



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN

COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

“ESTUDIO BIODIRIGIDO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS  
FRACCIONES CON MAYOR EFECTO  
ANTIINFLAMATORIO DE *Bidens odorata*”

“TESIS”

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN MEDICINA  
MOLECULAR

QUE PRESENTA

IBQ. CINTHIA JAQUELINEE MAÑON BLANCO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ

CODIRECTORA: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

Cuernavaca, Morelos, México a 05 de junio 2024

El presente trabajo se realizó en Enero del 2022 a Enero del 2024 en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en el laboratorio de Inflamación y enfermedades crónico-degenerativas dirigido por la Dra. Gabriela Rosas Salgado y en el Laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) dirigido por el Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez. Esta tesis fue dirigida por el Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y Dra. Gabriela Rosas Salgado; y asesorada por la Dra. Celeste Trejo Moreno.

### **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Dr. Rodolfo Abarca Vargas

### **MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN**

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Esta tesis contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de posgrado con número de registro 1179783

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, por ser un gran director en mis proyectos, recibirme desde 4° semestre de la licenciatura en su laboratorio de Fitoquímica e irme guiando y enseñando cada día algo nuevo, por la confianza, apoyo, tiempo y consejos brindados. A mi codirectora, Dra. Gabriela Rosas Salgado, por cada uno de sus consejos y enseñanzas, gracias por acobijarme como una más de sus alumnos, y permitirme conocer y desarrollarme en su laboratorio. Dr. Enrique Jiménez Ferrer, agradezco todo el apoyo académico brindado durante la maestría y por cada consejo recibido durante los tutoriales. Dr. Rodolfo Abarca Vargas, le agradezco todas sus observaciones que me hizo a lo largo de mi proyecto, así como el apoyo brindado para mi crecimiento profesional. Dr. Joel Gerardo Barrita Cruz, gracias por los consejos que me brindó para mejorar académicamente durante esta etapa.

Dra. Celeste Trejo Tapia, gracias por su apoyo en cada experimento, por sus consejos y enseñanzas. Y por estar en todo momento con nosotros.

A mi hija Hailey, porque en los momentos más difíciles es mi motor para salir adelante, mi amor incondicional y mi compañera en esta lucha de salir adelante.

A mi esposo, que a pesar de que ha sido una etapa muy complicada en nuestra vida en ningún momento dejó de apoyarme, y siempre hemos sabido salir adelante y elegirnos para ser mejores papás.

A mis padres que en ningún momento me han dejado sola y hasta el momento me siguen brindando sus consejos y apoyo incondicional.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Zimri, Paty, Miguel, Marisol, Alejandro y Samir por su apoyo en los experimentos.

A los Doctores y personal técnico que labora en la Facultad de Medicina, M. en C. Juan Carlos Villegas. A los técnicos del CIBIS, Jonathan Orduño y, por último, pero no menos importante, a Ixchel que no solo me apoyo académicamente si no que estuvo incondicionalmente conmigo, enseñándome nuevas cosas del proyecto o de la vida.

Mil gracias a todos.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN .....	7
2.1 Familia <i>Asteraceae</i> .....	7
2.2 Género <i>Bidens</i> .....	7
2.3 <i>Bidens odorata</i> .....	8
2.3.1 Etnomedicina de <i>Bidens odorata</i> .....	9
2.3.2 Extracto hidroalcohólico y fracciones de <i>Bidens odorata</i> frente a la respuesta inflamatoria .....	9
2.3.3 Farmacología de <i>Bidens odorata</i> .....	10
2.4 Respuesta inflamatoria .....	11
2.4.1 Células que participan en la inflamación .....	12
2.4.1.1 Macrófagos.....	14
2.4.1.1.1 Macrófagos Tipo 1 .....	15
2.4.1.1.1.1 Lipopolisacáridos.....	15
2.4.1.1.1.2 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	16
2.4.1.1.2 Macrófagos Raw 264.7 .....	17
2.5 Tratamientos farmacológicos.....	18
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
4 HIPÓTESIS.....	19
5 OBJETIVO .....	19
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
6 MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
6.1 Elucidación química de <i>Bidens odorata</i> .....	20
6.1.1 Colecta de la planta .....	20
6.1.2 Obtención del extracto hidroalcohólico .....	20
6.1.3 Bipartición del extracto integro de <i>Bidens odorata</i> (HABo).....	21
6.1.4 Obtención de las reuniones con mayor efecto antiinflamatorio de <i>Bidens odorata</i> .....	21
6.1.4.1 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R1 de <i>Bo</i> .....	23
6.1.4.2 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R2 de <i>Bo</i> .....	24
6.1.4.3 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R3 de <i>Bo</i> .....	25
6.1.4.4 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R4 de <i>Bo</i> .....	25
6.1.4.5 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R5 de <i>Bo</i> .....	26

6.1.4.6 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R6 de <i>Bo</i> .....	27
6.1.4.7 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R7 de <i>Bo</i> .....	28
6.1.4.8 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R8 de <i>Bo</i> .....	29
6.2 Cultivo de Macrófagos Raw 264.7 .....	29
6.3 Evaluación de la toxicidad de las reuniones de <i>Bidens odorata in vitro</i> .....	30
6.3.1 Cristal violeta .....	30
6.4 Cultivo de Macrófagos Raw 264.7 con los diferentes tratamientos .....	30
6.5 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	31
6.6 Segundo cultivo de Macrófagos Raw 264.7 con los diferentes tratamientos .....	31
6.7 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de las Subfracciones de las reuniones de <i>Bidens odorata</i> .....	32
6.8 Caracterización de la estructura química de los compuestos químicos presentes en las fracciones más activas de <i>Bidens odorata</i> .....	32
6.9 Determinación de la concentración de los compuestos más activos de las reuniones de las Subfracciones efectivas de <i>Bidens odorata</i> .....	33
6.10 Análisis estadístico .....	33
7 RESULTADOS .....	34
7.1 Elucidación química de <i>Bidens odorata</i> .....	34
7.1.1 Obtención de la fracción acetoélica de <i>Bidens odorata</i> .....	34
7.1.2 Obtención de las reuniones de la fracción acetoélica de <i>Bidens odorata</i> (FAEBo).....	38
7.2 Los tratamientos experimentales no tienen efectos citotóxicos sobre los macrófagos Raw 264.7 .....	51
7.3 FAEBo y sus reuniones controlan de manera eficiente la expresión de TNF $\alpha$ en macrófagos Raw 264.7 activados por LPS .....	52
7.4 Elucidación de los compuestos químicos de las subfracciones más activas de <i>Bidens odorata</i> .....	55
7.5 Las subfracciones de las reuniones de <i>Bidens odorata</i> controlan de manera diferencial la expresión de TNF $\alpha$ en Macrófagos Raw 264.7 activados por LPS.....	69
7.6 Concentración de los compuestos más activos de las reuniones de las Subfracciones efectivas de <i>Bidens odorata</i> .....	72
8 DISCUSIÓN .....	78
9 CONCLUSIÓN .....	82
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
11. ANEXOS.....	90
12. GLOSARIOS .....	90

## 1. RESUMEN

*Bidens odorata* (*B.o*) es una de las especies arvenses más comunes en el occidente de México, se encuentra prácticamente en todo el país excepto en la península de Yucatán. Tiene algunos usos comerciales como forraje para ganado bovino y también es utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos desórdenes del aparato digestivo, contra la ictericia, como tranquilizante, como antipirética y en la cura de la enfermedad cultural denominada “asombro”, la cual, se caracteriza por pesadez en el cerebro, uñas moradas, dolor de huesos, tristeza, rostro amarillo y pérdida del apetito<sup>13,16</sup>.

En un estudio preliminar, *Bidens odorata* mostró tener propiedades antiinflamatorias al suprimir la inflamación en 3 condiciones diferentes, las cuales son: Estudios *in vivo* en un modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por TPA y estudios *in vitro* de los sinoviocitos activados a manera de artritis reumatoide (AR) y de células endoteliales HUMEC activados de manera de disfunción endotelial (DE).

Con base en esta información, el objetivo de este trabajo fue conocer a través de estudios fitoquímicos las moléculas responsables de la eficiencia del extracto como antiinflamatorio y por otro evaluar el efecto antiinflamatorio de las fracciones activas de la planta en un modelo de inflamación *in vitro* en macrófagos RAW 264.7 inducida por LPS.

Para aislar las moléculas activas se utilizaron técnicas cromatográficas como la cromatografía en placa fina y columna abierta. Los compuestos aislados en forma pura se analizaron por varias técnicas espectroscópicas y espectrométricas, para poder elucidar y determinar la estructura química de las reuniones activas (R1-R8).

Para la evaluación de la capacidad antiinflamatoria de las reuniones activas de *Bo* se utilizó el modelo *in vitro* antes mencionado, para lo cual se confirmó el efecto a través de la producción de TNF $\alpha$  por la técnica de ELISA. Siendo la R4 y R7, las fracciones con mayor efecto antiinflamatorio al disminuir la concentración de TNF $\alpha$  en las concentraciones de 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4 y 2  $\mu\text{g/mL}$ . Dentro de estas fracciones se pueden encontrar compuestos químicos de tipo flavonoide y fenilpropanoide como la rutina, luteolina, ácido ferúlico, ácido clorogénico y ácido cafeico, los cuales, se caracterizan por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Familia *Asteraceae*

La familia *Asteraceae* o *Compositae* son una de las familias más grandes y diversas, que comprende el 10 % de todas las especies de plantas con flores<sup>1</sup>. Son una familia cosmopolita, que se distribuye en casi todas las latitudes<sup>2</sup>. Sus especies presentan una gran diversidad de formas de crecimiento, variabilidad morfológica, distribución geográfica y diversidad taxonómica<sup>3</sup>; por lo que no es raro verlas dominando los medios arvenses, ruderales o en ocasiones compitiendo con los cultivos como malezas<sup>2</sup>. El nombre alternativo de *Compositae* hace referencia a la disposición de la inflorescencia básica en la familia, una cabezuela que semeja una flor, pero que en realidad son pocas a muchas flores sésiles e insertas en una estructura parecida a un cáliz denominado involucre<sup>4</sup>.

En nuestro país existen 428 géneros, de los cuales 324 son nativos, 67 endémicos y 37 introducidos; el número de especies aumentó a 3127, de ellas 3065 son nativas, 1996 endémicas y 64 introducidas<sup>5</sup>.

Muchos miembros de las *Asteraceae* son utilizados como alimento, cercas vivas, materiales de construcción y fuente de aceites, insecticidas y ornamentales de jardín; sin embargo, se utilizan especialmente en la medicina tradicional<sup>6</sup>.

La gran diversidad de *Asteraceae* también se refleja en la presencia de diferentes compuestos bioactivos importantes para la industria farmacéutica<sup>7</sup>. Los miembros de *Asteraceae* son conocidos por sus actividades farmacológicas como antibacterianas, antiinflamatorias, cicatrizantes, antihemorrágicas, antipiréticas, hepatoprotectoras, antitusivas, antitumorales, antiparasitarias y antiespasmódicas. Algunas de las plantas medicinales más populares utilizadas en México son el (*Artemisia ludoviciana*), el árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*), el zoapatle (*Montanoa tomentosa*) y el cempazúchitl (*Tagetes erecta*)<sup>6</sup>.

### 2.2 Género *Bidens*

*Bidens* significa dos dientes, aludiendo a las dos púas del vilano<sup>8</sup>. El género comprende alrededor de 240 especies con distribución cosmopolita<sup>9</sup>. Gran parte de las especies son ruderales y crecen hasta en las calles de la capital, o en las milpas como maleza<sup>8</sup>.

El género *Bidens* presenta especies con usos etnofarmacológicos muy diversos<sup>10</sup>. Entre estos usos destacan indicaciones como emenagogo, afrodisíaco femenino, antifebril, analgésico

del oído y del tracto urinario, además de ayudar a eliminar cálculos renales y ser beneficioso para el hígado contra tumores de mama, esplenoesclerosis, dolores de garganta, problemas estomacales y asma<sup>10</sup>.

*Bidens pilosa* L. se destaca entre las especies del género debido a la gran cantidad de productos naturales caracterizados en ella y a las actividades biológicas reportadas para sus extractos, fracciones y compuestos<sup>9</sup>. Dentro de sus principales compuestos químicos identificados se encuentran los compuestos alifáticos, flavonoides, terpenoides, fenilpropanoides, grupos aromáticos, porfirinas, entre otros<sup>11</sup>; los cuales, han sido reportados como antimaláricos, antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatorios, inmunosupresores, anti-diabéticos, antioxidantes, etc<sup>12</sup>.

Dentro del género también encontramos a la especie *Bidens odorata*, una planta muy poco estudiada, pero con un gran uso en la medicina tradicional mexicana.

### 2.3 *Bidens odorata*



Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Subfamilia: *Asteroideae*

Género: *Bidens odorata (cav)*

Especie: *Bidens odorata (cav)*

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Bidens odorata*<sup>13</sup>

*Bidens odorata cav.* (Figura 1) es conocida comúnmente como Mozoquelite, Aceitilla, Acahual, Acahual blanco, rosetilla, té de milpa blanco, rosa blanca, ricilla, entre otros<sup>13</sup>. Es una hierba que mide de 10 a 80cm de altura y tiene tallos angulosos de color púrpura. Sus hojas suelen estar divididas como en cinco pequeños fascículos<sup>14</sup>. Alrededor presentan lengüetas blancas con líneas púrpuras, mientras las centrales son flores tubulosas y amarillas. Los frutos son largos y angostos, van del color café al negro<sup>14</sup>.

Habita principalmente en las sierras de México, así como en la región suroeste de Estados Unidos y Centroamérica<sup>15</sup>. Se presenta en climas cálido, semiseco, seco y templado, desde los 420 y hasta 2750 msnm. Es una maleza común en terrenos de cultivo<sup>14</sup>.

### 2.3.1 Etnomedicina de *Bidens odorata*

Un estudio etnobotánico de *Bidens odorata* demostró que la planta se utiliza para diversas dolencias, principalmente en trastornos gastrointestinales (diarrea, dolor de estómago, vomito, empacho y flatulencias), trastornos renales, diabetes, inflamación del hígado, y otros trastornos como espanto (susto), nervios (alteraciones nerviosas), coraje (ira), e infecciones<sup>16</sup>. También se prescribe la aceitilla en otras alteraciones orgánicas como dolor de huesos, de cabeza y dolor de riñón. Para heridas, mal de orín, anemia, irritación de la piel y contra la caída del cabello<sup>14</sup>. Además, que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitusiva, catártica y hemostática<sup>14</sup>.

### 2.3.2 Extracto hidroalcohólico y fracciones de *Bidens odorata* frente a la respuesta inflamatoria

A pesar de que *Bidens odorata*, es una planta poco estudiada, recientemente se ha descubierto que tiene propiedades antiinflamatorias<sup>14,17,18 y 19</sup>.

En el año 2016<sup>20</sup>, nuestro grupo de trabajo demostró una investigación para determinar si la fracción acetoélica de *Bidens odorata* (FAEBo) y sus reuniones (R1-R8), tenían capacidad antiinflamatoria frente a un modelo de artritis reumatoide, patología que al igual que la disfunción endotelial es caracterizada por un estado proinflamatorio. Castro colectó la planta en la comunidad de Chamilpa, Morelos. Posteriormente, la llevó a sequedad durante 10 días a 37 °C y la molió para después macerarla y obtener la extracción etanol/agua. Realizó una bipartición con acetato de etilo y se obtuvo la fracción acetoélica (FAEBo).

FAEBo se sub-fraccionó y agrupó en 8 reuniones, las cuales, evaluó exitosamente en un modelo de inflamación auricular murino inducido por TPA. Los resultados mostraron que tanto FAEBo, como las reuniones R1 y R5 fueron eficientes. R5 incluso controló el edema auricular mejor que el tratamiento farmacológico (Dexametasona). Posteriormente células de la membrana sinovial a las que previamente se les indujo inflamación, fueron sembradas y tratadas con diferentes concentraciones (0.08, 0.4, 2, 10 o 50 µg/mL) de la R5 y sus subfracciones (SF 20, 23, 31 o 33) para evaluar la expresión de IL-6. Los resultados indicaron que R5 y sus subfracciones controlaron la producción de IL-6 llevándolo al nivel del control

farmacológico y del control sin tratamiento. Esto indicó que R5 tenía capacidad antiinflamatoria. La fitoquímica realizada tanto a FAEBo y R5 indicó la presencia de terpenos y en su mayoría compuestos fenólicos como flavonoides y fenilpropanoides como el ácido cafeico, ácido ferúlico y poliacetileno<sup>20</sup>.

Seguido, en el año 2019<sup>21</sup>, se realizó una investigación en un modelo de DE que consistía en cultivar células HMEC-1, las cuales, fueron tratadas con las diferentes concentraciones de FAEBo y sus reuniones aunado a AGII, con la intención de evaluar si la fracción acetotética de *B. odorata* (FAEBo) y sus reuniones son capaces de controlar algunas de las características de la disfunción endotelial *in vitro*. Al término del tratamiento se obtuvieron células para evaluar la citotoxicidad de FAEBo y sus reuniones, se cosecharon los medios para evaluar las concentraciones de interleucina 6 (IL-6) parámetro importante de la DE. En base a los resultados obtenidos, se observó que las reuniones R1, R5, R7 y R8 controlan significativamente la producción de esta citocina.

Sin embargo, en estos resultados previos, quedo pendiente identificar a las moléculas presentes en la R1, R5, R7 y R8 que pudieran intervenir en el control de la inflamación que es parte de la disfunción endotelial y artritis reumatoide, y que permitiría sentar las bases para el desarrollo de un fito-medicamento útil, seguro y eficaz para el tratamiento de enfermedades en las que la inflamación sea un factor preponderante<sup>20,21</sup>.

### 2.3.3 Farmacología de *Bidens odorata*

*Bidens odorata* es una especie ampliamente distribuida y utilizada en la medicina tradicional mexicana, sin embargo, aunque existen pocos reportes de esta planta, existen algunos donde demuestran que puede ser una excelente fuente de moléculas activas con propiedades antimicobacterianas e hipolipidémicas<sup>22</sup>. También, demostró ejercer una baja toxicidad en un modelo *in vitro* (10-1000 µg/mL) e *in vivo* (500-5000 mg/kg), efectos antioxidantes utilizando una concentración de la planta de 10-1000 µg/mL, actividad antiinflamatoria medida en un modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por TPA y efectos antinociceptivos mediados por canales K sensibles al ATP<sup>+</sup><sup>17</sup>.

En el año 2020, *Bidens odorata* (100-200 mg/kg) mostró actividad anticonvulsiva al aumentar la latencia a la aparición de convulsiones inducidas por estricnina, también ejerció interacción sinérgica antinociceptiva con paracetamol (1:1) y naproxeno (1:1)<sup>23</sup>.

Hay reportes científicos donde se demuestra su actividad, diurética, antidiarreica y por primera vez en el 2017 un estudio dirigido a inflamación<sup>24</sup>. El efecto diurético se evaluó en un extracto acuoso, usando como tratamiento farmacológico furosemida a 2 mg / kg. Se evaluó el sodio, potasio y equilibrio de agua. Los resultados indicaron que el extracto acuoso de *Bidens odorata* induce una respuesta diurética. Su análisis fitoquímico mostró moléculas como: alcaloides, saponinas, azúcares reductores y taninos<sup>25</sup>.

Su actividad antidiarreica, fue evaluada en el extracto de cloroformo, donde mostró tener el mejor efecto al inhibir en un 72.9% la diarrea inducida. Se encontró que las fracciones que tiene este efecto contienen componentes, cuyos principales compuestos son ácido palmítico (9,14%), ácido linoleico (13,12%), Ácido trans-oleico (9,24%), ácido esteárico (3,39%), ácido lignocérico (3,55%), ácido octacosanoico (3,14%) y ácido behénico (3,23%)<sup>26</sup>.

#### 2.4 Respuesta inflamatoria

La inflamación es una respuesta de los organismos a diferentes agresiones endógenas o exógenas<sup>27</sup>. Puede clasificarse según el tiempo en que se prolonga, el daño que ocasiona, así como los efectores involucrados en su génesis. Se clasifica como aguda o crónica según el tiempo de evolución, aunque, en ocasiones, los patrones convencionales no detectan un suceso previo<sup>28</sup>.

La inflamación aguda comienza en minutos u horas y participan mecanismos de respuesta inmune innata que activan la adquirida. La presencia de pus en la dermis, esputo amarillento y líquido cefalorraquídeo turbio, son signos característicos de una respuesta inflamatoria aguda por algún agente<sup>29</sup>.

Mientras tanto, la inflamación crónica ocurre en días, semanas y hasta meses. Los mecanismos de respuesta innata participan, pero es la adquirida la que mantiene el proceso en el tiempo y causa daño tisular<sup>27</sup>.

Cuando los patógenos superan las barreras externas de la inmunidad innata (piel y mucosas), la infección o lesión tisular resultante puede inducir una cascada compleja de fenómenos

conocida como reacción inflamatoria.<sup>30</sup> La inflamación es una respuesta biológica del sistema inmunológico que puede desencadenarse por una variedad de factores, incluidos patógenos, células dañadas y compuestos tóxicos desencadenando así vías de señalización inflamatorias, más comúnmente las vías NF- $\kappa$ B, MAPK y JAK-STAT.<sup>31</sup> Su propósito es localizar y eliminar el agente nocivo, así mismo eliminar los componentes del tejido dañado para que pueda regresar el sistema al equilibrio<sup>32</sup>.

Es un proceso complejo en el que aumenta la permeabilidad capilar y migración de los leucocitos desde la sangre hacia la zona afectada. Esto se logra a través de cambios estructurales en los capilares sanguíneos, que permiten el paso de los leucocitos desde la sangre al tejido. Además, el reclutamiento celular se lleva a cabo por las citoquinas, especialmente el TNF y las quimiocinas, encargadas de activar y guiar a los fagocitos hacia la zona afectada<sup>33</sup>.

#### 2.4.1 Células que participan en la inflamación

Ante una respuesta inflamatoria, gran variedad de células acude al llamado, para intentar regresar al sistema al equilibrio, entre las participantes se encuentran los neutrófilos, los linfocitos B y T, eosinófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos<sup>34</sup>.

- Los neutrófilos: Son la primera línea de defensa inmunitaria innata<sup>35</sup>. Puede producir una gran variedad de citoquinas y quimiocinas tras la estimulación<sup>36</sup>; para contribuir al proceso inflamatorio, los neutrófilos deben migrar a los lugares correspondientes de los tejidos. Esto necesita cierto grado de organización: el órgano afectado debe señalar el lugar de la lesión, y el neutrófilo debe fijarse u adherirse específicamente a dicho tejido<sup>34</sup>. Diversas funciones de los neutrófilos, como la fagocitosis, el estallido oxidativo, la degranulación y las trampas extracelulares de neutrófilos (TNE), parecen estar alineadas para combatir la infección, pero también para generar respuestas proinflamatorias<sup>37</sup>.
- Linfocitos T y B: están implicados en la respuesta inmune adquirida o específica de antígeno dado que son las únicas células del organismo capaces de reconocer y responder específicamente a cada epítipo antigénico<sup>38</sup>. Los linfocitos T cooperadores producen citocinas que activan a las células de la respuesta inmune innata, los linfocitos T citotóxicos causan la lisis de las células infectadas, y los linfocitos B se

diferencian en células productoras de anticuerpos<sup>39</sup>. En el proceso inflamatorio se favorece la diferenciación de los linfocitos T en dos tipos de poblaciones celulares: Th1 secretoras de citocinas proinflamatorias y los Th2 que producen citocinas antiinflamatorias y de esta manera regulan el proceso<sup>40</sup>. Por otro lado, los linfocitos B (LB) tienen un mecanismo efector crítico para el daño tisular, por medio de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y LT- $\alpha$ , las cuales tienen la capacidad de inducir producción de IL-6, que a su vez estimula los LB y por ende también perpetúan la inflamación<sup>41</sup>.

- Eosinófilos: Los eosinófilos son una de las principales células efectoras del sistema inmunitario<sup>42</sup>. Para acumularse dentro de los sitios de inflamación, los eosinófilos deben adherirse y migrar a través de la microvasculatura<sup>43</sup>. Una vez en los tejidos los eosinófilos pueden generar sus propias citocinas inductoras de sobrevivencia en particular IL-5 y GM-CSF a través de la interacción entre VLA-4 y VLA-6 y entre fibronectina tisular y laminina<sup>44</sup>.
- Monocitos: Los monocitos, son leucocitos circulantes importantes tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, que funcionan principalmente en la defensa inmunitaria, la remodelación tisular y la inflamación<sup>45</sup>. Las proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP) y sus receptores son fundamentales en la respuesta inflamatoria y en el reclutamiento de células inmunes en sitios de inflamación<sup>46</sup>. Ante una respuesta inflamatoria, los monocitos circulantes abandonan el torrente sanguíneo y migran a los tejidos donde, se diferencian en poblaciones de macrófagos o células dendríticas<sup>47</sup>. Es por ello, por lo que, ya sea una infección o una lesión, los monocitos son una característica clave en un proceso inflamatorio<sup>45</sup>.
- Mastocitos: Los mastocitos son una población de células heterogéneas, localizadas en los tejidos conectivos del organismo<sup>48</sup>. Sirven como protectores celulares, detectando una variedad de sustancias químicas, patógenos y desencadenantes biofísicos<sup>49</sup>. Su objetivo es restaurar la homeostasis en el tejido dañado, eliminando o aislando el agente causante que la puso en marcha<sup>48</sup>. Ellos actúan en respuestas inflamatorias donde son activados por desencadenantes no alérgicos, por ejemplo, citocinas<sup>50</sup> como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL 1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP 1- $\alpha$  y  $\beta$ ).<sup>51</sup>

- **Macrófagos:** Los macrófagos corresponden a células clave en la regulación de la inflamación, respuesta inmune, homeostasis ósea y remodelación tisular<sup>52</sup>. En procesos inflamatorios tienen un papel muy importante ya que son los mayores productores de mediadores inflamatorios en las enfermedades autoinmunes y auto-inflamatorias<sup>53</sup>. Cuando ocurre un proceso inflamatorio, los macrófagos reclutados y residentes en el tejido proliferan, se diferencian o se activan bajo el efecto de interleucinas o factores de crecimiento. Posteriormente, asumen el papel de células presentadoras de antígenos, dejan de responder a los estímulos proliferativos y se convierten en fagocitos eficientes<sup>54</sup>.

#### 2.4.1.1 Macrófagos

Los macrófagos son grandes glóbulos blancos del sistema inmunológico innato que residen en todos los tejidos y tienen múltiples funciones y, a menudo, diferentes nombres según su ubicación<sup>55</sup>. Su nombre se deriva del término griego "grandes comedores" (makros, grande; y phagein, comer)<sup>56</sup>. A finales del siglo XIX, Elie Metchnikoff fue el primero en identificar los macrófagos como grandes células mononucleares fagocíticas que pueden desempeñar un papel importante en la inmunidad<sup>50</sup>. Él asignó a la internalización de partículas el papel de defender al huésped contra estímulos nocivos, lo que representaba una nueva función relativa a la tarea previamente reconocida de la digestión intracelular<sup>57</sup>. Sus atributos fundamentales les permiten "limpiar" su entorno fagocitando el material celular y regulando la reparación y el mantenimiento de los tejidos<sup>58</sup>.

Clásicamente se considera que, para que los macrófagos logren su plena actividad deben pasar de un estado de reposo a un estado de activación por señales, primero de INF- $\gamma$ , y luego una segunda señal dada por el DAMP, que en este caso es el lipopolisacárido (LPS)<sup>59</sup>.

Desde el punto de vista funcional, se dividen las células del sistema fagocítico mononuclear (SMF) en dos grandes grupos: macrófagos tipo 1 (M1) y macrófagos tipo 2 (M2). El tratamiento con INF- $\gamma$  o LPS induce macrófagos M1, que se consideran proinflamatorios y secretan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, que promueven la generación de linfocitos Th1, especies reactivas de oxígeno y derivadas de óxido nítrico y pueden destruir células tumorales<sup>60</sup>.

Los macrófagos no pueden distinguir entre las moléculas que son "propias" y las que no son "propias" durante el proceso inflamatorio; por ello cuentan con numerosos receptores los cuales se encargan de mantener dicha función<sup>61</sup>.

#### 2.4.1.1.1 Macrófagos Tipo 1

Los macrófagos M1 se originan durante la respuesta inflamatoria tras la estimulación con IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o componentes microbianos como el lipopolisacárido (LPS)<sup>62</sup>. Se caracteriza por el aumento del nivel de interleucinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, IL-23<sup>64</sup>) junto con una prevalencia de las células CD68+ sobre CD206+ y CD163+<sup>63</sup>, y baja concentración de IL-10<sup>64</sup>. Producen mediadores de inflamación como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y óxido nítrico<sup>64</sup>. Los macrófagos en el extremo M1 del espectro se consideran un fenotipo proinflamatorio, con una robusta capacidad fagocítica y citotóxica; estas células se definen por su expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) Clase II, el grupo de diferenciación (CD)14, CD80/CD86 y CD38, así como el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)<sup>65</sup>.

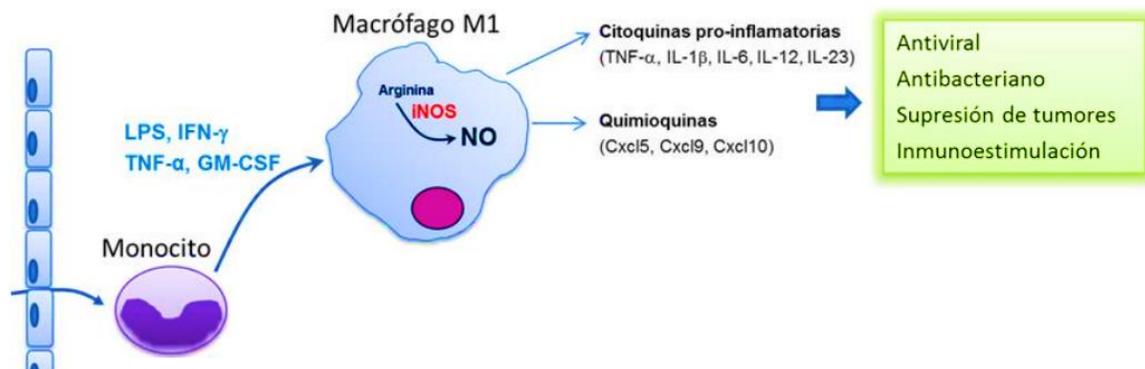


Figura 2. Macrófagos tipo 1 (M1)<sup>62</sup>.

##### 2.4.1.1.1.1 Lipopolisacáridos

El lipopolisacárido (LPS) es un componente importante de la pared celular de las bacterias gramnegativas y es vital para la integridad celular bacteriana, la viabilidad y la defensa contra el estrés ambiental<sup>66</sup>. Es una toxina bacteriana serológicamente reactiva<sup>67</sup>.

El lipopolisacárido es una molécula anfifílica estable al calor compuesta por tres regiones: lípido lipofílico A, polisacáridos hidrofílicos o núcleo de oligosacárido y antígeno O (Figura 3)<sup>66</sup>. Estas moléculas también se conocen como lipoglicanos debido a la presencia de moléculas de lípidos y azúcares<sup>67</sup>.

Representan un modelo clave para caracterizar la respuesta inflamatoria mediada por el receptor tipo Toll 4 (TLR4)<sup>68</sup>. Se ha utilizado a menudo en la respuesta inflamatoria porque puede activar los macrófagos<sup>69</sup>. Los macrófagos estimulados por LPS activan varias vías de señalización intracelular, incluidas las vías NF- $\kappa$ B y MAPK<sup>69</sup>. En consecuencia, transactivan genes proinflamatorios, incluidos iNOS, COX-2, IL-12 y TNF- $\alpha$ <sup>70</sup>.

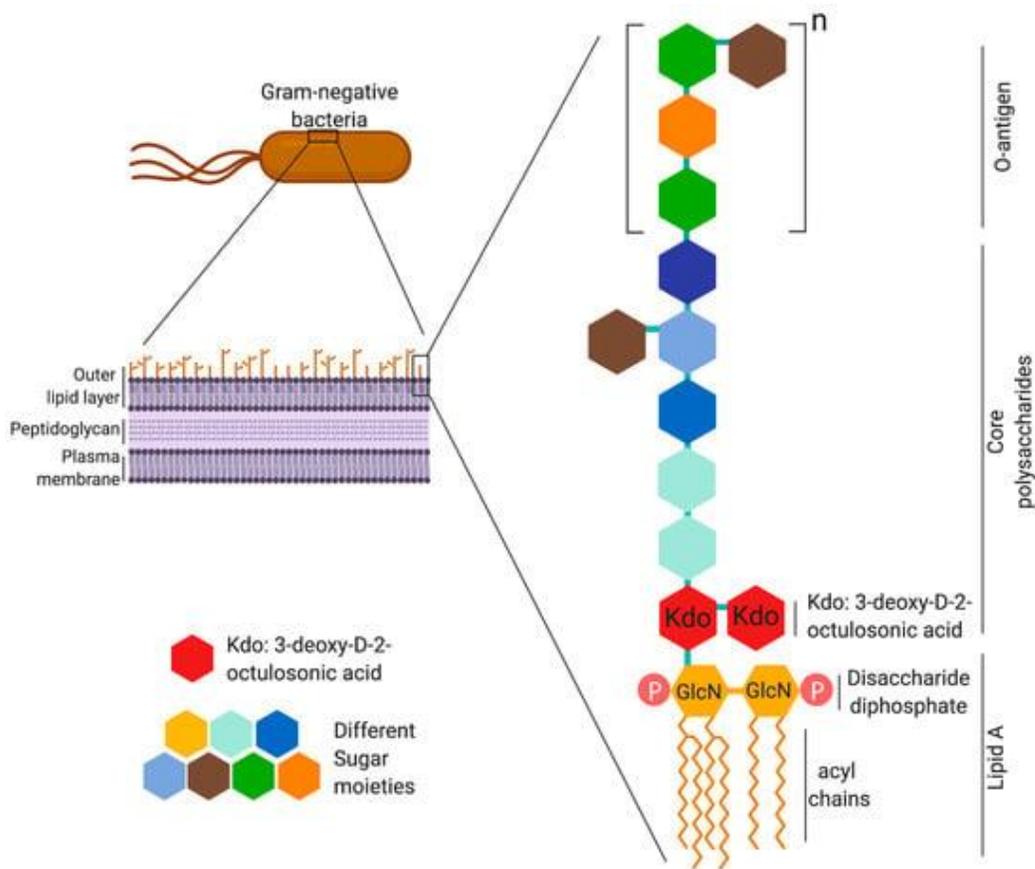


Figura 3. Detalles estructurales del lipopolisacárido de una bacteria Gram-negativa<sup>66</sup>.

#### 2.4.1.1.1.2 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

Las M $\Phi$  son las células fagocíticas más importantes del sistema inmunológico y, entre otras funciones, liberan citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>71</sup>. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina proinflamatoria<sup>72</sup>. Está codificada

por el gen TNFA ubicado en el cromosoma 6 y comparte locus con los genes de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que desempeña un papel central en la presentación de antígenos<sup>73</sup>. Es un componente crucial para una respuesta inmunitaria normal, puede activar el sistema inmunitario para regular; sin embargo, la producción inadecuada o excesiva de TNF- $\alpha$  puede ser perjudicial y provocar enfermedades<sup>74</sup>.

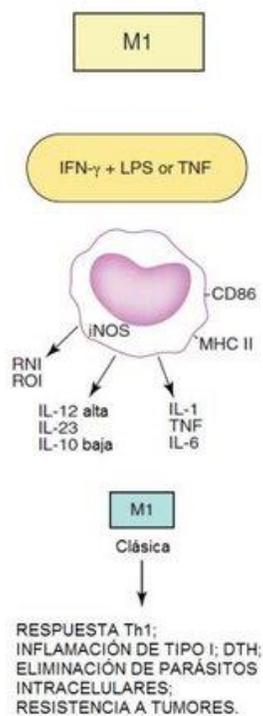


Figura 4. Producción de TNF $\alpha$  por macrófagos tipo 1<sup>75</sup>.

#### 2.4.1.1.2 Macrófagos Raw 264.7

La línea celular RAW 264.7 es una línea celular similar a los macrófagos que se derivó inicialmente de la ascitis de un tumor inducido por el virus de la leucemia de Abelson (A-MuLV) en un ratón macho BALB/c<sup>76</sup>. Es un cultivo de células del linaje osteoblástico y en tejido subcutáneo<sup>77</sup>. Son capaces de realizar pinocitosis y fagocitosis<sup>78</sup>.

Tras la estimulación con LPS, las células RAW 264.7 aumentan la producción de óxido nítrico (NO) y mejoran la fagocitosis. Además, estas células son capaces de matar a las células diana por citotoxicidad dependiente de anticuerpos<sup>78</sup>. Las células RAW 264.7 M0 pueden polarizarse en macrófagos de tipo M1 o M2<sup>76</sup>.

## 2.5 Tratamientos farmacológicos

Los medicamentos utilizados para tratar enfermedades inflamatorias son los glucocorticoides (GC) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), y las terapias biológicas, utilizadas para atacar e inhibir moléculas específicas de las respuestas inmunitarias e inflamatorias<sup>79</sup>, (por ejemplo, anticuerpos o receptores solubles para bloquear citocinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), entre otras<sup>80</sup>.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son el grupo farmacológico que más se consume globalmente con o sin prescripción médica, sobre todo para el tratamiento sintomático de diversos padecimientos que cursan con dolor agudo o crónico<sup>81</sup>. Sin embargo, su uso se ve limitado por la posible aparición de efectos adversos, potencialmente letales, como puede ser la úlcera péptica o la insuficiencia renal. Tanto los efectos terapéuticos como su potencial toxicidad se deben a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) y, en consecuencia, a la inhibición de prostaglandinas y tromboxanos<sup>82</sup>.

Un tratamiento farmacológico que ayuda a regular los factores inflamatorios e inmunológicos es la dexametasona: Es un glucocorticoide sintético que ejerce una potente acción antiinflamatoria e inmunosupresora, siendo muy utilizado para tratar alergias severas y problemas inflamatorios del organismo<sup>83</sup>.

La alta incidencia de enfermedades en las que está involucrada la inflamación como proceso patológico y la presencia de efectos adversos con el empleo de muchos de los fármacos antiinflamatorios que se utilizan en la práctica médica actual, ha orientado las investigaciones hacia la búsqueda de nuevas moléculas, con el objetivo de encontrar nuevas alternativas que de manera eficaz y segura limiten los efectos dañinos de los procesos inflamatorios y sus patologías asociadas<sup>82</sup>.

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado en diferentes modelos biológicos que *Bidens odorata* controla la respuesta inflamatoria. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la identidad química de los compuestos responsables de este efecto biológico.

Dado a eso en este proyecto surge y se resolverá la siguiente pregunta, ¿Cuáles son los compuestos químicos de las fracciones con mayor efecto antiinflamatorio de *Bidens odorata* en macrófagos 264.7 activados con LPS?

### 4 HIPÓTESIS

Los compuestos químicos de las fracciones más activas de *Bidens odorata* suprimen la respuesta inflamatoria en un modelo de macrófagos RAW 264.7 activados por LPS.

### 5 OBJETIVO

Identificar los compuestos químicos antiinflamatorios de las fracciones más activas de *Bidens odorata* a través de un estudio biodirigido.

#### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el fraccionamiento químico del extracto hidroalcohólico de *Bidens odorata*
2. Identificar las fracciones con mayor efecto antiinflamatorio en un modelo *in vitro* para su posterior fraccionamiento químico.
3. Identificar los compuestos químicos de las subfracciones más activas de *Bidens odorata*.
4. Determinar la concentración de los compuestos mayoritarios de las subfracciones más activas de *Bidens odorata*.
5. Caracterizar la estructura química de los compuestos presentes en las subfracciones más activas de *Bidens odorata*.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Elucidación química de *Bidens odorata*

En nuestro grupo de investigación, se estudiaron las fracciones activas de *Bidens odorata*, las cuales, mostraron tener propiedades antiinflamatorias en 3 modelos distintos, 1 *in vivo* y 2 *in vitro*. Pero debido al poco material almacenado, se decidió realizar una segunda colecta de la planta y su elucidación química.

#### 6.1.1 Colecta de la planta

Las partes aéreas de la planta fueron colectadas el 11 de febrero del 2022 en los alrededores de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) (Figura 5) campus Chamilpa, bajo las coordenadas de recolección previstas por la Biol. Gabriela Castro Martínez, 18°59'1.8" latitud norte y 99°14'23.6" longitud oeste, e identificadas por el M. en C. Gabriel Flores Franco del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) con el folio 34101 de la familia *Asteraceae*.

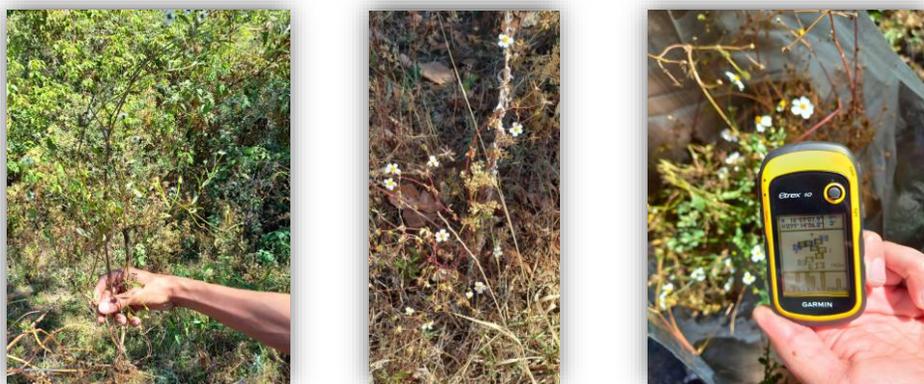


Figura 5. Colecta de *Bidens odorata*

#### 6.1.2 Obtención del extracto hidroalcohólico

El material vegetal de *Bidens odorata* (flor, hojas y tallos) se limpió y secó durante 10 días a temperatura ambiente en la comunidad de Xochitepec, Morelos. Una vez secas, se redujo el tamaño de partícula a 1-5 mm en un molino PULVEX-PLASTIC®. Posteriormente se realizó la extracción del material vegetal (441.2 g) por medio de una maceración en etanol/agua 60:40 (v/v) a temperatura ambiente durante 72 horas para la obtención del extracto hidroalcohólico.

De igual manera, se realizó la extracción del material vegetal (441.2 g) colectado por la Biol. Gabriela Castro Martínez en el año 2016 siguiendo las mismas condiciones.

#### 6.1.3 Bipartición del extracto integro de *Bidens odorata* (HABo)

El extracto hidroalcohólico de *Bidens odorata* 2016 fue comparado con el extracto de la planta colectada en el año 2022 mediante cromatografía en capa fina y análisis HPLC. Al observarse que se trataba de la misma especie se decidió unirlos para después concentrarlos por destilación a presión reducida en un rotavapor para su posterior secado. Con la intención de obtener la fracción de acetato de etilo (FAEBo), fracción a evaluar con base a los antecedentes antes mencionados, se utilizaron 810 mL del extracto y se suspendieron con 1350 mL de acetato de etilo (AE) en un embudo de separación para obtener dos fases, la acuosa y la orgánica (fase de AE). Ambas fases se concentraron en el rota vapor, obteniendo así la fracción acuosa (FAcBo) y la fracción acetoétilica (FAEBo).

#### 6.1.4 Obtención de las fracciones con mayor efecto antiinflamatorio de *Bidens odorata*

Para obtener las fracciones con mayor efecto antiinflamatorio de FAEBo, esta se fraccionó en una columna con sílica gel (Merck) que se eluyó con un sistema de diclorometano: metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH) a diferentes proporciones, como se muestra en la tabla 2. Las subfracciones obtenidas se concentraron por destilación a presión reducida en un rotavapor para su posterior secado.

Con la finalidad de determinar el perfil químico de las subfracciones obtenidas, se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF) de fase normal, utilizando quercetina (Flavonoide de tipo flavonol) como estándar y la FAEBo como referencia, así como diferentes reveladores que permitirán identificar el tipo de moléculas presentes. Con base a sus características coloridas al reaccionar con sulfato sérico y a su desplazamiento en la CCF se agruparon las 57 fracciones en 8 reuniones (tabla 2) (Figura 6). Siguiendo las similitudes con las fracciones obtenidas por la MMM. Gabriela Castro Martínez. Donde al ser evaluadas en cromatografía

en capa fina y HPLC, se encontraron moléculas como: ácidos grasos, terpenos, flavonoides no glicosilados y flavonoides glicosilados que revelan en color amarillo y naranja al ser expuestos a RPN/PEG<sup>20</sup>.

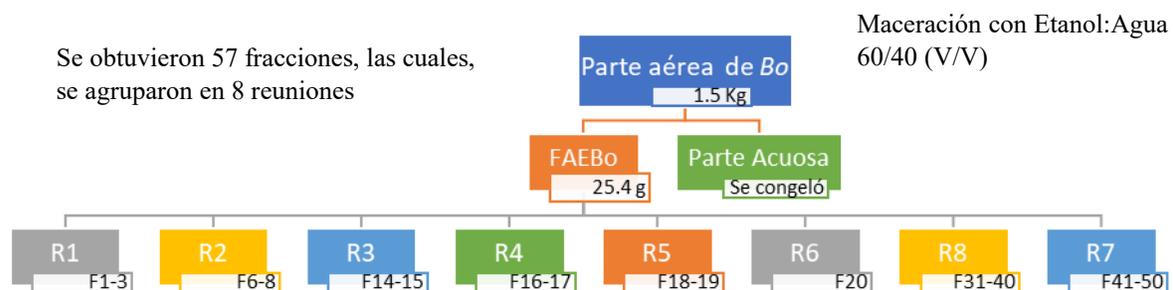


Figura 6. Elucidación de *Bidens odorata*

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave
1-7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	1-3	R1
8-14	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 95%-5%	6-8	R2
15-22	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 90%-10%	14-15	R3
23-28	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 85%-15%	16-17	R4
29-38	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 80%-20%	18-19	R5
39-42	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 75%-25%	20	R6
43-44	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 70%-30%	41-50	R7
45-51	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 50%-50%	31-40	R8
52-57	MeOH 100%		

Tabla 2. Subfracciones de *Bo* y las concentraciones de sus eluyentes.

#### 6.1.4.1 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R1 de *Bo*.

La reunión 1 de *Bo* (3.1 g) fue elucidada por cromatografía en columna utilizando como sistema de elución Hexano-AcoEt en gradientes de polaridad creciente. Se colectaron 69 fracciones de 25 mL cada una, las cuales, fueron reunidas en base a su similitud al ser comparada por CCF. El fraccionamiento se muestra en la tabla 3.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-3	n-hexano-AcoEt 100%-0%			
4-11	n-hexano-AcoEt 95%-05%	7-8 9-11	BoC9F7-8 BoC9F9-11	En BoC9F9-11 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Poliacetilenos en un tiempo de retención de 29.334 min. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
12-18	n-hexano-AcoEt 90%-10%	17 18-19	BoC9F17 BoC9F18-19	BoC9F18-19 31 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Poliacetilenos en un tiempo de retención de 28.667 y 29.634 min.
19-29	n-hexano-AcoEt 85%-15%	24 28-31	BoC9F24 BoC9F28-31	BoC9F24 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Cumarina en un tiempo de retención de 29.684 min. En BoC9F28-31 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Poliacetilenos en un tiempo de retención de 28, 28.517 y 28.883 min. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
30-42	n-hexano-AcoEt 80%-20%	32-34	BoC9F32-34	
43-49	n-hexano-AcoEt 75%-25%			
50-56	n-hexano-AcoEt 70%-30%			
57-63	n-hexano-AcoEt 50%-50%			
64-69	MeOH 0%-100%			

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico de R1 de *Bo*.

Las fracciones elucidadas mencionadas en la tabla anterior fueron estudiadas debido a que se trataba de los compuestos químicos mayoritarios de dicha reunión. Éstas, fueron estudiadas de manera separada, debido a que presentaron un Rf distinto entre ellas en CCF, lo cual indica que se trata de compuestos distintos por su diferencia de polaridad.

#### 6.1.4.2 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R2 de *Bo*

La reunión 2 de *Bo*, fue elucidada a través de 2 columnas cromatográficas, la primera utilizando un sistema de elución Hexano-AcoEt-MeOH en gradientes de polaridad creciente, de esta, se colectaron 41 fracciones de 15 mL cada una, las cuáles, fueron reunidas en base a su similitud al ser comparada por CCF. Al ser analizadas las CCF, se observó que los compuestos químicos mayoritarios no pudieron ser separados satisfactoriamente, debido que en las fracciones 2,3 y 4 se agruparon todos ellos, por lo cual, estas fracciones se reunieron y se montó una segunda columna cromatográfica, utilizando un sistema de elución n-hexano-AcoEt recolectando un volumen menor (10 mL,), se colectaron 45 fracciones, las cuales, fueron estudiadas mediante CCF al ser reveladas con 4-Hidroxibenzaldehido. El fraccionamiento se muestra en la tabla 4.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-6	n-hexano-AcoEt 100%-0%			
7-14	n-hexano-AcoEt 95%-05%			
15-22	n-hexano-AcoEt 90%-10%	19-22	BoC12F19-24 BoC12F23-24	BoC9F19-24 No se pueden observar compuestos mediante HPLC por lo que posiblemente se trata de terpenos. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
23-31	n-hexano-AcoEt 85%-15%			
32-38	n-hexano-AcoEt 80%-20%			
39-42	n-hexano-AcoEt 70%-30%			
43	n-hexano-AcoEt 50%-50%			
44	n-hexano-AcoEt 0%-100%			
45	MeOH 100%			

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de R2 de *Bo*.

Las fracciones elucidadas mencionadas en la tabla anterior fueron las estudiadas debido a que se trataba de los compuestos químicos mayoritarios de dicha reunión. Las fracciones fueron estudiadas de manera separada, debido a que al realizar el estudio mediante CCF, presentaron un Rf distinto entre ellas, lo cual indica que se trata de compuestos distintos por su diferencia de polaridad.

#### 6.1.4.3 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R3 de *Bo*

La reunión 3 de *Bo* (1.7 g) se corrió en un sistema de elución Hexano/AcoEt/MeOH en una proporción 50%-50% Hexano/AcoEt y se aumentó gradualmente la polaridad del MeOH hasta llegar a un 100%, esto, utilizando una columna cromatográfica fase normal. Se colectaron 60 fracciones de 15 mL cada una, las cuales, fueron estudiadas mediante CCF y al ser reveladas con Productos naturales (NP/PEG) revelaron principalmente flavonoides. El fraccionamiento se observa en la siguiente tabla 5.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-28	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-0%	F5-8	BoC7F5-8	En BoC7F5-8 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Cafeato en un tiempo de retención de 15.683 min. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
29-37	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-5%			
38-47	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-10%			
48-52	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-15%			
53-57	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-20%			
58-60	MeOH 100%			

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico de R3 de *Bo*.

La fracción elucidada mencionada en la tabla anterior fue evaluada debido a que almacenaba los compuestos químicos mayoritarios de dicha reunión.

#### 6.1.4.4 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R4 de *Bo*

Se empaco una columna cromatográfica fase normal con 20 g de sílica, la muestra R4 (1.701g) se corrió mediante un sistema de elución Hexano/AcoEt/MeOH en donde la polaridad del Hexano/AcoEt se conservó en un 50%-50% y la del MeOH fue aumentando gradualmente hasta llegar a un 100 %. Se obtuvieron 37 fracciones de 25 mL cada una, y mediante CCF fueron estudiadas para ser agrupadas mediante sus características químicas al ser reveladas con Natural Products (NP/PEG). Las fracciones elucidadas se muestran en la siguiente tabla 6.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-17	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-0%	F9 F10	BoC5F9 BoC5F10	En BoC5F9 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo flavanona, quercetina, cumarina y Ác. Cumarico. En BoC5F10 se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Ác. Cafeico, Luteolina y Ác. Protocatechuico. <i>Evaluadas en modelo biológico</i>
18-23	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-5%			
24-28	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-10%			
29-32	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-15%			
33-35	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-20%			
36-37	MeOH 100%			

Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico de R4 de *Bo*.

Las fracciones observadas en la tabla fueron elucidadas y evaluadas con el fin de determinar su comportamiento en el modelo biológico y reconocer las estructuras químicas responsables de dicha función.

#### 6.1.4.5 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R5 de *Bo*

La reunión R5 (1g) se absorbió en 2.5g de sílica fase normal y se empacó la columna cromatográfica con el mismo tipo de sílica. Se utilizó un sistema de elución Hexano/AcoEt/MeOH en donde la polaridad del Hexano/AcoEt se conservó en una proporción 50%-50% y la del MeOH fue aumentando gradualmente hasta llegar a un 100%. Se colectaron 50 fracciones, cada una de 25 mL y en base a sus características observadas en CCF, se decidió agrupar las fracciones y así obtener las reuniones a evaluar. Como se observa en la siguiente tabla 7.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-15	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-0%	F5 F10-14	BoC4F5 BoC4F10-14	En estas reuniones se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Quercetina, Ác. Cafeico, Flavanona y cumarinas. <a href="#">Evaluadas en modelo biológico</a>
16-26	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-5%			
27-36	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-10%			
37-41	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-15%			
42-46	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-20%			
47-50	MeOH 100%			

Tabla 7. Fraccionamiento cromatográfico de R5 de *Bo*.

Las fracciones elucidadas fueron evaluadas en el modelo biológico con el fin de determinar su actividad antiinflamatoria.

#### 6.1.4.6 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R6 de *Bo*

Se absorbió 0.7975g de R6 en 2 g de sílica fase normal y se empaco en una columna cromatográfica con 15g de sílica fase normal. Se utilizó el mismo sistema de elución Hexano/AcoEt/MeOH en donde la polaridad del MeOH fue aumentando gradualmente hasta llegar a un 100%. Se recolectaron 59 fracciones como se observa en la siguiente tabla 8.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-9	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-0%			
10-27	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-5%	F23-25	BoC8F23-25	Esta fracción se evaluó en HPLC, pero no se identificó el compuesto químico presente. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
28-35	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-10%			
36-43	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-15%	F39-43	BoC8F39-43	En esta reunión se puede observar mediante HPLC compuestos como Glucósido de quercetina y de Luteolina. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
44-49	n-hexano-AcoEt-MeOH 50%-50%-20%			
50-59	MeOH 100%			

Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de R6 de *Bo*

Cada una de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica fue evaluada mediante cromatografía en placa fina y reveladas con Natural products (NP/PEG), al observar sus características químicas similares, se decidió agruparlas con la finalidad de poder ser evaluadas en el modelo biológico y de la misma manera poder determinar su composición química de esta.

#### 6.1.4.7 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R7 de *Bo*

La reunión R7 (1.1988 g) de *Bo* se montó en una columna cromatográfica fase reversa, se corrió con un sistema Agua/Acetonitrilo y se utilizó MeOH para el lavado. Se colectaron 37 fracciones, las cuales, se plaquearon en cromatografía en placa fina y con base a sus características químicas al ser revelada con sulfato sérico se decidió agrupar cada una de ellas.

En la tabla 9 siguiente se observan cada una de las fracciones a evaluar.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-6	Agua/Acetonitrilo 100%-0%			
7-11	Agua/Acetonitrilo 95%-5%			
12-16	Agua/Acetonitrilo 90%-10%			
17-21	Agua/Acetonitrilo 85%-15%	F19	BoC11F19	En esta reunión se puede observar mediante HPLC compuestos como Glucósido de quercetina y Ác. Ferulico. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
22-26	Agua/Acetonitrilo 80%-20%			
27-30	Agua/Acetonitrilo 70%-30%	F28	BoC11F28	En esta reunión se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo Cafeato <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
31-33	Agua/Acetonitrilo 50%-50%			
34-35	Acetonitrilo 100%			
36-37	MeOH 100%			

Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico de R7 de *Bo*.

Las fracciones mostradas en la tabla anterior fueron estudiadas por HPLC y evaluadas en el modelo biológico para determinar su actividad antiinflamatoria.

#### 6.1.4.8 Separación de los compuestos químicos mayoritarios en R8 de *Bo*

La reunión R8 (1.3 g) se disolvió con metanol y la parte soluble se absorbió en 1.5g de sílica fase normal. La columna cromatográfica se empacó con 10 g de sílica fase normal, primero se lavó con metanol, seguido con Agua y se comenzó a correr la muestra con un sistema de elución Agua/Acetonitrilo. Se colectaron 43 fracciones, las cuales, se analizaron mediante CCF para poder ser agrupadas de acuerdo con sus características químicas al ser revelada con 4-Hidroxibenzaldehído. Las fracciones se observan en la siguiente tabla 10.

Número de fracciones	Sistema de elución	Fracciones elucidadas	Clave	Observaciones
1-4	Agua/Acetonitrilo 100%-0%			
5-9	Agua/Acetonitrilo 95%-5%			
10-16	Agua/Acetonitrilo 90%-10%	F14-15	BoC10F14-15	En esta reunión se puede observar mediante HPLC compuestos de tipo flavanona y cafeato. <a href="#">Evaluada en modelo biológico</a>
17-21	Agua/Acetonitrilo 85%-15%			
22-27	Agua/Acetonitrilo 80%-20%			
28-33	Agua/Acetonitrilo 70%-30%			
34-39	Agua/Acetonitrilo 50%-50%			
40-42	Acetonitrilo 100%			
43	MeOH 100%			

Tabla 10. Fraccionamiento cromatográfico de R8 de *Bo*

La fracción mostrada en la tabla anterior fue estudiada por HPLC y fue evaluada en el modelo biológico para determinar su actividad antiinflamatoria.

#### 6.2 Cultivo de Macrófagos Raw 264.7

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC ® Tib-71 TM) se cultivaron en medio ADVANCED DMEM (GIBCO) suplementado con 1% de GLUTAMAX™, 7% de SFB (inactivado por calentamiento) y 1% de antibiótico Pen-Strep (GIBCO) en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, posteriormente se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 70-90%. Se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1x y las células se desprendieron con 3 mL de tripsina (GIBCO), se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C por 20 min. Posteriormente se realizó el desprendimiento

de las células mecánicamente aplicando suavemente golpes laterales al frasco e inmediatamente se inactiva la tripsina mediante la adición de 9 mL del mismo medio de cultivo suplementado, la suspensión celular se colocó en un tubo Falcón de 15 mL para centrifugarlo a 1200 rpm durante 5 min.

Finalmente, se decantó el sobrenadante, el botón celular se suspendió en 1 mL de medio de cultivo y se realizó el conteo en la cámara de Neubauer para realizar los subcultivos.

### 6.3 Evaluación de la toxicidad de las reuniones de *Bidens odorata in vitro*

#### 6.3.1 Cristal violeta

Se cultivaron macrófagos RAW 264.7 en placas de cultivo celular de 96 pozos con un volumen de 200  $\mu$ L/pozo de medio de cultivo DMEM suplementado (7% SFB, 1% Penicilina/Estreptomicina y 1% Glutamina). Se incubaron durante 24 h a 37°C para promover la adhesión de las células a los pozos; después de 24 h se retiró el medio y se adicionó medio suplementado fresco con el tratamiento adecuado (0.016  $\mu$ g/mL, 0.08  $\mu$ g/mL, 0.4  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ g/mL y 10  $\mu$ g/mL), incubando nuevamente por 24 h a 37 °C.

Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 100  $\mu$ L PBS 1x frío, después de secarse se agregaron 50  $\mu$ L de solución cristal violeta al 0.1 % a cada pozo y se incubaron por 25 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se lavó cada pozo con agua hasta retirar el excedente de colorante y se dejó secar la placa sin tapa a temperatura ambiente. Posterior a ello, se agregaron 200  $\mu$ L de metanol al 100 % y se dejó incubar la placa durante 25 min a temperatura ambiente; pasado el tiempo de incubación se leyó la densidad óptica de cada pozo a 570 nm en un lector de placas.

#### 6.4 Cultivo de Macrófagos Raw 264.7 con los diferentes tratamientos

Se sembraron macrófagos RAW 264.7 ( $1.25 \times 10^5$  células/pozo) en placas de cultivo celular de 24 pozos, con 0.5 mL de medio suplementado durante 24 horas y posteriormente se estimularon con 100 ng/mL de LPS por 4 horas, pasado ese tiempo se colocaron los diferentes tratamientos (0.016  $\mu$ g/mL, 0.08  $\mu$ g/mL, 0.4  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ g/mL y 10  $\mu$ g/mL) en conjunto con LPS. Como control farmacológico se utilizó dexametasona a 84 nM y se incubaron por 22 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se cosecharon 100  $\mu$ L del medio para la técnica de ELISA (TNF $\alpha$ ).

### 6.5 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se cuantifico la concentración de TNF $\alpha$  en el medio recuperado de 22 horas de cultivo utilizando el Kit Human TNF ELISA Set BD OptEIA™. Para ello, placas de 96 pozos se sensibilizaron con el anticuerpo de captura en buffer de carbonatos en una relación 1:250 y se dejaron incubar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con 300  $\mu$ L/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente se bloquearon con 200  $\mu$ L/pozo de PBS-SFB al 10 % y se dejaron incubar a temperatura ambiente por una hora. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las placas con PBS Tween 0.05% y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo de las muestras, se incubaron a temperatura ambiente por dos horas. Concluidas las dos horas, se agregó el anticuerpo de detección conjugado con la enzima HRP y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Después la placa se lavó 7 veces y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo del sustrato TMB (Sigma, T0440), se dejó incubar a temperatura ambiente por treinta minutos en total oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo con 50  $\mu$ L/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N y se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 450 nm. Se determinaron las concentraciones de TNF $\alpha$  empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una R<sup>2</sup>>0.98. Para la cuantificación de proteínas se realizó el método de Bradford (Sigma, B6916), para ello, se colocaron 5  $\mu$ L/pozo de las muestras en placas de 96 pozos, se agregaron 250  $\mu$ L/pozo del reactivo de Bradford se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en total oscuridad y finalmente se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 595 nm. Se determinaron las concentraciones de proteínas empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una R<sup>2</sup>>0.98.

### 6.6 Segundo cultivo de Macrófagos Raw 264.7 con los diferentes tratamientos

Se sembraron macrófagos RAW 264.7 ( $2 \times 10^5$  células/pozo) en placas de cultivo celular de 24 pozos, con 0.5 mL de medio suplementado durante 24 horas y posteriormente se estimularon con 100 ng/mL de LPS por 4 horas, pasado ese tiempo se colocaron los diferentes tratamientos (0.0032  $\mu$ g/mL, 0.016  $\mu$ g/mL, 0.08  $\mu$ g/mL, 0.4  $\mu$ g/mL y 2  $\mu$ g/mL) en conjunto con LPS. Como control farmacológico se utilizó dexametasona a 84 nM y se incubaron por 22 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la cosecha del medio sobrenadante para la técnica de ELISA (TNF $\alpha$ ).

### 6.7 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de las Subfracciones de las reuniones de *Bidens odorata*

Se cuantificó la concentración de TNF $\alpha$  en el medio recuperado de 22 horas de cultivo utilizando el Kit Human TNF ELISA Set BD OptEIA™. Para ello, placas de 96 pozos se sensibilizaron con el anticuerpo de captura en buffer de carbonatos en una relación 1:250 y se dejaron incubar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces con 250  $\mu$ L/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente se bloquearon con 200  $\mu$ L/pozo de PBS-SFB al 1 % y se dejaron incubar a temperatura ambiente por una hora. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las placas con PBS Tween 0.05% (3 veces) y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo de las muestras, se incubaron a temperatura ambiente por dos horas. Concluidas las dos horas, se agregó 100  $\mu$ L/pozo del anticuerpo de detección conjugado con la enzima HRP y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Después la placa se lavó 7 veces y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo del sustrato TMB (Sigma, T0440), se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min debido a que la reacción fue muy rápida. Finalmente, la reacción se detuvo con 50  $\mu$ L/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N y se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 450 nm. Se determinaron las concentraciones de TNF $\alpha$  empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una R<sup>2</sup>>0.98. Para la cuantificación de proteínas se realizó el método de Bradford (Sigma, B6916), para ello, se colocaron 5  $\mu$ L/pozo de las muestras en placas de 96 pozos, se agregaron 250  $\mu$ L/pozo del reactivo de Bradford se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en total oscuridad y finalmente se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 595 nm. Se determinaron las concentraciones de proteínas empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una R<sup>2</sup>>0.98

### 6.8 Caracterización de la estructura química de los compuestos químicos presentes en las fracciones más activas de *Bidens odorata*

Los principios activos aislados de las fracciones más activas de *Bidens odorata* se analizaron por varias técnicas espectroscópicas (resonancia magnética nuclear, absorción de luz ultravioleta y espectroscopia IR) y espectrométricas (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) para determinar la estructura química de los compuestos químicos más activos.

#### 6.9 Determinación de la concentración de los compuestos más activos de las reuniones de las Subfracciones efectivas de *Bidens odorata*

Después de determinar las moléculas de los compuestos químicos más activos, se determinó la concentración al estandarizar la cantidad del compuesto presente en la fracción acetoetílica.

Para ello, se realizó un análisis de Cromatografía líquida de alta resolución para generar la curva de calibración de los compuestos mayoritarios en los tratamientos activos, utilizando concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ . Se compararon los tiempos de retención ( $t_r$ ) y el área bajo la curva (AUC) de cada lectura por cada gramo de muestra estándar. Se analizaron 2 mg del extracto íntegro (hidroalcohólico) y 2 mg de fracción acetoetílica por este medio. Los datos fueron adquiridos en el mismo sistema cromatográfico, constituido por un módulo de separación Waters Alliance 2695 con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996 y analizados con el software Empower Pro. La separación química se realizó en una columna de fase reversa de 25 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno empacada previamente con gel de sílice de fase reversa de 5  $\mu\text{m}$ . La fase móvil consistió en un sistema de gradiente de ácido trifluoroacético al 0.5 % en el reservorio A y acetonitrilo en el reservorio B. Se utilizó un flujo de 1 mL por minuto durante un periodo de 30 min de elución, como se describe a continuación: 0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 24–25 min, 80% B; 26–27 min, 100% B; 28–30 min, 0% B. El análisis de absorción se realizó con una ventana de 190-600 nm. La luteolina fue analizada a una longitud de onda de 340 nm, en el caso del ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido cafeico se usó una longitud de onda 325 nm. La rutina fue identificada analizada a una longitud de onda de 350 nm.

#### 6.10 Análisis estadístico

Cada uno de los parámetros obtenidos; farmacológicos e inmuno-inflamatorios, se recopiló en una base de datos utilizando el programa Excel y posteriormente se analizaron con el programa INSTAT, la significancia de la diferencia entre los grupos se determinó a través de un análisis de varianza (ANOVA). Al realizarse una prueba Dunnett como prueba post-hoc con un valor de significancia de  $P < 0.05$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Elucidación química de *Bidens odorata*

#### 7.1.1 Obtención de la fracción acetotélica de *Bidens odorata*

En el año 2016 la MMM. Gabriela Castro Martínez realizó una elucidación química en donde obtuvo 8 reuniones, las cuales, fueron analizadas. Debido a la poca cantidad de las reuniones se realizó una segunda extracción química de la planta.

La colecta de *Bidens odorata* del año 2016 se comparó con la del 2022 tanto físicamente, como químicamente con la maceración metanólica e hidroalcohólica, en donde, se realizó mediante cromatografía en capa fina y HPLC.

La placa cromatográfica de la maceración metanólica se corrió en capa fina fase normal con un sistema de elución 95:5 Diclorometano/MeOH, en el primer carril se colocó el extracto integro, seguido el extracto metanólico 2016, el extracto metanólico 2022 y por último la muestra estándar quercetina. La placa se reveló con el revelador de Productos Naturales-Polietilen Glicol (Natural Products-Polyethylene Glycol: NP/PEG), el cual, permite la identificación de compuestos de tipo flavonoide.

Al observarse bajo la luz UV a 264 nm (UV-264) y 356 nm (UV-356) antes de ser revelada la placa, se observó en los extractos metanólicos al menos 5 compuestos químicos visibles presentes en un factor de retención (Rf) de 0.5, 0.63, 0.86, 0.91 y 1, por lo que se determinó se trata de la misma planta. Aunque se utilizó como estándar quercetina, se observó que no es uno de los compuestos químicos mayoritarios de la especie *Bidens odorata*.

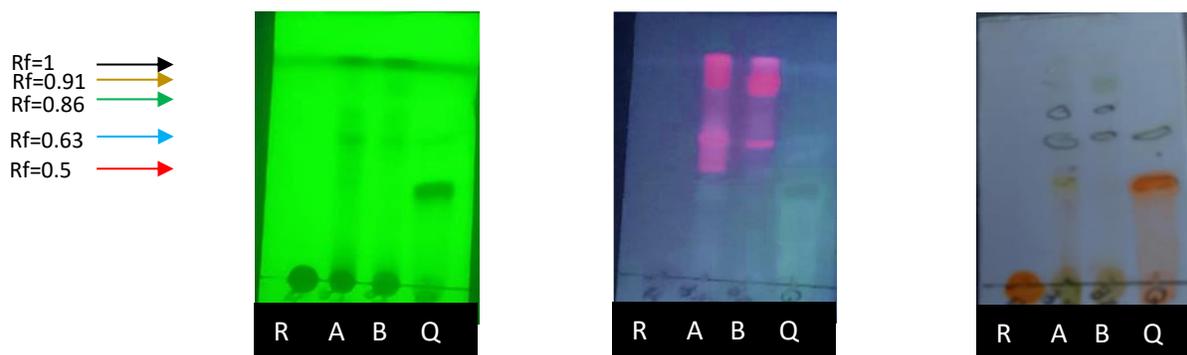
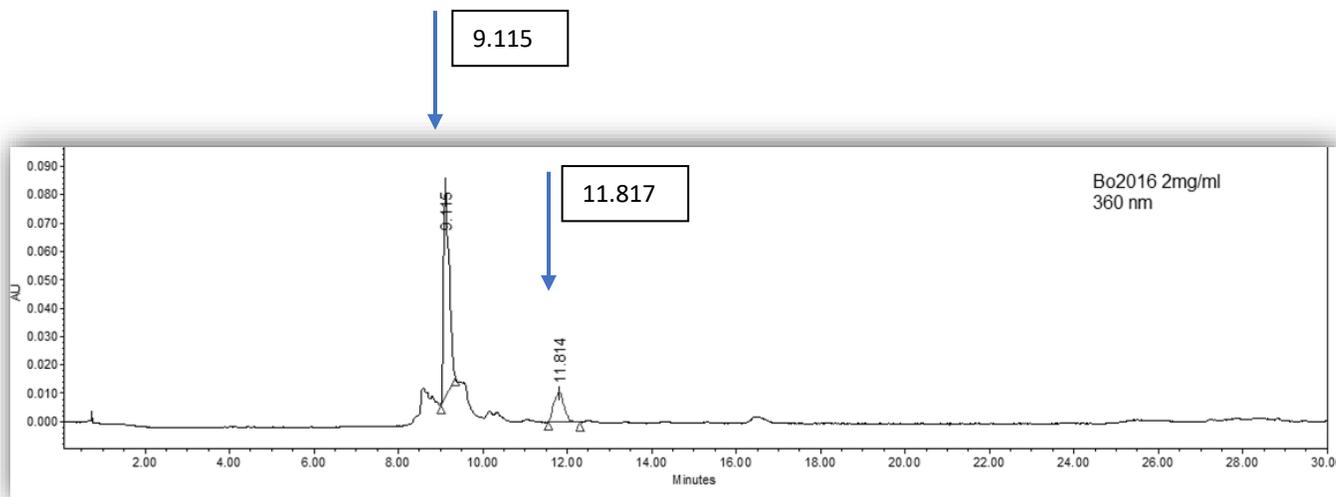
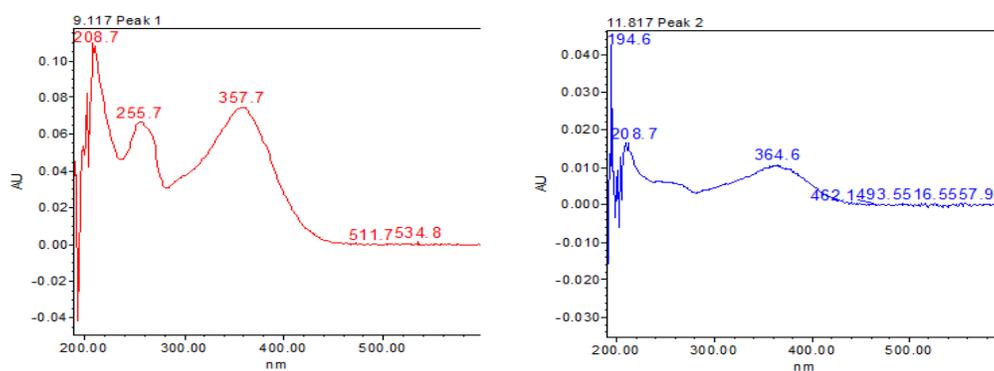


Figura 7. Cromatografía en capa fina de *Bidens odorata* 2016 y 2022. Fase normal (FN), Referencia (R), *Bidens odorata* 2016 (A), *Bidens odorata* 2022 (B) y Quercetina (Q). Eluidas en un sistema 95:5 Diclorometano/MeOH, revelada con NP/PEG y observadas bajo la luz UV a 264 nm y 356 nm.

Después de analizar las muestras por CCF, se analizaron las muestras mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, (HPLC, por sus siglas en inglés) en donde, se determinó que se trataba de la misma especie. Se observó en el espectro 1 los compuestos químicos mayoritarios presentes en el extracto metanólico 2016, los cuales, tenían un tiempo de retención de 9.115 y 11.814 minutos, estos se pueden observar en el Espectro HPLC-UV 1, los cuáles, determinan se trata de compuestos de tipo flavonoide.

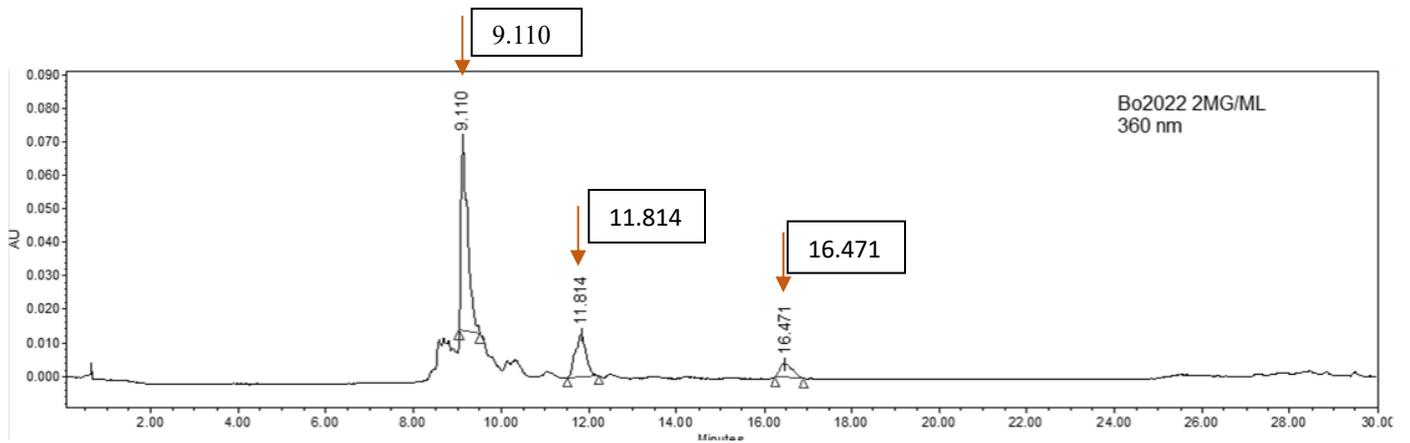


Espectro 1. Análisis de *Bo* 2016 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 2 mg/mL a 360 nm.

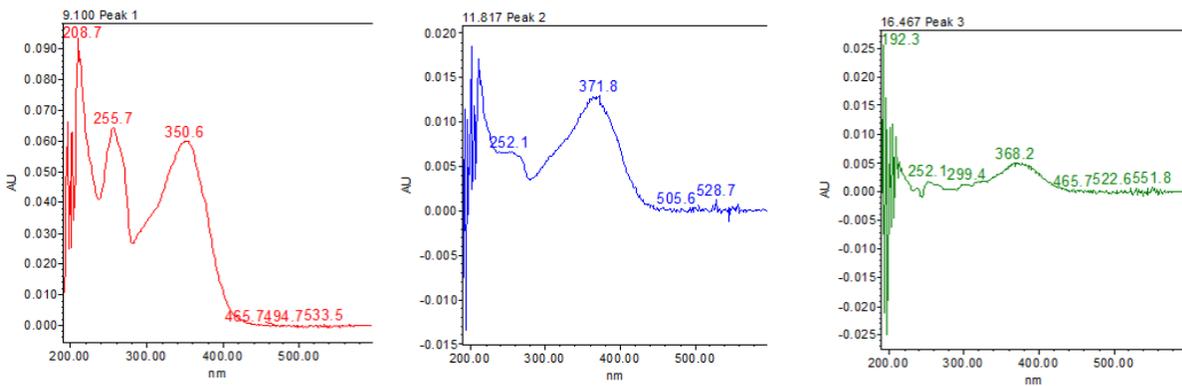


Espectro HPLC-UV 1. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.117 y 11.817 min de *Bo* 2016.

Al analizar el extracto metanólico 2022 por el mismo método (Espectro 2), los compuestos químicos mayoritarios se observaron en un tiempo de retención de 9.110, 11.814 y 16.471, los cuáles, se pueden observar en el Espectro HPLC-UV 2 y estos indican que está compuesto por flavonoides| y fenilpropanoides, principalmente.



Espectro 2. Análisis de *Bo 2022* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 2 mg/mL a 360 nm

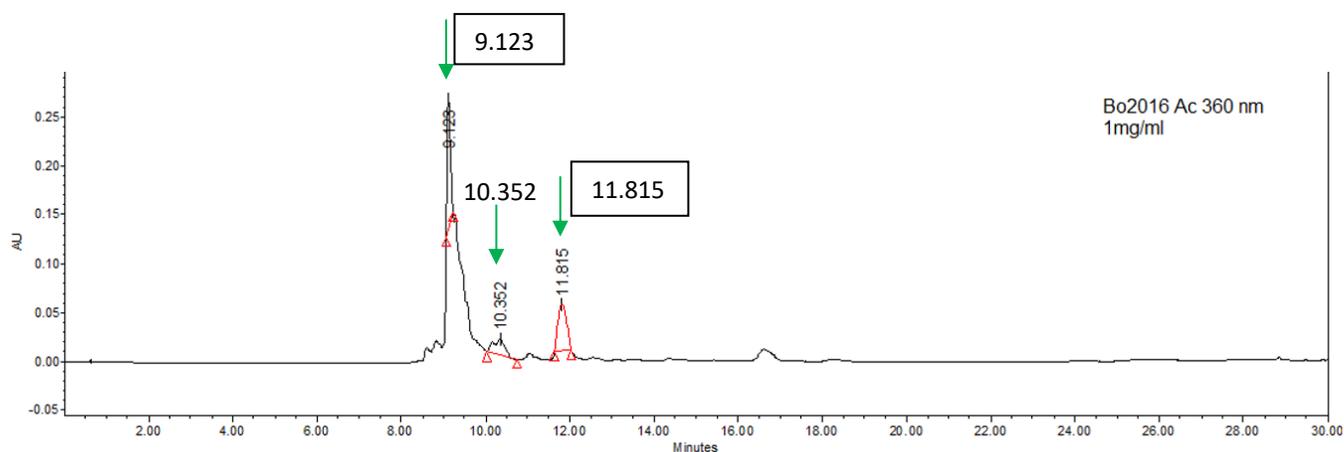


Espectro HPLC-UV 2. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.100, 11.817 y 16.467 min de *Bo 2022*

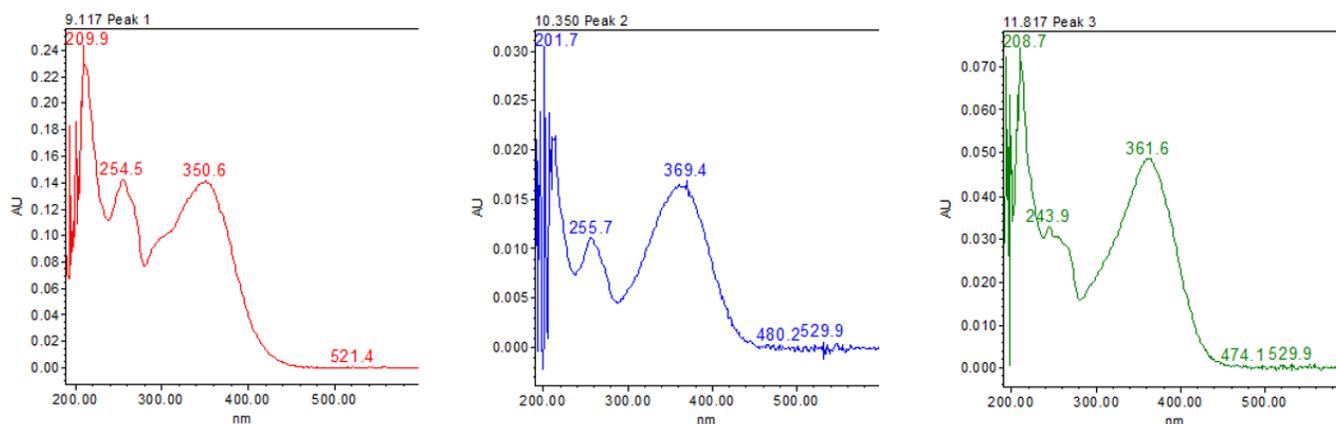
De acuerdo con los resultados observados en los 2 extractos metanólicos, se pudo deducir que se trata del mismo, ya que se observaron los compuestos mayoritarios de ambos en el mismo tiempo de retención y los espectros UV nos lo confirmaron.

Seguido, se realizó una bipartición química de cada uno de ellos con la finalidad de separar la parte acuosa del extracto y así obtener la fracción acetoetílica, la cual, era de nuestro interés.

De igual manera, la fracción acetoéilica (FAEBo) del año 2016 y 2022 fueron comparadas mediante HPLC; al analizar FAEBo 2016 (Espectro 3), en los tiempos de retención de 9.123, 10.352 y 11.815 se observaron los compuestos mayoritarios, los cuales, se observaron en el Espectro HPLC-UV 3 y se confirmó que estaba compuesto principalmente de flavonoides.

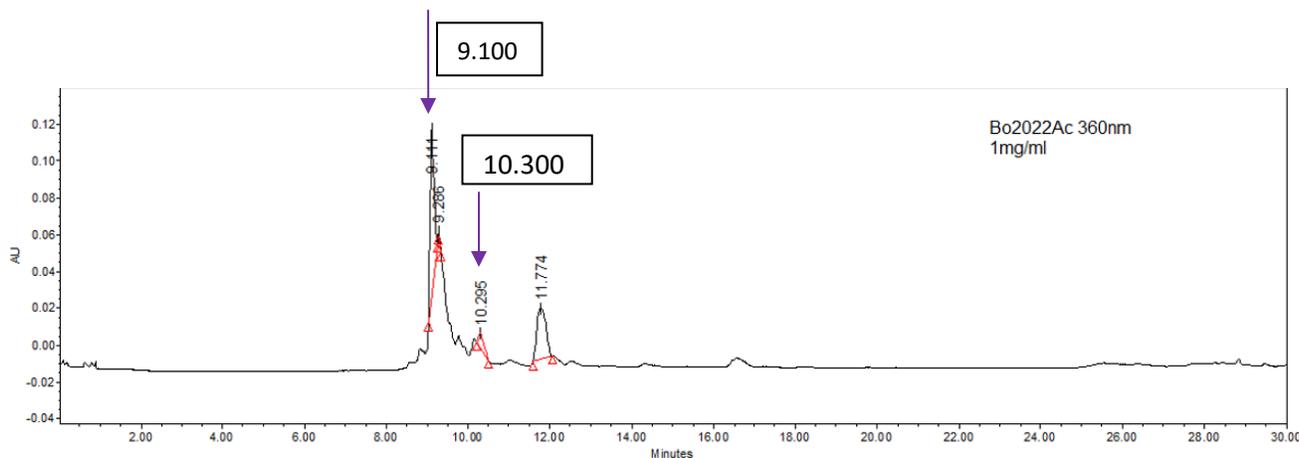


Espectro 3. Análisis de FAEBo 2016 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 2 mg/mL a 360 nm

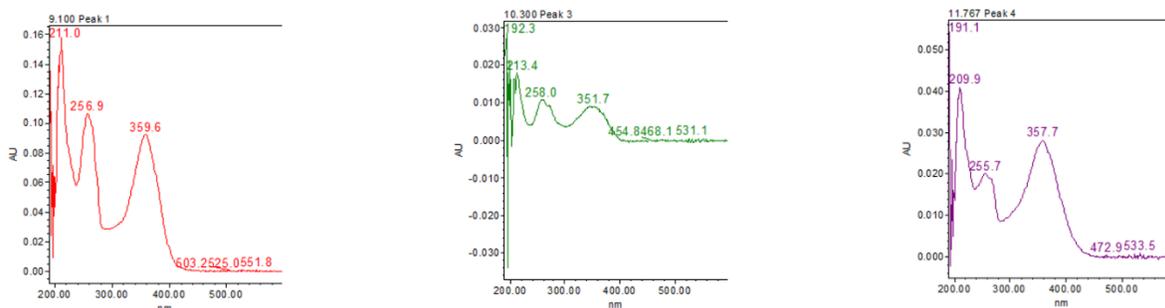


Espectro HPLC-UV 3. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.117, 10.350 y 11.817 min de FAEBo 2016

En el análisis mediante HPLC de FAEBo 2022 (Espectro 4), en un tiempo de retención de 9.100, 10.300 y 11.767, se pudieron observar los compuestos mayoritarios, los cuáles, a través del Espectro HPLC-UV 4 se pudieron determinar de igual manera como flavonoides.



Espectro 4. Análisis de FAEBo 2022 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 2 mg/mL a 360 nm



Espectro HPLC-UV 4. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.100, 10.300 y 11.767 min de FAEBo 2016

Debido a los resultados obtenidos del extracto metanólico y la fracción acetoétilica de los años 2016 y 2022 de *Bidens odorata*, se determinó que se trataba de la misma especie, por lo que se decidió reunirlos para su elucidación química.

7.1.2 Obtención de las reuniones de la fracción acetoétilica de *Bidens odorata* (FAEBo)  
 Al realizar la separación química de la fracción acetoétilica mediante cromatografía en columna, se obtuvieron 57 fracciones, las cuáles, se analizaron mediante cromatografía en capa fina y HPLC. El análisis, nos ayudó a determinar cada una de las reuniones previstas por la MMM. Gabriela Castro Martínez en el año 2016, debido a que se realizó de manera comparativa con dichos antecedentes ya previstos.

Cada una de las fracciones se analizaron bajo luz UV, también, fueron analizadas al ser reveladas con sulfato sérico y NP/PEG. En las siguientes imágenes se puede observar cada una de las capas finas con las fracciones elucidadas en el año 2016 y las fracciones que se obtuvieron en el año 2022. A través de las características colorimétricas de la placa fina y de las fracciones, se decidió agruparlas en las 8 reuniones.

De la figura 8 a la 17 se puede observar la cromatografía en capa fina de las fracciones elucidadas de FAEBo, en donde se realizó de manera comparativa con las fracciones obtenidas en el año 2016, mismas que ayudaron a determinar cada una de las reuniones.

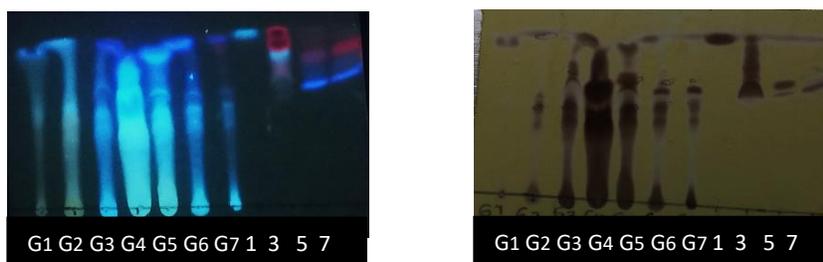


Figura 8. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 95:5 Diclorometano/MeOH, revelada con sulfato sérico de las fracciones 1-7 del año 2016 y 2022 de la FAEBo.



Figura 9. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 95:5 Diclorometano/MeOH, revelada con sulfato sérico de las fracciones 8-12 del año 2016 y 2022 de la FAEBo.

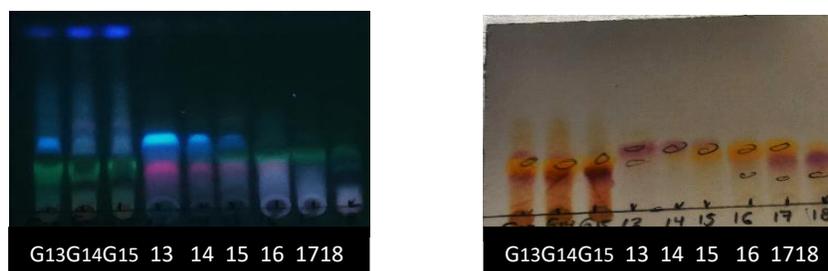


Figura 10. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 95:05 Diclorometano/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG de las fracciones 13-15 del año 2016 y 13-18 del año 2022 de la FAEBo.

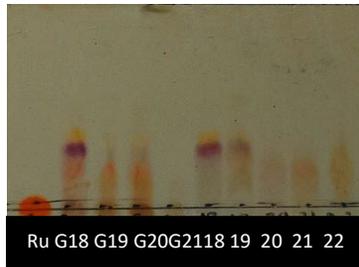


Figura 11. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 90:10 Diclorometano/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG de las fracciones 18-21 del año 2016 y 18-22 del año 2022 de la FAEBo.

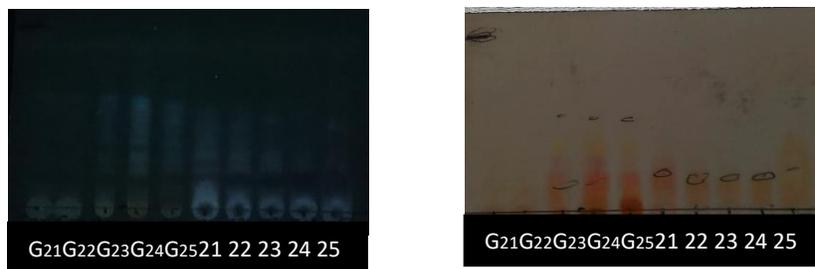


Figura 12. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 90:10 Diclorometano/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG de las fracciones 21-25 del año 2016 y 21-25 del año 2022 de la FAEBo.

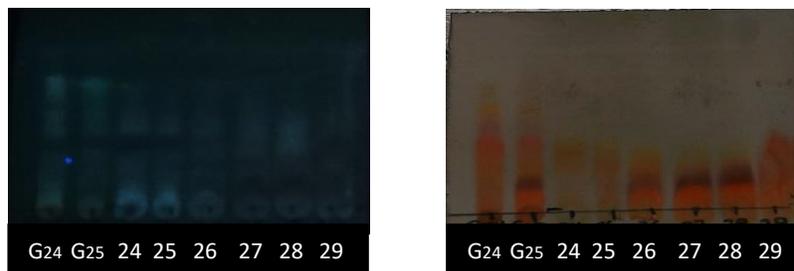


Figura 13. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 85:15 Diclorometano/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG de las fracciones 24-25 del año 2016 y 24-29 del año 2022 de la FAEBo

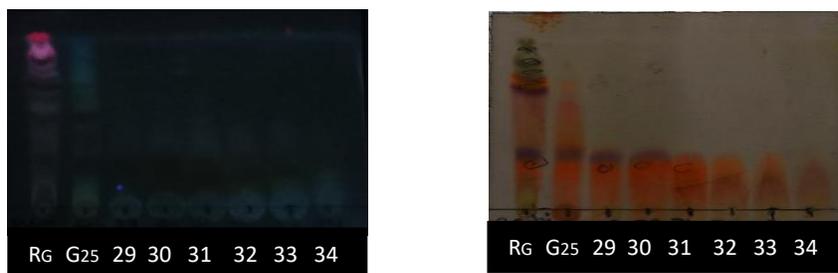


Figura 14. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 85:15 Diclorometano/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG de la Referencia de AcoEt y la fracción 25 del año 2016 y las fracciones 29-34 del año 2022 de la FAEBo.

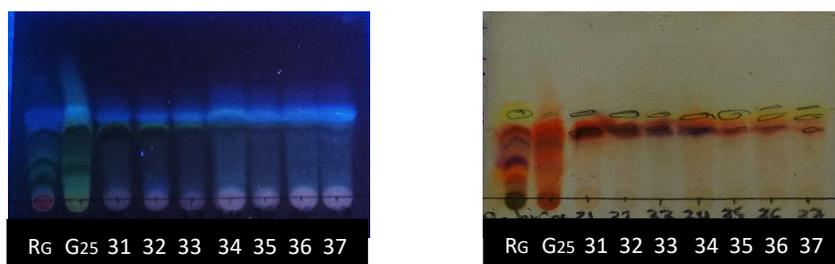


Figura 15. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase reversa (FR), eluida en un sistema 70:30 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, revelada con productos naturales NP/PEG de la Referencia de AcoEt y la fracción 25 del año 2016 y las fracciones 31-37 del año 2022 de la FAEBo.

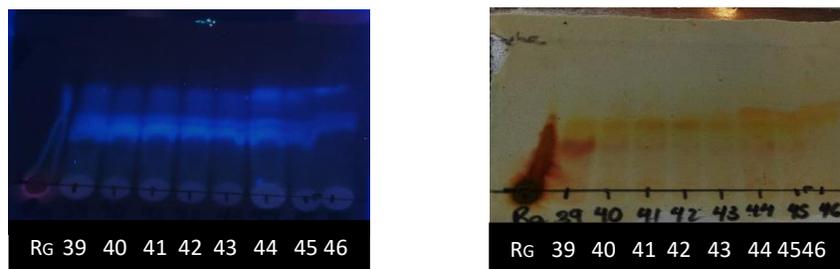


Figura 16. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase reversa (FR), eluida en un sistema 70:30 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, revelada con productos naturales NP/PEG de la Referencia de AcoEt del año 2016 y las fracciones 39-46 del año 2022 de la FAEBo.

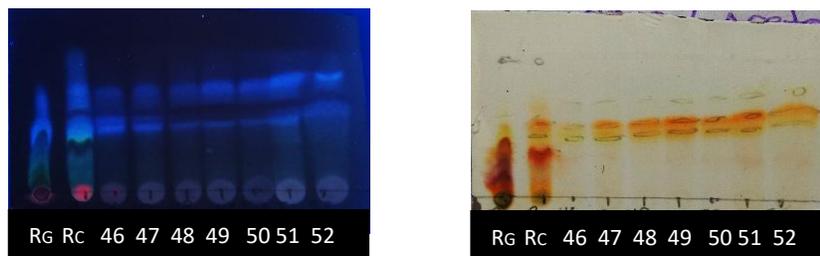
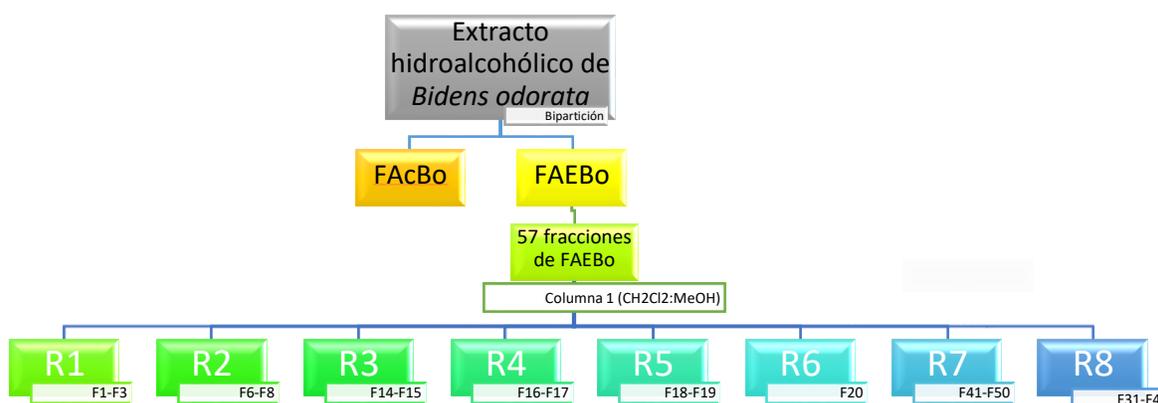


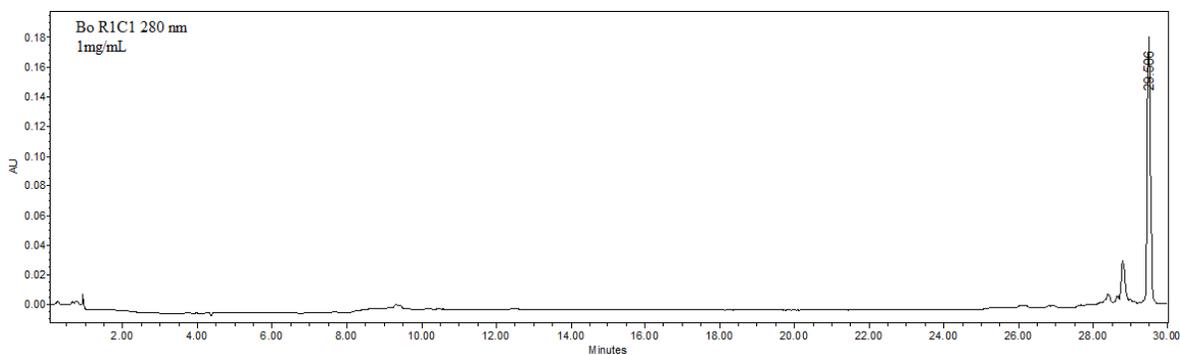
Figura 17. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase reversa (FR), eluida en un sistema 70:30 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, revelada con productos naturales NP/PEG de la Referencia de AcoEt del año 2016 y la referencia y fracciones 46-52 del año 2022 de la FAEBo.

En el siguiente esquema se puede observar cómo quedaron agrupadas cada una de las fracciones en las 8 reuniones debido a sus características similares. Estas reuniones de igual manera fueron analizadas mediante HPLC como se muestra a continuación.

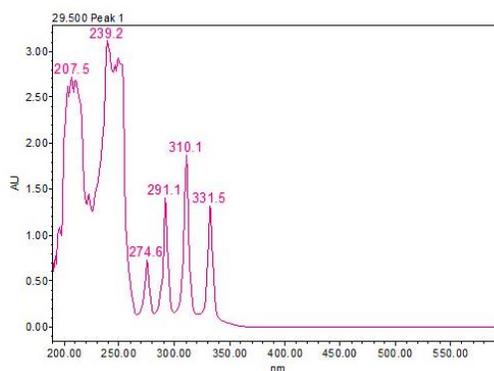


Esquema 1. Separación química de *Bidens odorata*

En el espectro 5, se puede observar la elucidación de la reunión 1 compuesta por las fracciones 1-3 de FAEBo. Al analizarla se pudo observar en un tiempo de retención de 29.500 min el compuesto mayoritario de dicha reunión, la cual, al observar el Espectro HPLC-UV 5 corresponde a compuestos de tipo poliacetilenos.

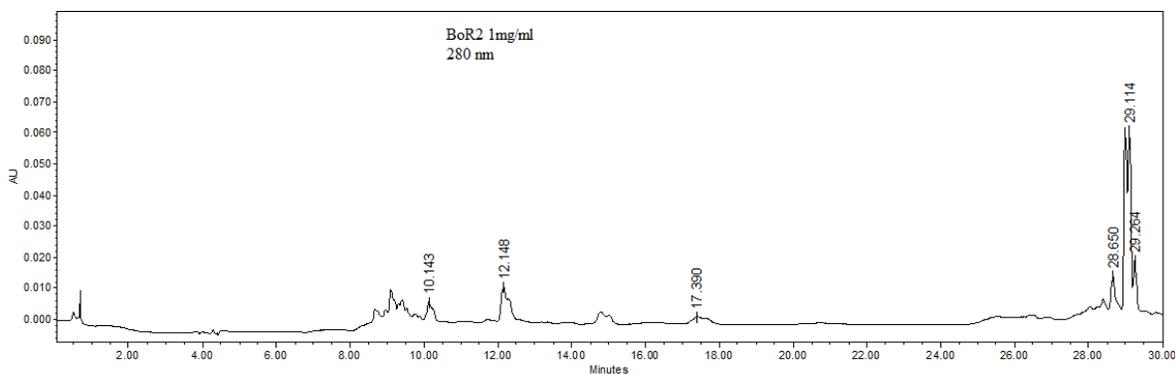


Espectro 5. Análisis de R1 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm

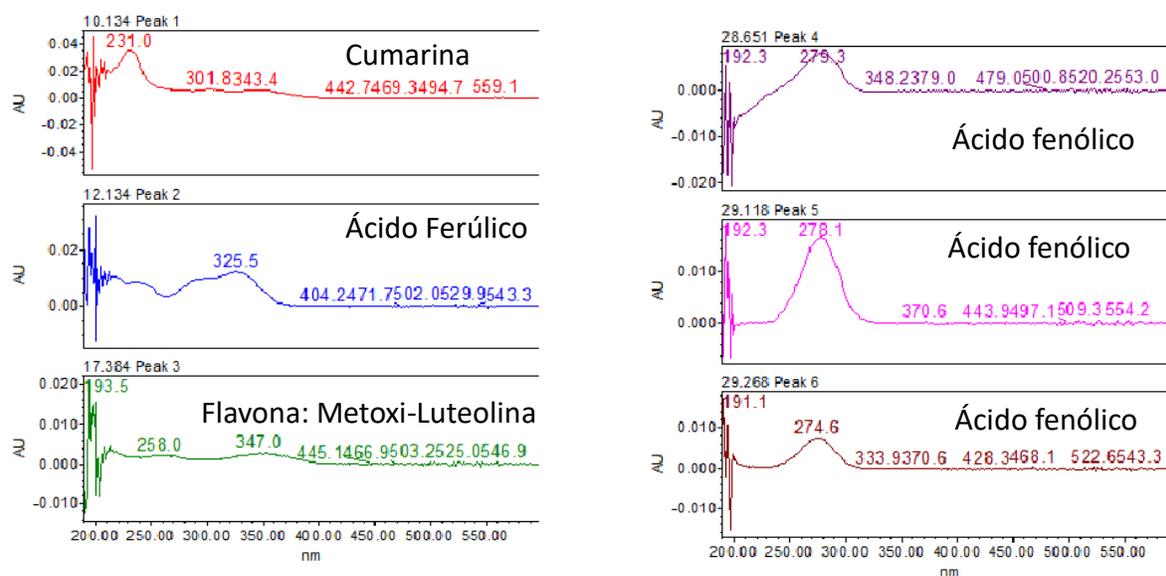


Espectro HPLC-UV 5. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 29.500 min de R1

Seguido se obtuvo la reunión 2 compuesta por las fracciones 6-8 de la elucidación de la fracción acetoetílica de la planta (Espectro 6). Los compuestos mayoritarios de la reunión fueron observados en un tiempo de retención de 10.134, 12.134, 17.384, 28.652, 29.118 y 29.268 min. Los cuáles, al observar el Espectro HPLC-UV 6, se determinó que está compuesta por cumarinas, ácido ferúlico, Flavona: Metoxi-Luteolina y ácido fenólico.

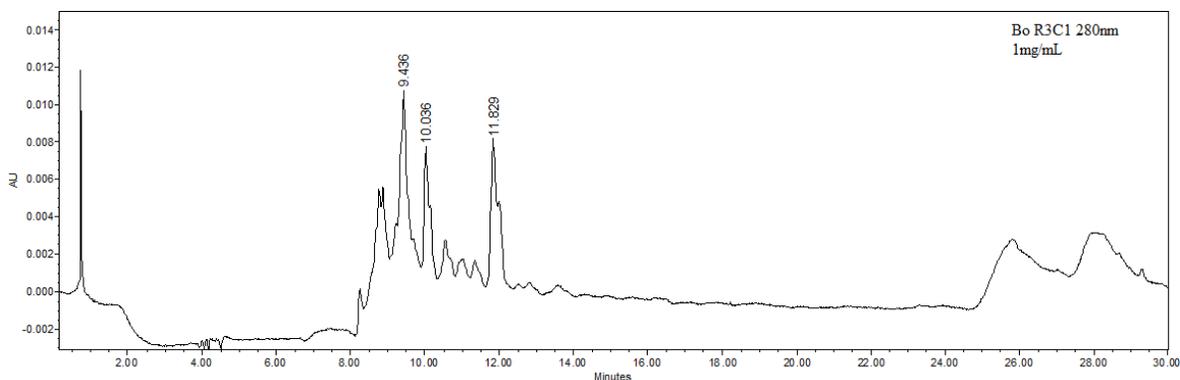


Espectro 6. Análisis de R2 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm

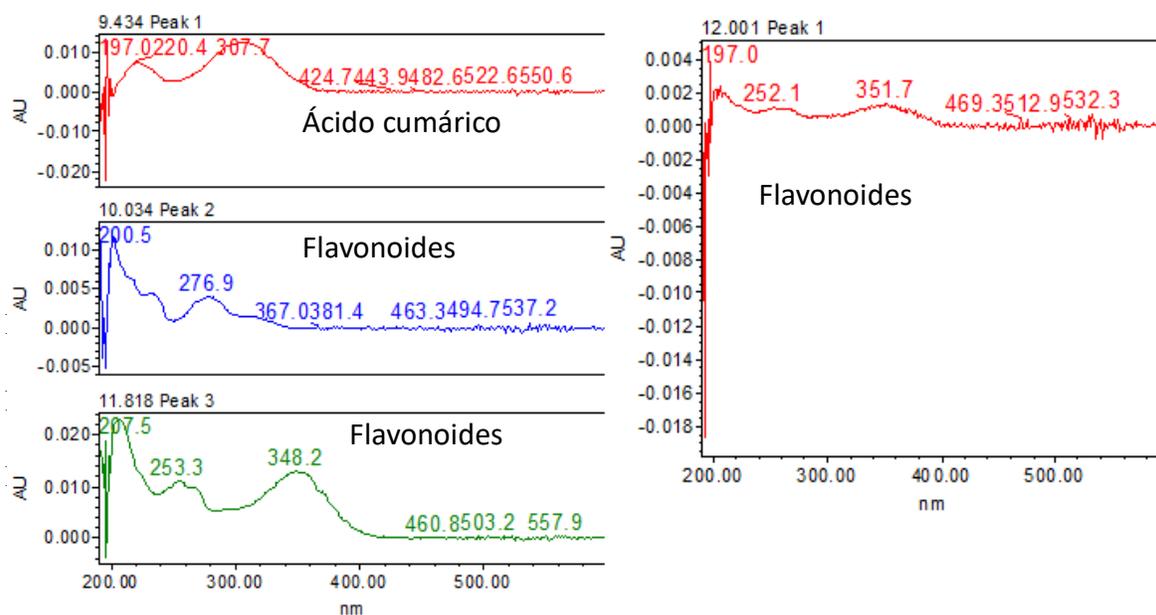


Espectro HPLC-UV 6. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 10.134 (Cumarina), 12.134 (Ácido ferúlico), 17.384 (Flavona: Metoxi-luteolina), 28.651 (Ácido fenólico), 29.118 (Ácido fenólico) y 29.268 (Ácido fenólico) min de R2.

En la reunión 3 (R3) compuesta por las fracciones 14-15 de la elucidación de la fracción acetoétilica de la planta (Espectro 7), se pueden observar los compuestos mayoritarios de la reunión en un tiempo de retención de 9.434, 10.034, 11.818 y 12.001 min. Los cuáles, al observar el Espectro HPLC-UV 7, se determinó que está compuesta por ácido cumárico y flavonoides principalmente.

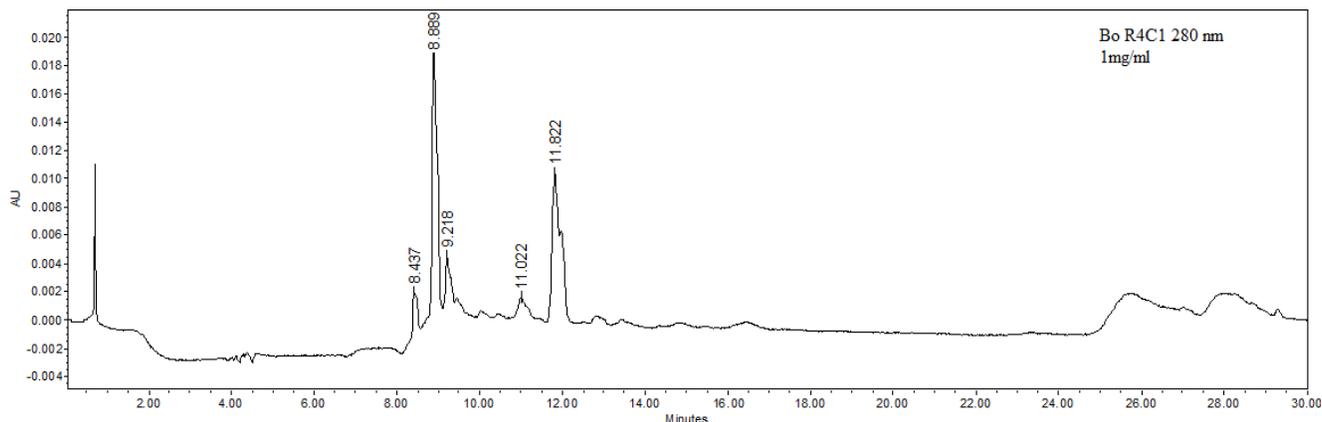


Espectro 7. Análisis de R3 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm

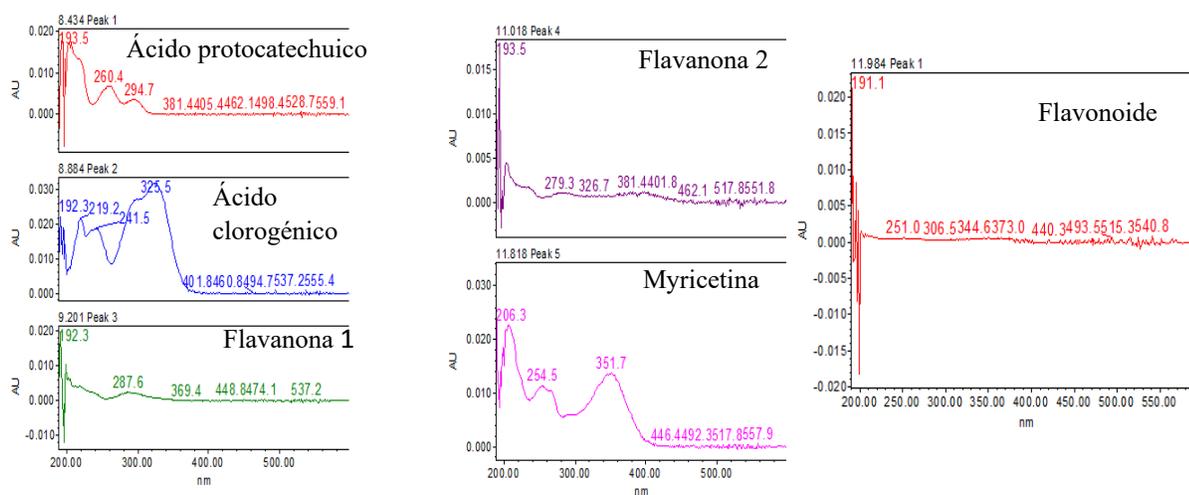


Espectro HPLC-UV 7. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.434 (Ácido cumárico), 10.034 (Flavonoides), 11.818 (Flavonoides) y 12.001 (Flavonoides) min de R3.

En la reunión 4 (R4) compuesta por las fracciones 16-17 de FAEBo (Espectro 8), se pueden observar los compuestos mayoritarios de la reunión en un tiempo de retención de 8.434, 8.884, 9.201, 11.018, 11.818 y 11.984 min. Los cuáles, al observar el Espectro HPLC-UV 8, se determinó que está compuesta por ácido protocatechuico, ácido clorogénico, flavanona 1, flavanona 2, myricetina y flavonoides.

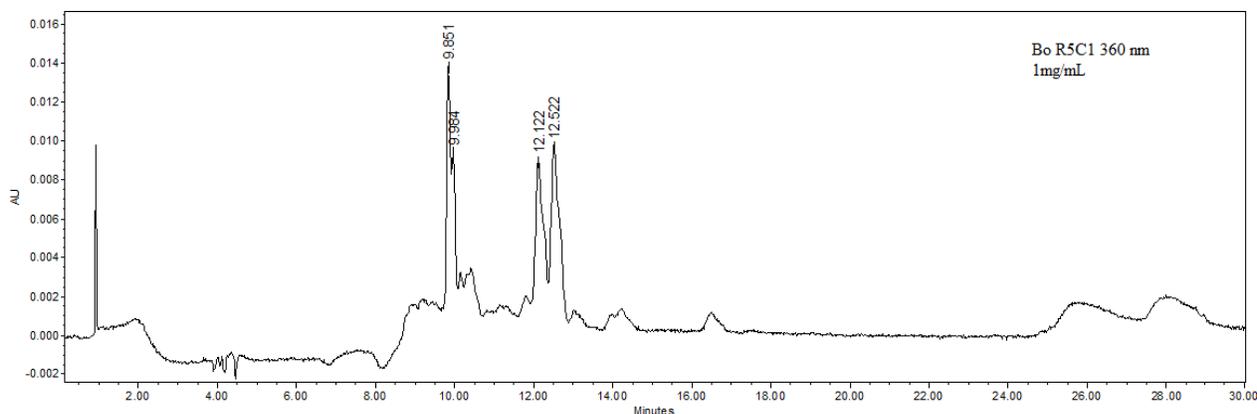


Espectro 8. Análisis de R4 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm

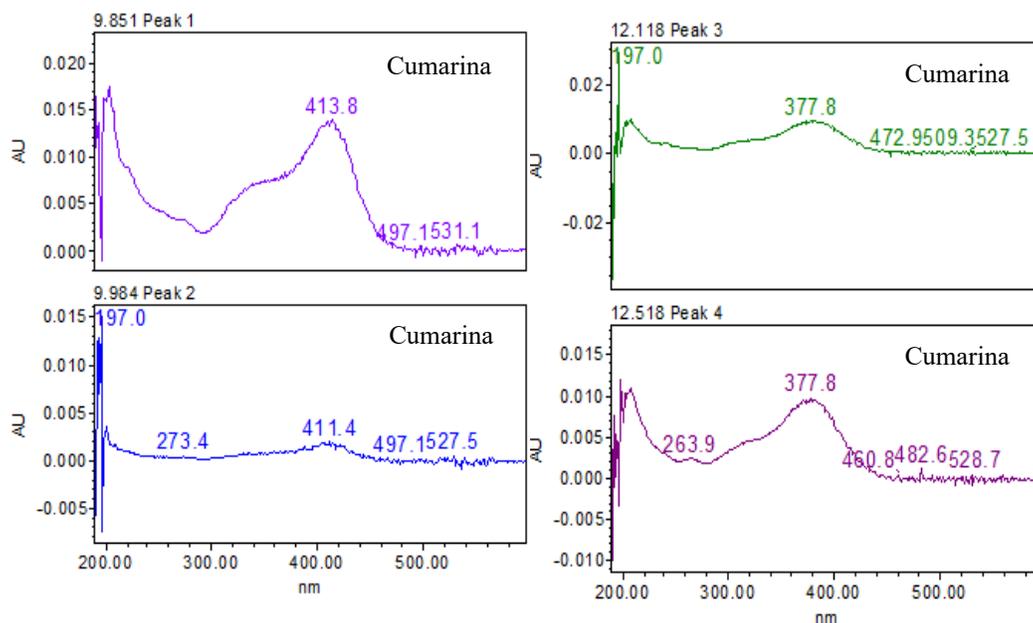


Espectro HPLC-UV 8. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 8.434 (Ácido protocatechuico), 8.884 (Ácido clorogénico), 9.201 (Flavanona 1), 11.018 (Flavanona 2), 11.818 (Myricetina) y 11.984 (Flavonoide) min de R4.

La reunión 5 (R5) compuesta por las fracciones 18-19 de FAEBo (Espectro 9), está compuesta principalmente por cumarinas, las cuales, se observaron a través de su Espectro HPLC-UV 9 en un tiempo de retención de 9.851, 9.984, 12.118 y 12.518 min.

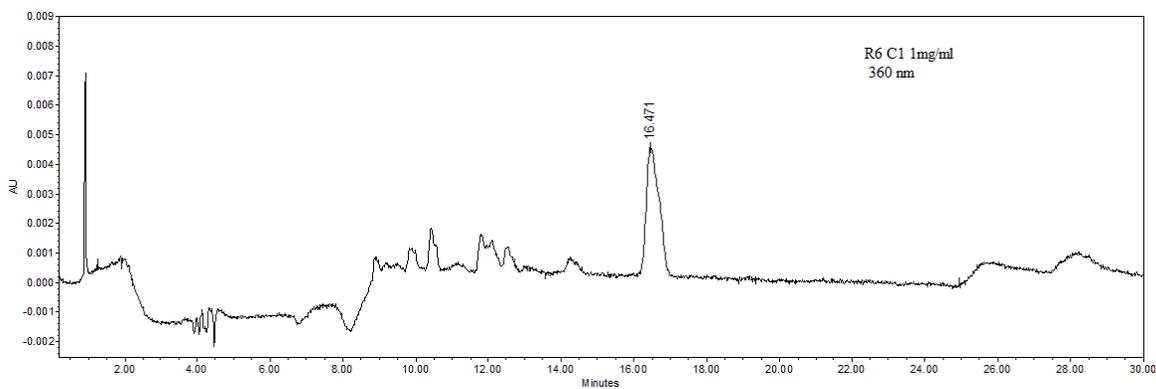


Espectro 9. Análisis de R5 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 360 nm

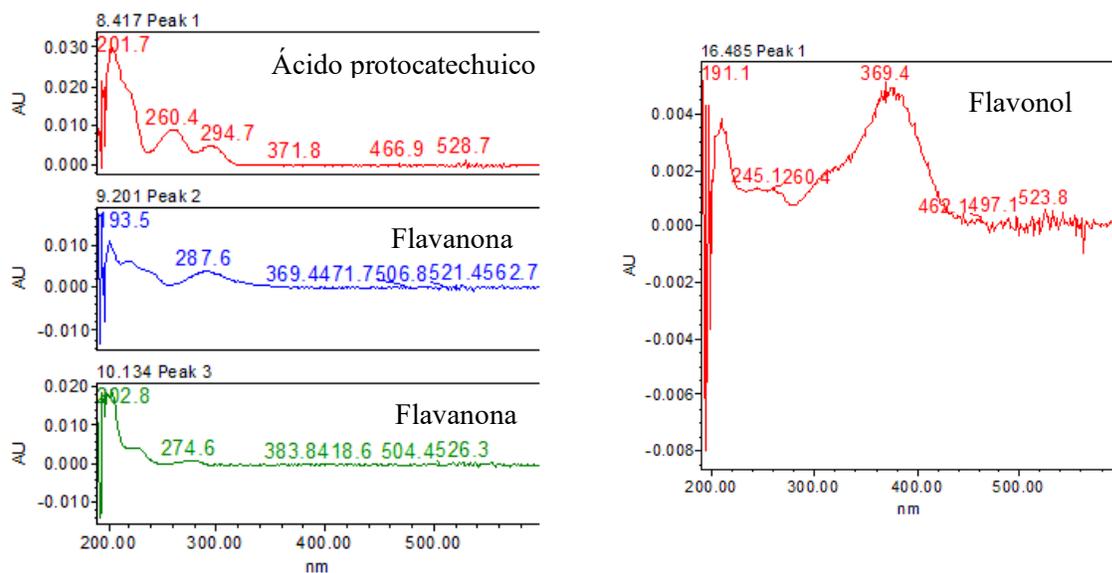


Espectro HPLC-UV 9. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.851, 9.984, 12.118 y 12.518 min de R5 (Cumarinas).

En la reunión 6 (R6) compuesta por la fracción 20 de FAEBo (Espectro 10), se pueden observar los compuestos mayoritarios de la reunión en un tiempo de retención de 8.417, 9.201, 10.134 y 16.485 min. Al observarse los compuestos mayoritarios en el Espectro HPLC-UV 10, se pudo observar que la R6 está compuesta principalmente por ácido protocatechuico, flavanonas y flavonol.

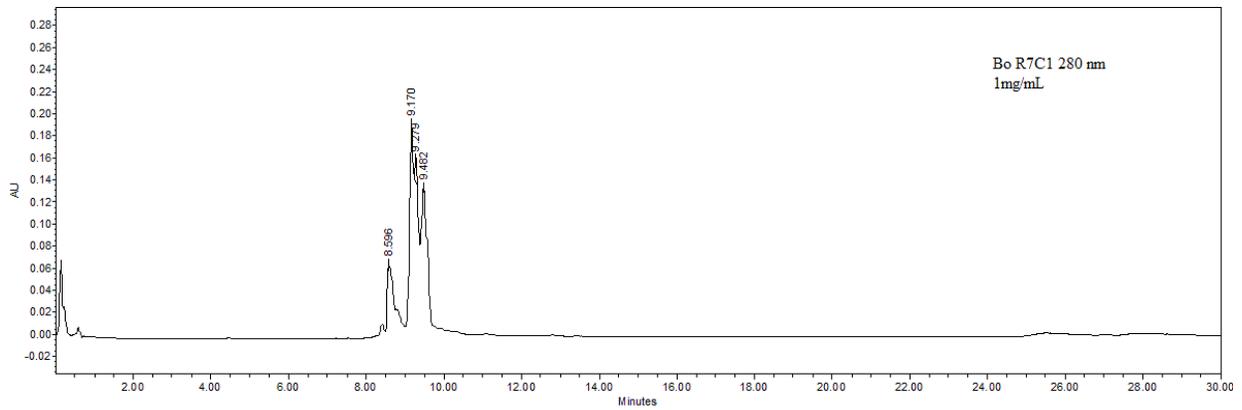


Espectro 10. Análisis de R6 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 360 nm



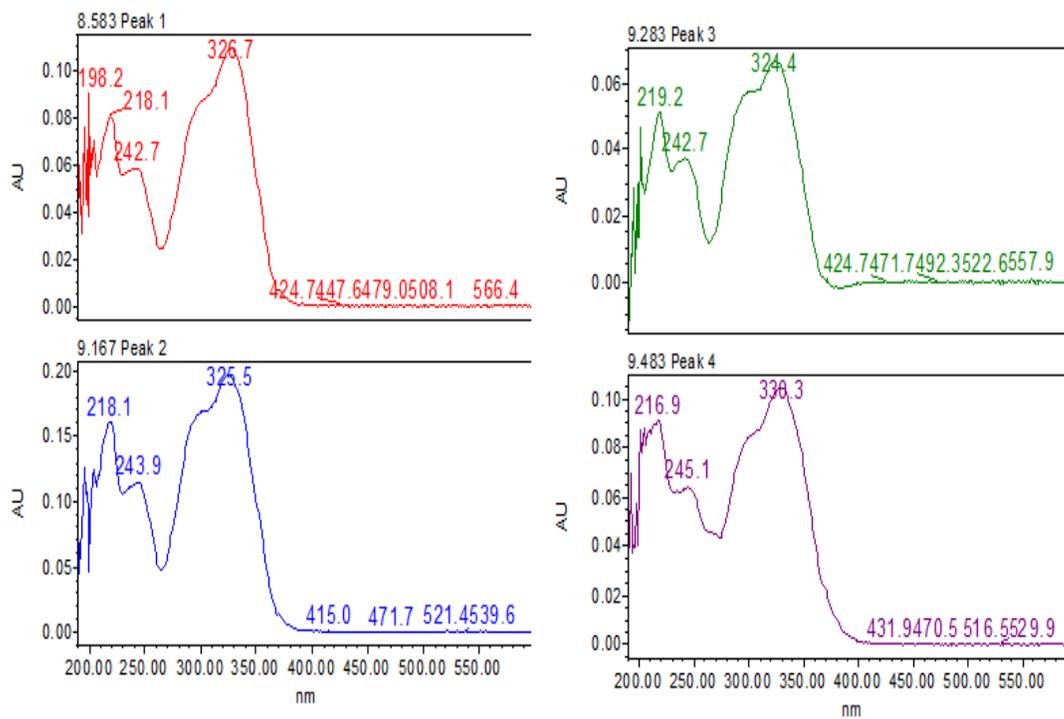
Espectro HPLC-UV 10. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 8.417 (Ácido protocatehuico), 9.201 (Flavanona), 10.134 (Flavanona) y 16.485 (Flavonol) min de R6.

En la reunión 7 (R7) compuesta por las fracciones 41-50 de FAEBo (Espectro 11), se pueden observar los compuestos mayoritarios de la reunión en un tiempo de retención de 8.583, 9.167, 9.283 y 9.483 min. Al observarse los compuestos mayoritarios en el Espectro HPLC-UV 11, se pudo observar que la R7 está compuesta principalmente por derivados de cafeoil.



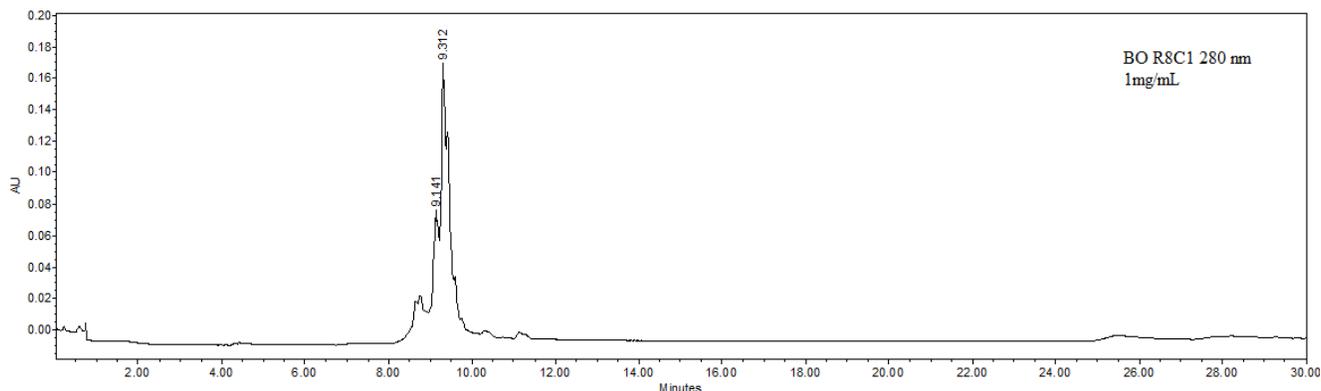
Espectro 11. Análisis de R7 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm

### Derivados de cafeilo

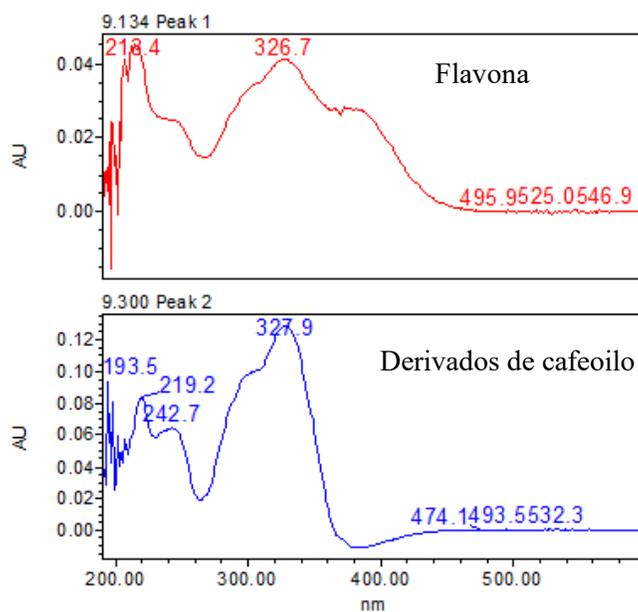


Espectro HPLC-UV 11. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 8.583, 9.167, 9.283 y 9.483 min de R7 (Derivados de cafeilo).

Por último, en la reunión 8 (R8) compuesta por las fracciones 31-40 de FAEBo (Espectro 12), se pueden observar los compuestos mayoritarios de la reunión en un tiempo de retención de 9.134 y 9.300 min. Al observarse los compuestos mayoritarios en el Espectro HPLC-UV 12, se pudo observar que la R8 está compuesta principalmente por flavonas y derivados de cafeoilo.



Espectro 12. Análisis de R8 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm



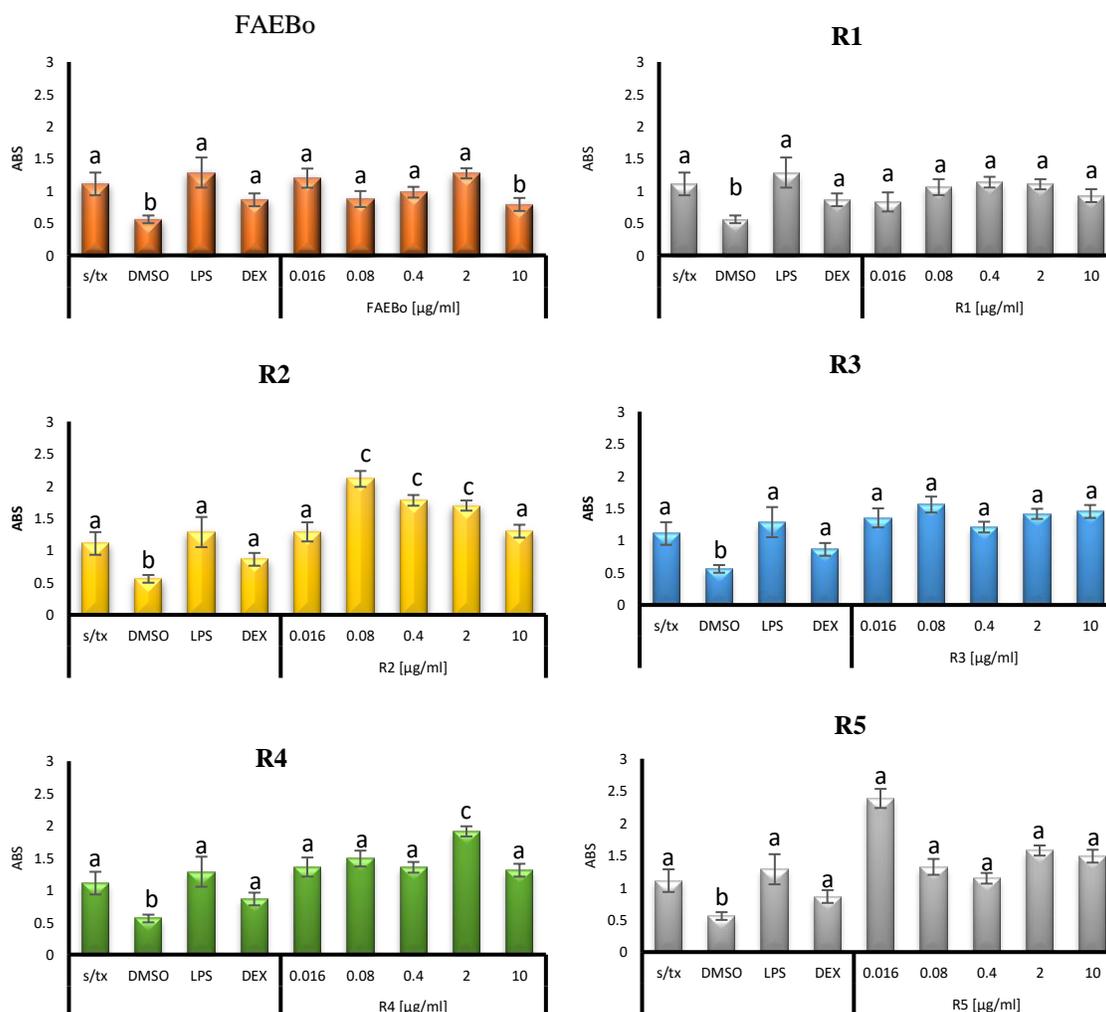
Espectro HPLC-UV 12. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.134 (Flavona) y 9.300 (Derivados de cafeoilo) min de R8.

Después de analizar las 8 reuniones de FAEBo, se determinaron las de mayor efecto antiinflamatorio a través de un estudio biodirigido.

## 7.2 Los tratamientos experimentales no tienen efectos citotóxicos sobre los macrófagos Raw 264.7

Después de elucidar las reuniones con mayor efecto antiinflamatorio de *Bidens odorata*, se demostró que las diferentes concentraciones de estas (0.016, 0.08, 0.4, 2 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) no redujeron la viabilidad de las células (Macrófagos Raw 264.7), lo que significa que no produjeron citotoxicidad.

Se evaluaron las 8 reuniones elucidadas, así como FAEBo. Los resultados mostrados en la figura 18 indicaron que ninguna de las concentraciones evaluadas de las diferentes muestras tiene efecto citotóxico significativo sobre los Macrófagos Raw 264.7 a excepción de la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de FAEBo, el cual, mostró reducir la viabilidad de las células como lo hizo el control de daño (DMSO 80%).



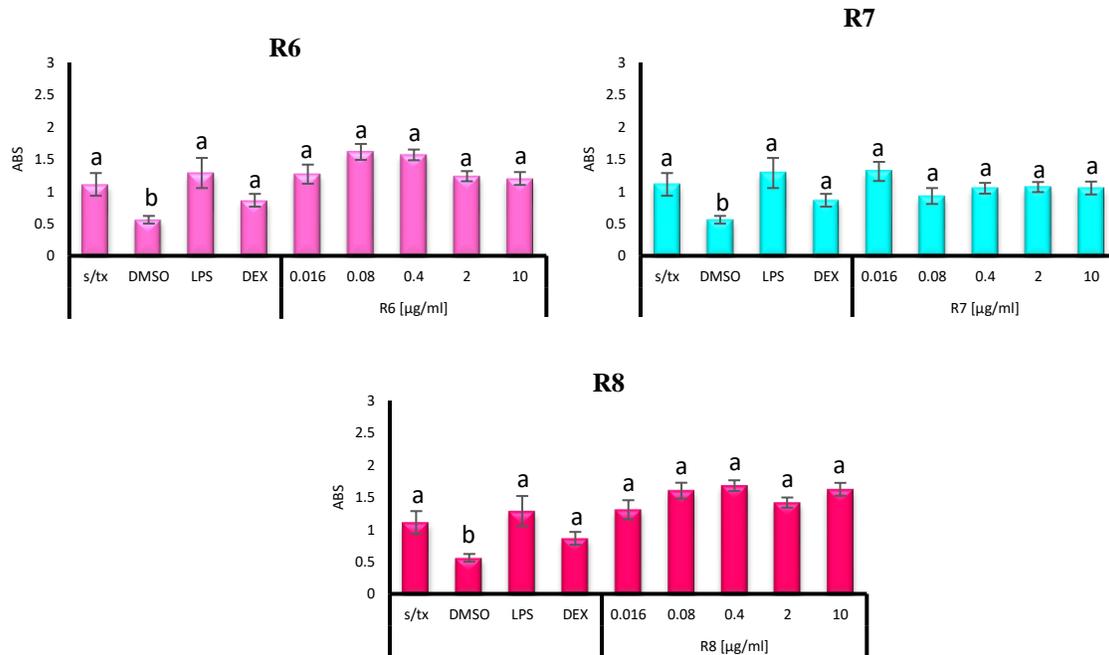


Figura 18. Viabilidad celular de Macrófagos Raw 264.7 expuesta a 24 horas de distintas concentraciones de FAEBo y sus 8 reuniones. En el eje de las “X” se presentan las diferentes condiciones de cultivo y en el eje de las “Y” la absorbancia de las células vivas del total de células. s/tx = células control sin tratamiento, DMSO=control de células muertas, LPS= células tratadas con 100 ng/mL de LPS, DEX=células cultivadas con Dexametasona [84mM], 0.016, 0.08, 0.4, 2 o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  son las concentraciones evaluadas de FAEBo o de sus reuniones. Se realiza la prueba de post hoc de Dunnett, en donde  $P < 0.05$  se considera significativa. Literales iguales indican que no hay diferencia significativa entre grupos.

### 7.3 FAEBo y sus reuniones controlan de manera eficiente la expresión de $\text{TNF}\alpha$ en macrófagos Raw 264.7 activados por LPS

Una de las características de los Macrófagos RAW 264.7 en su estado proinflamatorio es que manifiesta un aumento en la producción de diversas citocinas, entre las que se encuentra el  $\text{TNF}\alpha$ <sup>71</sup>. Este parámetro se utilizó para evaluar la capacidad de los diferentes tratamientos para controlar la producción de  $\text{TNF}\alpha$ , considerando esta referencia como indicador de inflamación.

Los resultados mostrados en la Figura 19 indican que al estimular los macrófagos Raw 264.7 con el LPS, se incrementa la producción de  $\text{TNF}\alpha$  significativamente ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control sin tratamiento.

Aunque de manera general se puede decir que todas las condiciones evaluadas regularon la expresión de esta citocina en los macrófagos activados con LPS, lo hicieron de manera

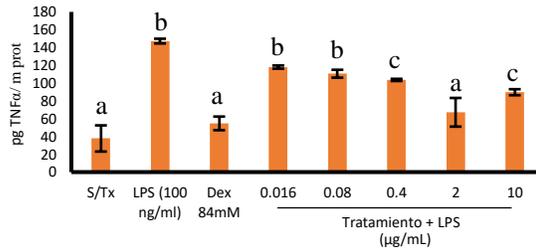
diferente, es decir, mientras que todas las concentraciones evaluadas de FAEBo y de las reuniones R2, R4, R6, R7 y R8 mantuvieron la concentración de TNF $\alpha$  igual que el control sin tratamiento ó el control con dexametasona, las reuniones R1(0.08 y 0.4ug/mL), R3(0.016 y 0.08ug/mL) y R5 (0.4ug/mL) no lo hicieron. Es importante mencionar que no se evaluó la concentración de 10  $\mu$ g/mL en FAEBo porque el experimento previo indicó que esta concentración dañaba a las células. Este efecto no se observó en el HABo, ya que sólo la concentración de 2 $\mu$ g/mL disminuyó la concentración de la citocina como los controles anteriormente mencionados.

Esto se puede deber a las diferentes concentraciones de las moléculas que lo conforman, es decir, mientras que en FAEBo se encuentran todas las fracciones que tiene este efecto biológico, éstas se encuentran diluidas en el extracto total, sin embargo, se espera que este efecto se logre contrarrestar al estandarizar el extracto con base en las moléculas más abundantes de las reuniones más efectivas. De las moléculas encontradas como los ácidos hidroxicinámicos (Ac. cumarico, ac. clorogénico, cumarinas y cafeato) y algunos poliacetilenos y flavonoides se relacionan con disminuir la concentración de TNF $\alpha$  por diferentes motivos, al actuar como antioxidantes por lo que evitan la producción de DAMPS que llevan a la inflamación y por su acción sobre los factores de transcripción NF $\kappa$ B o AP1 con lo que evitan la expresión de la citocina.

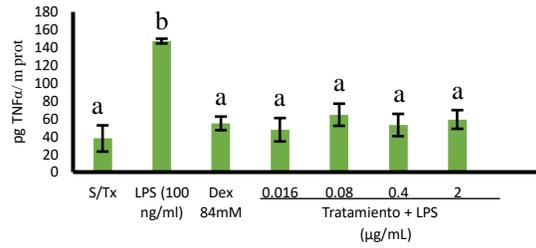
Estos resultados indican que la planta tiene bondades antiinflamatorias por los diferentes compuestos presentes en ella, lo que permitirá evaluar el efecto del HABo estandarizado.

Hasta el momento se han elucidados grupos de compuestos con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, pero se pretende elucidar cada una de estas reuniones para así determinar los compuestos químicos con mayor actividad antiinflamatoria y así saber su estructura química y el efecto ante este modelo biológico.

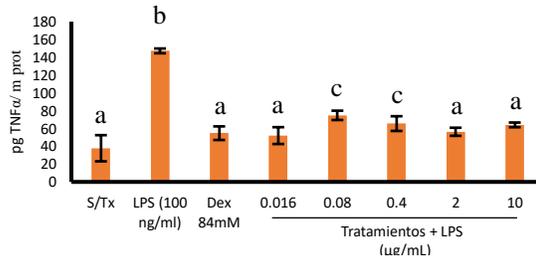
### Extracto Hidroalcoholico



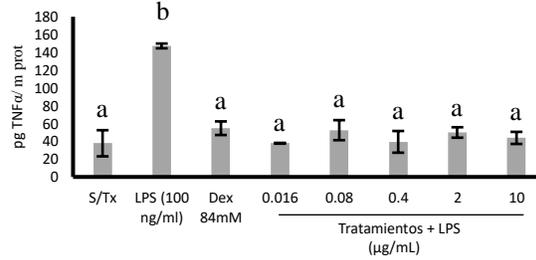
### FAEBo



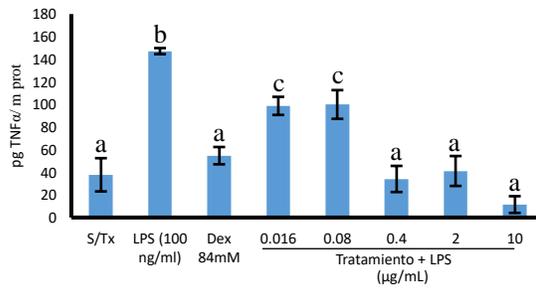
### R1



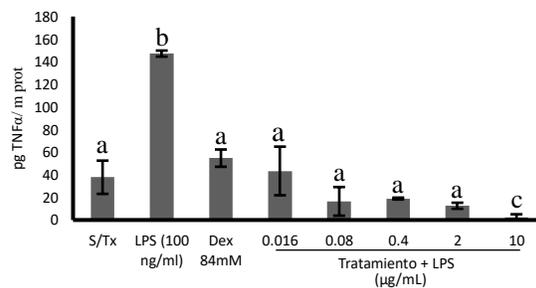
### R2



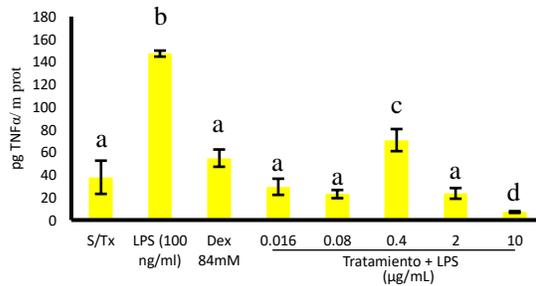
### R3



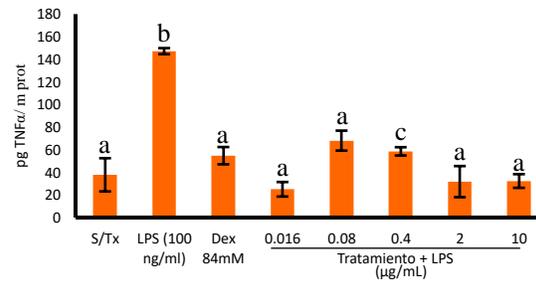
### R4



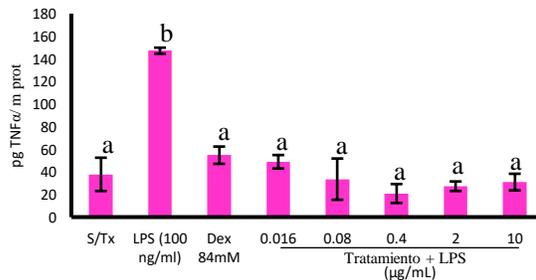
### R5



### R6



### R7



### R8

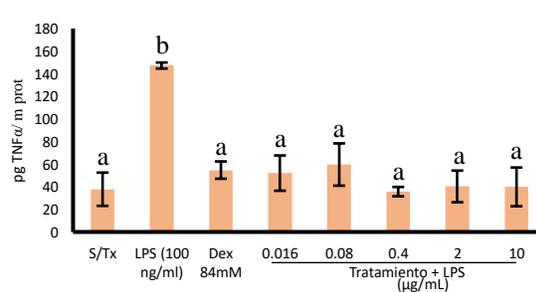


Figura 19. Inhibición de la producción de TNF $\alpha$  inducida por diferentes concentraciones de Extracto hidroalcohólico, FAEBo y sus 8 reuniones en presencia de LPS después de 22 horas de cultivo. En el eje de las X se presentan las diferentes condiciones de cultivo y en el eje de las Y las concentraciones de TNF $\alpha$  (pg TNF $\alpha$ /m proteína) detectada en el medio de cultivo. s/Tx = células control sin tratamiento, LPS=Células activadas con 100 ng/mL de LPS, DEX=células cultivadas con Dexametasona [84mM], 0.016, 0.08, 0.4, 2 o 10  $\mu$ g/mL son las concentraciones evaluadas del Extracto hidroalcohólico, FAEBo y sus reuniones. Se realiza la prueba de estadística post hoc de Dunnett, en donde P<0.05 se considera significativa. Literales iguales indican que no hay diferencia significativa entre grupos.

#### 7.4 Elucidación de los compuestos químicos de las subfracciones más activas de *Bidens odorata*

Después de analizar las 8 reuniones de FAEBo de *Bidens odorata* en sus distintas concentraciones se observó que lograron inhibir satisfactoriamente la producción de TNF $\alpha$  inducida por LPS, por lo cual, se decidió elucidar cada una de ellas para determinar los compuestos químicos mayoritarios y en efecto, los responsables de dicha actividad antiinflamatoria.

Se inició con la elucidación de la reunión 1 (R1) de *Bidens odorata*. Las 69 fracciones elucidadas, se analizaron mediante cromatografía en capa fina y con base a sus similitudes químicas fueron agrupadas obteniendo así la subfracciones a evaluar. En las siguientes placas cromatográficas se pueden observar los compuestos químicos mayoritarios al ser revelada con sulfato cérico en las fracciones 9-11 y 28-31.

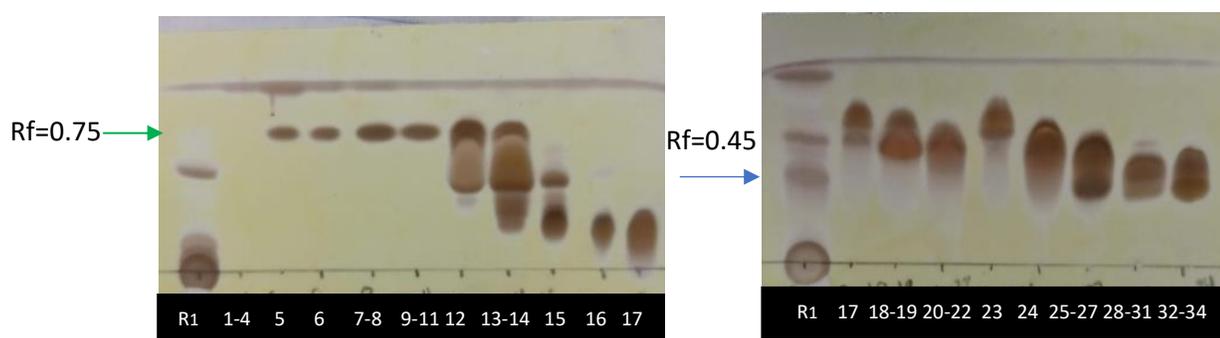
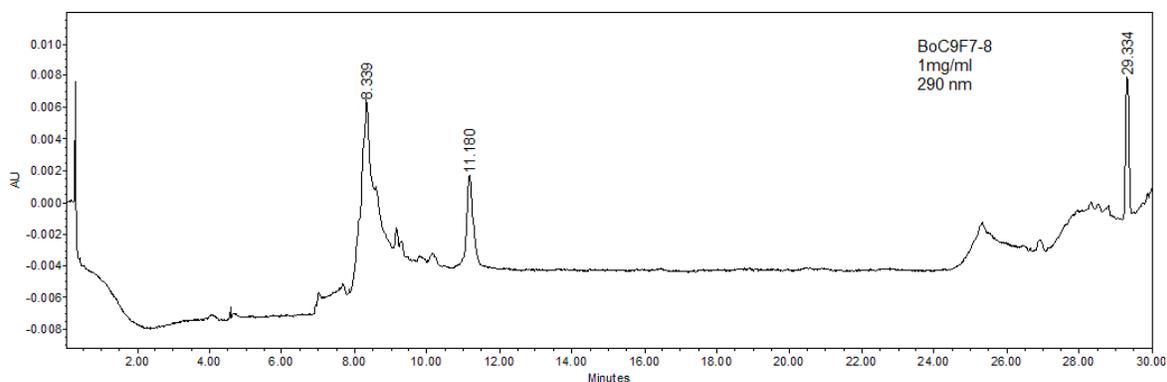


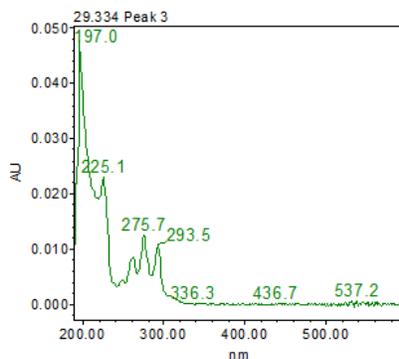
Figura 20. Placas cromatográficas de las subfracciones de R1 de *Bo*. a) Subfracción BoC9F9-11, b) Subfracción BoC9F28-31

La subfracción BoC9F9-11 se corrió en un sistema de elución 8:2 Hexano/AcoEt y al ser revelada con sulfato cérico mostró una mancha de color marrón con un factor de retención de 0.75, por lo que, al ser una placa en fase normal, se trata de los compuestos menos polares, mismos que se volvieron a revelar en la subfracción 7-8.

Al analizarse la fracción 7-8 mediante HPLC, se pudo observar en un tiempo de retención de 29.334 min y una longitud de onda de 290 nm los compuestos mayoritarios. En donde, al observarse el Espectro HPLC-UV 13 muestra que se trata de compuestos de tipo poliacetilenos. Mismos que se encuentran en la fracción BoC9F9-11, la cual, será evaluada en el modelo biológico.

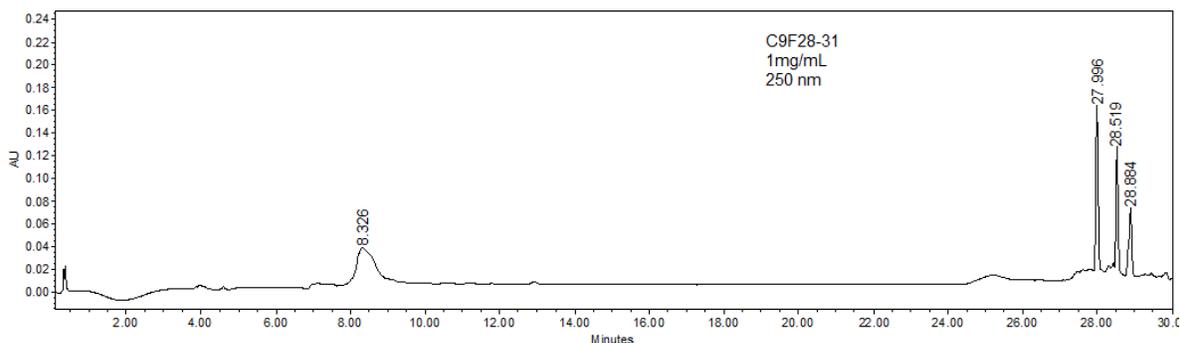


Espectro 13. Análisis de BoC9F7-8 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 290 nm

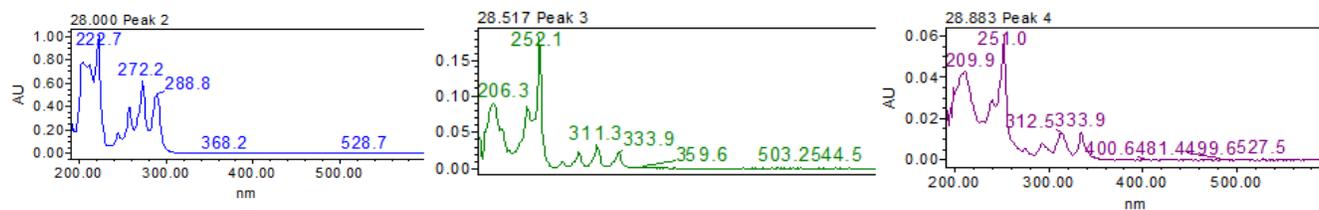


Espectro HPLC-UV 13. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 29.334 min (Poliacetilenos) de BoC9F7-8.

La subfracción BoC9F28-31 se corrió en un sistema Hexano/AcoEt 8:2 en cromatografía en capa fina y al ser revelada con sulfato cérico mostró compuestos de mayor polaridad con un Rf de 0.45. Al analizarse mediante HPLC, se observó a una longitud de 250 nm compuestos de tipo poliacetilenos en los tiempos de retención de 28, 28.517 y 28.883 min.



Espectro 14. Análisis de BoC9F28-31 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 250 nm



Espectro HPLC-UV 14. Espectros de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 28, 28.517 y 28.883 min (Poliacetenos) de BoC9F28-31.

Al elucidar R2 se obtuvieron 45 subfracciones, estas se analizaron a través de cromatografía en capa fina con ayuda del revelador 4-Hidroxibenzaldehído, seguido, se decidió analizar la fracción BoC12F21-24, las cual, de acuerdo con su de Rf=0.06 y de 0.23 se observó que se trata de los mismos compuestos químicos presentes en las fracciones BoC12F19-20 (Figura 21). Esta fracción fue analizada mediante HPLC, pero, en el espectro no fue posible visualizar ningún pico, por lo que posiblemente se trata de Terpenos.

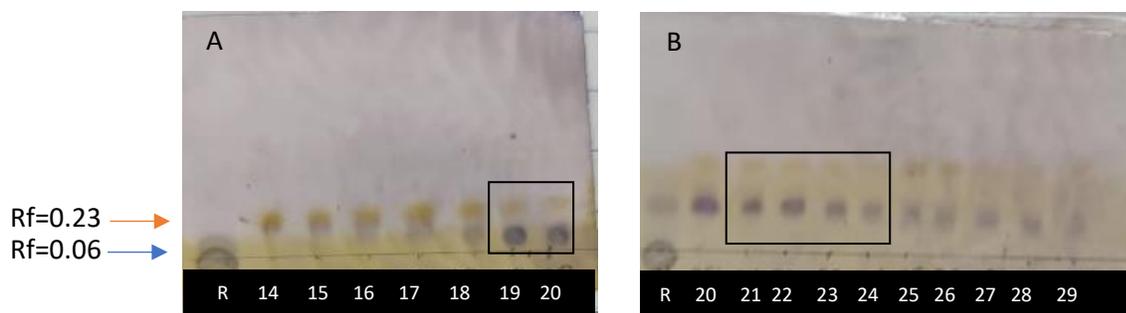


Figura 21. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN) reveladas con 4-Hidroxibenzaldehído de las subfracciones de R2 de *Bo*. A) Análisis de BoC12F19-20 en un sistema de elución 95:5 Hexano/AcoEt. B) Análisis de BoC12F21-24 en un sistema de elución 85:15 Hexano/AcoEt

Al elucidar R3 se obtuvieron 60 subfracciones, las cuales, se decidieron agrupar y analizar a través de sus similitudes químicas observadas en capa fina fase normal al ser revelada con productos naturales NP/PEG. Se decidió evaluar la subfracción BoC7F5-8, ya que contenía los compuestos mayoritarios observados en un  $R_f=0.73$ ,  $R_f=0.65$  y  $R_f=0.52$ , en donde tornan de color verde, amarillo y morado (Figura 22).

Al analizar la muestra mediante HPLC (Espectro 15), se observaron los compuestos mayoritarios en un tiempo de retención de 15.690 min y al observarse en el Espectro HPLC-UV 15 en una longitud de onda de 300 nm, mostraron ser compuestos de tipo cafeato.

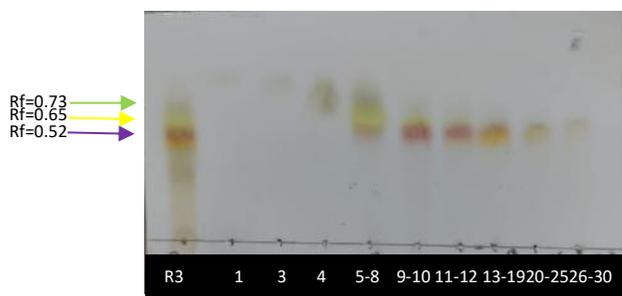
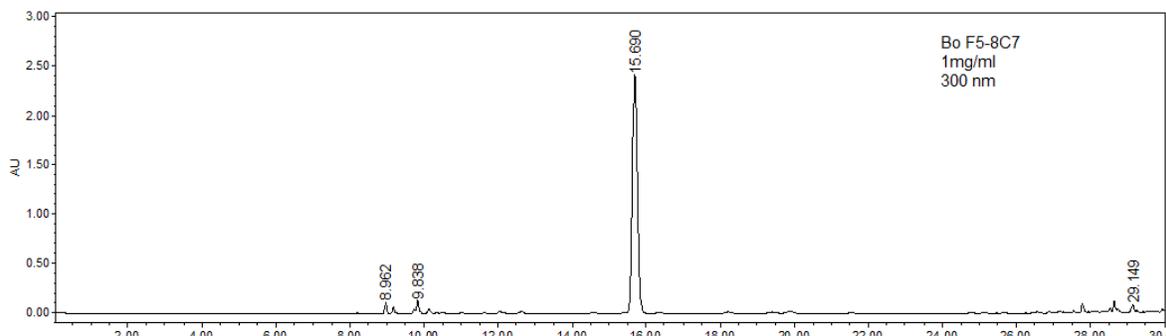
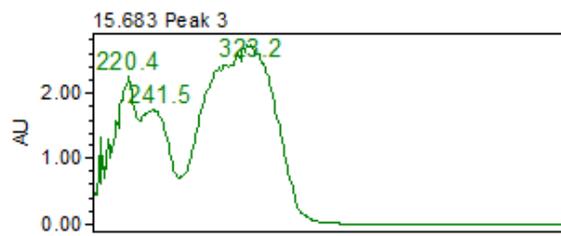


Figura 22. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN), eluida en un sistema 5:5:2 Hexano/AcoEt/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG de la Referencia de R3 y las subfracciones 1-30 de R3.



Espectro 15. Análisis de BoC7F5-8 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 300 nm



Espectro HPLC-UV 15. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 15.683 min (Cafeato) de BoC7F5-8.

R4 fue elucidada mediante un sistema en fase normal, del cual, se obtuvieron 37 subfracciones. Al analizar las subfracciones mediante cromatografía en capa fina y al ser revelada con productos naturales NP/PEG se logró visualizar en las primeras subfracciones los compuestos mayoritarios de la reunión, por lo cual se decidió analizar 2 de ellas (BoC5F9 y BoC5F10) (Figura 23). De acuerdo con su factor de retención, los compuestos mayoritarios se observaron en un  $R_f = 0.52$  y  $0.47$ .

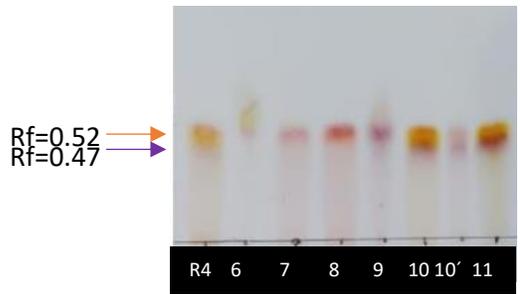
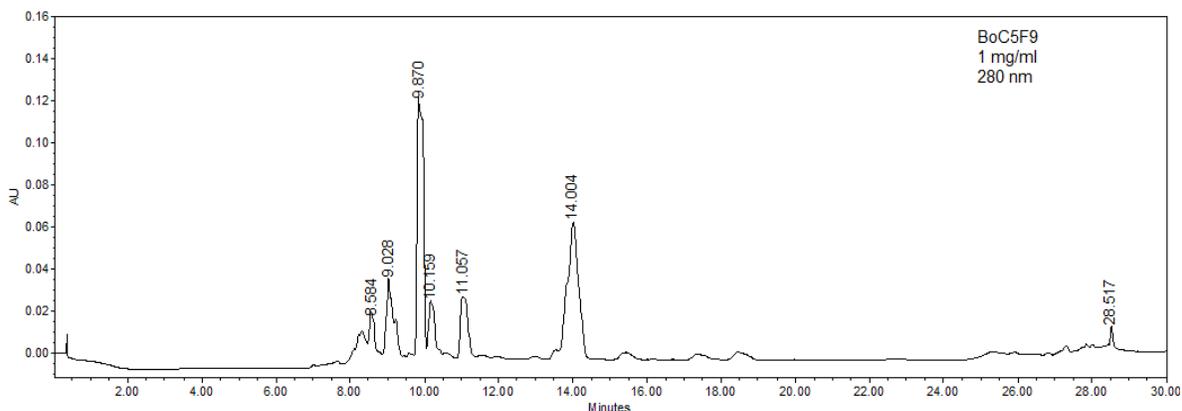
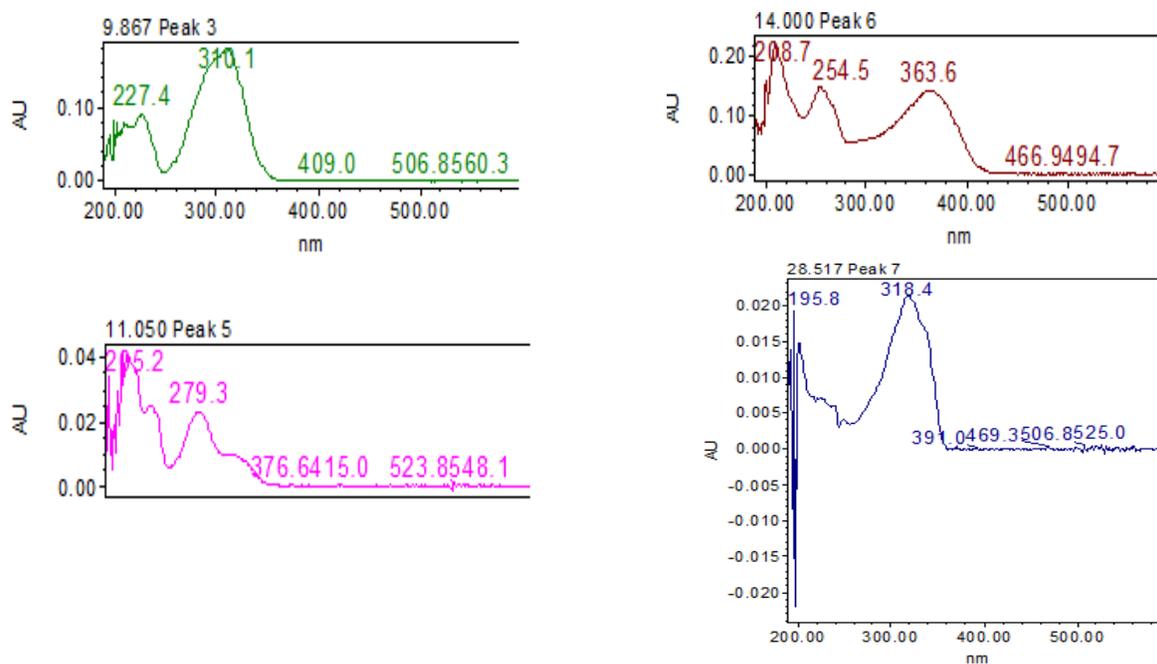


Figura 23. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN) de la Referencia de R4 y las subfracciones 6-11 de R4, eluida en un sistema 5:5:2 Hexano/AcoEt/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG.

Las muestras se analizaron mediante HPLC, en la subfracción BoC5F9 se observaron los compuestos mayoritarios en un tiempo de retención de 8.867 (ácido cumárico), 11.050 (flavanona), 14.00 (quercetina) y 28.517 (cumarina) min (Espectro 16).

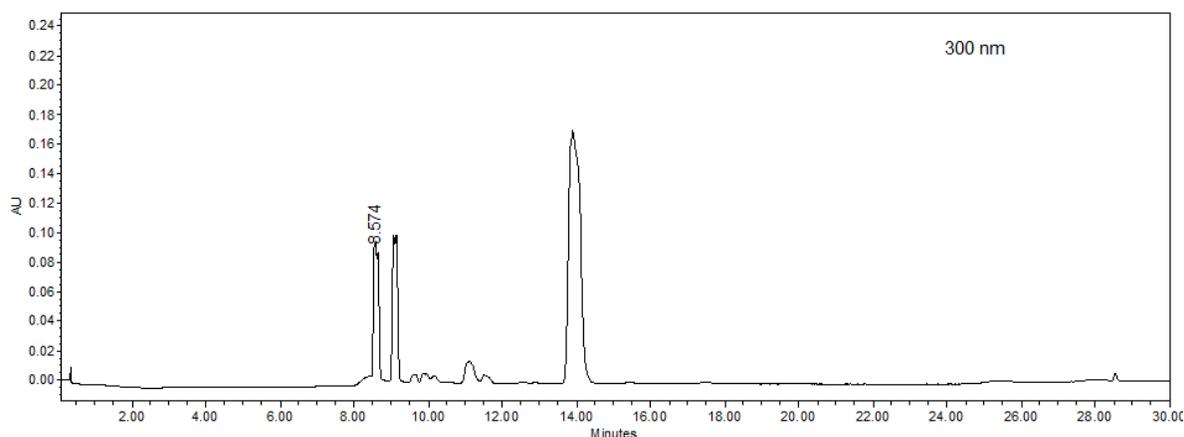


Espectro 16. Análisis de BoC5F9 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 280 nm

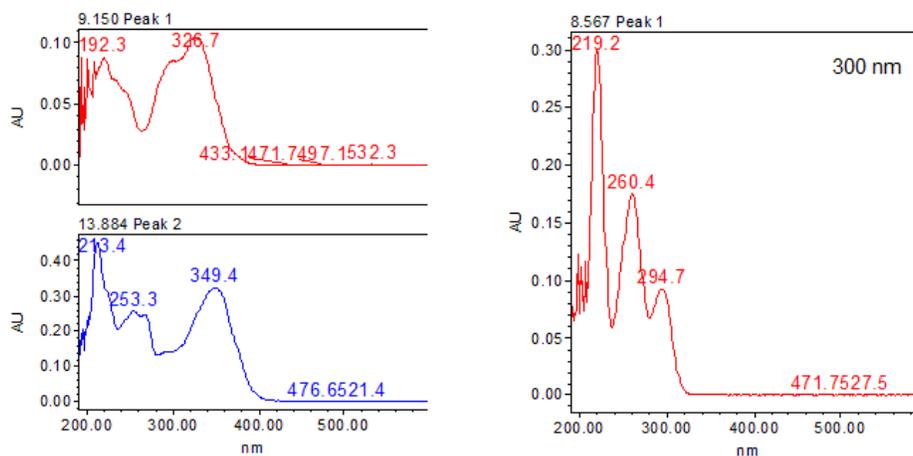


Espectro HPLC-UV 16. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.867 (Ácido cumárico), 11.050 (Quercetina), 14.000 (Quercetina) y 28.517 (Cumarina) min de BoC5F9.

El análisis de BoC5F10 mediante HPLC mostró estar compuesta por ácido protocatechuico en un tiempo de retención de 8.567 min, ácido cafeico en un tiempo de retención de 9.150 min y por último en un tiempo de retención de 13.884 min se observo estaba compuesta por luteolina, como se observa en el siguiente espectro (Espectro 17).



Espectro 17. Análisis de BoC5F10 mediante cromatografía liquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 300 nm.



Espectro HPLC-UV 17. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 8.567 (Ácido protocatechuico), 9.150 (Ácido cafeico) y 13.884 (Luteolina) min de BoC5F10.

Al elucidar la reunión R5 de *Bo* se obtuvieron 50 subfracciones, las cuales, al ser analizadas mediante cromatografía en capa fina con un sistema de elución 5:5:2 Hexano/AcoEt/MeOH y al ser revelada con productos naturales NP/PEG, se agruparon con base a sus características químicas similares. Se analizaron 2 de las subfracciones, la subfracción BoC4F5 (La cual, en un Rf 0.45 muestra un compuesto químico igual que BoC4F6) y BoC4F10-14 (Figura 24).

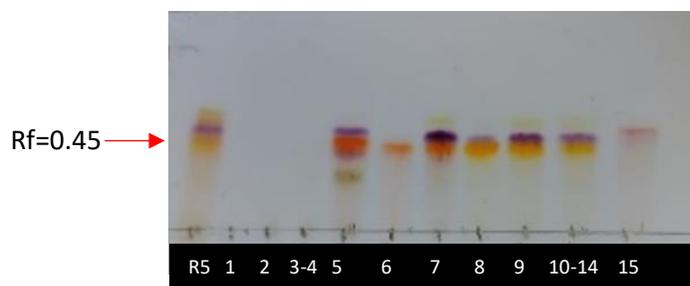
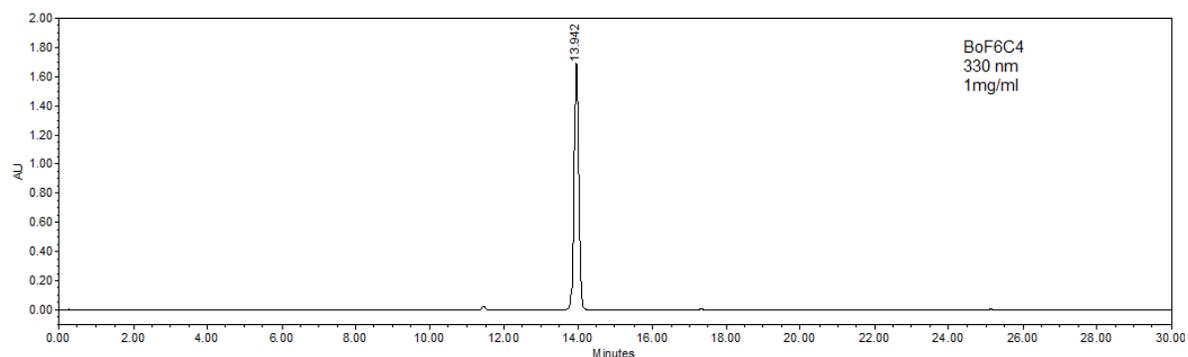
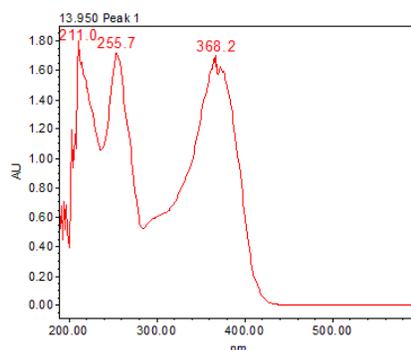


Figura 24. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN) de la Referencia de R5 y las subfracciones 1-15 de R5, eluida en un sistema 5:5:2 Hexano/AcoEt/MeOH, revelada con productos naturales NP/PEG.

El espectro 18 mostró el análisis mediante HPLC de BoC4F6, a una longitud de onda de 330 nm y un tiempo de retención de 13.942 se observó el compuesto mayoritario de dicha fracción, el cual a través de su Espectro HPLC-UV 18 demostró se trataba de Quercetina.

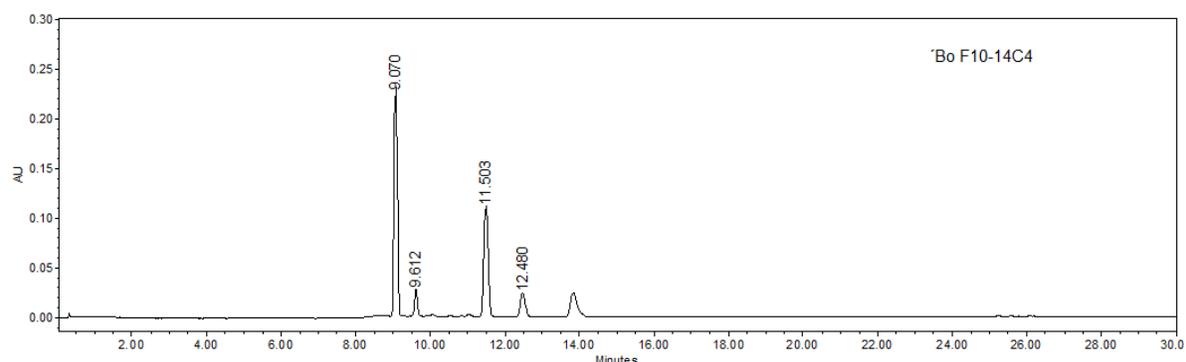


Espectro 18. Análisis de BoC4F6 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 330 nm.

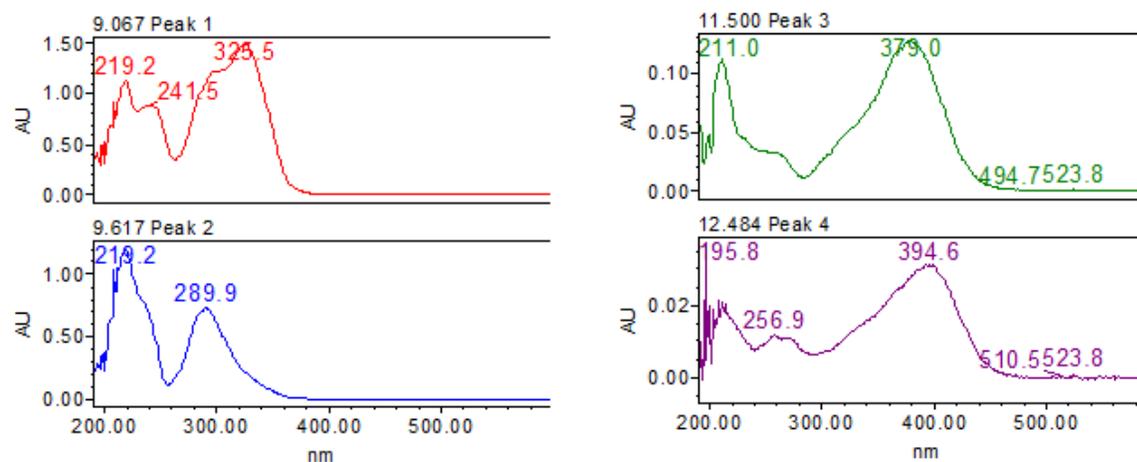


Espectro HPLC-UV 18. Espectro de absorción UV del compuesto mayoritario presente en un tiempo de retención de 13.950 min (Quercetina) de BoC4F6.

Al analizar la subfracción BoC4F10-14, se observaron los compuestos mayoritarios en su espectro de HPLC en un tiempo de retención de 9.067 (ácido cafeico), 9.617 (compuesto de tipo flavanona), 11.500 y 12.480 (Compuestos de tipo cumarina). Por lo cual, se decidió de igual manera evaluarla en el modelo biológico.



Espectro 19. Análisis de BoC4F10-14 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 330 nm.



Espectro HPLC-UV 19. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.067 (Ácido cafeico), 9.617 (Flavanona), 11.500 y 12.484 (Cumarina) min de BoC4F10-14.

R6 fue elucidada con un sistema de fase normal, se obtuvieron 59 fracciones, las cuales, al ser analizadas mediante CCF y al ser reveladas con productos naturales NP/PEG se decidió agruparlas con base a sus características químicas. Se decidió evaluar 2 de ellas ya que agrupaban los compuestos químicos mayoritarios de la reunión, estas fueron la subfracción BoC8F23-25 y Bo C8F39-43 (Figura 25).

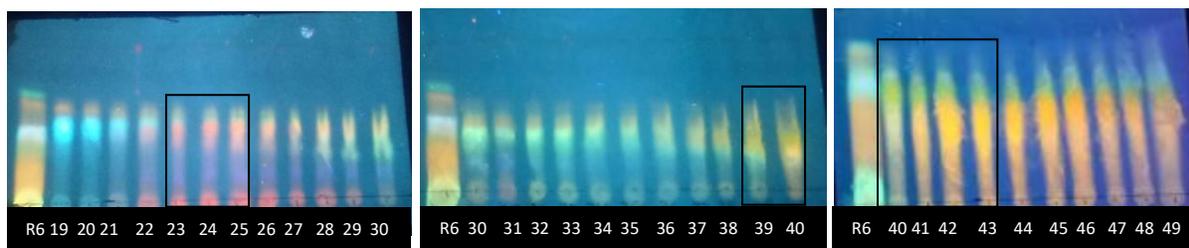
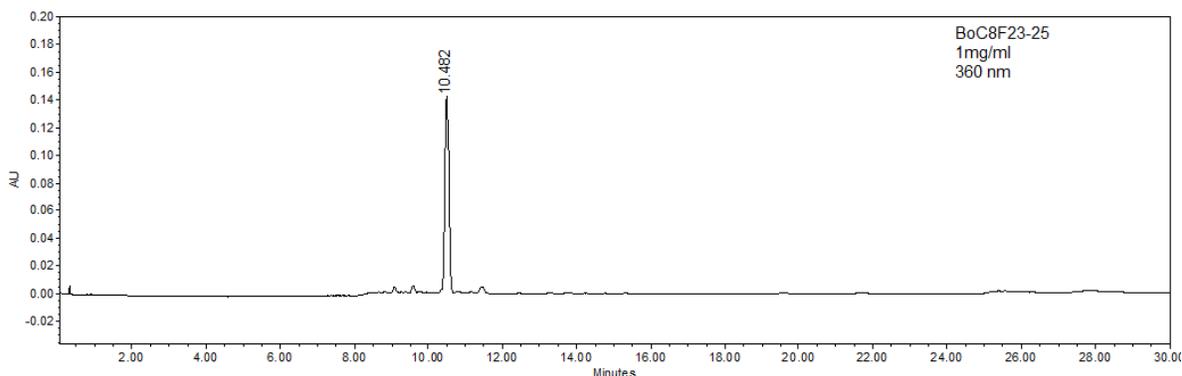
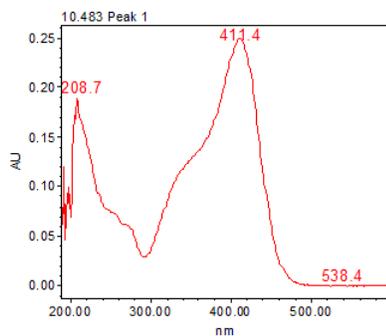


Figura 25. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase normal (FN) reveladas con productos naturales NP/PEG de las subfracciones de R6 de *Bo*. A) Análisis de BoC8F23-25 en un sistema de elución 5:5:2 Hexano/AcoEt/MeOH. B) Análisis de BoC8F39-43 en un sistema de elución 5:5:2 Hexano/AcoEt/MeOH y C) Análisis de BoC8F39-43 en un sistema de elución 5:5:3 Hexano/AcoEt/MeOH

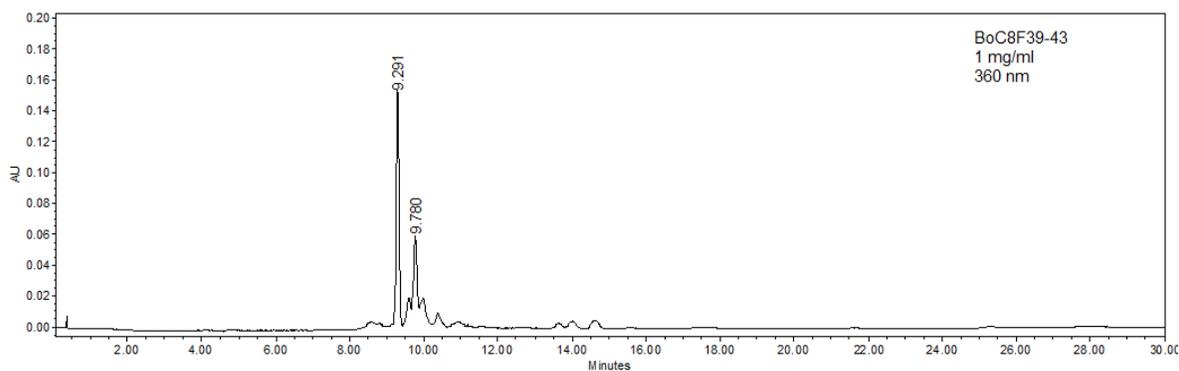
Las subfracciones se analizaron mediante HPLC, en la subfracción BoC8F23-25 en un tiempo de retención de 10.482 min se observó un compuesto mayoritario, el cual, no pudo ser identificado. La subfracción BOC8F39-43, al ser analizada mostró en un tiempo de retención de 9.283 min glucósido de quercetina y en un tiempo de retención de 9.783 min glucósido de luteolina.



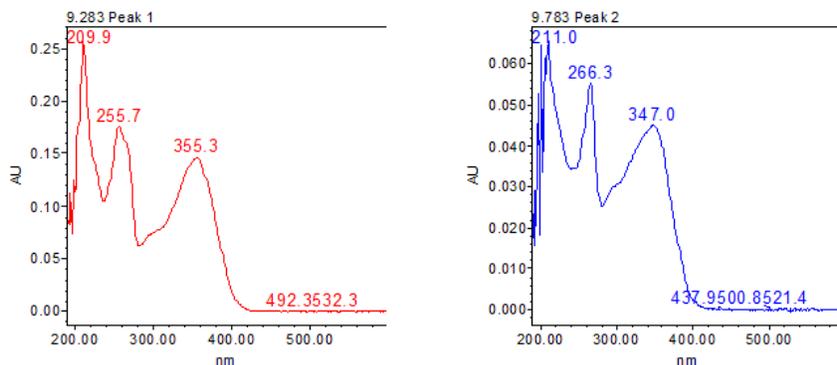
Espectro 20. Análisis de BoC8F23-25 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 360 nm.



Espectro HPLC-UV 20. Espectro de absorción UV del compuesto mayoritario presente en un tiempo de retención de 10.483 min de BoC8F23-25.



Espectro 21. Análisis de BoC8F39-43 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 360 nm.



Espectro HPLC-UV 21. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.283 (Glucósido de quercetina) y 9.783 (Glucósido de luteolina) min de BoC8F39-43.

R7 fue elucidada en 37 subfracciones obtenidas a través de cromatografía en columna fase reversa, las cuales, al ser analizadas mediante cromatografía en capa fina, se eligieron 2 de ellas, las cuales, contenían los compuestos químicos mayoritarios de dicha reunión (Figura 26) Estas fracciones llevan por nombre BoC11F19 y BoC11F28.

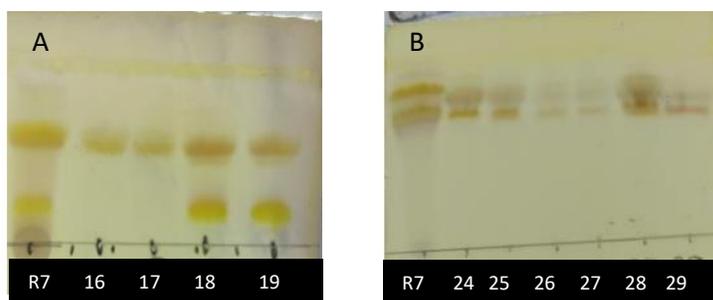
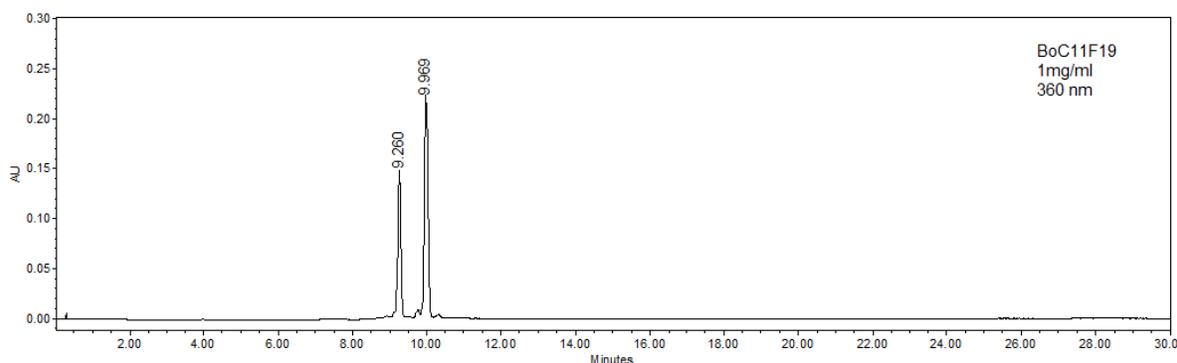
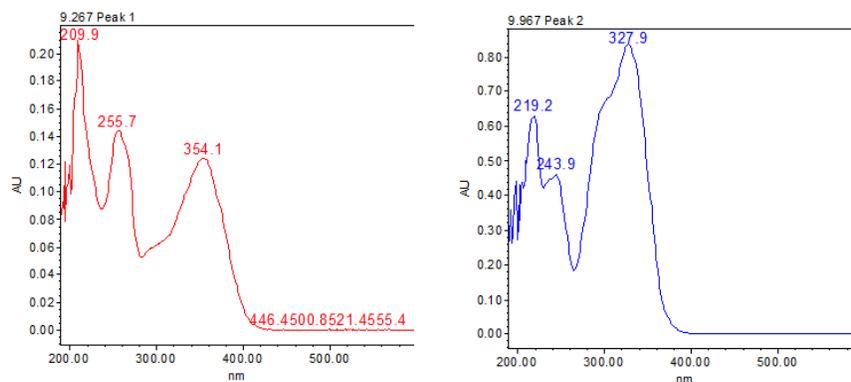


Figura 26. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase reversa (FR) reveladas con sulfato cérico de las subfracciones de R7 de *Bo*. A) Análisis de BoC11F19 en un sistema de elución 7:3 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN. B) Análisis de BoC11F28 en un sistema de elución 5:5 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN.

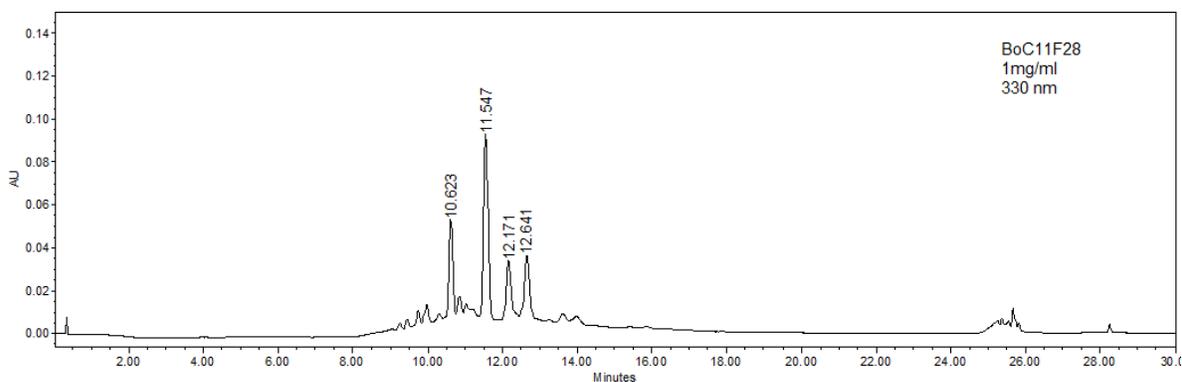
Al analizar las subfracciones mediante HPLC, la primera (BoC11F19) mostró tener 2 compuestos químicos mayoritarios en un tiempo de retención de 9.267 min (Glucósido de quercetina) y 9.967 min (ácido ferúlico). La segunda (BoC11F28) mostró en 4 tiempos de retención distintos (10.617, 11.550, 12.167 y 12.634 min) estar conformada por compuestos de tipo cafeato.



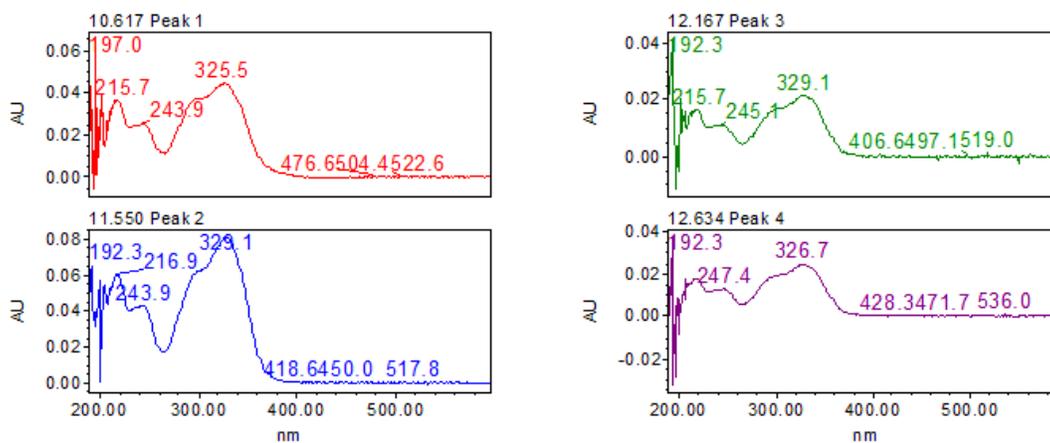
Espectro 22. Análisis de BoC11F19 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 360 nm.



Espectro HPLC-UV 22. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 9.267 (Glucósido de quercetina) y 9.967 (Ácido ferúlico) min de BoC11F19.



Espectro 23. Análisis de BoC11F28 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 330 nm.



Espectro HPLC-UV 23. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios (cafeatos) presentes en un tiempo de retención de 10.617, 11.550, 12.167 y 12.634 min de BoC11F28.

Por último, la reunión 8 de *Bo* fue elucidada a partir de un sistema fase reversa, en donde se obtuvieron 43 subfracciones, las cuales, fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina y al ser reveladas con productos naturales NP/PEG se eligieron las fracciones a evaluar con un Rf igual a 0.48 (BoC10F14-15) (Figura 27).

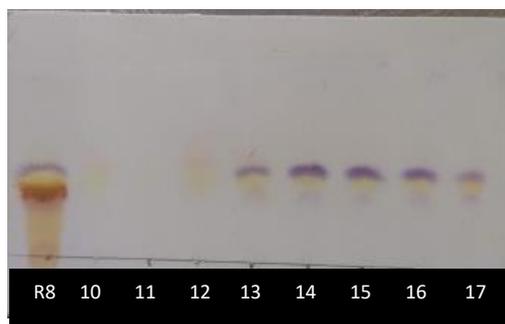
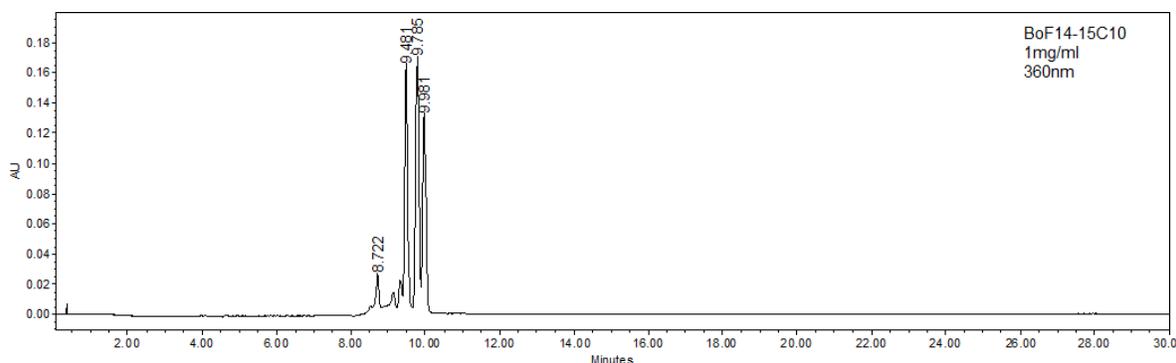
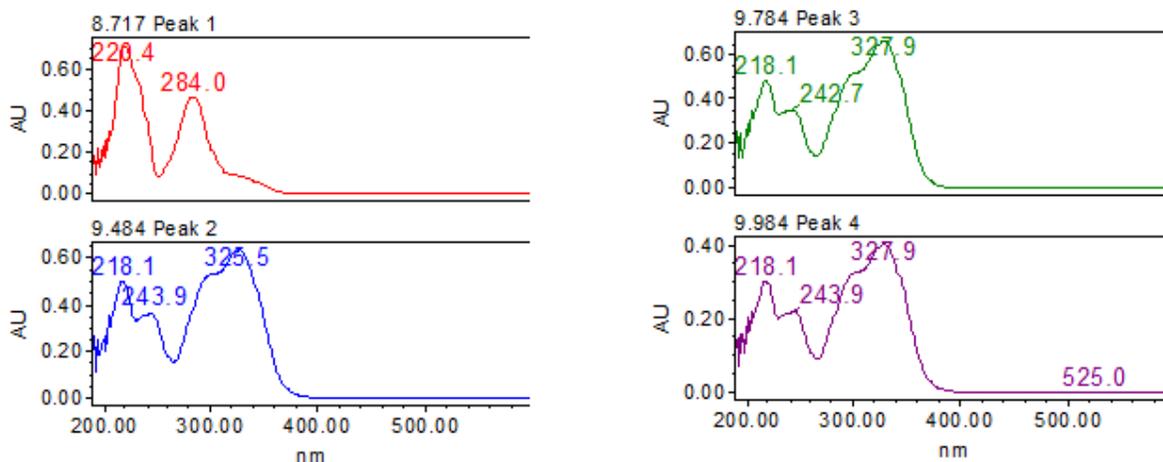


Figura 27. Análisis mediante cromatografía en capa fina fase reversa (FR) de la subfracción BoC10F14-15, eluida en un sistema 7:3 H<sub>2</sub>O/ CH<sub>3</sub>CN, revelada con productos naturales NP/PEG.

Al analizarla mediante HPLC, se determinó que en un tiempo de retención de 8.717 min se observaban compuestos de tipo flavanona, en un tiempo de retención de 9.484, 9.784, y 9.984 min se pueden observar compuestos de tipo cafeatos, como se observa en los siguientes espectros.



Espectro 24. Análisis de BoC10F14-15 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 1 mg/mL a 360 nm.



Espectro HPLC-UV 24. Espectro de absorción UV de los compuestos mayoritarios presentes en un tiempo de retención de 8.717 min (Flavanona), 9.484, 9.784 y 9.984 min (Cafeatos) de BoC10F14-15.

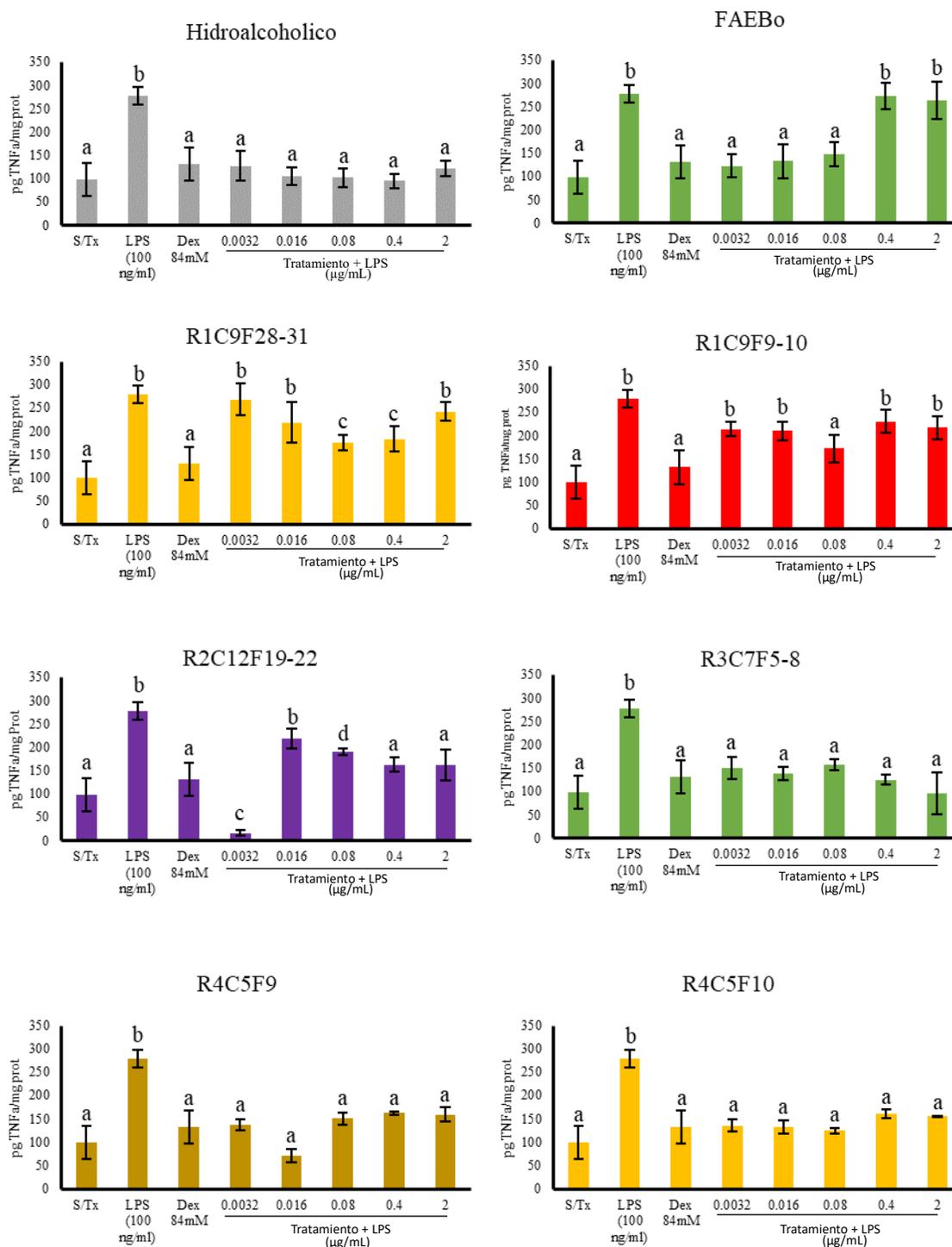
Cada una de las subfracciones elucidadas fueron analizadas en el modelo biológico para determinar si tienen actividad antiinflamatoria, y poder determinar los compuestos químicos responsables de dicha actividad.

#### 7.5 Las subfracciones de las reuniones de *Bidens odorata* controlan de manera diferencial la expresión de TNF $\alpha$ en Macrófagos Raw 264.7 activados por LPS

Al evaluar cada una de las subfracciones de las reuniones de *Bo*, se observó (Figura 28) que el LPS incrementa la producción de TNF $\alpha$  significativamente ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control sin tratamiento, sin embargo, pese a la presencia constante del estímulo, las diferentes fracciones evaluadas llevaron al nivel del control y la dexametasona la concentración de TNF $\alpha$ .

A partir de las subfracciones de la reunión R3, las diferentes concentraciones (0.0032  $\mu\text{g/mL}$ , 0.016  $\mu\text{g/mL}$ , 0.08  $\mu\text{g/mL}$ , 0.4  $\mu\text{g/mL}$  y 2  $\mu\text{g/mL}$ ) evaluadas regularon la expresión de esta citocina, lo hicieron de manera diferente, es decir, mientras que todas las concentraciones evaluadas del extracto hidroalcohólico y de las subfracciones de las reuniones R3, R4, R5, R6, R7 y R8 mantuvieron la concentración de TNF $\alpha$  igual que el control sin tratamiento ó el control con dexametasona, FAEBo no lo hizo en una concentración de 0.4 y 2  $\mu\text{g/mL}$ . Es importante mencionar que no se evaluó la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  porque en experimentos previos se observó que esta concentración dañaba a las células. Los resultados obtenidos de R1 y R2 no indicaron que ninguna de las concentraciones evaluadas regula la

expresión de esta citocina, todo lo contrario, se elevó como el control de daño. Esto se puede deber a las diferentes concentraciones de las moléculas que lo conforman, entre ellas compuestos de tipo poliacetilenos y posiblemente terpenos.



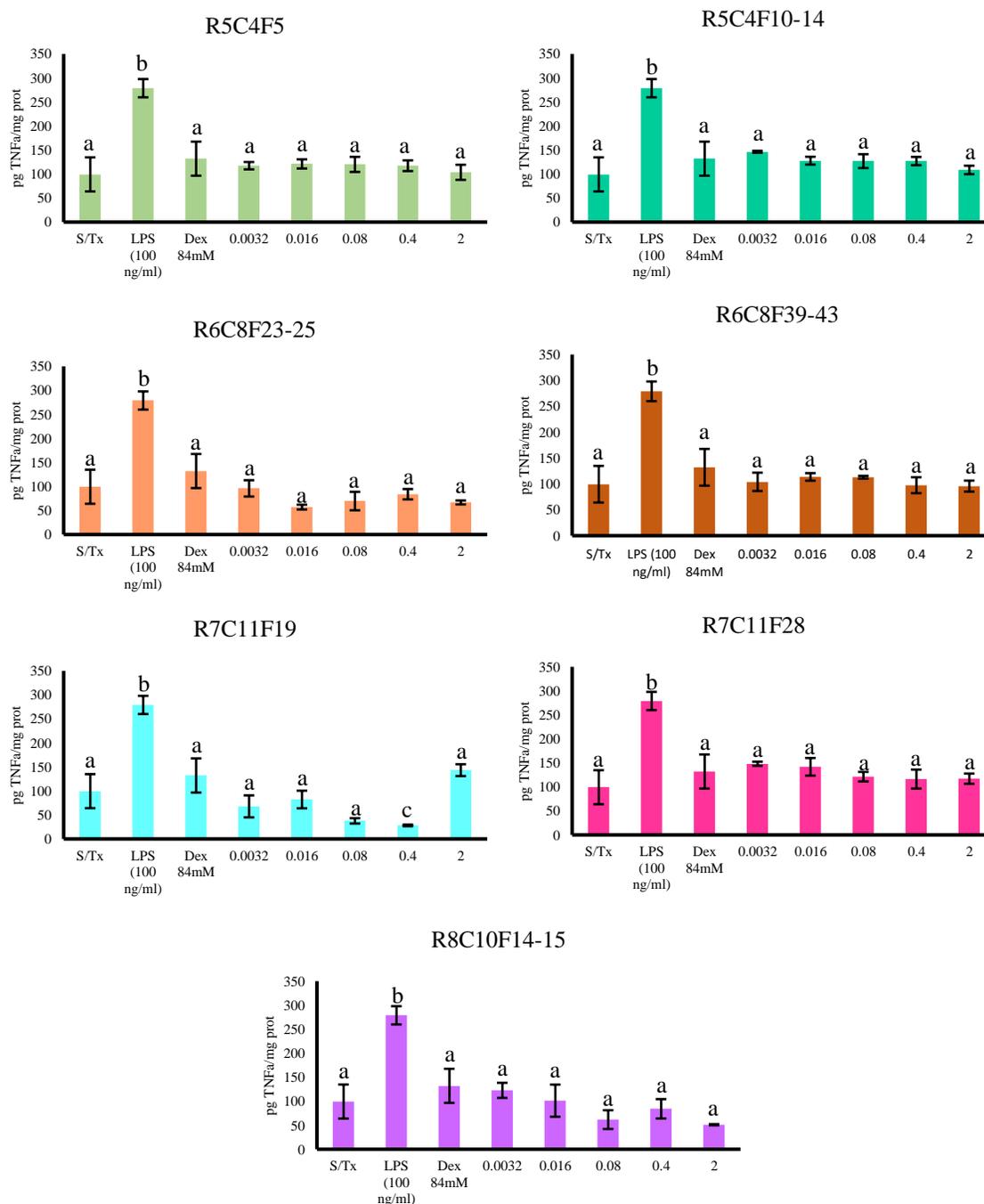
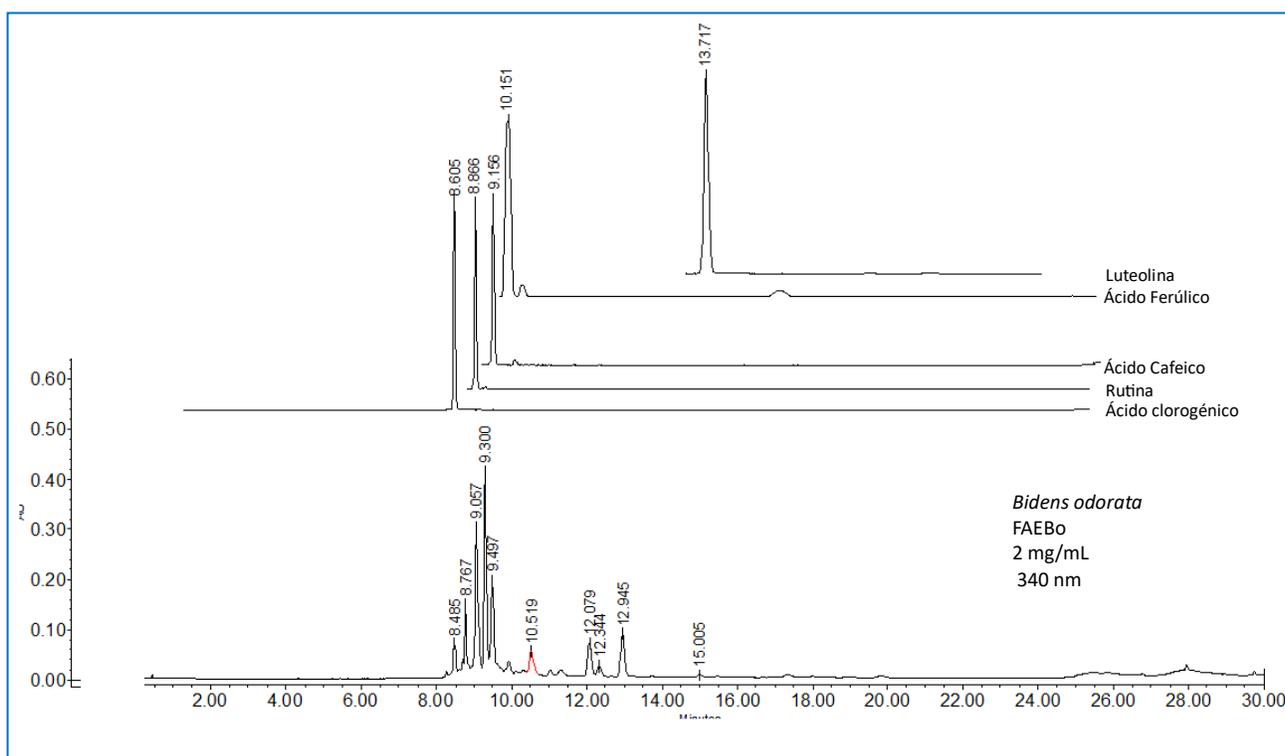


Figura 28. Inhibición de la producción de TNF $\alpha$  inducida por diferentes concentraciones de Extracto hidroalcohólico, FAEBO y sus 13 subfracciones en presencia de LPS después de 22 horas de cultivo. En el eje de las X se presentan las diferentes condiciones de cultivo y en el eje de las Y las concentraciones de TNF $\alpha$  (pg/mg proteína) detectada en el medio de cultivo. s/tx = células control sin tratamiento, LPS=Células activadas con 100 ng/mL de LPS, DEX=células cultivadas con Dexametasona [84mM]; 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4 y 2  $\mu$ g/mL son las concentraciones evaluadas de FAEBO o de sus subfracciones. Se realiza la prueba de estadística, en donde P<0.05 se considera significativa. Literales iguales indican que no hay diferencia significativa entre grupos.

## 7.6 Concentración de los compuestos más activos de las reuniones de las Subfracciones efectivas de *Bidens odorata*

Después de evaluar y analizar detenidamente cada de una de las reuniones y sus subfracciones, se observó que la R4 y R7 junto con sus subfracciones, lograron regular la concentración de TNF $\alpha$  satisfactoriamente, llevándola a niveles como el grupo control y la dexametasona.

Es por eso, que se determinaron los compuestos químicos presentes responsables de dicha acción y su concentración en la fracción Acetoetílica. Debido que es la fracción que integra todas las reuniones y compuestos sin ser elucidados. En el siguiente espectro (Espectro 25) se puede observar los compuestos químicos presentes en FAEBo y los cuales fueron elucidados de la R4 y R7.



Espectro 25. Análisis de FAEBo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en una concentración de 2 mg/mL a 340 nm, comparado con Ácido clorogénico, Rutina, Ácido cafeico, Ácido ferúlico y Luteolina.

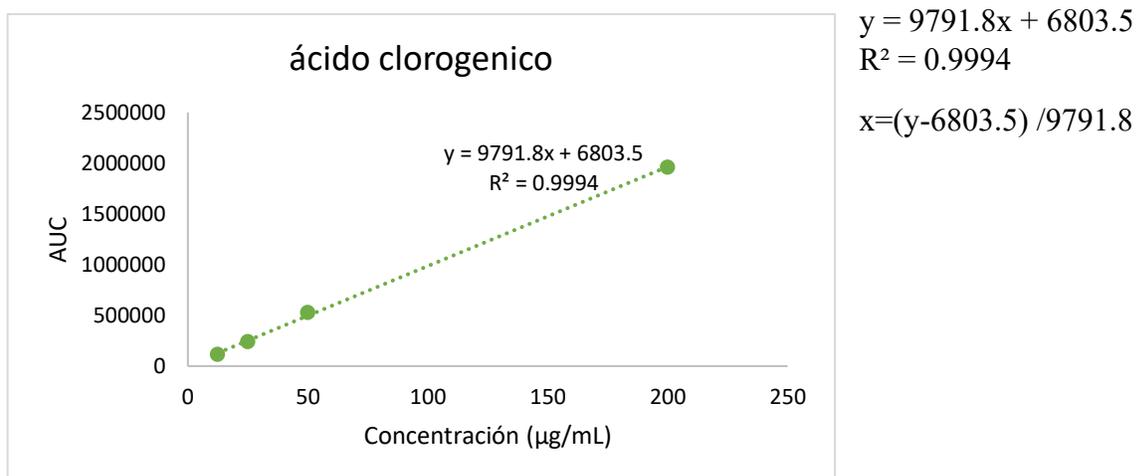
Para determinar cada una de las concentraciones de los compuestos químicos elucidados, se realizó una curva de concentración de los compuestos puros (Estándar), seguido se obtuvo la ecuación lineal que al ser despejada se pudo obtener la concentración buscada.

A continuación, se muestran cada uno de los datos obtenidos.

## Curva del Ácido clorogénico

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO					
Concentración (µg/mL)	TR	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Promedio AUC
12.5	8.605	113246	117400	117400	116015.3333
25	8.602	241724	237014	239629	239455.6667
50	8.601	528120	526296	526711	527042.3333
100	9.47	1466883	1466883	1466883	1466883
200	8.605	1961924	1961924	1955683	1959843.667

Tabla 11. Curva de concentración del ácido clorogénico



Muestra problema	TR	Longitud de onda	AUC 1	AUC2	AUC3	Promedio AUC	Concentración en 2 g de extracto	µg de ác. Clorogenico/g Extr.	mg de ác. Clorogenico/g Extr.
200 (µg/mL)	8.605	340 nm	1961924	1961924	1955683	1959843.7	199.45671	99728.3526	99.7283526
FAEBo	8.605	340 nm	333863	261453	324194	306503.333	30.607226	15303.6129	15.3036129

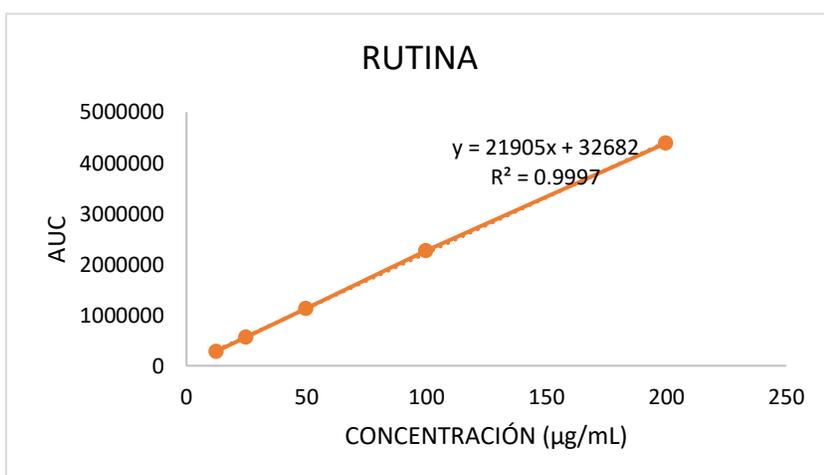
Tabla 12. Concentración del ácido clorogénico en FAEBo

Al realizar los cálculos correspondientes se determinó que cada gramo de FAEBo contiene 15.30 mg de Ácido clorogénico.

## Curva de Rutina

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE RUTINA					
Concentración (µg/mL)	TR	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Promedio AUC
12.5	8.857	285110	289272	282184	285522
25	8.858	576724	563338	568740	569600.6667
50	8.857	1130085	1143043	1128602	1133910
100	8.87	2272189	2272189	2272189	2272189
200	8.866	4352049	4409331	4409331	4390237

Tabla 13. Curva de concentración de la rutina



$$y = 21905x + 32682$$

$$R^2 = 0.9997$$

$$x = (y - 32682) / 21905$$

Muestra problema	TR	Longitud de onda	AUC 1	AUC2	AUC3	Promedio AUC	Concentración en 2g de extracto	µg de rutina/g Extr.	mg de rutina/g Extr.
200 (µg/mL)	8.866	340 nm	4352049	4409331	4409331	4390237	198.929696	99464.8482	99.4648482
FAEBo	8.605	340 nm	1436538	1306127	1503089	1415251	63.1166096	31558.3048	31.5583048

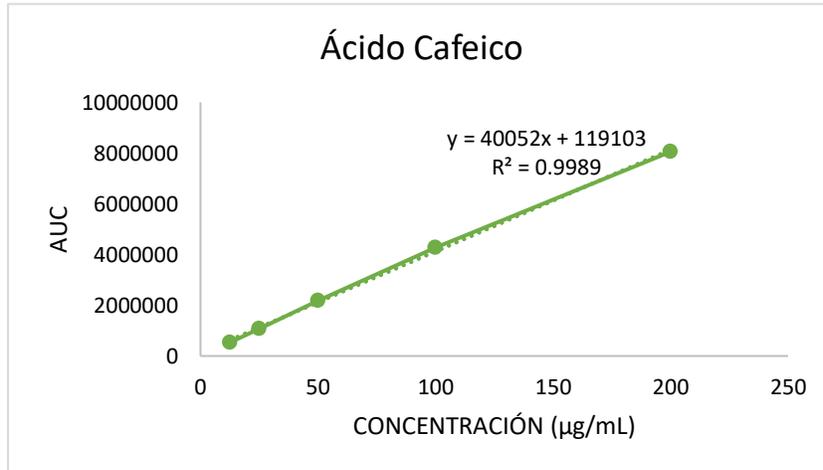
Tabla 14. Concentración de Rutina en FAEBo

Al realizar los cálculos correspondientes se determinó que cada gramo de FAEBo contiene 31.55 mg de Rutina.

### Curva del Ácido Cafeico

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CAFEICO					
Concentración (µg/mL)	TR	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Promedio AUC
12.5	8.654	532634	532634	532606	532624.6667
25	8.652	1088462	1097651	1059505	1081872.667
50	8.647	2182550	2160808	2182550	2175302.667
100	8.641	4295920	4282710	4245639	4274756.333
200	8.654	7820485	8213507	8119614	8051202

Tabla 15. Curva de concentración del ácido cafeico



$$y = 40052x + 119103$$

$$R^2 = 0.9989$$

$$x = (y - 119103) / 40052$$

Muestra problema	TR	Longitud de onda	AUC 1	AUC2	AUC3	Promedio AUC	Concentración en 2 g de extracto	µg de ác. Cafeico/g Extr.	mg de ác. Cafeico/g Extr.
200 (µg/mL)	8.654	340 nm	7820485	8213507	8119614	8051202	198.045016	99022.5082	99.0225082
FAEBo	9.3	340 nm	1505469	1505469	1602412	1537783.33	35.4209611	17710.4805	17.7104805

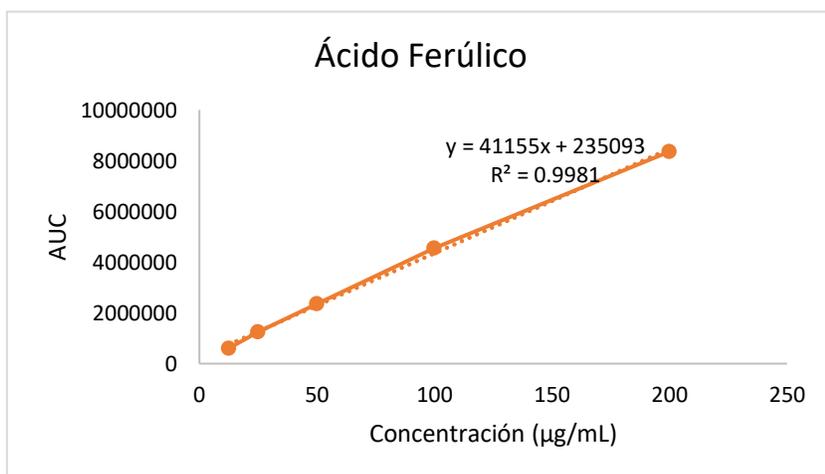
Tabla 16. Concentración del ácido cafeico en FAEBo

Al realizar los cálculos correspondientes se determinó que cada gramo de FAEBo contiene 17.71 mg de Ácido Cafeico.

### Curva del ácido Ferúlico

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO					
Concentración (µg/mL)	TR	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Promedio AUC
12.5	8.871	606692	606692	606692	606692
25	8.873	1250320	1247847	1247847	1248671.333
50	8.871	2360454	2354226	2350449	2355043
100	8.879	4568136	4504907	4582704	4551915.667
200	8.882	8360258	8351866	8370140	8360754.667

Tabla 17. Curva de concentración del ácido ferúlico



$$y = 41155x + 235093$$

$$R^2 = 0.9981$$

$$x = (y - 235093) / 41155$$

Muestra problema	TR	Longitud de onda	AUC 1	AUC2	AUC3	Promedio AUC	Concentración en 2g de extracto	µg de ác.Ferúlico /g Extr.	mg ác.Ferúlico/g ext
200 (µg/mL)	8.882	340 nm	8360258	8351866	8370140	8360755	197.440449	98720.2244	98.7202244
FAEBo	9.497	340 nm	718540	718540	718540	718540	11.7469809	5873.49046	5.87349046

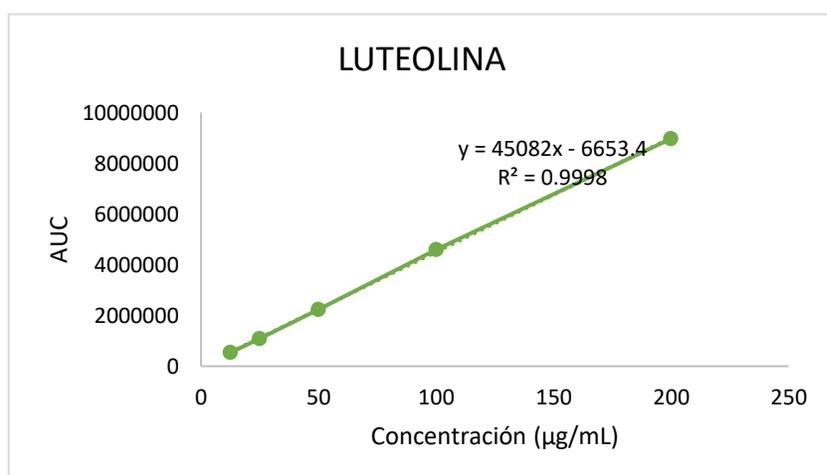
Tabla 18. Concentración del ácido ferúlico

Al realizar los cálculos correspondientes se determinó que cada gramo de FAEBo contiene 5.87 mg de Ácido Ferúlico.

## Curva de Luteolina

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE LUTEOLINA					
Concentración (µg/mL)	TR	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Promedio AUC
12.5	13.479	536434	534805	536434	535891
25	13.536	1086029	1087265	1111948	1095080.667
50	13.554	2259065	2230065	2246938	2245356
100	13.593	4564745	4591768	4608612	4588375
200	13.717	8925604	9008449	8980108	8971387

Tabla 19. Curva de concentración de la luteolina



$$y = 45082x - 6653.4$$

$$R^2 = 0.9998$$

$$x = (y + 6653.4) / 45082$$

Muestra problema	TR	Longitud de onda	AUC 1	AUC2	AUC3	Promedio AUC	Concentración en 2g de extracto	µg de Luteolina/g Extr.	mg Luteolina/g ext
200 (µg/mL)	13.717	340 nm	8925604	9008449	8980108	8971387	199.149115	99574.5575	99.5745575
FAEBo	15.005	340 nm	32046	26803	31442	30097	0.8151901	407.595049	0.40759505

Tabla 20. Concentración de la luteolina en FAEBo

Al realizar los cálculos correspondientes se determinó que cada gramo de FAEBo contiene 0.40 mg de Luteolina.

Por lo tanto, cada gramo de FAEBo esta principalmente conformado por 15.30 mg de ácido clorogénico, 31.55 mg de rutina, 17.71 mg de ácido cafeico, 5.87 mg de ácido ferúlico y 0.40 mg de Luteolina.

## 8 DISCUSIÓN

En el grupo de investigación, se mostró que *Bidens odorata* tiene propiedades antiinflamatorias al suprimir la inflamación en 3 condiciones diferentes, las cuales son: Estudios *in vivo* en un modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por TPA y estudios *in vitro* de los sinoviocitos activados a manera de artritis reumatoide y de células endoteliales HUMEC activados de manera de disfunción endotelial.<sup>20,21</sup>

Al elucidar y evaluar las 8 reuniones de Bo, se observó que FAEBo logró modular la producción de TNF $\alpha$  en las concentraciones de 0.0016, 0.08, 0.4 y 2  $\mu$ g/mL y todas las mezclas evaluadas regularon la expresión de esta citocina en los macrófagos activados con LPS, aunque, lo hicieron de manera diferente, es decir, mientras que todas las concentraciones evaluadas de las reuniones R2, R4, R6, R7 y R8 mantuvieron la concentración de TNF $\alpha$  igual que el control sin tratamiento o el control con dexametasona, las reuniones R1(0.08 y 0.4 $\mu$ g/mL), R3(0.016 y 0.08 $\mu$ g/mL) y R5 (0.4 $\mu$ g/mL) no lo hicieron.

Para determinar las moléculas responsables de dicho efecto, se generaron las subfracciones de R1 (R1C9F28-31 y R1C9F9-10), R2 (R2C12F19-22), R3 (R3C7F5-8), R4 (R4C5F9 y R4C5F10), R5 (R5C4F5 y R5C4F10-14), R6 (R6C8F23-25 y R6C8F39-43), R7 (R7C11F19 y R7C11F28) y R8 (R8C10F14-15 y R8C10F19).

Las subfracciones R1C9F28-31, R1C9F9-10 y R2C12F19-22 no lograron mantener la concentración de TNF $\alpha$  igual que el grupo control ó la dexametasona, por lo tanto, se determina que los terpenos y poliacetilenos presentes en estas dos fracciones influyen en el efecto antiinflamatorio de *B. odorata* modulado por TNF $\alpha$ . Por otro lado, las subfracciones de la R3, R4, R5, R6, R7 y R8, en todas sus condiciones lograron atenuar la expresión de esta citocina utilizando el mismo modelo biológico. Las moléculas encontradas en las reuniones que controlaron la expresión de TNF $\alpha$  se pueden encontrar compuestos de tipo flavonoide (luteolina, quercetina, myricetina, glucósido de quercetina, 3-glucósido de quercetina, 7-glucósido de quercetina y rutina), cumarinas, fenilpropanoides (ácido cumárico, cafeatos, ésteres de cafeato, ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido ferúlico), y compuestos hidroxibenzoicos (ácido protocatechuico). En la literatura<sup>48,49</sup>, se explica que los fenilpropanoides, flavonoides y los compuestos hidroxibenzoicos tienen actividad

antioxidante, y por lo tanto protegen a las células del cuerpo de los DAMPs y PAMPs, evitando así un proceso inflamatorio. Estos mismos tipos de moléculas también actúan sobre la vía de TLR4, evitando inhibir algún punto de la cascada de señalización logrando evitar o modular la producción de TNF $\alpha$ .

Los compuestos mayoritarios presentes en la fracción acetoétilica (1 g) son: el ácido clorogénico en una concentración 15.30 mg, rutina 31.55 mg, ácido cafeico 17.71 mg, ácido ferúlico 5.87 mg y luteolina en una concentración de 0.40 mg. Estos compuestos actúan como antioxidantes<sup>84,85,88,90,95,97</sup> por lo que evitan la producción de DAMPs que llevan a la inflamación y también son conocidos por su acción sobre los factores de transcripción NF $\kappa$ B<sup>86,87, 89,92,93,94,95,96</sup> o AP-1<sup>94</sup> con lo que evitan la expresión de TNF $\alpha$ . El ácido cafeico, es un inhibidor de la lipooxigenasa<sup>91</sup> y de esta manera disminuye la formación de los metabolitos quimiotácticos del ácido araquidónico y la luteolina suprime la producción de la COX-2<sup>97</sup>.

Estos resultados confirman que esta planta medicinal tiene propiedades antiinflamatorias (Figura 29) por los diferentes compuestos presentes en ella, lo que permitirá evaluar el efecto del HABo estandarizado. En la siguiente tabla 21 se pueden observar cada una de las reuniones elucidadas, además, de los compuestos químicos mayoritarios presentes en cada una.

BIDENS ODO RATA (ENC ONTRADO)

GRUPOS DE COMPUESTOS	GÉNERO BIDENS	BIDENS ODO RATA (REPORTADO)	R1*	R2*	R3*	R4*	R5*	R6*	R7*	R8*	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
			R1C9F9-10 R1C9F28-31	R2C12F19-22	R3C7F5-8	R4C5F9 R4C5F10	R5C4F5 R5C4F10-14	R6C8F23-25 R6C8F39-43	R7C11F19 R7C11F28	R8C10F14-15 R8C10F19	
	ESTEROLES	ESTEROIDES									
TERPENOS	TERPENOS	TERPENOS TRITERPENOS ACEITES ESENCIALES		Terpenos							
FENILPROPANOIDE				Ác. Ferulico	Cafeato Ác. Cumarico*	Ác. Clorogenico* Ác. Cumarico Ác. Cafeico	Ác. Cafeico		Derivado de cafeoilo* Ác. Ferulico	Derivado de cafeoilo* Clorogenicos	Antioxidantes Antiinflamatorio (Inhibe IkB)
GRUPOS AROMATICOS	ACEITES ESENCIALES	DERIVADOS DE ANTRACENO		Ác. Fenolico							
FLAVONOIDE	FLAVONOIDE	FLAVONOIDES		Cumarina Metoxi-Luteolina	Flavonoides	Flavononas* Myricetina* Cumarina Quercetina Luteolina	Quercetina Flavanona Cumarina*	Flavanona* FlavonoI* Cumarina Gluc. de Quercetina Gluc. de Luteolina	Gluc. de Quercetina	Flavanona* 3-Glucósido de Quercetina 7-Glucósido de Quercetina	Antioxidantes Antiinflamatorio(Inhibe vías MAPK y NF-Kb, Suprime expresión de TLR4 y MyD88)
COMPUESTOS HIDROXIBENZOICOS						Ác. Protocatehuico*		Ác. Protocatehuico*			Antioxidante(Inhibe la actividad de NADPH Oxidasa) Suprime MAPK
GRUPOS ALIFÁTICOS			Poliacetilenos*								Inmunomoduladores Inmunosupresores

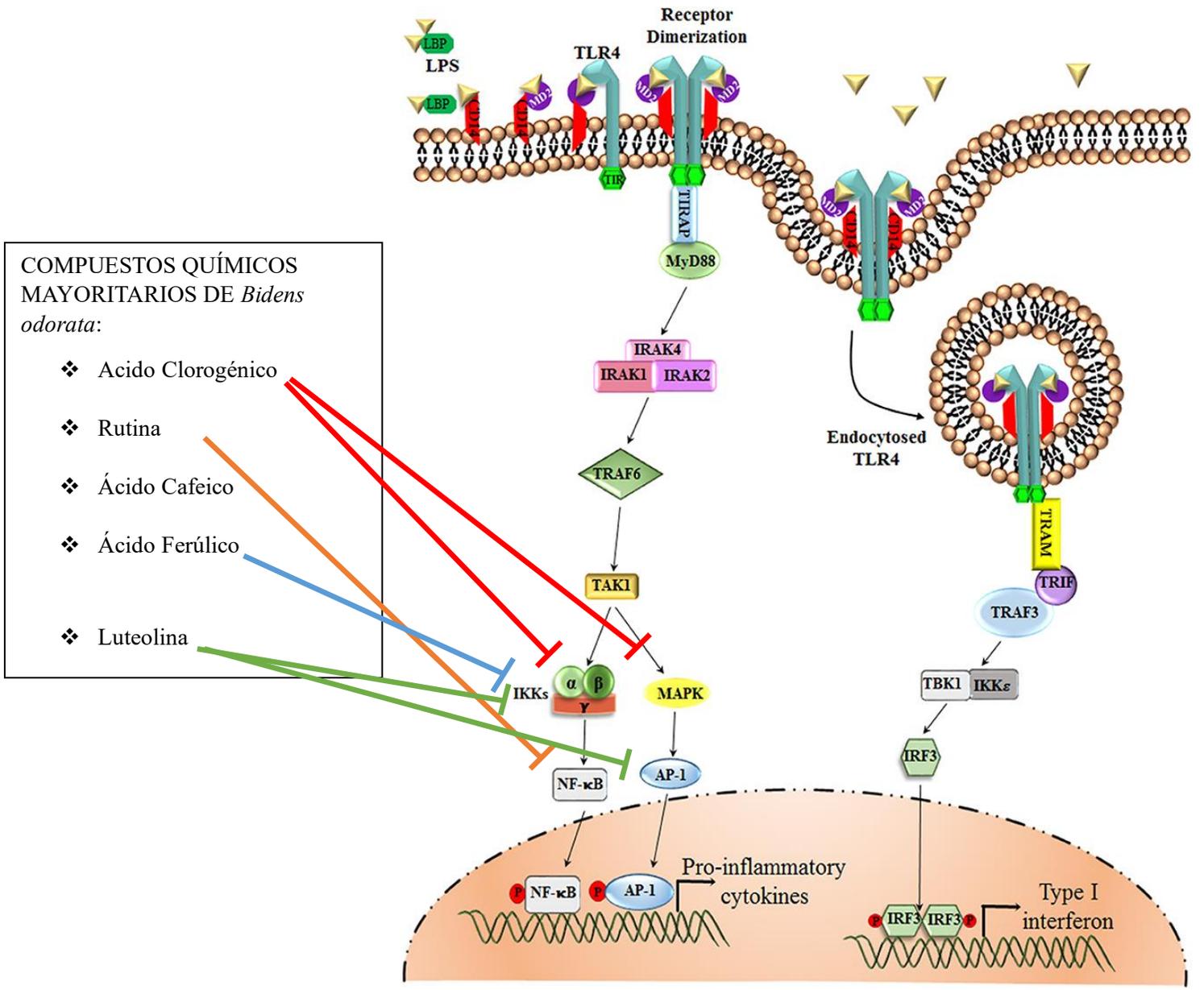


Figura 29. Compuestos químicos mayoritarios de *Bidens odorata* en la Vía de señalización TLR4

## 9 CONCLUSIÓN

Este trabajo de investigación química y farmacológica de *Bidens odorata*, permitió confirmar el efecto antiinflamatorio de la fracción orgánica obtenida de las partes aéreas de esta especie vegetal, así como la determinación de los principales grupos de compuestos químicos que la componen.

La reunión más activa (R4) está constituida principalmente por ácidos orgánicos (ácido protocatechuico, fenilpropanoides (ácido clorogénico) y flavonoides (Flavanonas y myricetina). Es importante destacar que la separación química de R4, produjo una disminución del efecto farmacológico.

Estos resultados nos permitirán proponer la generación de posibles tratamientos clínicos elaborados con extractos estandarizados en el contenido de los principios activos de esta planta medicinal.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mandel, J.R., Dikow, R.B., Siniscalchi, C.M., Thapa, R., Watson, L.E & Funk, V.A (2019) A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*. <https://doi.org/10.1073/pnas.190387111>
2. Tapia, J. (2010) LA FAMILIA ASTERACEAE. Enero 05, 2024 de Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales. Sitio Web: [2010-12-16-Tapia-Asteraceae.pdf](http://2010-12-16-Tapia-Asteraceae.pdf) ([cicy.mx](http://cicy.mx))
3. Leyva-Castañeda, D., Sigala-Rodríguez, J. J., & Ocampo, G. (2020). Species richness estimation of the Asteraceae family in four areas for conservation from central Mexico using non-parametric methods to measure biodiversity. *Botanical Sciences*, 98(2), 317-327. <https://doi.org/10.17129/botsci.2552>
4. Villaseñor, J. L. (2018). Diversity and distribution of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358. <https://doi.org/10.17129/botsci.1872>
5. Redonda, R. (2022) Tribus de Asteraceae en México, morfología y clave de identificación. *Acta botánica mexicana*, (129), e2122. Epub 05 de mayo de 2023. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2122>
6. Cilia-López, V. G., Cariño-Cortés, R., & Zurita-Salinas, L. R. (2021). Ethnopharmacology of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 99(3), 455-486. <https://doi.org/10.17129/botsci.2715>
7. Kostić, A., Janačković P., Kolašinac, S. & Stevanović, Z. (2020) Balkans' Asteraceae Species as a Source of Biologically Active Compounds for the Pharmaceutical and Food Industry. *Chemistry & Biodiversity*, Volume 17, Issue 6 e2000097. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000097>
8. Paray, L. (1957) EL GENERO BIDENS EN EL VALLE DE MEXICO. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 20: 1-12
9. Lima Silva, F.; Fischer, D.C.H.; Fachine Tavares, J.; Sobral Silva, M.; Filgueiras de Athayde-Filho, P.; Barbosa-Filho, J.M. (2011) Compilation of Secondary Metabolites from *Bidens pilosa* L. *Molecules*, 16, 1070-1102. <https://doi.org/10.3390/molecules16021070>
10. Lucchetti, L., Teixeira, D., Barbi, N.S., & Silva, A.M. (2009). *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). *Revista Fitos*.
11. Lima Silva, F.; Fischer, D.C.H.; Fachine Tavares, J.; Sobral Silva, M.; Filgueiras de Athayde-Filho, P.; Barbosa-Filho, J.M. (2011) Compilation of Secondary Metabolites from *Bidens pilosa* L. *Molecules*, 16 (2), 1070-1102. <https://doi.org/10.3390/molecules16021070>
12. Bimenyindavyi, E., Khusnetdinova, L.Z. & Timofeeva, O.A. (2023) Phenolic Compounds of Plants *Bidens tripartita* (L.) and *Bidens pilosa* (L.) from Different Locations. *Russ J Plant Physiol* 70, 160. <https://doi.org/10.1134/S1021443723700243>
13. Heike Vibrans (2009) Malezas de México, México. Recuperado Enero 06, 2024. Sitio web: [Bidens odorata - ficha informativa \(conabio.gob.mx\)](http://Bidens odorata - ficha informativa (conabio.gob.mx))

14. Argueta, A. et al (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana ISBN: 968-29-7323-6. Primera edición. D.R. ©, Instituto Nacional Indigenista. Impreso en México.
15. Vibrans, H., 1995. *Bidens pilosa* L. y *Bidens odorata* Cav. (Asteraceae: Heliantheae) en la vegetación urbana de la Ciudad de México. Acta Botánica Mexicana 31: 85-89.
16. Astudillo, A; Dávalos, H & Patiño, A. (2015) *Alternanthera repens* and *Bidens odorata*, Resilience Medicinal Plants in Mexico City. Revista de Ciencias. Universidad del Valle. pp. 31-41
17. Zapata, J; Alonso, A; Domínguez, F; Carranza, C; Isiordia, M; Hernández, A. & Solorio, C. (2017) The antinociceptive effects of a standardized ethanol extract of the *Bidens odorata* Cav (Asteraceae) leaves are mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, Journal of Ethnopharmacology, Volume 207, Pages 30-33, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.021>.
18. García, G. (2015) Plantas Medicinales de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp: 20-21
19. Fernández, C. (2016) Estudio fitoquímico comparativo de la especie vegetal *Bidens odorata* del estado de Hidalgo y Tlaxcala. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
20. Castro, G. (2008) Identificación de las subfracciones efectivas del extracto acetato de etilo de *Bidens odorata* en células de la articulación sinovial con perfil inflamatorio. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).
21. Hernández, B. (2019) Evaluación de la fracción acetoétilica de *Bidens odorata* y sus reuniones para controlar la producción de IL6, ON y el remodelado vascular asociados a la disfunción endotelial in vitro. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).
22. Hernández, K; Garduño, L; Luna, J; Zepeda, L; Lagunas, S; García, G. & Vargas, M. (2018) Antimycobacterial and hypolipemiant activities of *Bidens odorata* (Cavanilles). J Ethnopharmacol. 10;222:159-164. doi: 10.1016/j.jep.2018.04.028. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29704591.
23. Alonso, A; Zapata, J; Solorio, C. et al. (2020) Central nervous system evaluation of an ethanol extract of *Bidens odorata* Cav (Asteraceae) leaves, and its antinociceptive interaction with paracetamol and naproxen. *Inflammopharmacol* **28**, 749–757. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00664-8>
24. Melendez, E; Reyes, J; & Melendez, M. (1991) Effects of furosemide on the renal functions of the unanesthetized newborn rat. Dev Pharmacol Ther;17(3-4):210-9. doi: 10.1159/000457525. PMID: 1841840.
25. Astudillo, A; Dávalos, H; De Jesús, L; Herrera, G; & Navarrete, A. Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. (2008) Fitoterapia.79(7-8):577-80. doi: 10.1016/j.fitote.2008.07.001. Epub 2008 Jul 10. PMID: 18674603.
26. Zavala, D; Alarcon, F; Pérez, S; Escobar, M; & Zavala, M. Composition and Antidiarrheal Activity of *Bidens odorata* Cav. (2013) Evid Based Complement

- Alternat Med. 2013;2013:170290. doi: 10.1155/2013/170290. Epub 2013 Oct 27. PMID: 24282432; PMCID: PMC3825220.
27. González, M. & González, A. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-44. Recuperado en 11 de abril de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es&tlng=es).
  28. Gross, V; Monet, D; & Álvarez, J. (2023). Regulación de la respuesta inflamatoria dependiente de citocinas. *MEDISAN*, 27(5), e4317. Epub 29 de octubre de 2023. Recuperado en 11 de abril de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192023000500016&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192023000500016&lng=es&tlng=es).
  29. Cristobo, T; Quirós, O. & Rodríguez, D. (2015). Actualización en la detección y manejo de la sepsis en el menor de un año. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 19(5), 512-527. Recuperado en 11 de abril de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552015000500011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552015000500011&lng=es&tlng=es).
  30. Owen J.A., & Punt J, & Stranford S.A., & Jones P.P.(Eds.), (2016). KUBY. Inmunología, 7e. McGraw Hill.
  31. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., ... & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204.
  32. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2020, November 2). Inflammation
  33. Brandan, Nora; Aquino Esperanza, José; Codutti, Alexis; Respuesta Inmunitaria (2007) ; Cátedra de Bioquímica Facultad de Medicina – UNNE
  34. Celada, A.; Inmunología Básica y clínica 2da edición (2011); Elsevier España, S.L.
  35. Kolaparthi, L; Sanivarapu, S; Swarna, C; & Devulapalli, N. (2014) Trampas extracelulares de neutrófilos: Su papel en la enfermedad periodontal. *J Soc indio Periodontol. Noviembre-diciembre de 2014*; 18(6):693-7. doi: 10.4103/0972-124X.147399. Retracción en: *J Indian Soc Periodontol. 2015 marzo-abril*; 19(2):128. PMID: 25624623; PMCID: PMC4296451.
  36. Yang, F; Feng, C; Zhang, X; Lu, J; & Zhao, Y. (2017) Las diversas funciones biológicas de los neutrófilos, más allá de la defensa contra las infecciones. *Inflamación*. febrero de 2017; 40(1):311-323. DOI: 10.1007/s10753-016-0458-4. PMID: 27817110.
  37. Singhal, A; & Kumar, S. (2022) Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation. *Immunology*. 165(1):22-43. doi: 10.1111/imm.13423. Epub 2021 Nov 9. PMID: 34704249.
  38. Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. A., & Cervera, R. (2013). Autoimmunity: from bench to bedside, capítulo 5
  39. Ruiz, B; Cruz, D; Estrada, I; & Wong, I. (2017). Las células linfoides innatas y su papel en la regulación de la respuesta inmune. *Revista alergia México*, 64(3), 347-363. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i3.284>

40. González-Costa, M., & González, A. A. P. (2019). Inflammation from an immunologic perspective: A challenge to medicine in the 21st century. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-44.
41. Leal, M. C. P., Gómez, L. M., & Anaya, J. M. (2006). Implicaciones funcionales de los linfocitos B en el desarrollo de la artritis reumatoide. *MedUNAB*, 9(1), 34-44.
42. Buckland, K. (2023) Eosinófilos. British Society for immunology. Recuperado el 15 Marzo, 2024: <https://www.immunology.org/es/public-information/immunolog%C3%ADa-bitesized/celulas/eosinofilos>
43. Nagata, M., Nakagome, K., & Soma, T. (2020). Mechanisms of eosinophilic inflammation. *Asia Pacific Allergy*, 10(2).
44. Brito, F; Yamazaki, M; Espinosa, S; Vázquez, Ó; Huerta, J; & Berrón, R. (2003) Eosinófilos: Revisión de la literatura. Vol.12, Núm 2. pp 56-62. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*.
45. Kratofil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2017). Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(1), 35-42
46. Bastarrachea, R; López, J; Bolado, V; Téllez, J; Laviada, H; & Comuzzie, A. (2007) Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac Méd Méx* Vol. 143 No. 6, Department of Genetics Southwest Foundation for Biomedical Research
47. Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews immunology*, 11(11), 762-774.
48. García Moreno, H. (2018). Papel de la melatonina en los procesos inflamatorios mediados por mastocitos: Implicaciones clínicas. Universidad de Sevilla.
49. Msallam, R; Balla, J; Rathore, A; Malleret, B; John, A; & Ginhoux, F. (2021) Transferencias de las alergias en el útero...El papel de los mastocitos maternos. Vol.2. Número 1. Los ojos de la ciencia. *Open Journal Systems*
50. Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1801.
51. Di Girolamo, M. T. V., Coronato, S., & Laguens, G. E. (2011). Revisión acerca de la biología y las funciones inmunológicas de los mastocitos. *Salud (i) ciencia (Impresa)*, 326-331.
52. Zamorano, D. (2022) Efecto dosis-respuesta de boldina sobre viabilidad y toxicidad celular en macrófagos humanos. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/188195>
53. Hamidzadeh, K; Christensen, S; Dalby, E; Chandrasekaran, P; & Mosser, D. (2017) Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. *Ann. Rev. Physiol.* 79, 567-592.
54. Lee, C. H., & Choi, E. Y. (2018). Macrophages and inflammation. *Journal of Rheumatic Diseases*, 25(1), 11-18.
55. Cassetta, L., & Pollard, J. W. (2020). Tumor-associated macrophages. *Current Biology*, 30(6), R246-R248.

56. Abbas, A et al. 2014 *Inmunología básica. Funciones y trastornos del sistema inmunitario*. Cuarta edición. p. 24 Elsevier España, S.L. Barcelona, España
57. Teti, G; Biondo, C; & Beninati, C. (2016) El fagocito, Metchnikoff y la Fundación de la Inmunología. *Microbiol Spectr.* 4(2). DOI: 10.1128/microbiolspec. MCHD-0009-2015. PMID: 27227301.
58. Park, M; Silvin, A; Ginhoux, F; & Merad, M. (2022) Macrophages in health and disease. *Cell Press.* VOLUME 185, ISSUE 23, P4259-4279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.007>
59. Wang, Y., Zhao, M., Liu, S., Guo, J., Lu, Y., Cheng, J., & Liu, J. (2020). Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death & Disease*, 11(10), 1-18
60. Lee KY. (2019) M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng.* 2(1):1–5
61. Rashid, Sumaira & Majeed, Lone & Nisar, Bisma & Nisar, Hina & Bhat, Aftab & Ganai, Bashir. (2021). *Phytomedicines: Diversity, extraction, and conservation strategies*.
62. Hortelano, S. (2014) *Inflamación y macrófagos: amigos o enemigos*. Instituto de Investigaciones de Enfermedades Raras (IIER), ISCIII. SEBBM. [Sonsoles Hortelano - Enero 2014: Inflamación y macrófagos \(sebbm.es\)](https://www.sebbm.es/sonsoles-hortelano-enero-2014-inflamacion-y-macrofagos)
63. Demyashkin, G; Shapovalova, E; Malanichev, M; Pogosyan, D; Zorin, I; Shchekin, V; & Zatsepina, M. (2022) Características inmunofenotípicas de los macrófagos dermales en condiciones de sepsis experimental. *Actas Dermosifiliogr.* Vol. 113. Núm. 4. [10.1016/j.ad.2021.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.06.009)
64. Maldonado, M; & Calderón, J. (2022) EL TEJIDO ADIPOSO Y LA RESPUESTA DE MACRÓFAGOS EN EL PROCESO INFLAMATORIO Y RESISTENCIA A INSULINA. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 41(1):3-17. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2022/reb221b.pdf>
65. Ross, E; Devitt, A; & Johnson, J. (2021) Macrófagos: los buenos, los malos y la gula. *Sec. Inmunidad Innata Molecular.* Volumen 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>
66. Mazgaen, L; & Gurung, P. (2020) Avances recientes en sistemas de reconocimiento de lipopolisacáridos. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares.* 21(2):379. <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>
67. Farhana, A. (2021). *Biochemistry, Lipopolysaccharidae. Statpearls content is king.* <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/24323>
68. Liu, F; Aulin, L; Guo, T; Krekels, E; Moerland, M; Van der Graaf, P; & Van Hasselt, J. (2022) Modelización de la dinámica de biomarcadores inflamatorios en un estudio de desafío con lipopolisacáridos humanos (LPS) utilizando ecuaciones diferenciales de retardo. *British Journal of Clinical Pharmacology.* <https://doi.org/10.1111/bcp.15476>
69. Xu, J., Zhao, Y., & Aisa, H. A. (2017). Efecto antiinflamatorio de la flor de granada en macrófagos RAW264.7 estimulados por lipopolisacáridos (LPS). *Biología Farmacéutica*, 55(1), 2095–2101. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1357737>

70. Gihan, A; Tae, K; Dumindu, M; Lee, S; Kang, S; Lee, M; Kang, C; Hyun, Y; & Kim, G. (2022) La pinostrobinina mejora la inflamación y la endotoxemia inducidas por lipopolisacáridos (LPS) al inhibir la unión de LPS al complejo TLR4/MD2. Vol. 156, 113874. *Biomedicina y Farmacoterapia*. ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113874>
71. Braz, J. (2020) Evaluation of cell damage and modulation of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in macrophages exposed to PpIX-mediated photodynamic therapy. *Biol.* 80 (3) <https://doi.org/10.1590/1519-6984.193748>
72. Patsalos, O; Dalton, B; Leppanen, J; Ibrahim, M. & Himmerich, H. (2020) Impacto de los inhibidores del TNF- $\alpha$  en el peso corporal y el IMC: una revisión sistemática y metanálisis. *Frente. Pharmacol. Sec. Farmacología de la inflamación*. Volumen 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00481>
73. Rolski, F.; Błyszczuk, P. (2020) Complejidad de la señalización del TNF- $\alpha$  en la enfermedad cardíaca. *J. Clin. Med.*, 9, 3267. <https://doi.org/10.3390/jcm9103267>
74. Jang, D; Lee, A; Shin, H; Canción, H; Parque, J; Kang, T; Lee, S; Yang, S. (2021) El papel del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes y los inhibidores actuales del TNF- $\alpha$  en la terapéutica. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
75. Forero, M; Roa, A; Ramírez, A; & Valderrama, J. (2018) PRODUCCIÓN DE IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 E IL-12 POR MACRÓFAGOS MURINOS J774A.1 DURANTE SU INTERACCIÓN CON VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMV) DE *Escherichia coli* JC8031. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.31669.32484>
76. Línea celular RAW 264.7 en investigación de macrófagos e inmunología. *Cytion*. [Línea celular RAW 264.7 en investigación de macrófagos e inmunología \(cytion.com\)](http://www.cytion.com)
77. Assed, R. (2007) Hidróxido de cálcio asociado á clorhexidina- Estudio em cultura de células (RAW 264.7 e cultura primaria de células da linhagem osteoblástica) e em tecido subcutâneo de camundongos. *Avaliação da atividade antimicrobiana*. Ribeirão Preto. 92p.: il. [Microsoft Word - A- CAPA.doc \(usp.br\)](http://www.usp.br)
78. Taciak, B; Białasek, M; Braniewska, A; Sas, Z; Sawicka, P; Kiraga, Ł; Rygiel, T; & Król, M. (2018) Evaluación de la estabilidad fenotípica y funcional de la línea celular RAW 264.7 a través de pasajes seriados. *PLoS Uno*. 13(6):e0198943. doi: 10.1371/journal.pone.0198943. PMID: 29889899; PMCID: PMC5995401.
79. Abbasi, M; Javad, M; Jamalzehi, S; Alimohammadi, R; Hasanzadeh, M; Mohammadi, H; & Aslani, S. (2018) Estrategias para el tratamiento de la artritis reumatoide; Lo viejo y lo nuevo. *Volumen234, Número7*. Páginas 10018-10031. <https://doi.org/10.1002/jcp.27860>
80. Domínguez, L; Hohlatheff, A; & Montiel, J. (2012). Tratamientos farmacológicos contra alternativos en el manejo de pacientes con artritis reumatoide. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(2), 23-30. Recuperado en 15 de abril de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952012000200003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000200003&lng=es&tlng=es).

81. García, I; Díaz, S; Zorrilla, J; & Cortés, R. (2018). Aspectos de seguridad en el tratamiento del dolor con analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. *Revista de sanidad militar*, 72(5-6), 324-331. Epub 23 de agosto de 2019. Recuperado en 15 de abril de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-696X2018000400324&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-696X2018000400324&lng=es&tlng=es).
82. Regalado, A; & Sánchez, L. (2015). Cuban plants with anti-inflammatory effects. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 156-164. Recuperado en 14 de abril de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152015000100015&lng=es&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000100015&lng=es&tlng=en).
83. Shiraishi-Zapata, C. (2014). Dexametasona versus dimenhidrinato en la profilaxis de las náuseas y vómitos postoperatorios en pacientes adultos sometidos a cirugía general y digestiva. *Acta Médica Peruana*, 31(4), 220-227.
84. Ballesteros, F.; Ramirez, J.; Orrego, E.; Teixeira, A.; Mussatto, I. (2016). *Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. Journal of Food Engineering*, (), S0260877416304216-. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.11.014
85. Félix, M. (2009) Determinación de ácido clorogénico y cafeico, cafeína, polifenoles totales y actividad antioxidante de tres variedades de café (*Coffea arabice L.*) Universidad Nacional Agraria de la Selva
86. Artusa, V. (2022). Modulation of the Innate Immune Response by Targeting Toll-like Receptor 4 Signalling: Exploring the Role of Natural Products. (Tesi di dottorato, Università degli Studi di Milano-Bicocca, 2022).
87. Carmona, F.; Millalonco, F.; Marín, M.; & Álvarez, C. (2022). Major Phytochemicals with Therapeutic Potential in the Treatment of Diabetic Retinopathy. *Revista Cubana de Oftalmología*, 35(4), Epub 01 de diciembre de 2022. Recuperado en 30 de mayo de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21762022000400007&lng=es&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762022000400007&lng=es&tlng=en).
88. Katarzyna K.; Todd H.; Chia-Chung H.; Wen-Chin Y.; Guo-Jane T. (2010). Propiedades antiinflamatorias de compuestos fenólicos y extracto crudo de *Porphyra dentata*., 128(1), 0–130. doi:10.1016/j.jep.2009.12.037
89. Maghfiroh, K.; Widyarti, S.; Batoro, J.; & Sumitro, S. (2021) Ethnopharmacological study of flavonoid compounds in *Magnolia champaca (L.)* Baill.ex Pierre as anti-inflammatory agents by molecular docking. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 9 (5).
90. Kroon, P. A.; Williamson, G. J. *Sci. Food Agric.* 1999, 79, 355–361
91. dos Santos, Jeanine Salles; Monte-Alto-Costa, Andréa (2013). *Caffeic Acid Phenethyl Ester Improves Burn Healing in Rats Through Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects. Journal of Burn Care & Research*, 34(6), 682–688. doi:10.1097/bcr.0b013e3182839b1c
92. Beltrán, Y.; Rojas, J.; Morales, I.; & Morris, H. (2019). Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* con proteínas del balance redox. *Revista Cubana de Química*, 31(3), 336-353. Recuperado en 30 de mayo de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-542120190003003336&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-542120190003003336&lng=es&tlng=es).

93. Jin, L.; Lei, B.; Haiping, M.; & Hai, G. (2021) Ferulic Acid Alleviates Diabetic Cardiomyopathy in Mice via Decreasing Blood Glucose, Reducing Inflammation and Down-regulating TLR-4/NF- $\kappa$ B Pathway. *Latin American Journal of Pharmacy. Lat. Am. J. Pharm.* 40 (7): 1445-50
94. Chen, C.; Peng, W.; Tsai, K.; & Hsu, S. La luteolina suprime la expresión génica asociada a la inflamación mediante el bloqueo de la vía de activación NF-kappaB y AP-1 en macrófagos alveolares de ratón. *Life Sci.* 30 de noviembre de 2007; 81(23-24):1602-14. doi: 10.1016/j.lfs.2007.09.028. Epub 5 de octubre de 2007. PMID: 17977562; PMCID: PMC7094354.
95. Remolino, A.; Rajakumar, A.; Spradley, F.; Labriego, J.; & Rana, S. (2024) Luteolin prevents TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and ROS production in cultured human placental explants and endothelial cells. *Placenta*, Volume 145, Pages 65-71, ISSN 0143-4004, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2023.12.004>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400423006288>)
96. Kim, J.; & Jobin, C. El flavonoide luteolina previene la señalización y la expresión génica de NF-kappaB inducida por lipopolisacáridos al bloquear la actividad de la quinasa IkappaB en las células epiteliales intestinales y las células dendríticas derivadas de la médula ósea. *Inmunología.* julio de 2005; 115(3):375-87. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02156.x. PMID: 15946255; PMCID: PMC1782165.
97. Dominguez, M.; Keck, A.; Jeffery, E.; & Cespedes, C. Effects of extracts, flavonoids and iridoids from *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae) on inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-Activated RAW 264.7 macrophage cells and their antioxidant activity *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 9, núm. 5, 2010, pp. 397-413 Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile

## 11. ANEXOS

## 12. GLOSARIOS



Cuernavaca, Morelos, 19 de junio de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"ESTUDIO BIODIRIGIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS FRACCIONES CON MAYOR EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Bidens odorata*"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Cinthia Jaquelinee Mañon Blanco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2024-06-20 10:46:52 | FIRMANTE**

A/uZLrB1aS/YD5XafucpSC0SEuF9iaCAX84BYgbSyRF0yvulBudVy1WUiaKTiv6IYmcRN6V9B4piCyrNJTdcbJRRz6paFetEs9XhWKZD8SxxV9U8RADPUsCXSe0gfHSaokF8mme35OrMKUZwuhEjoi4YGrxktBXRMeuD3PzCzjfrbgK/jNhChQtgDBWgQo1ssZduJks4jPMdnHzLpdMUvg2tt7yZ0S53J+slHqoJDyseEU4tmJs1XHIS6fvr6Ho4exhD/Oh5rc3hEBGDQ+JWFscs0u2BQVTNtDmYt0reKfz1x9BVLAL0tFVsDEmibdSgXfSEhkej7Ji0Klvo1wg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ZbtPjwJ8f](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ih5z17J6XIfYgOuddM4niiRFY6zDvmTq>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 19 de junio de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"ESTUDIO BIODIRIGIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS FRACCIONES CON MAYOR EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Bidens odorata*"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Cinthia Jaquelinee Mañon Blanco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GERARDO JOEL BARRITA CRUZ | Fecha:2024-06-20 14:11:38 | FIRMANTE**

1xNFQG1MZ5GKKTFsdnb1OxOTVTzD77Zsu5cDCKAyqqY1GNI19E51vLeb6nWtF7ivKdRmnE0AWD1HEJgeSD9pmQvtsqitY/HFunnizC9vDg2tQOQETdQkIMD1RCth+n4o/cMK2X52d5QtHWhbaQuowxgsLRXdZNUVpIY70T8rwzYOyao3vh/sL8oP5LgA5pbqeB3MRozkrfbyXaZE1j1hh860uXKDGHNao60L3RNV73DlaTZrCAIMEz/Gnp7mmh9e2BDq53IASxnpGJDFVglimXQHpztlM7y/1GRcC+EzrDdmuOKMpPdmMGJa0rY0B9Ows617JHKtqH3KmxzLKA7/xw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[C3b2TaMBr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ixk7mwvrhUgyIWkfeRoC4QwMfl5pjnP8>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 19 de junio de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"ESTUDIO BIODIRIGIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS FRACCIONES CON MAYOR EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Bidens odorata*"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Cinthia Jaquelinee Mañon Blanco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2024-06-19 19:08:52 | FIRMANTE**

SucFc0atAc3s47hkiRubmijk7xlMRtuz09rhkby23jdL9V4HwpAAunNzM9iZZ993DRYJV+ldhB1uDokI+0M/3fDxJhGiCYID9swyPRj8ENGN78SZVHrjQ68ZO9+3yvYfov/BUeEzHB2nlCb8dY6qe+kVsNg1qf031Pn3dSjvWmUI9SpE4mWAipf+27E+gcoOHmcq+12BNt6YbPigDwkOhcFBmRmLeeFRuX8WN+Q7cLy7NwGqOJAU5aOv1PR3x5dWle6jMcVpjCR1G6Pt1iOULdFD0TNwIS96jgljYVji4BCb7IAjt3i70HuC1Eaeck5htnfKgLyBCnWkK68HnyMQxnA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[027ThiplP](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0IKUARZeV7BpP5vIKyYUvkAQSWG8Vky>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 19 de junio de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"ESTUDIO BIODIRIGIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS FRACCIONES CON MAYOR EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Bidens odorata*"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Cinthia Jaquelinee Mañon Blanco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dra. Gabriela Rosas Salgado**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2024-06-21 13:45:18 | FIRMANTE**

Z0SuyqtVbgG9SkOFOYeDtUtLi3Si8HUPasdmGlrC0rYE+EigInmF1kd/ntnSXd7wXgO5Kgo/5nUbsiSSJY4uoRKK8rlJFnURPrIqc2V1Zjl/27HooXgbcokozMlr0EwCVjubwKqGPd92zmEFL0FLgY9j8YK9JAaE88S5embsYIVi92yX86MwaC6OJAaktMYBQXSRtHjTlvVm9Q97w79xVFrF9wuCOpVWwr2+NykGHRkjw5D38DwjNBfYTFYB/qXpMC/2pd0MalGkK8a/C5GCyqKhHM80wZSdfj7Hj8Vq2Lm534GJCgfnrshXbQsIBBuyH7Y26ugFI5JlqWrf/e3NA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[r7e1Hq5s9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Gw31p3f4wbbxa4TW3ix5eUlXr2yvk1Hr>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029