 (0.1265)	0.9026 (0.2833)	-0.8590 (0.3422)	0.9465 (0.2092)	-0.9158 (0.2631)	0.7866 (0.4237)	1	-0.9992 <b>(0.0253)</b>
IαG	-0.9556 (0.1904)	0.7398 (0.4699)	-0.9874 <b>(0.1012)</b>	-0.9190 (0.2580)	0.8786 (0.3169)	-0.9585 (0.1840)	0.9310 (0.2378)	-0.8105 (0.3984)	-0.9992 <b>(0.0253)</b>	1

<sup>1</sup> Valores en negritas indican correlación significativa diferente de cero ( $p \leq 0.1$ ). <sup>2</sup> Actividad antioxidante: **DPPH**, **ABTS** y **ORAC**. **FT**, fenólicos totales; **FlaT**, flavonoides totales; **TT**, taninos totales; **IαG**, Inhibición de la enzima α-glucosidasa; **INM**, Inmunomodulador (% Proliferación de esplenocitos).

## X. DISCUSIÓN

### 10.1. Humedad y rendimiento de extracción

La humedad de las hojas de las tres especies de *Graptopetalum* fue superior al 90%. Estas plantas pertenecen a la familia Crassulaceae y presentan Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés), caracterizándose por almacenar grandes cantidades de agua (Atmaca, 2022; Niechayev y col., 2019). El contenido de humedad coincide con lo reportado para *G. paraguayense* (>96%) (Chung y col., 2012; Wu y col., 2011) y crasuláceas del estado de Sinaloa (*E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida*) (93.6 - 96.5%) (López-Angulo y col., 2019).

Los rendimientos de extracción para los EMs de las especies de *Graptopetalum* oscilaron entre el 20.65% y el 26.13%. Al respecto, los rendimientos de los extractos acuosos de *G. paraguayense* estuvieron en el rango de 3.84 a 45.20% (Ai y col., 2017; Chung y col., 2012; Wu y col., 2011), mientras que para extractos etanólicos fue de 1.95 a 3.84% (Chou y col., 2008; Chung y col., 2005; Huang y col., 2005). En comparación con especies pertenecientes a la familia Crassulaceae, en este trabajo se obtuvieron rendimientos para el EM similares a los reportados en *Rhodiola rosea* (25%) (Olennikov y col., 2020) y mayores rendimientos a los reportados para *Bryophyllum pinnatum* (10.46%) (Bhandari y col., 2021). Por otra parte, estos resultados también fueron similares a los reportados para el EM de *E. subrigida* (20.7%) e inferiores a los de *E. craigiana* (32.3%) y *E. kimnachii* (40.3%) (López-Angulo y col., 2019). La diferencia de rendimiento entre especies de Crassulaceae depende de diversos factores tales como composición química, solvente de extracción y método de extracción. De esta manera, la selección de las condiciones de extracción es esencial



para maximizar el contenido de metabolitos y actividades biológicas de la muestra (Hayouni y col., 2007; Lezoul y col., 2020).

## **10.2. Caracterización fitoquímica**

Los metabolitos secundarios son comunes en plantas y muy importantes en sus procesos fisiológicos y ecológicos, por ejemplo, en fotosíntesis, polinización, protección contra predadores y adaptación al entorno, entre otros. Las plantas producen estas sustancias en respuesta al estrés biótico (e.g., herbívoros y microorganismos) y abiótico (e.g., sequia, temperatura y salinidad) a través de estímulos celulares; éstos promueven cascadas de señalización en diversos tejidos (e.g., hojas, tallos, raíces, flores y frutos) que resultan en los ajustes metabólicos que la planta requiere (de Melo y col., 2023). Los metabolitos secundarios muestran una diversidad de actividades biológicas tales como antioxidante, antimicrobiana, antifúngica y antiviral; además, algunos de ellos contribuyen a la nutrición. Esta combinación de propiedades ha permitido que muchas plantas sean utilizadas en medicina tradicional y en las industria farmacéutica, química y alimentaria (de Melo y col., 2023).

### **10.2.1. Análisis fitoquímico cualitativo**

El análisis fitoquímico cualitativo de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* mostró la presencia de terpenos, flavonoides, taninos y poca presencia de saponinas. Los grupos de compuestos identificados tuvieron una proporción similar en las tres especies. Actualmente, la información sobre la composición química para especies de *Graptopetalum* es escasa; sin embargo, algunos autores han descrito la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos/proantocianidinas y

otros componentes como esteroides y terpenos (Ai y col., 2017; Chao y col., 2019; Todorovay col., 2022), información que coincide con los hallazgos en el presente estudio. Por otro lado, algunos géneros de la familia Crassulaceae (e.g., *Crassula*, *Echeveria*, *Sedum*, *Bryophyllum*) presentan una abundante cantidad de esteroides, triterpenos, flavonoides, cumarinas, taninos, saponinas, antraquinonas libres, lactonas y alcaloides; componentes que se han asociado a diversas actividades biológicas (e.g., antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, anticonvulsivante, anticancerígena y antidiabética) (Elufioye y col., 2022; Hassan y col., 2021).

## **10.2.2. Cuantificación de metabolitos totales**

### *10.2.2.1. Fenólicos totales*

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos de amplia distribución en plantas. Los fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, e incluyen una amplia variedad de compuestos, por ejemplo, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanos y estilbenoides (Elufioye y col., 2019). La presencia de estos componentes en la dieta humana puede ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (de Melo y col., 2023). Algunas especies de la familia Crassulaceae (e.g., *Rhodiola*, *Kalanchoe*, *Echeveria*, *Sedum*, *Crassula*) presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antidiabéticas que se han asociado a sus compuestos fenólicos (Eid y Gonaid, 2018; Hassan y col., 2021).

El contenido de fenólicos totales en los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* (88.19 - 133.34 mg EAG/g EM) fue mayor que el registrado para extractos acuosos de *G. paraguayense* (23 - 56.4 mg EAG/g) (Chao y col., 2019;

Chung y col., 2005; Wu y col., 2011) y similar o menor al de especies de *Echeveria* del estado de Sinaloa (*E. craigiana* = 102.1 mg EAG/g; *E. kimnachii* = 108.8 mg EAG/g; y *E. subrigida* = 302.8 mg EAG/g) (López-Angulo y col., 2019). En comparación con otras especies de la familia de las crasuláceas, el contenido de fenólicos totales fue mayor que los reportados para un EM de *B. pinnatum* (8.30 mg EAG/g) (Elufioye y col., 2019), extractos hidroalcohólicos de raíces y retoños de algunas especies de *Rhodiola* (21.24 - 79.2 mg EAG/g) (Kumar y col., 2010), un extracto acuoso de *Orostachys japonicus* (39.9 mg EAG/g) (Ko y col., 2020) y un extracto etanólico de *Penthorum chinense* (19.83 mg EAG/g) (Kim y col., 2021).

En comparación con otros productos caracterizados por presentar compuestos fenólicos, los EMs de *Graptopetalum* presentaron valores superiores que los extractos hidroalcohólicos de 13 tipos de frutos de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) (0.44-7.94 mg EAG/g) (Di Lorenzo y col., 2019) y diversos tipos de té verde, negro y azul (*Camellia sinensis*) (21.3-31.6 mg EAG/g) (Bizuayehu y col., 2016).

Nuestros resultados indicaron un alto contenido de compuestos fenólicos en las especies de *Graptopetalum*. En este sentido, el contenido de FT de los EMs puede ser responsable de las actividades biológicas registradas en la presente investigación, como se discutirá en las siguientes secciones.

#### 10.2.2.2. Flavonoides totales

Los flavonoides son compuestos bioactivos caracterizados por su anillo benzopirona con grupos fenólicos o polifenólicos en diversas posiciones. A la fecha se han identificado una gran diversidad de flavonoides (Ullah y col., 2020). Su abundancia en diferentes partes de las plantas les confiere valor medicinal y diversas actividades

biológicas. Los flavonoides han sido ampliamente reconocidos como agentes terapéuticos, destacando su aplicación en medicina como anticancerígenos, antimicrobianos, antivirales, antioxidantes, entre otras actividades benéficas para la salud (Ullah y col., 2020).

El contenido de flavonoides totales (FVT) de las especies de *Graptopetalum* de Sinaloa (15.51 – 22.12 mg EQ/g EM) fue más alto que el del extracto acuoso de *G. paraguayense* (1.03 mg EQ/g) (Lee y col., 2023). Respecto a otras especies de Crassulaceae, el contenido de FVT del EM al 80% de hojas de *B. pinnatum* (17.49 mg EQ/g) (Elufioye y col., 2019), un extracto acuoso de *O. japonicus* (17.5 mg EQ/g) (Ko y col., 2020) y un EM de *P. chinense* (10.89 mg EQ/g) (Kim y col., 2021) fue menor que el registrado para nuestros extractos; mientras que los valores para EMs de tres especies de *Echeveria* (*E. craigiana* = 24.4mg EQ/g; *E. subrigida* = 23.9 mg EQ/g; y *E. kimnachii* = 12.7 mg EQ/g) (López- Angulo y col., 2019) fueron similares a los de las tres especies de *Graptopetalum*.

#### 10.2.2.3. Taninos totales

Los taninos son compuestos fenólicos complejos derivados de la polimerización de ciertos flavonoides (e.g., catequina o epicatequina). Éstos se clasifican en taninos hidrolizables y condensados (proantocianidinas). Los taninos pueden interactuar con biomoléculas como proteínas o carbohidratos, lo que los distingue de otros polifenoles (de Melo y col., 2023).

El contenido de taninos totales (TT) de las especies de *Graptopetalum* (482.13 - 1159.46 mg EC/g EM) coincidió con los valores de FT. A la fecha, el contenido de taninos de otras especies de *Graptopetalum* no ha sido reportado. Sin embargo, existe

información sobre otras especies de crasuláceas. Los valores de TT en *Graptopetalum* fueron superiores a los de los EMs de *Sedum villosum* (7.42 mg EC/g), *B. pinnatum* (17.03 mg EAG/mg) y rizomas de *R. imbricata* (260 mg EAG/g) (Elufioye y col., 2019; Hadri-Ghembaza y col., 2014; Senthilkumar y col., 2013). Asimismo, los *Graptopetalum* tuvieron más TT que un extracto de gel de *Aloe vera* (14.97 mg EC/g), especie de metabolismo CAM (Tabatabaei y col., 2017).

### **10.3. Identificación y cuantificación de componentes individuales**

#### **10.3.1. Perfil de compuestos lipofílicos**

Actualmente, el uso de compuestos bioactivos derivados de recursos naturales en productos alimenticios, farmacológicos y nutracéuticos con el fin de aprovechar su potencial biológico es de gran importancia (Anal y col., 2023). Un gran número de estos compuestos son lipofílicos, por ejemplo, ácidos grasos insaturados, carotenoides, fitoesteroles, terpenos y vitaminas liposolubles. El consumo de algunos compuestos lipofílicos (e.g., carotenoides y vitaminas liposolubles) proporciona beneficios en la salud humana, controlando y reduciendo el riesgo de contraer enfermedades infecciosas y crónico degenerativas (Banwo y col., 2021). En general, estos compuestos desempeñan un papel importante en funciones estructurales, defensa, producción y señalización hormonal, así como otras funciones biológicas en los organismos (Ambavade y col., 2014; Yang., 2020). En este sentido, este tipo de componentes químicos poseen un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, inmunomoduladora y antibacteriana. Asimismo, a partir de compuestos lipofílicos se han derivado fármacos

tales como el cortisol, el ácido fusídico, la carbenoxolona y la  $\beta$ -escina (Hisham y col., 2020).

Los terpenos y esteroides presentan gran diversidad estructural y una amplia distribución en fuentes naturales (Hisham y col., 2020). Los terpenos son hidrocarburos que generalmente se encuentran en aceites esenciales, presentan estructuras lineales o cíclicas, su precursor es el isopreno y se clasifican según el número de unidades que presenten (*e.g.*, monoterpeno, sesquiterpeno, diterpeno, triterpeno) (Yang., 2020). Entre los terpenos tenemos a los tocoferoles, éstos son epímeros de la vitamina E y comúnmente se presentan en cuatro formas:  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. Entre estas isoformas, el  $\alpha$ -tocoferol se considera la forma más activa de vitamina E, desempeñando un papel importante en la protección de las células contra el daño oxidativo causado por los radicales libres (Munné-Bosch y Alegre, 2002).

Por otra parte, los esteroides (*e.g.*, colesterol, sitosterol, estigmasterol) forman parte de una categoría específica de lípidos conformados por compuestos cíclicos con un núcleo de cuatro anillos de carbono fusionados (anillos ciclopentano perhidrofenantreno) y un grupo funcional hidroxilo (-OH) en una de las posiciones del anillo A (Ambavade y col., 2014). Los fitoesteroides son compuestos similares al colesterol que se encuentran de forma natural en las plantas, siendo los más abundantes  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol. Estos compuestos son esenciales en la salud humana al tener la capacidad de reducir los niveles de colesterol en plasma y presentar actividades biológicas relevantes (*e.g.*, antiinflamatorias, antidiabéticas y anticancerígenas) (Miras-Moreno y col., 2016).

El análisis por GC-MS de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* mostró como compuestos mayoritarios al  $\gamma$ -sitosterol y  $\alpha$ -tocoferol. En un estudio previo, Todorova y col. (2022) analizaron el perfil metabólico de *G. paraguayense* por GC-MS e identificaron  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol y  $\alpha$ -tocoferol como los compuestos predominantes en la fracción de esteroides, terpenoides y tocoferoles. Por otro lado, López-Angulo y col. (2019) reportaron un alto contenido de  $\alpha$ -tocoferol en especies de *Echeveria* del estado de Sinaloa. Además, se identificó a  $\gamma$ -sitosterol como uno de los constituyentes principales (López-Angulo y col., 2018).

El  $\alpha$ -tocoferol es uno de los antioxidantes liposolubles de mayor actividad y de gran importancia para la salud (Yoshida y col., 2007). Con respecto al  $\gamma$ -sitosterol, su epímero  $\beta$ -sitosterol es uno de los fitoconstituyentes de mayor abundancia en plantas y ha sido ampliamente estudiado, reportándose diversas actividades como antioxidante, antidiabético, antimicrobiano, antiinflamatorio, anticancerígeno, anticonceptivo, angiogénico e inmunomodulador (Ambavade y col., 2014). En este sentido, Balamurugan y col. (2011) demostraron que el  $\gamma$ -sitosterol reduce la hiperglucemia mediante el aumento de la secreción de insulina y la inhibición de gluconeogénesis en ratas diabéticas, sugiriendo su potencial antidiabético. En estudios posteriores, los autores demostraron mediante análisis *in silico* que el  $\gamma$ -sitosterol es un buen ligando de algunas proteínas diana relacionadas con la diabetes *mellitus* (Balamurugan y col., 2012). Además, Sundarraj y col. (2012) establecieron que el  $\gamma$ -sitosterol tiene potencial anticancerígeno debido a su efecto en el ciclo celular, afectando proliferación y apoptosis en células cancerosas.

Otros fitoesteroles encontrados en las tres especies de *Graptopetalum* fueron el campesterol y fucosterol. Hasta la fecha, no se han registrado informes en el género que indiquen la presencia de estos compuestos. No obstante, la presencia de estos componentes se ha reportado en otras plantas de géneros de crasuláceas como *Kalanchoe pinnata* (Akihisa y col., 1991; Sharmin y col., 2016), así como en especies de *Echeveria* del estado de Sinaloa y en 17 especies de *Echeveria* de México (Beltrán-Aguilar, 2020; López-Angulo y col., 2018). Debido a su similitud estructural con el colesterol, los esteroides vegetales, incluyendo el campesterol, poseen efectos reductores de niveles plasmáticos de colesterol. Además de esta propiedad, los esteroides vegetales desempeñan diversas funciones biológicas adicionales, tales como su potencial anticancerígeno, propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas (Choi y col., 2007). En concreto se ha establecido que el campesterol posee propiedades anticancerígenas y quimiopreventivas ante distintos tipos de cáncer (e.g., próstata, pulmón, mama) (Choi y col., 2007).

El fucosterol es uno de los esteroides más abundantes en las macroalgas marinas (Hannan y col., 2020). Este compuesto presenta una amplia gama de propiedades biológicas, lo que lo convierte en un prometedor candidato para aplicaciones nutracéuticas y farmacéuticas. Entre estas propiedades se incluyen su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antiosteoartrítica, anticancerígena, antifotoenvejecimiento, hepatoprotectora, antineurológica, algicida, antiobesidad, antimicrobiana e inmunomoduladora (Meinita y col., 2021).

El 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol) fue otro componente presente en las tres especies de *Graptopetalum*. El fitol es un alcohol diterpénico acíclico



insaturado que forma parte de la clorofila y es abundante en la naturaleza al ser producido por la gran mayoría de los organismos fotosintéticos (Islam y col., 2018). El fitol exhibe efectos ansiolíticos, citotóxicos, moduladores del metabolismo, antioxidantes, inductores de autofagia y apoptosis, antinociceptivos, antiinflamatorios, inmunomoduladores y antimicrobianos (Islam y col., 2018).

En relación con los triterpenos detectados en los EMs de las especies de *Graptopetalum*, algunos podrían considerarse como marcadores quimiotaxonómicos:  $\alpha$ -amirina para *G. sinaloensis* y *G. rusbyi*, hopenona B y lupeol para *G. occidentale*, baurenol para *G. sinaloensis* y simiarenol para *G. rusbyi*. Al respecto,  $\beta$ -amirina es uno de los compuestos lipofílicos predominantes en *G. paraguayense* (Todorova y col., 2022). Por otro lado,  $\alpha$ -amirina ha sido ampliamente descrita en diversas especies de *Kalanchoe* (*K. pinnata*, *K. crenatra* y *K. tomentosa*) (Ghoneim y col.; Rathour y col., 2013; Yadav y col., 2014), así como en *Bryophyllum calycinum* y *B. daigremontianum* (Pandurangan y col., 2019; Sharker y col., 2013). La  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina presentan actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral (Hernández-Vázquez y col., 2012). Por otra parte, lupeol ha sido identificado en otras crasuláceas como *K. pinnata* (Yadav y col., 2014) y algunas especies de *Echeveria* (*E. gibbiflora* y *E. gigantea*) (Beltrán-Aguilar, 2020), mientras que hopenona B en *E. kimnachii* (López-Angulo y col., 2018). Entre las actividades biológicas del lupeol están las antioxidantes, antimutagénicas, antiinflamatorias, antiartríticas, antifúngicas y antibacterianas (Ekalu y col., 2019; Parsaeimehr y col., 2017). Además, el lupeol posee actividad anticancerígena al inhibir varias vías de señalización (Lee y col., 2007; Saleem y col., 2004). Por su parte, la

hopenona B ha sido relacionada con actividad antitumoral en estudios *in vitro* y se ha descrito como un potente analgésico y antiinflamatorio (Veloz y col., 2019). Acerca del simiarenol, éste actúa en sinergia con otros componentes no polares para potenciar las actividades antioxidante, antiinflamatoria y leishmanicida (Amin y col., 2017; El Hawary y col., 2021). Por otro lado, el baurenol presenta efecto antinociceptivo en un modelo murino (Freitas y col., 2009).

Otros componentes identificados incluyen escualeno y ácidos grasos, los cuales también tienen descritas actividades biológicas (Choudhary y col., 2019). El escualeno se ha asociado con actividad antioxidante, anticancerígena, antitumoral, antimicrobiana, quimiopreventiva y pesticida, entre otras (Ezhilan y Neelamegam, 2012). Los ácidos palmítico y oleico fueron detectados en las tres especies de *Graptopetalum* y entre las actividades descritas se encuentran prevención del cáncer, antiinflamatorias, antioxidantes, antiandrogénicas, hipocolesterolemiantes, dermatogénicas, efectos anemogénicos, capacidad para inhibir la 5-alfa reductasa, además de actuar como nematocidas e insectocidas (Choudhary y col., 2019). Por otro lado, el ácido mirístico se detectó exclusivamente en *G. sinaloensis* y *G. rusbyi*, y se le atribuyen propiedades biológicas similares a las del ácido oleico y palmítico (Choudhary y col., 2019).

### **10.3.2. Perfil de compuestos fenólicos**

Las actividades biológicas de los compuestos fenólicos y su asociación en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades y trastornos crónico-degenerativos continúan siendo de especial interés (Zhang y col., 2022). Se ha establecido que los fenólicos presentan efectos antioxidantes, antimicrobianos,

antivirales, antiparasitarios, anticancerígenos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, analgésicos, antiaterogénicos, antialérgicos y cardioprotectores, entre otros. Por lo tanto, se ha sugerido su participación en la prevención/tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo y enfermedades infecciosas (Zhang y col., 2022). Esto sugiere un amplio campo de posibilidades en la identificación y estudio de nuevos compuestos de este tipo.

La familia Crassulaceae es conocida por su abundancia de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides que se destacan por su ubicuidad y actividades biológicas beneficiosas para la salud humana (Eid y Gonaïd, 2018; Karak, 2019). Los flavonoides pueden presentarse como agliconas (formas libres) pero son más abundantes las formas glicosiladas (Dias y col., 2021). En este contexto, la glicosilación es un mecanismo que potencia la solubilidad, la distribución y el metabolismo de estos componentes al simplificar su transporte y almacenamiento en las células (Dias y col., 2021). Aspectos como la presencia, ubicación, estructura y cantidad de grupos de azúcar en los flavonoides desempeñan un papel crucial en sus actividades biológicas (Kumar y Pandey, 2013). Por lo general, las agliconas tienden a ser más activas que sus formas glucosídicas equivalentes, aunque la biodisponibilidad puede beneficiarse de su unión a carbohidratos (Kumar y Pandey, 2013).

Actualmente la caracterización del perfil de compuestos fenólicos en el género *Graptopetalum* es muy escasa. El análisis de los EMS de las tres especies de *Graptopetalum* de Sinaloa por HPLC/ESI-MS mostró predominancia de ácidos fenólicos derivados de los ácidos gálico, cumárico, cafeico y siríngico y de flavonoides

glicosilados derivados de quercetina, kaempferol, miricetina y luteolina; así como dímeros y trímeros compuestos por unidades de (epi)catequina, (epi)galocatequina y (epi)catequin galato, (epi)robinetinidol, (epi)azfelequina, galato de (epi)azfelequina, distenidina y teaflavina (**Cuadro 11**). En estudios previos de *G. paraguayense* se han identificado entre sus componentes principales a flavonoides y acetil glucósidos de flavonol sustituidos con un grupo HMG. Liu y col. (2015) analizaron el EM de *G. paraguayense* e identificaron isoquercetina, kaempferol, quercetín-3-O-[6-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)]-β-D-glucopiranosido, kaempferol-3-O-[6-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)]-β-D-glucopiranosido, quercetín-3-O-[6-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-2-acetil]-β-D-glucopiranosido, kaempferol-3-O-[6-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-2-acetil]-β-D-glucopiranosido y kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosido. Por su parte Zhang y col. (2016) identificaron en una fracción en acetato de etilo de *G. paraguayense* a componentes como el ácido gálico, isoquercetín-6-O-(3-hidroxi-3-metilglutarato), astragalin-6-(3-hidroxi-3-metilglutarato), isoquercetin-2-acetil-6-(3-hidroxi-3-metilglutarato) y astragalin-2-acetil-6-(3-hidroxi-3-metilglutarato), lo que coincide con los compuestos **2**, **23** y **26** encontrados en las tres especies de *Graptopetalum* estudiadas. Por otro lado, en la fracción más activa de un extracto en DMSO (30%) de *G. paraguayense* se identificaron compuestos poliméricos de tipo tanino, constituidos principalmente por epicatequina, (-)-epigalocatequina, galato de (-)-epigalocatequina y (-)-epicatequina-3-O-galato (Hsu y col., 2019), igualmente, las especies de *Graptopetalum* estudiadas en este trabajo presentaron los taninos condensados **9**, **10**, **20**, **22**, **30**, **31** y **37**.

Con respecto a otros géneros en familia Crassulaceae, en nuestro grupo de trabajo se caracterizaron mediante HPLC-DAD-ESI/MS tres especies de *Echeveria* (Crassulaceae) del estado de Sinaloa (*E. subrigida*, *E. kimnachii*, *E. craigiana*), entre los compuestos identificados se incluyen hexósidos derivados de quercetina e isoramnetina (HMG sustituidos), derivados de kaempferol y proantocianidinas (López-Angulo y col., 2018). En *E. subrigida* se observó la presencia de quercetín-7-O-hexósido, isoramnetín-3-O-hexósido y kaempferol-3-O-hexósido; en *E. kimnachii* se identificaron derivados de kaempferol (O,O-disustituidos) y proantocianidinas como galato de (epi)galocatequina; mientras que en *E. craigiana* se observaron los compuestos quercetín-7-O-[3-hidroxi-3-metilglutaroil(1→2)] hexósido e isoramnetín-7-O-[3-hidroxi-3-metilglutaroil(1→2)]hexósido (López-Angulo y col., 2018). Posteriormente, Beltrán-Aguilar (2020) empleó HPLC-ESI/MS/MS para analizar los EMs de 17 especies de *Echeveria* de México e identificó ácidos fenólicos, proantocianidinas y derivados de quercetina, kaempferol e isoramnetina, reportando en una de las especies más activas (*E. secunda*) los flavonoides miricetín-O-hexósido, petunidín-O-hexósido, quercetín-3-O-(ramnosil)-7-O-HMG-hexósido, quercetín-O-hexósido, quercetín-O-ramnosil-O-(diacetil)hexósido y quercetín-ramnósido y otros compuestos como galato de galocatequina y (epi)galocatequín-3-O-galato. Algunos de estos compuestos fueron identificados en las especies de *Graptopetalum* en estudio. Adicionalmente, la presencia del sustituyente HMG y de carbohidratos acetilados parece ser característico en especies de la familia Crassulaceae.

Por otra parte, en especies de *Rhodiola* se han descrito glicósidos de quercetina, kaempferol, gosipetina y herbacetina (Iwashina y col., 2023; Petsalo y col., 2006); así

como otros componentes, por ejemplo, ácido gálico y proantocianidinas conformadas por catequina, (epi)catequina, (epi)galocatequina y ésteres 3-O-galato (Han y col., 2016; Yousef y col., 2006). En especies de *Kalanchoe* se han identificado glicósidos derivados de quercetina, isoramnetina y kaempferol (El Abdellaoui y col., 2010), derivados de ácidos benzoicos (e.g., gálico, siríngico, protocatecúico) y derivados del ácido cinámico (e.g., cafeico, *p*-cumárico, ferúlico) (Bogucka-Kocka y col., 2018). Al respecto, los derivados de ácidos fenólicos (e.g., cafeico, elágico, cumárico, cresótico, málico, músico, siríngico) también estuvieron presentes en las especies de *Graptopetalum*. Mientras que en especies de *Bryophyllum* se ha reportado la presencia de glicósidos de miricetina, kaempferol, quercetina y espinacetina, además se describieron otras subclases de componentes como flavonas glicosiladas derivadas de apigenina y acacetina y glicósidos de antocianinas derivados de malvidina (García-Pérez y col., 2021). Los derivados de kaempferol y quercetina suelen ser muy comunes en extractos de plantas (Dabeek y Marra, 2019), en el caso de miricetina es menos común y solo fue identificado un derivado de miricetina (miricetín-O-(acetil)hexósido) en *G. rusbyi*.

#### **10.4. Evaluación de la actividad biológica *in vitro***

##### **10.4.1. Actividad antioxidante**

Actualmente, la identificación y cuantificación de antioxidantes de diversas fuentes naturales para encontrar compuestos efectivos que mitiguen el estrés oxidativo tiene gran relevancia. Generalmente los extractos naturales están conformados por compuestos con diversas características que pueden llevar a más de un mecanismo para mitigar el estrés oxidativo, por lo cual es fundamental utilizar más de un enfoque

para determinar el potencial antioxidante (AAox) en productos naturales (Diniz do Nascimento y col., 2020). Algunos de los métodos analíticos para detectar y medir la actividad AAox son simples, eficientes y rentables (Normah y Hanapi, 2019). Existen dos tipos de enfoques para determinar la AAox en una muestra, métodos basados en transferencia de electrones (e.g., FRAP y CUPRAC) y de átomos de hidrógeno (e.g., ORAC) (Floegel y col., 2011; Normah y Hanapi, 2019). En general, la capacidad antioxidante de un compuesto es establecida en términos de equivalentes de Trolox (Miller y col., 1993).

Los valores de AAox ( $\mu\text{mol ET/g EM}$ ) de las especies de *Graptopetalum* fueron mayores por el método ABTS (3179.17 a 5307.24) que por los métodos DPPH (2199.58 a 2940.47) y ORAC (553.08 a 750.35), lo cual podría deberse a la naturaleza de detección de los métodos. El ensayo DPPH detecta mejor compuestos hidrofílicos, mientras que el ensayo ABTS es aplicable tanto a hidrofílicos como lipofílicos. Por su parte, el método ORAC mide la inactivación de radicales por transferencia de átomos de hidrógeno y la versión empleada es mejor para compuestos hidrofílicos (Floegel y col., 2011). Esto sugiere que la actividad presentada por las especies de *Graptopetalum* podría deberse a un efecto aditivo o una sinergia entre compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica.

Los EMs de *Graptopetalum* mostraron valores de AAox altos ( $\mu\text{mol ET/g b.f}$ ) en comparación con ciertos frutos caracterizados por sus propiedades antioxidantes. En concreto fueron superiores a los presentados por fresas (*Fragaria × ananassa*) por DPPH (6.83) y comparables por ORAC (21.18) (Kevers y col., 2007). Por otro lado, se observaron valores de AAox superiores por el método ABTS que los registrados para

distintos tipos de arándanos (*Vaccinium ashei* Reade) (27.60) y zarzamoras (20.3) (*Rubus L.*) (Sellappan y col., 2002). Asimismo, mostraron valores más altos que frambuesas (*Rubus idaeus*) por DPPH (29.0) y ABTS (39.5) (Mihailović y col., 2019). Sin embargo, los valores por ORAC fueron inferiores a los reportados para frambuesas negras (*Rubus occidentalis L.*) (28.2) pero similares a los de frambuesas rojas (18.2) (*Rubus idaeus*) (Wang y Lin, 2000).

Los reportes que evalúen la AAox de especies de *Graptopetalum* en términos de  $\mu\text{mol ET}$  son inexistentes. Sin embargo, la concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) de extractos acuosos y etanólicos de *G. paraguayense* está reportada por los métodos DPPH (1.45 a 4.14 mg/mL) y ABTS (0.300 a 620  $\mu\text{g/mL}$ ) (Chung y col., 2005; Ai y col., 2017), presentando valores mayores y por lo tanto ser menos activos en comparación con nuestros resultados (DPPH = 234.38 a 304.70  $\mu\text{g/mL}$ ; ABTS = 107.16 a 167.45  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Cuadro 12**). En cuanto a otras especies de la familia Crassulaceae, se han reportado valores de  $\text{IC}_{50}$  más altos para el aceite esencial de *B. pinnatum* (DPPH = 789  $\mu\text{g/mL}$ ) (Adibe y col., 2019) y el EM de *R. imbricata* (DPPH = 330  $\mu\text{g/mL}$ ) (Kumar y col., 2010); así como valores comparables en diversas especies de *Kalanchoe* (DPPH = 61.5 a 1457  $\mu\text{g/mL}$ ) (Bogucka-Kocka y col., 2018). Por otro lado, la AAox ( $\mu\text{mol ET/g EM}$ ) presentada por los EMs de *Graptopetalum* estuvo dentro de los rangos reportados para 17 especies de *Echeveria* por DPPH (934.8 - 3607.6), ABTS (586.1 - 4126.5) y ORAC (265.4 - 1069.3) (Beltrán-Aguilar, 2020).

Diversos estudios han descrito la correlación entre la AAox de extractos de plantas y su contenido de fenólicos (Floegel y col., 2011; Wu y col., 2011). En nuestro estudio, el contenido de FT correlacionó fuerte y significativamente con la AAox por los



métodos DPPH ( $r = 0.9944$ ,  $P = 0.0676$ ) y ABTS ( $r = 0.9999$ ,  $P = 0.0064$ ), lo cual podría sugerir que estos contribuyen de manera importante con la actividad. Específicamente la AAox mostró una mejor correlación con el contenido de TT por el método ABTS ( $r = 0.9916$ ,  $P = 0.0828$ ). Por otra parte, se encontró al  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) como uno de los componentes lipofílicos principales y es un potente antioxidante (Yoshida y col., 2007) que podría contribuir, en sinergia con otros componentes, en la AAox de las muestras.

#### **10.4.2. Actividad inhibitoria de la enzima $\alpha$ -glucosidasa**

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un grave problema de salud pública en el mundo que afecta a más de 220 millones de personas (Li y col., 2022). La DM2 es un trastorno metabólico caracterizado por niveles anormalmente altos de glucosa en sangre; enfermedad que a largo plazo puede provocar complicaciones graves e irreversibles en el organismo (Yin y col., 2014). Una de las principales estrategias empleadas en el control de los niveles de glucosa se basa en retardar la absorción de carbohidratos complejos a nivel intestinal mediante el uso de fármacos (e.g., acarbosa, miglitol, voglibosa) que inhiben enzimas digestivas como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa. No obstante, la mayoría de estos agentes terapéuticos han sido asociados con efectos adversos intestinales graves, aunado a la resistencia que puede generar el uso prolongado en pacientes durante el régimen terapéutico (Li y col., 2022; Yin y col., 2014). Debido a esto se ha vuelto fundamental encontrar nuevas alternativas más eficientes y seguras para el control de este trastorno metabólico.

Este estudio mostró que los EMs de *Graptopetalum* fueron de 8 a 14 veces mejores inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50} = 126.85 - 72.30 \mu\text{g/mL}$ ) que el fármaco

comercial acarbosa ( $IC_{50} = 968.85 \mu\text{g/mL}$ ). A la fecha, este es el primer reporte de esta actividad para plantas del género *Graptopetalum*. Sin embargo, Lee y col. (2013) reportaron una reducción en los niveles de glucosa en sangre de ratones C57BL/6 tratados con el extracto etanólico de *G. paraguayense*, registrando aumento en la síntesis de insulina, supresión de la expresión de la proteína potenciadora CCAAT y mejora en la sensibilidad a la insulina.

Varios estudios han descrito la actividad antihiper glucemiante de extractos de diversas especies de la familia Crassulaceae, demostrando inhibición de enzimas implicadas en la absorción de carbohidratos como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa. Kwon y col. (2006) reportaron que extractos acuosos y etanólicos de especies de *Rhodiola* presentaron valores de  $IC_{50}$  de  $\alpha$ -glucosidasa similares o menores a los obtenidos en el presente estudio: 44.7 a 52.3  $\mu\text{g/mL}$  para *R. rosea* y 60.3 a 60.2  $\mu\text{g/mL}$  para *R. crenulata*. Dichos extractos mostraron mayor actividad que el compuesto aislado tirosol ( $IC_{50} = 70.8 \mu\text{g/mL}$ ), utilizado como control positivo en el estudio. Los autores establecieron una correlación entre la actividad inhibitoria y los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en los extractos, tales como el ácido gálico, ácido cumárico y el propio tirosol. El tirosol resultó crítico para la alta actividad que presentan estas especies. En estudios posteriores, se aislaron cuatro compuestos del extracto acuoso de *R. crenulata* con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50}$ ): epicatequina (29.85  $\mu\text{M}$ ), procianidina B 2-3'-O-galato (0.31  $\mu\text{M}$ ), galato de epicatequina (0.71  $\mu\text{M}$ ) y 2-(4-hidroxifenil) etil-3,4,5-trihidroxibenzoato (4.77  $\mu\text{M}$ ). Estos valores fueron mucho menores que el de quercetina (5.30  $\mu\text{M}$ ) y muestran el gran potencial antihiper glucemiante de estos compuestos y de extractos estandarizados de *R.*

*crenulata* (Chu y col., 2014). Por su parte, Osman y col. (2022) encontraron valores de IC<sub>50</sub> para una fracción butanólica y un EM de *Kalanchoe laxiflora* de 89.02 y 190.7 µg/mL, respectivamente, siendo 3 y 6 veces menos activos que su control positivo acarbosa (30.57 µg/mL). En el estudio se identificaron 35 compuestos principales, en su mayoría taninos y flavonoide-O-glicósidos (Osman y col., 2022).

En comparación con otros géneros de crasuláceas, 16 especies de *Echeveria* de México presentaron mejor actividad inhibitoria de α-glucosidasa (IC<sub>50</sub> = 16.9 a 51.2 µg/mL) que la acarbosa (IC<sub>50</sub> = 3.89 mg/mL), destacando *E. secunda* como la más activa (Beltrán-Aguilar, 2020). Respecto a especies del estado de Sinaloa, López-Angulo y col. (2019) reportaron valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) de 25.21 (*E. subrigida*), 56.67 (*E. craigiana*) y 50.57 (*E. kimnachii*), presentando una actividad superior a la acarbosa (IC<sub>50</sub> 3.59 mg/mL).

En el presente estudio no se observó una correlación específica entre la actividad IαG con alguno de los componentes químicos cuantificados, por lo que es necesario realizar estudios adicionales para la identificación de compuestos específicos responsables de dicha actividad. Al respecto, López-Angulo y col. (2019) realizaron un fraccionamiento biodirigido en *E. subrigida* e identificaron como responsables de la actividad inhibitoria de α-glucosidasa a compuestos derivados de flavonoides (e.g., quercetín-3-O-glucósido e isoramnetín-3-O-glucósido) y taninos condensados (trímeros a heptámeros de proantocianidinas), compuestos que ya han sido reportados por poseer dicha actividad (López-Angulo y col., 2022). En el análisis de compuestos fenólicos, las especies de *Graptopetalum* contienen compuestos fenólicos de tipo

flavonoide (glicósidos de quercetina, kaempferol y miricetina) y taninos (hidrolizables y condensados) que podrían relacionarse con la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa.

La información disponible en la literatura muestra que fenólicos, particularmente flavonoides, desempeñan un papel esencial en la actividad antidiabética que presentan numerosas plantas (Şöhretoğlu y Sari, 2020). Yin y col. (2014) reportaron la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de 103 flavonoides de 24 géneros diferentes de plantas entre los que se incluían xantonas, flavononas, flavonas, antocianinas, chalconas, entre otras estructuras modificadas. Por su parte, Wang y col. (2020) reportaron una gran actividad inhibitoria de 32 tipos de flavonoides identificados a partir de una fracción del extracto etanólico de *Radix scutellariae*, sugiriendo una posible aplicación de dichos flavonoides en el tratamiento de la DM2. En este sentido, los flavonoides tienen gran potencial como inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa debido a su gran diversidad estructural. En particular, las agliconas tienden a presentar mayor actividad que sus glucósidos. En la relación estructura actividad, la evidencia muestra que la presencia de un doble enlace entre la posición C-2 y C-3 y un grupo hidroxilo (-OH) libre en la posición C-4' son críticos para la inhibición enzimática. Adicionalmente, la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones C-3 y C-7 y en diversas posiciones del anillo B, así como la presencia del oxígeno del carbonilo en C-4 son clave para mejorar la actividad. Estos grupos participan en las interacciones con la enzima a través de puentes de hidrógeno (Şöhretoğlu y Sari, 2020).

#### **10.4.3. Actividad inmunomoduladora**

El sistema inmunológico es indispensable para mantener la salud humana. Sin embargo, distintos factores como el estrés oxidativo pueden desregular este sistema

y provocar trastornos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes, tumores y cáncer (Han y col., 2022). Actualmente, la búsqueda de productos naturales que modulen el sistema inmunológico se ha incrementado. Al respecto, las plantas son una fuente importante de compuestos de gran diversidad estructural (e.g., fenoles, polifenoles, flavonoides, taninos, fitoesteroles) que presentan diversas actividades biológicas, tales como antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora (Maheshwari y col., 2022; Zhong y col., 2022). Al respecto, un inmunomodulador se define como una sustancia capaz de regular el sistema inmunológico, ya sea al inducir la estimulación (inmunoestimulante) o suprimir la respuesta inmune (inmunosupresor) (Nair y col., 2019).

Los EM de las especies de *Graptopetalum* presentaron actividad inmunomoduladora al estimular la proliferación de esplenocitos de ratón. La mayor actividad se registró a 100 µg/mL y *G. rusbyi* fue la especie más activa (55%), resultando mejor que el mitógeno de células B (LPS, 21%) pero menos activo que el de células T (ConA, 78%). Estudios futuros deben demostrar qué tipos de células afectan estos extractos.

Algunos estudios han reportado la actividad inmunomoduladora con respecto a proliferación de esplenocitos de ratón. Nuestros resultados coinciden con los reportados por López-Angulo y col. (2022) para las especies de *E. subrigida* (34%), *E. kimnachiei* (20%) y *E. craigiana* (9%) a la concentración de 10 µg/mL. Manosroi y col. (2003) registraron incremento en la proliferación de esplenocitos al tratarlos con 112.5 µg/mL de extractos de *Clausena excavata* (acuoso, 20%; acetónico, 80%; etanólico, 120%). El incremento en la proliferación de esplenocitos con los extractos acetónico y

etanólico fue superior al observado con los extractos de las especies de este estudio. Por otro lado, los valores obtenidos por las especies de *Graptopetalum* en este estudio son comparables a los de un compuesto aislado de *Zingiber zerumbet* (zerumbone), que incrementó la proliferación de esplenocitos de ratones en 41.99% (7.5 µg/mL) después de 48 h de tratamiento (Keong y col., 2010).

Otras especies de Crassulaceae han mostrado actividad inmunomoduladora por otros mecanismos. Chou y col. (2011) reportaron que el extracto de *R. rosea* estandarizado en salidrósido (4.39% p/v) moduló la expresión de citocinas proinflamatorias en un modelo murino previamente sensibilizado con ovoalbúmina. Además, el extracto resultó ser más efectivo que el tratamiento con salidrósido puro, adjudicando la actividad a un efecto sinérgico con otros compuestos no identificados. En este sentido, el extracto acuoso de *R. imbricata* estimuló la respuesta innata y adaptativa en monocitos de sangre periférica humana al aumentar la expresión de receptores TLR-4 y la producción intracelular de granzima B, a la par de un aumento en la actividad de citocinas tipo Th1 (Mishra y col., 2012). Por otro lado, el tratamiento oral con el extracto acuoso de *B. pinnatum* promovió un efecto protector contra reacciones proanafilácticas en modelo murino hipersensibilizado con ovoalbúmina, modulando a la baja la expresión de inmunoglobulinas E, eosinofilia y la expresión de ciertas citocinas (e.g., IL-5, IL-10 y TNF- $\alpha$ ). Adicionalmente, la quercetina aislada del extracto inhibió en 75% las reacciones anafilácticas mortales de los ratones tratados (Al-Snafi, 2013).

En este estudio, no se encontró una correlación significativa entre la actividad inmunomoduladora *in vitro* de las especies de *Graptopetalum* con alguno de los

componentes químicos. En estudios previos, Lin y Tang (2007) analizaron el efecto inmunomodulador *in vitro* de frutas y verduras de colores intensos sobre la proliferación de esplenocitos de ratón (BALB/c). Los autores describieron que la mora, fresa y cebolla morada estimulan dicha actividad, relacionándose con su contenido de fenólicos y flavonoides totales. En contraste, una variedad de melón amargo inhibió la proliferación de esplenocitos, correlacionándose con su contenido total de fenólicos y flavonoides. Esto podría indicar que diferentes tipos de fenólicos pueden ser inmunoestimuladores o inmunosupresores de la proliferación de esplenocitos (Lin y Tang, 2007). Consecuentemente, los estudios sobre inmunomodulación de las especies de *Graptopetalum* deben continuar para identificar los compuestos específicos asociados a la actividad. Al respecto, varios estudios sobre el efecto inmunomodulador de diversos tipos de flavonoides han demostrado que presentan propiedades antiinflamatorias y supresoras de la proliferación de esplenocitos, especialmente en células T, argumentando que la presencia de insaturaciones en la posición C-2,3 y al menos un grupo hidroxilo en el anillo B resulta crítico para ejercer dicha acción (Cerqueira y col., 2003; López-Posadas y col., 2008; Namgoong y col., 1994; You y col., 1998). Además, se ha observado que las sustituciones glicosídicas pueden inhibir en cierto grado este efecto supresor (Namgoong y col., 1994). Sin embargo, epicatequina, proantocianidina B2 y proantocianidina B4 carecen de estas insaturaciones e inducen la proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratón (Zhao y col., 2007).

Raj y Gothandam (2015) demostraron el efecto inmunomodulador del extracto metanólico de *Amorphophallus commutatus* en condiciones normales e

inmunosuprimidas en modelo murino; el extracto exhibió actividad mitogénica y comitogénica en esplenocitos murinos, activación de la respuesta inmune humoral y supresión de la respuesta inmunitaria mediada por células. Los autores analizaron la muestra mediante GC-MS y mostraron que sus principales constituyentes fueron el ácido hexadecanoico, campesterol, estigmasterol y en mayor medida  $\gamma$ -sitosterol. Estos compuestos están en las especies de *Graptopetalum* y podrían estar involucrados en su actividad inmunomoduladora. Por otro lado, el extracto clorofórmico de hojas de *Nitraria retusa* presenta efecto antitumoral, demostrando que el tratamiento con este extracto (50 mg/kg p.c.) restauró la proliferación de los esplenocitos en un modelo de ratón con melanoma, identificándose como componentes principales del extracto el ácido palmítico y el  $\beta$ -sitosterol, atribuyendo el efecto antitumoral a estos compuestos (Boubaker y col., 2018).

#### **10.4.4. Actividad antibacteriana**

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* bajo estudio, resultaron activos solo contra bacterias Gram positivas (CMI = 250 - 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ). En coincidencia con nuestros resultados, estudios previos han demostrado que las bacterias Gram positivas son más sensibles a los productos naturales (Chouna y col., 2009; Królicka y col., 2008; Ming y col., 2005). Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular más gruesa compuesta por peptidoglucano que las bacterias Gram negativas, aunque estas últimas presentan una membrana externa adicional. La pared celular de las bacterias Gram positivas es menos compleja y con mayor tamaño de poro, lo que facilita la entrada de sustancias. Las diferencias estructurales entre estos tipos de bacterias afectan sus propiedades, especialmente en su respuesta a estresores



externos, lo cual explicaría la ausencia de actividad de los EMs de *Graptopetalum* sobre las cepas Gram negativas (Borroto y col., 2011; Mai-Prochnow y col., 2016).

Nuestros resultados coinciden con lo registrado para el EM de *G. paraguayense* contra cepas similares a las utilizadas en nuestro estudio (e.g., *S. aureus*, ATCC 29213, *E. faecalis*, ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) NBIMCC 8327 (“National Bank for Industrial Microorganisms”, Bulgaria), *S. pyogenes* SAIM 10535). Las especies Gram negativas no mostraron susceptibilidad (CMI > 5 mg/mL); mientras que los valores de CMI contra las bacterias Gram positivas estuvieron en el rango 2.5 – 5 mg/mL, resultando más efectivo contra *Staphylococcus* (2.5 mg/mL) y *Streptococcus* (5 mg/mL) (Zaharieva y col., 2019). Los EMs de *Graptopetalum* fueron más activos que el de *G. paraguayense*.

La actividad antibacteriana de otras especies de la familia Crassulaceae ha sido evaluada. Por ejemplo, el extracto clorofórmico de *Sedum caeruleum* fue activo contra nueve cepas bacterianas (CMI = 80 µg/mL), incluyendo *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922 (Bensouici y col., 2016). Por otro lado, la CMI del EM de *Kalanchoe crenata* fue de 1.6 mg/mL contra *S. aureus* ATCC 25922 y *E. faecalis* ATCC 1054, además de mostrar actividad contra bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* 27853 (3.2 mg/mL), *E. coli* ATCC 11775 (0.8 mg/mL) y *S. enterica* serovar Typhi (1.6 mg/mL) (Foutse y col., 2014). Sin embargo, el valor de CMI contra bacterias Gram negativas carece de relevancia clínica. Valores de CMI en el rango de los obtenidos en la presente investigación son los reportados para el EM de *B. pinnatum* contra *S. aureus* (CMI = 512 µg/mL), *P. aeruginosa* (CMI = 256 µg/mL) y *S. Typhi* (CMI = 64 µg/mL) (Tatsimo y col., 2012).

Acerca de crasuláceas del estado de Sinaloa, *E. subrigida* presenta buena actividad antibacteriana contra cinco cepas bacterianas (*S. aureus* 29213, *Streptococcus* grupo A-4, *S. aureus* 3, *E. coli* AO11 y *S. dysenteriae*) (CMI = 15.63 - 125 µg/mL), siendo especialmente activa ante las cepas de *S. aureus* (CMI = 15.63 – 62.5 µg/mL); mientras que los valores para los EMs de *E. kimnachii* y *E. craigiana* estuvieron en el rango de 31.5 a 1000 µg/mL. Asimismo, en dicho estudio registraron actividad contra las cepas Gram negativas *E. coli* AO11 y *Shigella dysenteriae*, destacando la actividad de *E. subrigida* con valores de hasta 62.5 µg/mL (López-Angulo y col., 2019). Estas especies de *Echeveria* fueron más activas que las especies de *Graptopetalum* analizadas en esta investigación.

Los estudios de actividad antibacteriana de especies de Crassulaceae sugieren que entre los compuestos responsables se encuentran fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas (Bensouici y col., 2016; López-Angulo y col., 2019; Tajudin y Ismail, 2022; Tatsimo y col., 2012). Al respecto, los compuestos fenólicos muestran una amplia diversidad estructural y se ha observado que los numerosos grupos hidroxilo (-OH) presentes en estos compuestos contribuyen a su actividad antimicrobiana. Los grupos -OH interactúan con componentes de la membrana celular de las bacterias, dañan su integridad y liberan componentes celulares (Gyawali e Ibrahim, 2014). La capacidad de los fenólicos para acumularse en la superficie de la envoltura celular y penetrar en el citoplasma de las células microbianas depende de su grado de hidrofobicidad (Oulahal y Degraeve, 2022). Algunos investigadores sugieren que los grupos hidroxilo activos promueven la deslocalización de electrones y actúan como transportadores de protones, lo que reduce el gradiente de protones en

la membrana citoplasmática de las células bacterianas (Gyawali e Ibrahim, 2014; Gyawali y col., 2015; Mummed y col., 2018). Estos compuestos pueden interactuar dentro del citoplasma con diversos componentes celulares o modificar el pH intracelular, lo que puede afectar la estructura del ADN y ARN, la síntesis de proteínas e inducir la aglomeración de componentes citoplasmáticos (Oulahal y Degraeve, 2022). Además, estos grupos -OH pueden unirse fácilmente al sitio activo de enzimas, alterando así el metabolismo celular de los microorganismos, agotando las reservas de ATP y en última instancia provocando la muerte celular. Por otro lado, estos grupos facilitan la formación de complejos con proteínas solubles y extracelulares que desempeñan diversas funciones, como la inhibición de la división celular bacteriana (Gyawali e Ibrahim, 2014; Gyawali y col., 2015; Mummed y col., 2018).

Con base en lo anterior, el análisis fitoquímico de las especies de *Graptopetalum* reveló la presencia de fenólicos, flavonoides, taninos y saponinas; así como un mayor contenido de compuestos fenólicos en las dos especies con mayor actividad antibacteriana (*G. sinaloensis* y *G. rusbyi*); componentes que pudiera actuar de manera sinérgica y ser los responsables de la actividad de los EMs. Estudios previos soportan esta suposición (Królicka y col., 2008). En este sentido el análisis de componentes individuales indicó la presencia de compuestos fenólicos (e.g., derivados de ácido gálico, siríngico, quercetina, kaempferol, miricetina, catequina y epicatequina), y compuestos lipofílicos (e.g., sitosterol, fitol, campesterol, lupeol,  $\alpha$ -amirina) que han sido reportados en estudios de actividad antibacteriana (Akroum y col., 2009; Ambavade y col., 2014; Hernández-Vázquez y col., 2012; Islam y col., 2018; Meinita y col., 2021; Mounir y col., 2023; Oulahal y Degraeve, 2022).

En general las CMI para los extractos metanólicos de especies de *Graptopetalum* estuvieron en un rango de 62.5-250 µg/mL, demostrando una actividad significativa (Tamokou y col., 2017). En particular, *G. sinaloensis* y *G. rusbyi* presentaron CMI de 62.5 µg/mL contra *Streptococcus* grupo A-4 y *S. aureus* 3, siendo concentraciones altamente activas (CMI < 64-100 µg/mL) (Tamokou y col., 2017). Estos hallazgos sugieren un potencial considerable para la presencia de componentes individuales con mayor actividad y de relevancia clínica (Gibbons, 2004; Tatsimo y col., 2012; Tamokou y col., 2017).

#### **10.4.5. Actividad antiparasitaria**

Los EMs de *Graptopetalum* evaluados a una concentración máxima de 500 µg/mL no indujeron cambios en la viabilidad y reproducción de los trofozoítos de *G. duodenalis*; mientras que el fármaco comercial metronidazol utilizado normalmente como control positivo presentó IC<sub>50</sub> desde 0.09 hasta 2.5 µg/mL (Abraham y col., 2019; Elizondo-Luévano y col., 2021; Ticona y col., 2022). Acorde al criterio de clasificación establecido por Amaral y col. (2006) para extractos naturales, que indica que valores de IC<sub>50</sub> iguales o superiores a 500 µg/mL se consideran inactivos, los EMs de *Graptopetalum* solo se evaluaron hasta dicha concentración.

Actualmente, el efecto de extractos de especies de *Graptopetalum* contra *G. duodenalis* u otros parásitos de interés clínico no ha sido reportado. Sin embargo, algunas especies de la familia Crassulaceae presentan actividad antiparasitaria. Al respecto, el extracto acuoso de *K. pinnata* tiene actividad contra *Leishmania amazonensis*; el extracto estimula la respuesta inmunológica en modelos murinos y disminuye el tamaño de las lesiones inducidas por el protozoario. Asimismo, los

autores mostraron que el extracto acuoso presenta diversos fitoquímicos tales como flavonoides (Da Silva y col., 1995). En el mismo sentido, la administración oral del extracto acuoso de *K. pinnata* resultó efectivo y seguro en el tratamiento de la leishmaniosis humana (Torres-Santos y col., 2003). La actividad ha sido atribuida a compuestos flavonoides como quercetina y kaempferol, así como algunos flavonoides como quercetín 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido y kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (Costa y col., 2008). Por otro lado, Elizondo-Luévano y col. (2021) demostraron que el EM de *Kalanchoe daigremontiana* afectó el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica* (IC<sub>50</sub> = 70.71  $\mu$ g/mL) y *Trichomonas vaginalis* (IC<sub>50</sub> = 105.27  $\mu$ g/mL). Asimismo, extractos clorofórmicos y metanólicos de *Echeveria leucotricha* redujeron en un 64 y 52% la proliferación *in vitro* de *Leishmania donovani*, actividad que fue comparable a la registrada para los flavonoides puros quercetín-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosido, quercetín-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido, kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosido y 4',5-dihidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido; compuestos previamente identificados en *K. pinnata* (Martínez Ruiz y col., 2013).

La mayoría de los estudios sobre actividad antiparasitaria de especies de Crassulaceae ha sido asociada con flavonoides. El análisis fitoquímico de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* mostró un contenido similar de flavonoides, además en el análisis del perfil de compuestos fenólicos se encontraron glicósidos derivados de quercetina, kaempferol y miricetina, lo cual no repercutió en actividad contra *G. duodenalis*.

## **10.5. Evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos**

### **10.5.1. Ensayo de toxicidad *in vitro* frente a nauplios de *Artemia salina***

Los productos naturales son una valiosa fuente de componentes con potencial biológico para desarrollar nuevos medicamentos. Sin embargo, es fundamental considerar los aspectos tóxicos que podrían provocar efectos secundarios adversos. Por lo tanto, los estudios de toxicidad a la par con la evaluación de la actividad farmacológica son necesarios para garantizar parámetros de seguridad e inocuidad (Ntungwe y col., 2020). En este sentido, el modelo de *Artemia salina* es una herramienta útil en estudios preliminares de toxicidad de productos naturales, al mostrar una buena correlación con otros modelos de toxicidad (Meyer y col., 1982; Ntungwe y col., 2020).

Al respecto, los EMs de tres especies de *Graptopetalum* fueron inocuos ( $CL_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$ ) al no presentar mortalidad, además de no registrarse cambios en la apariencia y motilidad de los nauplios. Los reportes previos de toxicidad en *A. salina* de extractos de especies de *Graptopetalum* son inexistentes. En evaluaciones en otros modelos, extractos acuosos de *G. paraguayense* no mostraron toxicidad o mutagenicidad, evaluados de 1 a 5 mg/mL, en el ensayo de Ames (Chou y col., 2005). En especies de *Echeveria* del estado de Sinaloa (*E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida*), los extractos metanólicos fueron inocuos hasta una concentración máxima de 2000 ppm en el ensayo de *A. salina*, coincidiendo con los resultados del presente estudio (López-Angulo y col., 2022).

De acuerdo con la literatura, y los criterios establecidos por Meyer y col. (1982) y el CYTED (Pinzón y Sánchez, 1995), los EMs de *Graptopetalum* podrían

considerarse inocuos. Sin embargo, realizar ensayos adicionales y específicos en un modelo *in vivo* para confirmar su seguridad es necesario.

#### **10.5.2. Evaluación de toxicidad aguda en ratones BALB/c**

Los estudios de toxicidad aguda *in vivo* desempeñan un papel fundamental en la valoración de la seguridad de productos químicos con potencial terapéutico. Este proceso proporciona información sobre los posibles riesgos para la salud humana a causa de una exposición a corto plazo a través de la ingestión de dichos productos (EPA, 1998). En el presente estudio, los ratones BALB/c tratados con una dosis del EM de *Graptopetalum* (2 g/kg p.c.) sobrevivieron y no mostraron signos de toxicidad en un periodo de 14 días después de la administración oral. Asimismo, las características anatómicas y macroscópicas de los órganos de los ratones tratados fueron normales, sin presentarse variaciones en el peso corporal y de los órganos vitales. Anteriormente se demostró que *G. paraguayense* fue inocuo en modelo murino de toxicidad aguda al aplicarse una dosis oral de 5 g/kg p.c. (Chung y col., 2012).

Otras especies de Crassulaceae también han resultado inocuas a dosis de 2 g/kg. Chatterjee y col. (2015) demostraron la seguridad de un extracto metanólico de *R. rosea* al evaluar la toxicidad aguda en modelo murino tras 14 días de su administración. En este sentido, Amali y col. (2019) no reportaron ningún efecto toxico significativo, estableciendo una  $DL_{50} > 2$  g/kg p.c. para un extracto etanólico de *B. pinnatum*. Respecto a especies de *Echeveria* del estado de Sinaloa (*E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida*), los EMs fueron inocuos en el ensayo de toxicidad aguda en ratones ( $DL_{50} > 2$  g/kg p.c.) (López-Angulo y col., 2022).

Los resultados obtenidos en la presente investigación y la información existente en la literatura permiten sugerir que los EMs de *Graptopetalum* son inocuos y pueden clasificarse en la categoría cinco (muy bajo riesgo) del sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS). Sin embargo, aún es necesario realizar estudios de toxicidad crónica para establecer una mayor seguridad en su uso (OECD, 2022).



## XI. CONCLUSIONES

### 11.1. Conclusión general

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* nativas de Sinaloa (*G. sianloensis*, *G. rubsyi*, *G. occidentale*) presentaron compuestos lipofílicos (e.g.,  $\gamma$ -sitosterol y  $\alpha$ -tocoferol) e hidrofílicos (e.g., ácidos fenólicos, flavonoides y taninos) que podrían ser los responsables de su actividad antioxidante, inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, inmunomoduladora sobre la proliferación de esplenocitos de ratón y antibacteriana *in vitro*. Asimismo, los EMs resultaron inocuos en los modelos de *Artemia salina* y de toxicidad aguda en ratones.

### 11.2. Conclusiones específicas

El análisis fitoquímico cualitativo de los extractos metanólicos de *Graptopetalum* reveló la presencia de flavonoides, taninos, terpenos, esteroides y saponinas, presentando una proporción similar entre especies.

El contenido de metabolitos totales mostró diferencias significativas entre las especies, destacando a *G. rubsyi* por su contenido de fenólicos y taninos totales.

El análisis de compuestos lipofílicos por GC-MS reveló a  $\gamma$ -sitosterol y  $\alpha$ -tocoferol como los compuestos mayoritarios en las tres especies.

El análisis por HPLC-MS en las especies de *Graptopetalum* indicó la presencia de 46 compuestos fenólicos, destacando la presencia de 14 derivados de ácidos fenólicos (e.g., cumárico, cafeico, eláxico, gálico, málico, siríngico), 13 derivados de flavonoides (e.g., kaempferol, luteolina, miricetina, quercetina), 11 taninos (monómeros, dímeros y trímeros de (epi)catequina, (epi)galocatequina, galato de (epi)galocatequina, C-metil (epi)robinetinidol, (epi)azfelequina, galato de

(epi)azfelequina, distenidina y teaflavina) y otros compuestos específicos (e.g., shanzhiside, shikonina, pinostilbeno).

La actividad antioxidante de los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* presentó correlación positiva significativa con el contenido de compuestos fenólicos, los cuales junto con el  $\alpha$ -tocoferol pueden estar relacionados de manera sinérgica con dicha actividad.

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* fueron de 8 a 14 veces mejores inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa que la acarbosa, destacando a *G. rusbyi* como la especie con mayor actividad ( $IC_{50} = 72.30 \mu\text{g/mL}$ ).

Las tres especies de *Graptopetalum* presentaron actividad inmunomoduladora al estimular la proliferación de esplenocitos de ratón, presentando actividad superior, a excepción de *G. occidentale*, al agente mitógeno LPS. Dicha actividad podría atribuirse al  $\gamma$ -sitosterol y otros fitoesteroides presentes en las muestras.

Los extractos metanólicos de las tres especies de *Graptopetalum* fueron activos solo contra cepas Gram positivas (CMI = 62.5-250  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo *G. rusbyi* y *G. sinaloensis* las especies más activas. La actividad podría atribuirse al contenido de componentes fenólicos.

Los extractos metanólicos de las tres especies de *Graptopetalum* fueron inactivos contra *Giardia duodenalis* hasta la concentración máxima evaluada (500  $\mu\text{g/mL}$ ).

Los EMs de las tres especies de *Graptopetalum* fueron inocuos en el ensayo de *Artemia salina* hasta la concentración máxima evaluada ( $CL_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$ ) y no mostraron indicios de toxicidad aguda en modelo murino, ni alteraciones en

parámetros hematológicos a una dosis máxima de 2 g/kg p.c. tras 14 días de su administración oral.

## XII.PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Realizar un fraccionamiento biodirigido en las especies de *Graptopetalum* para la identificación y caracterización de metabolitos secundarios específicos responsables de las actividades biológicas evaluadas.
2. Analizar a detalle el contenido de los componentes fenólicos y lipofílicos específicos en las especies de *Graptopetalum*.
3. Analizar la actividad antimutagénica y antiinflamatoria *in vitro* de los EMs de las especies de *Graptopetalum*.
4. Analizar la actividad antibacteriana de los EMs de *Graptopetalum* en cepas resistentes a antibióticos.
5. Evaluar la actividad antidiabética del EM de la especie más activa (*G. rusbyi*) en modelo murino.
6. Realizar ensayos de toxicidad crónica de las tres especies de *Graptopetalum*.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott 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. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115722>
- Abraham, R. J., Abraham, S., Stevens, A. J., Page, S. W., McCluskey, A., Trott, D. J., y O'Handley, R. M. (2019). Aminoguanidines: New leads for treatment of *Giardia duodenalis* infection. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.04.003>
- Adibe, M. K., Gabriel, I. M., Akintunde, A.-A. M., y Esther, A. O. (2019). Chemical compositions and antioxidant activity of leaf and stem essential oils of *Bryophyllum pinnatum* (lam.) Kurz. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 057-064. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.9.2.0184>
- Ahmed, R., Elkhaisy, E., EL-kashak, W. A. H., El Raey, M., Nassar, M., y Aboutabl, E.-S. A. (2019). Structural characterization of polyphenolics in *Livistona chinensis* using HPLC-PDA-MS. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 3(1), 23-29. <https://doi.org/10.21608/aprh.2018.6527.1072>
- Ai, L., Chung, Y.-C., Jeng, K.-C. G., Lai, P. F.-H., Yeh, S.-C., Lee, K. C., Lin, S.-Y., Xia, Y., Wang, G., y Cui, S. W. (2017). Antioxidant hydrocolloids from herb

*Graptopetalum paraguayense* leaves show anti-colon cancer cells and anti-neuroinflammatory potentials. *Food Hydrocolloids*, 73, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.027>

Akihisa, T., Kokke, W., Tamura, T., y Matsumoto, T. (1991). Sterols of *Kalanchoe pinnata*: First report of the isolation of both C-24 epimers of 24-alkyl- $\Delta$ 25-sterols from a higher plant. *Lipids*, 26(8), 660-665. <https://doi.org/10.1007/bf02536432>

Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., y Lalaoui, K. (2009). Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4(2), 93-96. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=4f671aaa28a3242419090f414ffd0b41b5964693>

Alperth, F., Schneebauer, A., Kunert, O., y Bucar, F. (2023). Phytochemical Analysis of *Pinus cembra* Heartwood—UHPLC-DAD-ESI-MSn with Focus on Flavonoids, Stilbenes, Bibenzyls and Improved HPLC Separation. *Plants*, 12(19), 3388. <https://doi.org/10.3390/plants12193388>

Alfeqy, M. M., El-Hawary, S. S., El-Halawany, A. M., Rabeh, M. A., Alshehri, S. A., Serry, A. M. y Ezzat, M. (2023). Effect of Phenolics from *Aeonium arboreum* on Alpha Glucosidase, Pancreatic Lipase, and Oxidative Stress; a Bio-Guided Approach. *Pharmaceutics*, 15(11), 2541. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112541>

- Al-Snafi, A. E. (2013). The Chemical constituents and pharmacological effects of *Bryophyllum calycinum*. A review. *Journal of Pharma Sciences and Research*, 4(12), 171-176.
- Amin, E., Moawad, A., y Hassan, H. (2017). Biologically-guided isolation of leishmanicidal secondary metabolites from *Euphorbia peplus* L. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 236-240.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.003>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950>
- Amaral, F. M., Ribeiro, M. N. S., Barbosa-Filho, J. M., Reis, A. S., Nascimento, F. R., y Macedo, R. O. (2006). Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 696-720.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500017>
- Ambavade, S. D., Misar, A. V., y Ambavade, P. D. (2014). Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of  $\beta$ -sitosterol: a review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 14, 193-211. <https://doi.org/10.1007/s13596-014-0151-9>
- Anal, A. K., Boonlao, N., y Ruktanonchai, U. R. (2023). Emulsion systems stabilized with biopolymers to enhance oral bioaccessibility and bioavailability of lipophilic

bioactive compounds. *Current Opinion in Food Science*, 50, 101001.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101001>

Atmaca, E. (2022). The Effect of Different Water Types Techniques on the Development of the *Kalanchoe daigremontiana* Plant. *International Journal of Horticulture, Agriculture and Food Science*, 6, 16-23.  
<https://dx.doi.org/10.22161/ijhaf.6.6.3>

Ai, L., Chung, Y.-C., Jeng, K.-C. G., Lai, P. F.-H., Yeh, S.-C., Lee, K. C., Lin, S.-Y., Xia, Y., Wang, G., y Cui, S. W. (2017). Antioxidant hydrocolloids from herb *Graptopetalum paraguayense* leaves show anti-colon cancer cells and anti-neuroinflammatory potentials. *Food Hydrocolloids*, 73, 51-59.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.027>

Andrade-Rodríguez, M., Rodríguez-Rojas, T. J., Castillo-Gutiérrez, A., Villegas-Torres, O. G., y Guillén-Sánchez, D. (2019). Analysis of morphological characters and RAPDs fragments of twelve species of the Crassulaceae Family. *Revista Bio Ciencias*, 6, e537. <https://doi.org/0.15741/revbio.06>.

Andrade, J. L., De la Barrera, E., García, C. R., Ricalde, M. F., Soto, G. V., y Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 37-50. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/577/57708102.pdf>

Amali, M. O., Atunwa, S. A., Aiyelero, M. O., Usman, S. O., Olapade, A. I., Oyedotu, E. O., y Omotesho, Q. A. (2019). Acute Toxicity Study and Evaluation of the Anxiolytic Activity of the Ethanol Leaf Extract of *Bryophyllum Pinnatum* (Kurz) in



Mice. *Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 3, 27-35.  
<https://uilspace.unilorin.edu.ng/handle/20.500.12484/4824>

Ahumada-Santos, Y. P., Soto-Sotomayor, M. E., Báez-Flores, M. E., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Eslava-Campos, C. A., y Delgado-Vargas, F. (2016). Antibacterial synergism of *Echeveria subrigida* (B. L. Rob & Seaton) and commercial antibiotics against multidrug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(5), 638-644. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.08.160>

Ávila, F., Cruz, N., Alarcon-Espósito, J., Nina, N., Paillan, H., Márquez, K., Fuentealba, D., Burgos-Edwards, A., Theoduloz, C., y Vejar-Vivar, C. (2022). Inhibition of advanced glycation end products and protein oxidation by leaf extracts and phenolics from Chilean bean landraces. *Journal of Functional Foods*, 98, 105270. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105270>

Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh, S., Patel, A. R., Gupta, A. K., y Aguilar, C. N. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, 43, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101320>

Balamurugan, R., Stalin, A., y Ignacimuthu, S. (2012). Molecular docking of  $\gamma$ -sitosterol with some targets related to diabetes. *European journal of medicinal chemistry*, 47, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.10.007>

Balamurugan, R., Durairandiyar, V., y Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of

$\gamma$ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 667(1-3), 410-418. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.025>

Beltrán - Aguilar, A. (2020). Caracterización química y actividades antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* de 17 especies de *Echeveria* de México. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Sinaloa.

Bensouici, C., Kabouche, A., Karioti, A., Öztürk, M., Duru, M. E., Bilia, A. R., y Kabouche, Z. (2016). Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. *Pharmaceutical biology*, 54(1), 174-179. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1028078>

Bhandari, R., Gyawali, S., Aryal, N., Gaire, D., Paudyal, K., Panta, A., Panth, P., Joshi, D. R., Rokaya, R.K., Aryal, P., y Pandey, J. (2021). Evaluation of Phytochemical, Antioxidant, and Memory- Enhancing Activity of *Garuga pinnata* Roxb. Bark and *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken. Leaves. *The Scientific World Journal*, 2021, 6649574. <https://doi.org/10.1155/2021/6649574>

Bibi, N., Jan, G., Jan, F. G., Hamayun, M., Iqbal, A., Hussain, A., Rehman, H., Tawab, A., y Khushdil, F. (2019). *Cochliobolus* sp. acts as a biochemical modulator to alleviate salinity stress in okra plants. *Plant physiology and biochemistry*, 139, 459-469. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.019>

Bizuayehu, D., Atlabachew, M., y Ali, M. T. (2016). Determination of some selected secondary metabolites and their invitro antioxidant activity in commercially

available Ethiopian tea (*Camellia sinensis*). *SpringerPlus*, 5(1), 1-9.  
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2056-1>

Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y. C., Waksman, N., Hernández, M., y Salazar, R. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 34-42. Recuperado de:  
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=45708>

Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., Kasprzycka, M., Szymczak, G., y Szewczyk, K. (2018). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. *Saudi journal of Biological Sciences*, 25(4), 622-630.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.037>

Boubaker, J., Ben Toumia, I., Sassi, A., Bzouich-Mokded, I., Ghoul Mazgar, S., Sioud, F., y Chekir-Ghedira, L. (2018). Antitumoral Potency by Immunomodulation of Chloroform Extract from Leaves of *Nitraria retusa*, Tunisian Medicinal Plant, via its Major Compounds  $\beta$ -sitosterol and Palmitic Acid in BALB/c Mice Bearing Induced Tumor. *Nutrition and Cancer*, 70(4), 650-662.  
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1460683>

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 and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Buzgaia, N., Lee, S. Y., Rukayadi, Y., Abas, F., y Shaari, K. (2021). Antioxidant activity,  $\alpha$ -glucosidase inhibition and UHPLC–ESI–MS/MS profile of shmar (*Arbutus pavarii* Pamp). *Plants*, 10(8), 1659. <https://doi.org/10.3390/plants10081659>
- Castaño Osorio, J. C., y Giraldo García, A. M. (2019). Antiparasitic phytotherapy perspectives, scope and current development. *Infectio*, 23(2), 189-204. <https://doi.org/10.22354/in.v23i2.777>
- Cerqueira, F., Cordeiro-Da-Silva, A., Araujo, N., Cidade, H., Kijjoa, A., y Nascimento, M. (2003). Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: artelastin as a potent inhibitor. *Life sciences*, 73(18), 2321-2334. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00627-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00627-1)
- Cerulli, A., Napolitano, A., Masullo, M., Hošek, J., Pizza, C., y Piacente, S. (2020). Chestnut shells (Italian cultivar “Marrone di Roccadaspide” PGI): Antioxidant activity and chemical investigation with in depth LC-HRMS/MSn rationalization of tannins. *Food Research International*, 129, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108787>
- Chao, W. W., Chen, S. J., Peng, H. C., Liao, J. W., y Chou, S. T. (2019). Antioxidant activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther leaf extract counteracts oxidative stress induced by ethanol and carbon tetrachloride Co-induced hepatotoxicity in rats. *Antioxidants*, 8(8), 251. <https://doi.org/10.3390/antiox8080251>
- Chao, W.-W., Chen, S.-J., Peng, H.-C., Liao, J.-W., y Chou, S.-T. (2019). Antioxidant activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther leaf extract counteracts

oxidative stress induced by ethanol and carbon tetrachloride Co-induced hepatotoxicity in rats. *Antioxidants*, 8(8), 251. <https://doi.org/10.3390/antiox8080251>

Chatterjee, A., Sen, B., Das, S., y Chatterjee, T. K. (2015). Anti-inflammatory and analgesic activity of methanolic extract of medicinal plant *Rhodiola rosea* rhizomes. *International Journal of Pharma Research & Review*, 4(2), 1-8.

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.198>

Chou, S.-T., Chen, S.-J., Yeh, J.-Y., y Chung, Y.-C. (2005). Antimutagenic potential of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther extracts. *Taiwan Agricultural Chemistry and Food Science*, 43(5), 349-357. <https://doi.org/10.6578/TJACFS.2005.044>

Chou, S. T., Chung, Y. C., Teng, K. Y., y Yeh, J. Y. (2008). Effects of *Graptopetalum paraguayense* extract on tert-butylhydroperoxide-induced oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(3), 429-434. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3103>

Chouna, J. R., Nkeng-Efouet, P. A., Lenta, B. N., Devkota, K. P., Neumann, B., Stammer, H.-G., Kimbu, S. F., y Sewald, N. (2009). Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochemistry*, 70(5), 684-688. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.02.012>

- Chou Lin, S. S., Chin, L. W., Chao, P. C., Lai, Y. Y., Lin, L. Y., Chou, M. Y., Chou, M. C., Wei, J. C. C., y Yang, C. C. (2011). *In vivo* Th1 and Th2 cytokine modulation effects of *Rhodiola rosea* standardised solution and its major constituent, salidroside. *Phytotherapy Research*, 25(11), <https://doi.org/10.1002/ptr.3451>
- Choudhary, D., Shekhawat, J., y Kataria, V. (2019). GC-MS analysis of bioactive phytochemicals in methanol extract of aerial part and callus of dipterygium glaucum decne. *Pharmacognosy Journal*, 11(5), 1055-1063. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.165>
- Chung, Y.-C., Chou, S.-T., Jhan, J.-K., Liao, J.-W., y Chen, S.-J. (2012). *In vitro* and *in vivo* safety of aqueous extracts of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(1), 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.033>
- Choi, J. M., Lee, E. O., Lee, H. J., Kim, K. H., Ahn, K. S., Shim, B. S., Kim, N. I., Song, M. C., Baek, N. I., y Kim, S. H. (2007). Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytotherapy Research*, 21(10), 954-959. <https://doi.org/10.1002/ptr.2189>
- Chu, Y.-H., Wu, S.-H., y Hsieh, J.-F. (2014). Isolation and characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Rhodiola crenulata*. *Food Research International*, 57, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.029>

- Chung, Y.-C., Chen, S.-J., Hsu, C.-K., Chang, C.-T., y Chou, S.-T. (2005). Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry*, 91(3), 419-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.022>
- CLSI. (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, Eighth ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Costa, S. S., Muzitano, M. F., Camargo, L. M., y Coutinho, M. A. (2008). Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: flavonoids and other secondary metabolites. *Natural Product Communications*, 3(12), 1934578X0800301236. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800301236>
- Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., y Tudela, J. (2017). *Salvia officinalis* L. essential oils from Spain: determination of composition, antioxidant capacity, antienzymatic, and antimicrobial bioactivities. *Chemistry and biodiversity*, 14(8), e1700102. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700102>
- Cuyckens, F., y Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/jms.585>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2021). *Graptopetalum occidentale*. Enciclovida. Recuperado de <https://enciclovida.mx/especies/243750-graptopetalum-sinaloensis>
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., y Della Loggia, R. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of

Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 144-151.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.015>

Dabeek, W. M., y Marra, M. V. (2019). Dietary quercetin and kaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. *Nutrients*, 11(10), 2288. <https://doi.org/10.3390/nu11102288>

da Luz, B. B., Maria-Ferreira, D., Dallazen, J. L., de Oliveira, A. F., Telles, J. E. Q., Beltrame, O. C., y de Paula Werner, M. F. (2021). Effectiveness of the polyphenols-rich *Sedum dendroideum* infusion on gastric ulcer healing in rats: Roles of protective endogenous factors and antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114260>

da Silva Pinto, M., Kwon, Y. I., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., y Shetty, K. (2008). Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4386-4392. <https://doi.org/10.1021/jf0732758>

Da Silva, S., Costa, S., Mendonça, S., Silva, E., Moraes, V., y Rossi-Bergmann, B. (1995). Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta tropica*, 60(3), 201-210. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(95\)00128-2](https://doi.org/10.1016/0001-706X(95)00128-2)

de Carvalho, J. J. V., Boaventura, F. G., da Silva, A. D. C. R., Ximenes, R. L., Rodrigues, L. K. C., de Almeida Nunes, D. A., y de Souza, V. K. G. (2021).



Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social. *Research, Society and Development*, 10(6), e58810616303-e58810616303. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16303>

de Melo, L. F. M., Martins, V. G. d. Q. A., da Silva, A. P., de Oliveira Rocha, H. A., y Scortecchi, K. C. (2023). Biological and pharmacological aspects of tannins and potential biotechnological applications. *Food Chemistry*, 414, 135645. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135645>

Dias, M. C., Pinto, D. C., y Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>

Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Orgiu, F., Frigerio, G., Regazzoni, L., y Restani, P. (2019). Phenolic profile and antioxidant activity of different grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *In Bio Web of Conferences*, 12, 04005. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191204005>

Diniz do Nascimento, L., Moraes, A. A. B., Costa, K. S. D., Pereira Galúcio, J. M., Taube, P. S., Costa, C. M. L. y Faria, L. J. G. (2020). Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/biom10070988>

Di Renzo, L., Gualtieri, P., Romano, L., Marrone, G., Noce, A., Pujia, A., y De Lorenzo, A. (2019). Role of personalized nutrition in chronic-degenerative diseases. *Nutrients*, 11(8), 1707. <https://doi.org/10.3390/nu11081707>

- Esquivel-Gutiérrez, E., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M., Saavedra-Molina, A., y Salgado-Garciglia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1), 45-52. Recuperado de <https://www.researchgate.net/profile/Rafael-Salgado-Garciglia/publication/237082244>
- Eid, O., y Gonaid, M. (2018). Crassulaceae (chemistry and pharmacology)-A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2018.07.003>
- Ekalu A, Gbekele-Oluwa Ayo R, Habila J, Hamisu I. (2019). Bioactivity of phaeophytin A,  $\alpha$ -amyrin and lupeol from *Brachystelma togoense* Schltr. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 6(3), 411-418. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.571770>
- El Abdellaoui, S., Destandau, E., Toribio, A., Elfakir, C., Lafosse, M., Renimel, I. y Landemarre, L. (2010). Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(3), 1329-1338. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4047-3>
- El-Hawary, S. S., El-Kammar, H. A., Farag, M. A., Saleh, D. O., y El Dine, R. S. (2020). Metabolomic profiling of five Agave leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their anti-inflammatory, immunomodulatory and ulceroprotective activities. *Steroids*, 160, 108648. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108648>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105540>
- 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. <https://doi.org/10.1556/1326.2021.00956>
- Elizondo-Luévano, J. H., Pérez-Narváez, O. A., Sánchez-García, E., Castro-Ríos, R., Hernández-García, M. E., y Chávez-Montes, A. (2021). *In-vitro* effect of *Kalanchoe daigremontiana* and its main component, quercetin against *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Iranian journal of parasitology*, 16(3), 394. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v16i3.7092>
- Elufioye, T. O., Olusola, D. M., y Oyedeji, A. O. (2019). Correlation of total phenolic, flavonoid and tannin content of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) (crassulaceae) extract with the antioxidant and anticholinesterase activities. *Pharmacognosy Journal*, 11(5). <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.158>
- Elufioye, T. O., Oyedeji, A. O., y Habtemariam, S. (2022). A Review of the Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) (Crassulaceae). *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 12(3), 190-222. <https://doi.org/10.1080/22311866.2021.1988706>
- El Hawary, S., Ibrahim, N. A., Aly, H. F., Matlob, A., Dosoky, M. M., Abd Elhady Deabes, D., y Selim, N. M. (2021). Comparative phytochemical and biological studies of

lipoidal matter of *Ipomoea tricolor* (Cav.) and *Ipomoea fistulosa* (Mart. Ex Choisy) growing in Egypt. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(4), 1845-1857.  
<https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.61245.3316>

Environmental Protection Agency (EPA). (1998). Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Acute oral toxicity. OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 870.1100, EPA 712-C-98-190, Washington, DC (1998), p. 10

Ezhilan, B. P., y Neelamegam, R. (2012). GC-MS analysis of phytocomponents in the ethanol extract of *Polygonum chinense* L. *Pharmacognosy research*, 4(1), 11.  
<https://doi.org/10.4103/0974-8490.91028>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114554>

Feleke, D. G., Alemu, Y., Bisetegn, H., Mekonnen, M., y Yemanebrhane, N. (2021). Intestinal parasitic infections and associated factors among street dwellers and prison inmates: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 16(8), e0255641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255641>

Fierascu, R. C., Fierascu, I., Baroi, A. M., y Ortan, A. (2021). Selected aspects related to medicinal and aromatic plants as alternative sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1521.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22041521>

- Finney DJ. (1971). Probit Analysis, 3 ed. Press Cambridge, Cambridge University.
- Fischer, U. A., Carle, R., y Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*, 127(2), 807-821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Foutse, Y., Mouokeu, R., Nguimatsia, F., Njateng, G., Tamokou, J. d. D., y Kuate, J. (2014). Antibacterial activity of methanol extracts and fractions from *Kalanchoe crenata*, *Terminalia avicennioides* and *Sarcocephalus latifolius*. *Pharmacologia*, 5(6), 199-204. <https://scialert.net/abstract/?doi=pharmacologia.2014.199.204>
- Freitas, C. S., Baggio, C. H., Dos Santos, A. C., Mayer, B., Twardowschy, A., Luiz, A. P., Marcon, R., Soldi, C., Pizzolatti, M. G., y Dos Santos, E. P. (2009). Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 104(4), 285-292. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00367.x>
- Fürnkranz, U., y Walochnik, J. (2021). Nosocomial Infections: Do Not Forget the Parasites!. *Pathogens*, 10(2), 238. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020238>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives*

*of Toxicology*, 94(3), 651-715. [https://doi.org/ 10.1007/s00204-020-02689-3](https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3)

Gu, D., Yang, Y., Bakri, M., Chen, Q., Xin, X., y Aisa, H. A. (2013). A LC/QTOF-MS/MS application to investigate chemical compositions in a fraction with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from *Rosa rugosa* flowers. *Phytochemical Analysis*, 24(6), 661-670. [https://doi.org/ 10.1002/pca.2451](https://doi.org/10.1002/pca.2451)

Ghoneim, M., Ma, G., El-Hela, A., Mohammad, A., Kottob, S., y El-Ghaly, S. (2013). Biologically active secondary metabolites from *Asphodelus microcarpus*. *Natural Product Communications*, 3(6), 1117-1119. <https://doi.org/10.1177/1934578X130080082>

Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product reports*, 21(2), 263-277. <https://doi.org/10.1039/B212695H>

Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>

Gyawali, R., Hayek, S., y Ibrahim, S. A. (2015). Plant extracts as antimicrobials in food products: Mechanisms of action, extraction methods, and applications. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 49, 49-62.

Recuperado de

<https://books.google.es/books?hl=esylr=yid=a590AwAAQBAJyoi=fndypg=PA49ydq=Plant+extracts+as+antimicrobials+in+food+products:+Mechanisms+of+action,+extraction+methods,+and+applications.yots=YTOgcpicoAysig=pDv-EUU4>.

- Hadri-Ghembaza, N., Belyagoubi-Benhammou, N., Kanoun, K., y Bekkara, F. A. (2014). Phytochemical determination and *in vitro* antioxidant activities of *sedum villosum*, 36(3), 93-99. Recuperado De [https://www.researchgate.net/profile/Nabila-Belyagoubi-Benhammou/publication/302155520\\_phytochemical\\_determination\\_and\\_in\\_vitro\\_antioxidant\\_activities\\_of\\_sedum\\_villosum/links/572e774a08aee022975a60c8](https://www.researchgate.net/profile/Nabila-Belyagoubi-Benhammou/publication/302155520_phytochemical_determination_and_in_vitro_antioxidant_activities_of_sedum_villosum/links/572e774a08aee022975a60c8).
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., y Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.010>
- Hannan, M. A., Sohag, A. A. M., Dash, R., Haque, M. N., Mohibbullah, M., Oktaviani, D. F., Hossain, M. T., Choi, H. J., y Moon, I. S. (2020). Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. *Phytomedicine*, 69, 153201. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153201>
- Han, L., Fu, Q., Deng, C., Luo, L., Xiang, T., y Zhao, H. (2022). Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scandinavian Journal of Immunology*, 95(1), e13106. <https://doi.org/10.1111/sji.13106>
- Han, F., Li, Y., Mao, X., Xu, R., y Yin, R. (2016). Characterization of chemical constituents in *Rhodiola Crenulate* by high-performance liquid chromatography coupled with Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (HPLC-FT-ICR MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 51(5), 363-368.

<https://doi.org/10.1002/jms.3764>

Harborne, J. B. (1984). Methods of Plant Analysis. En J. B. Harborne (Ed.), *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (pp. 1-36). *Dordrecht: Springer Netherlands*. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7_1)

Hassan, M. H., Elwekeel, A., Moawad, A., Afifi, N., Amin, E., y El Amir, D. (2021). Phytochemical constituents and biological activity of selected genera of family Crassulaceae: A review. *South African Journal of Botany*, 141, 383-404. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.016>

Heredia - Mercado, B. (2015). Actividad adaptogénica, inmunomoduladora y antioxidante de tres especies de *Echeveria* (*E. craigiana*, *E. kimnachii*, *E. subrigida*) de Sinaloa. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Sinaloa.

Hisham Shady, N., Youssif, K. A., Sayed, A. M., Belbahri, L., Oszako, T., Hassan, H. M., y Abdelmohsen, U. R. (2020). Sterols and triterpenes: Antiviral potential supported by in-silico analysis. *Plants*, 10(1), 41. <https://doi.org/10.3390/plants10010041>

Huang, X.-y., Guo, X.-l., Luo, H.-l., Fang, X.-w., Zhu, T.-g., Zhang, X.-l., Chen, H.-w., y Luo, L.-p. (2015). Fast differential analysis of propolis using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 176475. <https://doi.org/10.1155/2015/176475>



- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., y Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Hsu, W.-H., Liao, S.-C., Chyan, Y.-J., Huang, K.-W., Hsu, S.-L., Chen, Y.-C. y Huang, C.-Y. F. (2019). *Graptopetalum paraguayense* Inhibits Liver Fibrosis by Blocking TGF- $\beta$  Signaling *In Vivo* and *In Vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2592. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2592>
- Hsu, W. H., Chang, C. C., Huang, K. W., Chen, Y. C., Hsu, S. L., Wu, L. C., y Huang, C. Y. F. (2015). Evaluation of the medicinal herb *Graptopetalum paraguayense* as a treatment for liver cancer. *PloS One*, 10(4), e0121298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121298>
- Hernández-Vázquez, L., Palazón Barandela, J., y Navarro-Ocaña, A. (2012). The pentacyclic triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryns: A review of sources and biological activities. *InTech*, 487-502. <https://doi.org/10.5772/1387>
- Huang, K.-F., Chen, Y.-W., Chang, C.-T., y Chou, S.-T. (2005). Studies on the inhibitory effect of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther extracts on mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*, 89(4), 583-587. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.022>
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., Shill, M. C., Karmakar, U. K., Yarla, N. S., y Khan, I. N. (2018). Phytol: A review of biomedical

- activities. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 82-94.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>
- Iwashina, T., Nakane, T., y Devkota, H. P. (2023). Flavonoids from the leaves and stems of *Rhodiola ishidae* (Crassulaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 107, 104622. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104622>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules27175629>
- Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567-1574.  
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74)
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J., y Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8596-8603.  
<https://doi.org/10.1021/jf071736j>
- Keong, Y. S., Alitheen, N. B., Mustafa, S., Aziz, S. A., Rahman, M. A., y Ali, A. M. (2010). Immunomodulatory effects of zerumbone isolated from roots of *Zingiber zerumbet*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 75-82.
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 487-488. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90120-7)

- Khoza, B., Gbashi, S., Steenkamp, P. A., Njobeh, P., y Madala, N. (2016). Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *South African Journal of Botany*, 103, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.018>
- Kim, J., Im, J. H., Park, C. Y., Lee, D. H., Lee, M. H., Jung, Y. H., y Na, C. S. (2021). Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of *Pethorum chinense* Purch seed extracts. *Korean Journal of Food Preservation*, 28(3), 384-390. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2021.28.3.384>
- Ko, M.-J., Nam, H.-H., y Chung, M.-S. (2020). Subcritical water extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae). *Scientific Reports*, 10(1), 10890. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67508-2>
- Koo, Y. E., Song, J., y Bae, S. (2018). Use of plant and herb derived medicine for therapeutic usage in cardiology. *Medicines*, 5(2), 38. <https://doi.org/10.3390/medicines5020038>
- Kosakowska, O., Bączek, K., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Czupa, W., Synowiec, A., y Węglarz, Z. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) dry extracts. *Molecules*, 23(7), 1767. <https://doi.org/10.3390/molecules23071767>
- Królicka, A., Szpitter, A., Gilgenast, E., Romanik, G., Kaminski, M., y Lojkowska, E. (2008). Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. *Enzyme*

and *Microbial Technology*, 42(3), 216-221.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.09.011>

Kumar, S., y Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Kumar, R., Phani, K. G., y Chaurasia, O. (2010). *In vitro* antioxidant activity of methanolic extract of *Rhodiola imbricata* Edgew. *Pharmacognosy Journal*, 2(7), 157-161. [https://doi.org/10.1016/s0975-3575\(10\)80084-7](https://doi.org/10.1016/s0975-3575(10)80084-7)

Kumar, R., Tayade, A., Chaurasia, O., Sunil, H., y Singh, S. B. (2010). Evaluation of anti-oxidant activities and total phenol and flavonoid content of the hydro-alcoholic extracts of *Rhodiola* sp. *Pharmacognosy Journal*, 2(11), 431-435. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80027-6](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80027-6)

Kwon, Y.-I., Jang, H.-D., y Shetty, K. (2006). Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 15(3), 425-432.

Lalle, M., y Hanevik, K. (2018). Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1921. <https://doi.org/10.2147/IDR.S141468>

Lee, B. H., Lee, C. C., Cheng, Y. H., Chang, W. C., Hsu, W. H., y Wu, S. C. (2013). *Graptopetalum paraguayense* and resveratrol ameliorates carboxymethyllysine (CML)-induced pancreas dysfunction and hyperglycemia. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.005>

- Lee, B.-H., Shen, S.-R., Lee, P.-S., Huang, X.-S., Chang, W.-C., y Wu, S.-C. (2023). Protective Effects of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther against Methylglyoxal-Induced Liver Damage and Microflora Imbalances Caused by High-Fructose Induction. *Fermentation*, 9(4), 366. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040366>
- Lezoul, N. E. H., Belkadi, M., Habibi, F., y Guillén, F. (2020). Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. *Molecules*, 25(20), 4672. <https://doi.org/10.3390/molecules25204672>
- Lee, T. K., Poon, R. T., Wo, J. Y., Ma, S., Guan, X.-Y., Myers, J. N., Altevogt, P., y Yuen, A. P. (2007). Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer research*, 67(18), 8800-8809. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0801>
- Li, X., Bai, Y., Jin, Z., y Svensson, B. (2022). Food-derived non-phenolic  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors for controlling starch digestion rate and guiding diabetes-friendly recipes. *Lwt*, 153, 112455. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112455>
- Ling, Y., Li, Z., Chen, M., Sun, Z., Fan, M., y Huang, C. (2013). Analysis and detection of the chemical constituents of *Radix Polygalae* and their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass

spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85, 1-13.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.011>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>

Liu, H.-Y., Peng, H.-Y., Hsu, S.-L., Jong, T.-T., y Chou, S.-T. (2015). Chemical characterization and antioxidative activity of four 3-hydroxyl-3-methylglutaroyl (HMG)-substituted flavonoid glycosides from *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Botanical Studies*, 56(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40529-015-0088-4>

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. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.001>

López-Angulo, G., Miranda-Soto, V., López-Valenzuela, J., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S., Garzón-Tiznado, J., y Delgado-Vargas, F. (2022).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory phenolics from *Echeveria subrigida* (BL Rob y Seaton) leaves. *Natural Product Research*, 36(4), 1058-1061. <https://doi.org/14786419.2020.1844695>

López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Vega-Aviña, R., Ahumada-Santos, Y. P., y Delgado-Vargas, F. (2019). Chemical composition and antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three

- Echeveria* DC. species from Mexico. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1964-1973. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.050>
- López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J. Á., y Delgado-Vargas, F. (2018). Comparison of terpene and phenolic profiles of three wild species of *Echeveria* (Crassulaceae). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91, 145-154. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.020>
- López-Posadas, R., Ballester, I., Abadía-Molina, A. C., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., y de Medina, F. S. (2008). Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), 495-506. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.06.001>
- 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 & Technology*, 55(9), 3190-3202. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14583>
- Luján, C. G., Hernández, B. E. P., Romero, A. M., y Barraza, F. C. (2009). Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes. Use of medicinal plants and dietary supplements for glycemic control of diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 8, 229-239. Recuperado de <https://www.veralmex.com/pdf/glucemico.pdf>
- Ma, Y., Kosińska-Cagnazzo, A., Kerr, W. L., Amarowicz, R., Swanson, R. B., y Pegg, R. B. (2014). Separation and characterization of phenolic compounds from dry-

blanched peanut skins by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1356, 64-81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.027>

Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., y Murphy, A. B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep38610>

Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A., y Manosroi, J. (2003). Immunomodulatory activities of *Clausena excavata* Burm. f. wood extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 89(1), 155-160. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00278-2)

Martínez Ruiz, M. G., Gómez-Velasco, A., Juárez, Z. N., Hernández, L. R., y Bach, H. (2013). Exploring the biological activities of *Echeveria leucotricha*. *Natural Product Research*, 27(12), 1123-1126. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.708662>

Maheshwari, S., Kumar, V., Bhadauria, G., y Mishra, A. (2022). Immunomodulatory potential of phytochemicals and other bioactive compounds of fruits: A review. *Food Frontiers*, 3(2), 221-238. <https://doi.org/10.1002/fft2.129>

Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D. j., y McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>



- Meinita, M. D. N., Harwanto, D., Tirtawijaya, G., Negara, B. F. S. P., Sohn, J.-H., Kim, J.-S., y Choi, J.-S. (2021). Fucosterol of marine macroalgae: Bioactivity, safety and toxicity on organism. *Marine Drugs*, 19(10), 545. <https://doi.org/10.3390/md19100545>
- Michael, A. S., Thompson, C. G., y Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, 123(3194), 464-464. <https://doi.org/10.1126/science.123.3194.464.a>
- Ming, D. S., Hillhouse, B. J., Guns, E. S., Eberding, A., Xie, S., Vimalanathan, S., y Towers, G. N. (2005). Bioactive compounds from *Rhodiola rosea* (Crassulaceae). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(9), 740-743. <https://doi.org/10.1002/ptr.1597>
- Mishra, K., Ganju, L., y Singh, S. (2012). Anti-cellular and immunomodulatory potential of aqueous extract of *Rhodiola imbricata* rhizome. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 34(3), 513-518. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.638307>
- Mihailović, N. R., Mihailović, V. B., Ćirić, A. R., Srećković, N. Z., Cvijović, M. R., y Joksović, L. G. (2019). Analysis of wild raspberries (*Rubus idaeus* L.): Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of phenolics and a new insight in phenolics bioaccessibility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74, 399-404. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00756-4>

- Miras-Moreno, B., Sabater-Jara, A. B., Pedreño, M., y Almagro, L. (2016). Bioactivity of phytosterols and their production in plant *in vitro* cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7049-7058. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02345>
- Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Sicairos-Félix, J., Delgado-Vargas, F., y Rivero, I. A. (2009). Solution-phase parallel synthesis of substituted chalcones and their antiparasitary activity against *Giardia lamblia*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(18), 6780-6785. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.052>
- Mounir, R., Alshareef, W. A., El Gebaly, E. A., El-Haddad, A. E., Ahmed, A. M. S., Mohamed, O. G., y Selim, H. M. R. M. (2023). Unlocking the Power of Onion Peel Extracts: Antimicrobial and Anti-Inflammatory Effects Improve Wound Healing through Repressing Notch-1/NLRP3/Caspase-1 Signaling. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1379. <https://doi.org/10.3390/ph16101379>
- Mummed, B., Abraha, A., Feyera, T., Nigusse, A., y Assefa, S. (2018). *In vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants in the traditional treatment of skin and wound infections in eastern Ethiopia. *BioMed Research International*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/1862401>
- Munné-Bosch, S., y Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31-57. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044179>
- Mustafa, N. H., Sekar, M., Fuloria, S., Begum, M. Y., Gan, S. H., Rani, N. N. I. M. Sathasivam, K. V. (2022). Chemistry, biosynthesis and pharmacology of

sarsasapogenin: a potential natural steroid molecule for new drug design, development and therapy. *Molecules*, 27(6), 2032. <https://doi.org/10.3390/molecules27062032>

Nair, A., Chattopadhyay, D., y Saha, B. (2019). Plant-derived immunomodulators. In New look to phytomedicine. *Elsevier*. 435-499. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00018-5>

Naturalista. (2021). Marmolitos (*Género Graptopetalum*). Naturalista, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México., México. Recuperado de <https://www.naturalista.mx/taxa/157228-Graptopetalum>

Naturalista. (2021). *Graptopetalum sinaloensis*, observación 80772792. Naturalista, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México., México. Recuperado de <https://www.naturalista.mx/observations/80772792>

Naturalista. (2021). *Graptopetalum rusbyi*, observación 31019680. Naturalista, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México., México. Recuperado de <https://www.naturalista.mx/observations/31019680>

Namgoong, S., Son, K., Chang, H., Kang, S., y Kim, H. (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life sciences*, 54(5), 313-320. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00787-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00787-X)

- Niechayev, N. A., Pereira, P. N., y Cushman, J. C. (2019). Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM). *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.06.004>
- Normah, H., y Hanapi, M. (2019). Antioxidant Capacity of The Green Leafy Vegetables Using Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC), 2, 2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid (ABTS) And 2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Assays. *Science Heritage Journal*, 3, 1-7. <https://doi.org/http://doi.org/10.26480/gws.01.2019.01.07>
- Ntungwe N, E., Dominguez-Martin, E. M., Roberto, A., Tavares, J., Isca, V., Pereira, P., Cebola, M.-J., y Rijo, P. (2020). *Artemia* species: An important tool to screen general toxicity samples. *Current Pharmaceutical Design*, 26(24), 2892-2908. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035>
- Odah, S. M., Salama, M. M., Aziz, W. M., El-Alfy, T. S., y Ezzat, S. M. (2020). Anti-wrinkle activity and UPLC-MS/MS metabolic profiling of pomegranate and grape seeds extracts. *International Journal of Scientific Progress & Research*, 11(8), 3679-3689. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11\(8\).3679-89](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(8).3679-89)
- OECD (2022), *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>
- Olennikov, D. N., Chirikova, N. K., Vasilieva, A. G., y Fedorov, I. A. (2020). LC-MS profile, gastrointestinal and gut microbiota stability and antioxidant activity of

*Rhodiola rosea* herbmetabolites: A comparative study with subterranean organs. *Antioxidants*, 9(6), 526. <https://doi.org/10.3390/antiox9060526>

Oliveira, A. F. d., Nascimento, G. E. d., Iacomini, M., Cordeiro, L. M. C., y Cipriani, T. R. (2017). Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 940-946. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.122>

Osman, E. E., Mohamed, A. S., Elkhateeb, A., Gobouri, A., Abdel-Aziz, M. M., y Abdel-Hameed, E. S. S. (2022). Phytochemical investigations, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antibiofilm activities of *Kalanchoe laxiflora* flowers. *European Journal of Integrative Medicine*, 49, 102085. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2021.102085>

Organización mundial de la salud. (2021). Enfermedades no transmisibles. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Organización mundial de la salud. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Ortiz, D. G., Lumbreras, E. L., y Picornell, J. A. R. (2009). La familia Crassulaceae en la flora alóctona valenciana (Vol. 4). *Monografías de la revista Bouteloua*.

- Oulahal, N., y Degraeve, P. (2022). Phenolic-rich plant extracts with antimicrobial activity: an alternative to food preservatives and biocides? *Frontiers in Microbiology*, 12, 753518. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753518>
- 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 annum* L.) by a combination of LC-ESI (-)-MS/MS and polarity prediction in reversed-phase separations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 3005-3015. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02547-2>
- Pandurangan, A., Kaur, A., Kumar, M., Kaushik, V., y Arunachalam, G. (2019). Evaluation of Anti-inflammatory Activity of *Bryophyllum calycinum* (Crassulaceae) on Acute and Chronic Inflammation Models. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(1), 263-266.
- Parsaeimehr, A., Martinez-Chapa, S., y Parra-Saldívar, R. (2017). Medicinal plants versus skin disorders: a survey from ancient to modern herbalism. In *The microbiology of skin, soft tissue, bone and joint infections*. Elsevier, 205-221. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811079-9.00013-6>
- Pacifico, S., Piccolella, S., Marciano, S., Galasso, S., Nocera, P., Piscopo, V., Fiorentino, A., y Monaco, P. (2014). LC-MS/MS profiling of a mastic leaf phenol enriched extract and its effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and A $\beta$  (25–35) oxidative injury in SK-B-NE (C)-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(49), 11957-11966. <https://doi.org/10.1021/jf504544x>

Peinado - Beltrán, L. (2021). Análisis de fitoquímicos totales y actividad antibacteriana de 17 especies de *Echeveria* de México (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Sinaloa.

Petsalo, A., Jalonen, J., y Tolonen, A. (2006). Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1112(1-2), 224-231.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.056>

Perveen, S., Al-Taweel, A. M., y Blumenberg, M. (2021). Terpenes and Terpenoids: Recent Advances. *IntechOpen*.  
[https://books.google.com.mx/books?id=zwc\\_EAAAQBAJ](https://books.google.com.mx/books?id=zwc_EAAAQBAJ)

Prior, R. L., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.  
<https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Puerta, J. L. (2019). Microorganismos y epidemias en la era de la globalización. *Cuadernos de Estrategia*, 203, 123-188. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7269524>

Pinzón, R., y Sánchez, C. (1995). Manual de Técnicas de Investigación: CYTED. *Subprograma X. Química fina farmacéutica*, 45-47.

Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M. y Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of*

*Ethnopharmacology*, 72(1), 35-42. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3)

Raj, S., y Gothandam, K. (2015). Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Amorphophallus commutatus* var. wayanadensis under normal and cyclophosphamide induced immunosuppressive conditions in mice models. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.026>

Rathour, A., Kamboj, A., Kaur, M., y Saluja, A. K. (2013). Isolation and characterization of constituents from the leaves of *Kalanchoe crenata* and their evaluation for antioxidant and antimicrobial potential. *World Journal of Pharmaceutical research*, 3(2), 2569-2584.

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. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rodriguez, J. R. G., Rojas, M. F. H., Velasco, Y. M., y Rivas, C. S. (2020). Compuestos activos en plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *RD-ICUAP*, 6(16), 175-200. Recuperado de <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/268>

Rodríguez-Rivera, M. P., Lugo-Cervantes, E., Winterhalter, P., y Jerz, G. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in peels of *Citrus limetta* Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC–



ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 158, 139-152.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.077>

Rui, W., Xia, W., Zhao, W., Li, B., Li, J., Feng, Y., Chen, H., y Zhao, S. (2020).

Differential constituents in roots, stems and leaves of *Polygonum multiflorum* thunb. screened by UPLC/ESI-Q-TOF-MS and multivariate statistical analysis.

*Journal of Chromatographic Science*, 58(2), 136-143.

<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz086>

Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., y Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). A

practical guide for designing effective nutraceutical combinations in the form of foods, beverages, and dietary supplements against chronic degenerative

diseases. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 179-193.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.026>

Saleem, M., Afaq, F., Adhami, V. M., y Mukhtar, H. (2004). Lupeol modulates NF-κB

and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*,

23(30), 5203-5214. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207641>

Sellappan, S., Akoh, C. C., y Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant

capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural*

*and Food Chemistry*, 50(8), 2432-2438. <https://doi.org/10.1021/jf011097r>

Senthilkumar, R., Parimelazhagan, T., Chaurasia, O. P., y Srivastava, R. (2013). Free

radical scavenging property and antiproliferative activity of *Rhodiola imbricata*

Edgew extracts in HT-29 human colon cancer cells. *Asian Pacific Journal of*

*Tropical Medicine*, 6(1), 11-19. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60194-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60194-1)

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO\\_1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO_1999_220801.pdf)
- Shin, J. A., Won, D. H., Swarup, N., Ahn, M. H., Yang, S. O., Chawla, K., y Cho, S. D. (2021). Methanol extract of *Sedum oryzifolium* and its constituent, trehalose, impede the invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via downregulation of Slug. *Phytomedicine*, 91, 153670. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153670>
- Sharifi-Rad, J., Song, S., Ali, A., Subbiah, V., Taheri, Y., y Suleria, H. A. (2021). LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of phenolic compounds from *Pyracantha coccinea* M. Roem. and their antioxidant capacity. *Cellular and Molecular Biology*, 67(1), 201-211. <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.1.29>
- Sharker, S. M., Hossain, M. K., Haque, M. R., Kabir, A., Hasan, C., y Rashid, M. (2013). Phytochemical and pharmacological studies of *Bryophyllum daigremontianum* (Raym.). *American Journal Of Pharmatech Research*, 3, 484-492.
- Sies, H. (2020). Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In *Oxidative Stress* (pp. 3-12). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818606-0.00001-8>

- Sharmin, S., Islam, M. Z., y Jabber, M. A. (2016). Isolation and identification of medicinal compounds from *Kalanchoe pinnata* of Crassulaceae family by <sup>1</sup>H NMR. *Bioscience and Bioengineering Communications*, 2(2), 123-129.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. Recuperado de <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.short>
- Şöhretoğlu, D., y Sari, S. (2020). Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: Mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1081-1092. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09610-6>
- Sundarraaj, S., Thangam, R., Sreevani, V., Kaveri, K., Gunasekaran, P., Achiraman, S., y Kannan, S. (2012).  $\gamma$ -Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 803-809. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.014>
- Tapia-Hernández, J. A., Rodríguez-Felix, F., Juárez-Onofre, J. E., Ruiz-Cruz, S., Robles-García, M. A., Borboa-Flores, J., y Del-Toro-Sánchez, C. L. (2018). Zein-polysaccharide nanoparticles as matrices for antioxidant compounds: A strategy for prevention of chronic degenerative diseases. *Food Research International*, 111, 451-471. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.036>
- Tabatabaei, S. R. F., Ghaderi, S., Bahrami-Tapehebur, M., Farbood, Y., y Rashno, M. (2017). *Aloe vera* gel improves behavioral deficits and oxidative status in

- streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 279-290. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.146>
- Tajudin, N. J., y Ismail, I. N. A. (2022). Antimicrobial Activity of *Kalanchoe pinnata*: A review. *Malaysian Journal of Science Health & Technology*, 8(1), 31-37. <https://doi.org/10.33102/2022245>
- Tamokou, J. D. D., Mbaveng, A. T., y Kuete, V. (2017). Chapter 8 - Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. En V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 207-237). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X>
- Tatsimo, S. J. N., Tamokou, J. d. D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J.-R., y Tane, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes*, 5(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-158>
- Ticona, J. C., Bilbao-Ramos, P., Amesty, Á., Flores, N., Dea-Ayuela, M. A., Bazzocchi, I. L., y Jiménez, I. A. (2022). Flavonoids from Piper Species as Promising Antiprotozoal Agents against *Giardia intestinalis*: Structure-Activity Relationship and Drug-Likeness Studies. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1386. <https://doi.org/10.3390/ph15111386>
- Todorova, N., Rangelov, M., Dincheva, I., Badjakov, I., Enchev, V., y Markova, N. (2022). Potential of hydroxybenzoic acids from *Graptopetalum paraguayense* for inhibiting of herpes simplex virus DNA polymerase—metabolome profiling,

molecular docking and quantum-chemical analysis. *Pharmacia*, 69(1), 113-123.

<https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e79467>

Torres-Santos, E., Da Silva, S., Costa, S., Santos, A., Almeida, A., y Rossi-Bergmann, B. (2003). Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, 17(7), 801-803. <https://doi.org/10.1002/ptr.1242>

Thuphairo, K., Sornchan, P., y Suttisansanee, U. (2019). Bioactive compounds, antioxidant activity and inhibition of key enzymes relevant to Alzheimer's disease from sweet pepper (*Capsicum annuum*) extracts. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(3), 327. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.327>

Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H., y Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 25(22), 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

Vanhaecke, P., y Persoone, G. (1981). Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia nauplii* (ARC-test). *Inserm*, 106, 359-376.

Vega Aviña, R., F. Delgado Vargas y J. F. Pío León. 2019(2020). *Graptopetalum sinaloensis* (Crassulaceae), una nueva especie de Sinaloa, México. *Acta Botánica Mexicana*, 127, e1550. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1550>

Veloz, A. I. R., Perera, L. M. S., Dorvigny, B. M., de Oliveira, I. M., y Flogio, M. A. (2019). Anti-inflammatory activity of fractions and isolated compounds from *Tabebuia hypoleuca* stems in mice. *Drug Discovery*, 13, 129-137.

- Vivancos, V., González-Alvarez, I., Bermejo, M., y Gonzalez-Alvarez, M. (2018). Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1287-1303. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002095314>
- Villaseñor, J. L. 2016. Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Wang, H.-P., Wang, Z.-J., Du, J., Lin, Z.-Z., Zhao, C., Zhang, R., Yin, Q., Fan, C.-L., Peng, P., y Wang, Z.-B. (2023). Comprehensive Identification of Ginsenosides in the Roots and Rhizomes of *Panax ginseng* Based on Their Molecular Features-Oriented Precursor Ions Selection and Targeted MS/MS Analysis. *Molecules*, 28(3), 941. <https://doi.org/10.3390/molecules28030941>
- Wang, H., Xu, J., Dong, P., Li, Y., Cui, Y., Li, H., Li, H., Zhang, J., Wang, S., y Dai, L. (2022). Comprehensive analysis of pterostilbene metabolites *in vivo and in vitro* using a UHPLC-Q-exactive plus mass spectrometer with multiple data-mining methods. *ACS omega*, 7(43), 38561-38575. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03924>
- Wang, H., y Feng, F. (2009). Identification of components in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5), 1157-1165. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.02.023>

- Wang, K., Zhang, C., Bao, J., Jia, X., Liang, Y., Wang, X., y He, C. (2016). Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep26064>.
- Wang, L., Tan, N., Wang, H., Hu, J., Diwu, W., y Wang, X. (2020). A systematic analysis of natural  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from flavonoids of *Radix scutellariae* using ultrafiltration UPLC-TripleTOF-MS/MS and network pharmacology. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2871-3>
- Wang, S. Y., y Lin, H.-S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146. <https://doi.org/10.1021/jf9908345>
- World of Succulents. (2013-2022). *Graptopetalum rusbyi* (San Francisco River Leatherpetal). Recuperado de <https://worldofsucculents.com/graptopetalum-rusbyi-san-francisco-river-leatherpetal/>
- Wu, S.-C., Su, Y.-S., y Cheng, H.-Y. (2011). Antioxidant properties of Lactobacillus-fermented and non-fermented *Graptopetalum paraguayense* E. Walther at different stages of maturity. *Food Chemistry*, 129(3), 804-809. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.025>
- Xu, J., Zhou, R., Luo, L., Dai, Y., Feng, Y., y Dou, Z. (2022). Quality evaluation of decoction pieces of gardeniae fructus based on qualitative analysis of the HPLC

- fingerprint and triple-Q-TOF-MS/MS combined with quantitative analysis of 12 representative components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2022, 2219932. <https://doi.org/10.1155/2022/2219932>
- Xu, Y., Gao, X., Wang, L., Yang, M., y Xie, R. (2021). Bakuchiol ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating NLRP3 inflammasome and Nrf2 signaling. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 292, 103707. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2021.103707>
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., y Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3), 1–13. <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>
- Yadav, H., Kumar, M., Nivsarkar, M., y Anandjiwala, S. (2014). Multiple marker-based evaluation of *Kalanchoe pinnata*, *Bombax ceiba*, and *Morus alba* leaves: Quantification of  $\alpha$ -amyrin, lupeol, and  $\beta$ -sitosterol using high-performance thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 27(6), 438-443. <https://doi.org/10.1556/jpc.27.2014.6.6>
- Yang, B., Kortensniemi, M., Liu, P., Karonen, M., y Salminen, J.-P. (2012). Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruits by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8672-8683. <https://doi.org/10.1021/jf302925v>



- Yao, H., Liu, J., Xu, S., Zhu, Z., y Xu, J. (2017). The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(2), 121-140. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1272757>
- Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., y Kang, W. (2014).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 136-174. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>
- You, K. M., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., y Kim, H. P. (1998). Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines *in vitro*. *Planta Medica*, 64(6), 546-550. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957511>
- Yousef, G. G., Grace, M. H., Cheng, D. M., Belolipov, I. V., Raskin, I., y Lila, M. A. (2006). Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species. *Phytochemistry*, 67(21), 2380-2391. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.026>
- Yoshida, Y., Saito, Y., Jones, L. S., y Shigeri, Y. (2007). Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: physiological significance and prospects as antioxidants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6), 439-445. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.439>
- Zaharieva, M. M., Genova-Kalou, P., Dincheva, I., Badjakov, I., Krumova, S., Enchev, V., y Markova, N. (2019). Anti-Herpes Simplex virus and antibacterial activities of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther leaf extract: A pilot study.

*Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 1251-1259.

<https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1656108>

Zakłós-Szyda, M., Pawlik, N., Polka, D., Nowak, A., Koziółkiewicz, M., y Podsedek, A. (2019). *Viburnum opulus* fruit phenolic compounds as cytoprotective agents able to decrease free fatty acids and glucose uptake by Caco-2 cells. *Antioxidants*, 8(8), 262. <https://doi.org/10.3390/antiox8080262>

Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., y Zhang, Y. (2022). A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications*, 17(1), 1934578X211069721. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>

Zhang, H., y Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

Zhang, L. F., Shen, S. R., Li, Y. H., Lo, C. Y., Lee, B. H., y Wu, S. C. (2016). Anti-Glycation of Active Compounds Purified from *Graptopetalum Paraguayense*. *Journal of Food Biochemistry*, 40(2), 161-169. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12203>

Zhao, M., Yang, B., Wang, J., Liu, Y., Yu, L., y Jiang, Y. (2007). Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp. *International Immunopharmacology*, 7(2), 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.09.003>

Zhong, Z., Vong, C. T., Chen, F., Tan, H., Zhang, C., Wang, N., Cui, L., Wang, Y., y Feng, Y. (2022). Immunomodulatory potential of natural products from herbal

medicines as immune checkpoints inhibitors: Helping to fight against cancer via multiple targets. *Medicinal Research Reviews*, 42(3), 1246-1279. <https://doi.org/10.1002/med.21876>

Zhou, T., Liu, H., Wen, J., Fan, G., Chai, Y., y Wu, Y. (2010). Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(17), 2520-2528. <https://doi.org/10.1002/rcm.4643>

## XIV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

- ATCC: American Type Culture Collection
- ABTS: Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
- ANOVA: Análisis de varianza
- ATP: Adenosín trifosfato
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- AOX: Actividad antioxidante
- AAPH: 2,2'-azobis[2-metilpropionamidina] dihidrocloruro
- b.f.: Base fresca
- BHT: Butilhidroxitolueno
- CDD: Chronic degenerative disease
- CONACYT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- CYTED: Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el Desarrollo
- CMI: concentración mínima inhibitoria
- CMB: Concentración mínima bactericida
- ConA: Concanavalina A
- CL<sub>50</sub>: Concentración letal media
- DL<sub>50</sub>: Dosis letal media
- D.E.: Desviación estándar
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- EO: Estrés oxidativo
- ET: Equivalente de Trolox

EAG: Equivalente de ácido gálico

EQ: Equivalente de quercetina

EC: Equivalente de catequina

ECD: Enfermedades crónico-degenerativas

EI: Estándar interno

e.g.: Ejemplo

EM: Extracto metanólico

ESI: Ionización por electroasperjado (electrospray)

EE. UU: Estados Unidos de América

FT: Fenólicos totales

FVT: Flavonoides totales

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

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

h: Hora

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

1 $\alpha$ G: Inhibición  $\alpha$ -glucosidasa

kg: Kilogramo

LSD: Contraste de la mínima diferencia significativa

L: Litro

LPS: Lipopolisacárido

mL: Mililitro

mg: Miligramo

Min: Minuto

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

NBIMCC: National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures

No: Número

OMS: Organización mundial de la salud

ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno

p/v: Peso/volumen

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

RAM: Resistencia a antimicrobianos/antibióticos

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

rpm: Revoluciones por minuto

SAIM: Collection of the St. Angeloff Institute of Microbiology

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SFB: Suero fetal bovino

s: segundos

Trolox: Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TT: Taninos totales

Vit E: Vitamina E

Vit C: Vitamina C

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

$\mu\text{mol}$ : Micromol

$\mu\text{L}$ : Microlitro

$\mu\text{g}$ : Microgramo

$^{\circ}\text{C}$ : Grados Celsius

%: Porcentaje