



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Caracterización de extractos de hoja de chipilín  
(*Crotalaria longirostrata*) y su evaluación biológica  
en el modelo de fibroblastos de ratón 3T3-L1 y pez  
cebra (*Danio rerio*)**

Tesis que presenta  
**Adaía Hernández Reyes**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Codirectores de la tesis:  
**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
**Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz**

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2023



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Caracterización de extractos de hoja de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) y su evaluación biológica en el modelo de fibroblastos de ratón 3T3-L1 y pez cebra (*Danio rerio*)” presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Adaía Hernández Reyes y aprobada el 02 de febrero de 2023 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa  
Codirectora de la tesis

Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz  
Codirector de la tesis

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava  
Asesor interno



## **Créditos institucionales**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y el Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 1080081) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

# Acta del examen

# Dedicatorias

A Eva Arancivia Cruz †  
*Por mil generaciones...*

# Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la contribución económica otorgada.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por abrirme sus puertas.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por su dedicación y paciencia en la dirección de este trabajo.

Al Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz por su asesoría y por todo el apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava por su valiosa asesoría y comentarios en este trabajo.

Al Dr. Antonio De León Rodríguez por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al M.C. Alberto Barrera Pacheco y al Dr. Víctor Balderas Hernández por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Aída Jimena Velarde Salcedo, al M.C. Óscar de Jesús Calva Cruz y la M.C. Selma Sofía Torres Valles por su orientación en el trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio.

A cada una de las personas que son parte fundamental de mi vida. Esto no sería posible sin ustedes. Gracias por permitirme ser parte de su orgullo: *Sola Gratia*.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Acta del examen</b>	iv
<b>Dedicatorias</b>	v
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Lista de Tablas</b>	ix
<b>Lista de Figuras</b>	x
<b>Resumen</b>	xii
<b>Abstract</b>	xiii
<b>Introducción</b>	1
Plantas comestibles en México	1
Chipilín ( <i>Crotalaria longirostrata</i> )	2
Extracción de metabolitos secundarios	5
Efecto antiobesidad de fitoquímicos de plantas	9
Métodos de evaluación de toxicidad	10
El pez cebra como modelo de estudio	10
<b>Justificación</b>	13
<b>Hipótesis</b>	14
<b>Objetivos</b>	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
<b>Materiales y métodos</b>	16
Material vegetal	16
Obtención de aceites esenciales con por maceración	16
Obtención de olerresinas por fluidos supercríticos (FSC)	16
Cuantificación de fenoles totales	17
Cuantificación de flavonoides	17
Determinación de la capacidad antioxidante	17
Perfil de metabolitos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	18
Evaluación del potencial antiadipogénico en células 3T3-L1	18
Ensayo de viabilidad celular	18

Diferenciación adiposa	19
Evaluaciones biológicas en el pez cebra ( <i>Danio rerio</i> )	19
Mantenimiento y reproducción de animales	19
Mantenimiento y reproducción de animales	20
Prueba de toxicidad crónica en embriones de pez cebra (FET)	20
Prueba de toxicidad aguda en larvas de pez cebra	21
Evaluación de la actividad motora en larvas de pez cebra	21
Análisis estadístico	22
<b>Resultados</b>	23
Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante	23
Perfil de metabolitos	24
Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antiadipogénica en células 3T3-L1	29
Ensayo de viabilidad celular	29
Ensayo antiadipogénico	31
Ensayos en el modelo del pez cebra	34
Prueba de toxicidad crónica en embriones de pez cebra	34
Prueba de toxicidad aguda en larvas de pez cebra	37
Evaluación de la actividad motora en larvas de pez cebra	39
<b>Discusión</b>	42
<b>Conclusiones</b>	50
<b>Prospectivas</b>	51
<b>Referencias</b>	52
<b>Anexo 1</b>	65
<b>Anexo 2</b>	66



# Lista de Tablas

Tabla 1. Propiedades críticas de solventes utilizados en fluidos supercríticos.	7
Tabla 2. Condiciones de extracción dinámica por fluidos supercríticos	16
Tabla 3. Identificación por GC-MS de los metabolitos en los extractos de chipilín.	26
Tabla 4. Parámetros de toxicidad crónica con criterios de valoración letales y subletales en embriones de pez cebra	34
Tabla 5. Embriotoxicidad acumulada hasta las 120 hpf de extractos de hoja de chipilín en embriones de pez cebra.	37

# Lista de Figuras

Figura 1. <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn.	2
Figura 2. Diagrama de fases del dióxido de carbono.	7
Figura 3. Diagrama de flujo del sistema de fluidos supercríticos.	8
Figura 4. Protocolo de grabación de la motilidad de larvas de pez cebra durante transiciones luz-oscuridad.	22
Figura 5. Cuantificación de fitoquímicos en hojas de chipilín.	23
Figura 6. Cromatograma GC-MS de los extractos de hoja de chipilín.	25
Figura 7. Ensayo de viabilidad celular de preadipocitos 3T3-L1 en presencia de los extractos de hoja de chipilín a las 24 (a) y 48 h (b).	30
Figura 8. Fotografías al microscopio de células 3T3-L1 en presencia y ausencia de fitoquímicos de hoja de chipilín. A) interacción durante la diferenciación adiposa. B) interacción después de la diferenciación.	32
Figura 9. Diferenciación de células 3T3-L1 en presencia de extractos de hoja de chipilín.	33
Figura 10. Mortalidad de embriones de pez cebra acumulada a las 120 hpf en presencia de extracto de chipilín.	36
Figura 11. Embriotoxicidad acumulada hasta las 120 hpf de extractos de hoja de chipilín en embriones de pez cebra.	37
Figura 12. Supervivencia de larvas 72 hpf de pez cebra a los extractos de hoja de chipilín (n=10).	38
Figura 13. Afectaciones morfológicas a las 12 h de exposición de las larvas de pez cebra a los extractos de hoja de chipilín.	39

Figura 14. Distancia recorrida (media $\pm$ SD) a lo largo del tiempo de embriones de pez cebra expuestos a los extractos de chipilín desde las 2hpf hasta los 7dpf.	40
Figura 15. Velocidad del nado durante la evaluación de la actividad motora de larvas expuestas a extractos de hoja de chipilín desde las 2hpf hasta los 7dpf.	41
Figura 16. Comparación de trayectorias de nado de larvas de pez cebra expuestas a extractos de hoja de chipilín en la prueba de locomoción.	41

# Resumen

## **Caracterización de extractos de hoja de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) y su evaluación biológica en el modelo de fibroblastos de ratón 3T3-L1 y pez cebra (*Danio rerio*).**

Las hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) tienen una larga tradición en la cultura maya. El chipilín se usa con fines alimenticios en la preparación de diversos platillos típicos y en la medicina tradicional se emplea como un agente hipnótico; sin embargo, es escasa la información que sustente esta propiedad. En este trabajo analizamos la composición fitoquímica de extractos de hoja de chipilín obtenidos por maceración acuosa y etanólica, así como las oleorresinas obtenidas con fluidos supercríticos. Se determinó el contenido de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos y el extracto acuoso tuvo la mayor cantidad de fenoles (5400 µg AGE/g en peso fresco (PF)). En cambio, los extractos etanólicos presentaron mayor contenido de flavonoides (4800 µg QE/g PF) y de potencial antioxidante (60%). Se identificaron 20 compuestos en el análisis por GC-MS. El fitol es el componente principal de los extractos etanólicos al cual se le atribuye propiedades antidiabéticas, anticonvulsivante, antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. El ácido 2,5- difluorobenzoico y un benzofurano solo se encontraron por extracción por fluidos supercríticos (FSC). La viabilidad celular de los extractos en la línea celular 3T3-L1 estuvo dentro de los límites permisibles ( $\geq 80\%$ ) y el ensayo de diferenciación celular mostró una disminución en la acumulación de lípidos de hasta el 35% durante y del 20% al finalizar la diferenciación con los extractos etanólicos y FSC. El ensayo de embriotoxicidad del pez cebra mostró que el extracto de FSC tiene el menor grado de toxicidad ( $LC_{50} = 4.99 \mu\text{g/mL}$ ) y en el ensayo de locomoción se observaron efectos sedantes con los extractos de FSC y con extractos acuosos, con una recuperación parcial y total del efecto, respectivamente.

**Palabras clave:** embriotoxicidad, fitoquímicos, fluidos supercríticos, locomoción, maceración.

# Abstract

## Characterization of chipilin (*Crotalaria longirostrata*) leaf extracts and their biological activity in the 3T3-L1 mouse fibroblast model and zebrafish (*Danio rerio*).

Chipilin (*Crotalaria longirostrata*) leaves have a long tradition in Mayan culture. Chipilin is used in various typical dishes. In traditional medicine, it is used as a hypnotic agent; however, information supporting this medicinal property is limited. In this work, we analyzed the phytochemical composition of chipilin leaf extracts obtained by aqueous, ethanolic maceration, and oleoresins obtained with supercritical fluids. The content of phenolic compounds was determined by spectrophotometric methods and the aqueous extract had a high concentration of phenols (5400  $\mu\text{g AGE/g}$  in fresh weight (FW)). In contrast, the ethanolic extracts presented the highest content of flavonoids (4800  $\mu\text{g QE/g FW}$ ) and antioxidant potential (60%). Twenty compounds were identified by GC-MS analysis. The main compound present in the ethanolic extracts was phytol which has been shown to have antidiabetic, anticonvulsant, antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. All extracts were tested for biological activity in 3T3-L1 cell line. The aqueous extracts did not affect viability within the defined limits ( $\geq 80\%$ ), but ethanolic extracts showed a decrease in cell differentiation of up to 35% and a reduction in lipid accumulation of 20%. The embryotoxicity in zebrafish assay showed that FSC oleoresins had the lowest degree of toxicity ( $LC_{50} = 4.99 \mu\text{g/mL}$ ). The locomotion assay showed that FSC oleoresins and aqueous extracts showed the highest sedative effects with a partial and full recovery of the effect, respectively.

**Keywords:** embryotoxicity, locomotion, maceration, phytochemicals, supercritical fluid.

# Introducción

## **Plantas comestibles en México**

Las plantas comestibles son una parte importante en la dieta de los humanos (Iqbal *et al.*, 2022). En México, desde tiempos prehispánicos el consumo de plantas nativas se ha mantenido en la preparación de alimentos tradicionales y también como parte de la medicina tradicional. La diversidad de plantas de México con potencial de uso alimenticio y medicinal incluye alrededor de 5000 especies de diferentes familias taxonómicas. La mayoría de estas plantas son herbáceas, silvestres o malezas (Manzanero-Medina *et al.*, 2020).

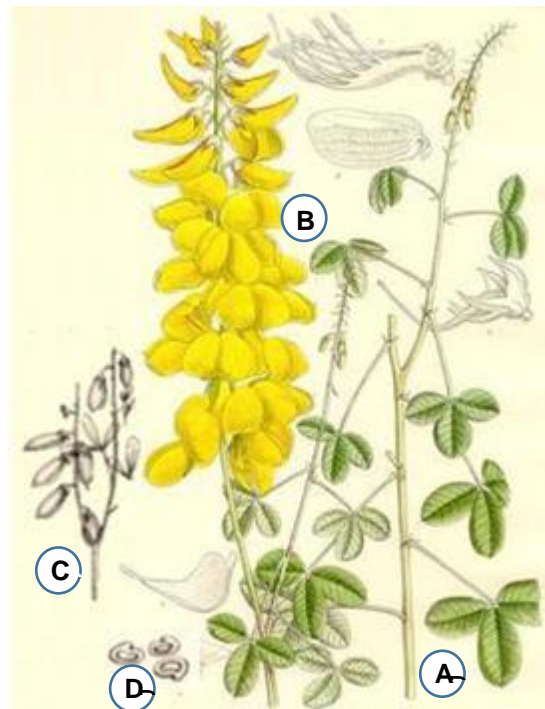
Un número importante de las plantas tradicionales comestibles tienen una composición química y actividades biológicas interesantes, por ejemplo, las hortalizas son fuentes de macro y micronutrientes como vitaminas, minerales, fibra, aminoácidos, proteínas, carbohidratos y compuestos funcionales en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades diarias de un individuo (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015). Esto sugiere que su uso permanente en la dieta puede ayudar en la soberanía alimentaria. Además, algunas de estas plantas se consideran como un alimento funcional, es decir, que poseen compuestos bioactivos que ayudan a prevenir y/o disminuir el riesgo de contraer enfermedades (Cáceres y Cruz, 2019; Friday *et al.* 2022). Sin embargo, a pesar de la importancia de las plantas tradicionales, existen pocos estudios sobre la composición nutricional y nutracéutica de hojas, tallos, flores, raíces y tubérculos (Mateos-Maces *et al.*, 2020). Por lo tanto, resulta de gran interés llevar a cabo estudios de caracterización y evaluación de estos recursos naturales, cuyos compuestos bioactivos son parte esencial de la medicina tradicional y que de acuerdo a su efectividad, presentan relativamente menos efectos secundarios que los fármacos sintéticos (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2022).

Una de las plantas tradicionales que se consume desde la época de los mayas es el chipilín (*Crotalaria longirostrata*); sin embargo, existen pocos estudios

en relación a su composición química e identificación de compuestos bioactivos. Es por esto que el chipilín es objeto del presente estudio.

### **Chipilín (*Crotalaria longirostrata*)**

*Crotalaria longirostrata*, conocido en la cultura mexicana como chipilín, pertenece a la familia de las leguminosas (*Fabaceae*) y es originaria del Sur de México y Centroamérica. De las 600 especies que conforman el género *Crotalaria*, el chipilín es la especie más utilizada como alimento. Las hojas y brotes tiernos del chipilín se consumen de diversas formas, mezclados con harina de maíz o añadidos a diferentes platillos según la región (Figura 1) (Rivas Larios, 2014).



**Figura 1. *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn**

(A) Ramas con hoja e inflorescencia, (B) flor, (C) frutos y (D) Semillas.

Un análisis nutricional de las hojas del chipilín indica que tiene una baja contribución energética (71.6 Kcal), un alto contenido proteínico (7 g) y un bajo contenido en grasas (0.8 g) y carbohidratos (9.1 g). En cambio, si se compara con el contenido nutricional del maíz que es el cultivo que representa mayor gasto para las familias mexicanas con un consumo de 196.4 Kg per cápita al año (SAGARPA,

2017), se evidencia las diferencias, ya que el maíz tiene una alta contribución energética (1277 Kcal) con contenido de proteína (33 g), grasas (16.6 g) y carbohidratos (260 g). Esto hace al chipilín un alimento ideal para dietas con bajo aporte calórico y de grasa, así como un alimento nutritivo (Gyori,2017).

De acuerdo con un estudio del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)/Organización Panamericana de la Salud (OPS), la hoja del chipilín (100 g de porción comestible) tiene un alto contenido de vitamina A (667 µg) y vitamina C (667 µg) (Martínez Muñoz, 2012). La vitamina A previene la ceguera nocturna, fatiga crónica, psoriasis, enfermedades cardíacas, derrames cerebrales, cataratas y la vitamina C (ácido L-ascórbico más ácido L-deshidroascórbico) previene el escorbuto, mantiene un sistema inmunológico sano y es un antioxidante (Randhawa *et al.*, 2015). El chipilín también es rico en minerales como calcio (287 mg), fósforo (72 mg) y hierro (4.7mg) los cuales tienen un papel clave en la fisiología y metabolismo de la célula para mantener la homeostasis y la protección celular (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015).

Existen pocos reportes sobre el chipilín en los que se ha explorado sus propiedades benéficas, las cuales se describen a continuación:

**a) Actividad antiproliferativa:** El extracto acetónico de hoja de chipilín, a una concentración de 200 µg/mL, inhibió un 61% la proliferación de la línea celular de cáncer de lengua (Rex *et al.*, 2014).

**b) Actividad antimicrobiana:** El extracto acetónico de chipilín a una concentración de 1 mg/mL inhibió un 65% el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*. Estos datos sugieren que podría contener moléculas bioactivas antimicrobianas para tratamientos de la cavidad oral ( Rex *et al.*, 2014)

Extractos metanólicos de hoja y rama de chipilín tienen actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos del maíz. El crecimiento micelial y la esporulación de *Aspergillus flavus* se redujo en 90% con extracto metanólico de hoja de chipilín (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017) y el crecimiento de *Fusarium verticillioides* se redujo del 70.4% al 40.12% (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020). Esto sugiere que la aplicación de extracto tanto de hoja y rama de chipilín podría aplicarse al suelo como tratamiento preventivo y evitar infecciones radiculares.



**c) Actividad insecticida:** Los extractos metanólicos de hojas de chipilín a una concentración de 30 mg/mL tienen actividad insecticida en ninfas de *Bactericera cockerelli* (López *et al.*, 2022). Nanopartículas bimetálicas verdes de un extracto acuoso de hoja de chipilín también tiene actividad insecticida ya que causó 63% de mortalidad contra *Phenacoccus solenopsis* después de 96 h de tratamiento (Mendez-Trujillo *et al.*, 2022). Estos resultados sugieren que compuestos bioactivos del chipilín podrían ser una alternativa natural para el control de ciertos patógenos de importancia agrícola.

**d) Efecto sedante e hipnótico:** Los extractos acuosos del chipilín se evaluaron en el ciclo vigilia-sueño en un modelo de rata macho Wistar a una dosis de 2.78 g/Kg vía nasogástrica. Se reportó un incremento tanto en el tiempo de la fase lenta del sueño como la fase de movimientos oculares rápidos (MOR) y una reducción del tiempo de vigilia, sin toxicidad aguda (Rodríguez-Campos *et al.* 1998). Estos resultados indicaron que las hojas de chipilín pueden ser estabilizadoras e inductoras de sueño, lo cual genera un particular interés ya que hasta el momento no se ha encontrado estos efectos en ninguna de las plantas utilizadas como fuentes de hipnóticos.

Sin embargo, existen muy pocos estudios relacionados a la caracterización de las moléculas bioactivas reportadas del chipilín. Se requiere la identificación y caracterización de estos compuestos, así como ensayos en modelos animales para determinar la ausencia toxicidad (Martínez Muñoz, 2012).

Los usos tradicionales de chipilín y los descritos en la literatura, muestran el interés en su demanda y cultivo comercial (Camarillo-Castillo y Mangan, 2020). El chipilín puede representar una alternativa para diversificar la producción de hortalizas y eventualmente incursionar en nuevos mercados. En EEUU su demanda ha aumentado por los inmigrantes centroamericanos en ese país. La rentabilidad comercial del cultivo del chipilín es de 1049.52 % en cultivos en suelo franco-arcilloso, a una altitud de 1420 msnm con dos cortes cada 60 días, con un rendimiento de 32638.20 Kg/ha lo que genera un ingreso de \$26787.56 USD

(Martínez Muñoz, 2012). Es evidente la importancia de su estudio y explotación (Córdova-Ballona *et al.*, 2022; Peña-Valdivia *et al.*, 2022).

### **Extracción de metabolitos secundarios**

Las plantas generan dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos) están involucrados principalmente en el crecimiento y la reproducción de las plantas (Moreno-Valdespino *et al.*, 2020). En cambio, los metabolitos secundarios o fitoquímicos, tales como pigmentos, fenoles, flavonoides, alcaloides, glicósidos, esteroides, saponinas y terpenoides, contribuyen principalmente a la protección de las plantas frente a enfermedades y a los cambios del medio ambiental (Sharma y Kaushik, 2021) y representan una amplia variedad de compuestos bioactivos con alto potencial para promover la seguridad alimentaria y la salud humana (Lee *et al.*, 2022).

La selección de un método de extracción es determinante para la identificación de los fitoquímicos de interés. Estos métodos tienen variaciones en los rendimientos de extracción, calidad y contenido (Hamuel, 2012). Existen algunos métodos de extracción tradicionales y novedosos:

#### a) Métodos tradicionales de extracción.

Los métodos de extracción como la maceración, digestión, percolación, decocción, infusión, extracción a contracorriente o la extracción continua en caliente, se han utilizado comúnmente para la extracción de compuestos bioactivos (Yaqoob *et al.*, 2022). Sin embargo, estos procedimientos presentan algunas desventajas como el uso de una gran cantidad de solventes, rendimientos de extracción bajos y alta temperatura de extracción. Además los solventes comunes de extracción como el metanol, el hexano y la acetona, pueden representar un riesgo ambiental y para la salud. Es por esto que se han desarrollado nuevos métodos para la extracción de biomoléculas que acorten el tiempo de extracción e incrementen el rendimiento con una degradación mínima y disminuyan el impacto ambiental (Oshadie *et al.*, 2017).

b) Métodos novedosos de extracción.

La extracción por fluidos supercríticos (FSC) es una alternativa a los métodos tradicionales la cual ofrece beneficios respecto al consumo de solventes, el tiempo de extracción, mayor selectividad, eficiencia, estabilidad, reproducibilidad e idoneidad debido al poder de solvatación ajustable del fluido supercrítico (temperatura, presión) (Vasquez *et al.*, 2021). Las ventajas de usar FSC son el uso de un fluido con alta densidad, alta difusividad, baja viscosidad, tensión superficial y condiciones de bajas de temperatura y presión, lo que evita la degradación de los compuestos (Hrnčič *et al.*, 2020).

Un fluido supercrítico excede la temperatura crítica ( $T_c$ ) y la presión crítica ( $P_c$ ) por lo que muestra las características tanto de un líquido como de un gas (Li *et al.*, 2021). La región crítica del  $\text{CO}_2$  se origina a  $31.1^\circ\text{C}$  y 73 atm y posee alta densidad como líquido, difusividad como gas y viscosidad como gas-líquido (Arumugham *et al.*, 2021) (Figura 2).

En la Tabla 1 se presentan algunas sustancias usadas en la extracción de fluidos supercríticos y sus condiciones críticas de  $T_c$  y  $P_c$  (García-Campoy y Barba de la Rosa, 2022). De estos compuestos, el más empleado para la extracción de productos naturales es el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), ya que es inerte, inodoro, incoloro, no inflamable, no tóxico, seguro, económico y reciclable.

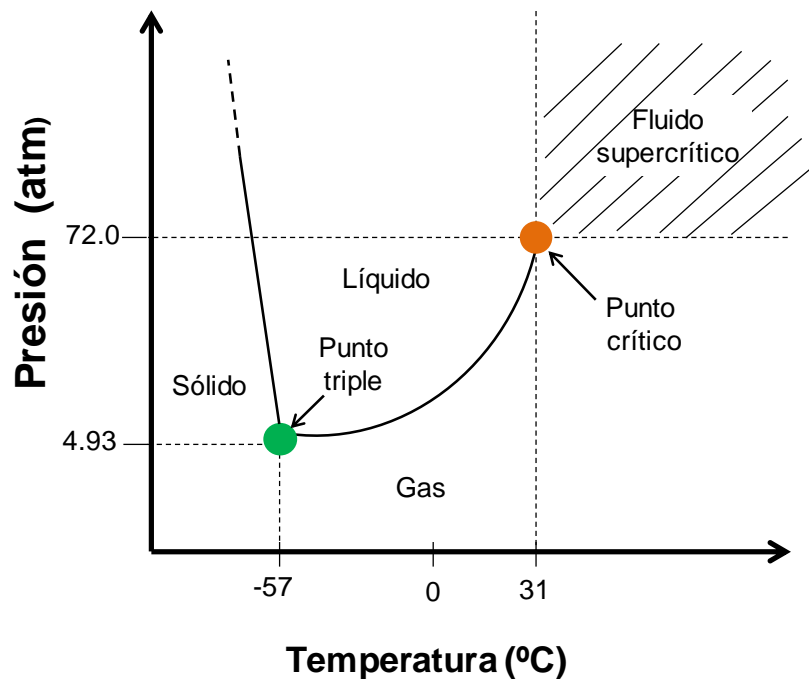


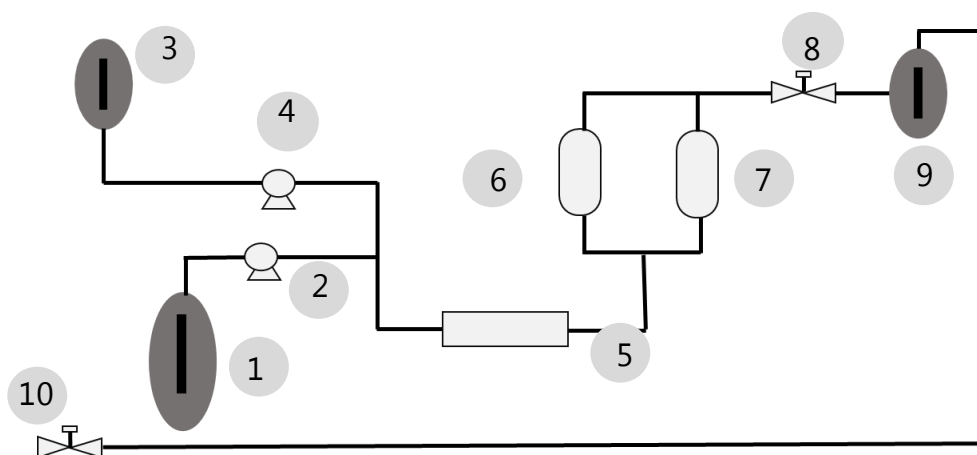
Figura 2. Diagrama de fases del dióxido de carbono.

Tabla 1. Propiedades críticas de solventes utilizados en fluidos supercríticos.

Solvente	$T_c$ (°C)	$P_c$ (atm)	$\rho_c$ (g/mL)
Agua	374.4	217.7	0.32
Acetona	235.1	46.40	0.27
Dióxido de carbono	31.30	72.04	0.46
Etano	32.30	48.10	0.20
Etanol	243.4	60.60	0.27
Etileno	9.400	49.70	0.21
Metano	-82.60	45.40	0.16
Metanol	240.5	79.80	0.27
Óxido nitroso	36.50	72.50	0.45
Propano	96.80	41.90	0.21
Propileno	91.90	45.40	0.23
Xenón	16.50	57.65	1.10

La adición de un cosolvente mejora la extracción de compuestos polares debido al cambio de polaridad, densidad y viscosidad del CO<sub>2</sub>, la miscibilidad del modificador, el CO<sub>2</sub> y la solubilidad del soluto, la interacción entre el CO<sub>2</sub> y la matriz y la interrupción de la unión entre los solutos y la matriz sólida (Gallo, 2022). El etanol ha sido uno de los modificadores más utilizados debido a la capacidad de su grupo hidroxilo para formar enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo con compuestos fenólicos (Čižmek *et al.*, 2021; Fornereto Soldan *et al.*, 2021).

El sistema de fluidos supercríticos consta de un suministro de CO<sub>2</sub> y del cosolvente, un intercambiador de calor en el que el CO<sub>2</sub> se lleva a condiciones supercríticas y en los recipientes de extracción difunde en la muestra para solubilizarla (Gandhi *et al.*, 2017). Finalmente el producto de extracción u oleorresina, que consta de dos fracciones 1) aceite volátil y (2) componentes semi volátiles, se deposita en un recipiente colector, tal como se aprecia en la Figura 3 (De Aguiar *et al.*, 2016; Knez *et al.*, 2019).



**Figura 3. Diagrama de flujo del sistema de fluidos supercríticos.**

Recipiente de almacenamiento de CO<sub>2</sub> (1), bomba de CO<sub>2</sub> (2), cosolvente (3), bomba de cosolvente (4), intercambiador de calor (5), recipiente de extracción (6),

7), regulador de contrapresión automático (PBR) (8), recipiente colector (9), regulador manual PBR (10).

### **Efecto antiobesidad de fitoquímicos de plantas**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (2022) la prevalencia de la obesidad ha incrementado globalmente en más de mil millones de personas. Padece obesidad en el mundo 650 millones de adultos, 340 millones de adolescentes y 39 millones de niños.

La obesidad se desarrolla debido al desequilibrio entre el consumo de energía y el gasto energético (Mopuri e Islam, 2017). Se caracteriza por un aumento en el tamaño de las células adiposas debido a la cantidad de grasa acumulada en el citoplasma de estas células (Patra y Nithya, 2015). Por lo tanto, inhibir la lipogénesis o mejorar la lipólisis disminuirá la cantidad de lípidos acumulados en los adipocitos y desencadenaría efectos favorables para tratar o prevenir la obesidad (Li *et al.*, 2021).

La línea celular de adipocitos 3T3-L1 es un modelo *in vitro* para evaluar los efectos antiobesidad y/o antiadipogénicos de diferentes compuestos bioactivos (Kim *et al.*, 2020). Se ha convertido en la línea celular preferida para estudiar la captación de glucosa estimulada por insulina y su señalización (Ruangaram y Kato, 2020).

Se han realizado investigaciones de plantas medicinales extractos, fracciones y/o compuestos purificados, para identificar actividades antiadipogénicas y su posible mecanismo de acción (Zang *et al.*, 2015; Mopuri e Islam, 2017; Sagbo y Hussein, 2022). En particular, se ha reportado el efecto antiobesidad de fitoquímicos de las leguminosas en modelos *in vitro* e *in vivo* (Moreno-Valdespino *et al.*, 2020), un ejemplo de ello es la evaluación del extracto de pétalos de flores de *Clitoria ternatea*, el cual inhibe la adipogénesis y la acumulación de lípidos en preadipocitos 3T3-L1 (Chayaratanasin *et al.*, 2019), sin embargo, no se ha explorado el chipilín como una fuente alternativa de compuestos bioactivos para mitigar este padecimiento.

## **Métodos de evaluación de toxicidad**

Los compuestos bioactivos de las plantas suelen tener propiedades terapéuticas (Nair *et al.*, 2013). Estos compuestos también pueden ser dañinos, por lo que se debe evaluar su toxicidad y garantizar su uso adecuado para la salud humana (Martinez-Mayorga *et al.*, 2017).

Generalmente los estudios de toxicidad inician en evaluaciones *in vitro* con líneas celulares, posteriormente se evalúan en varios modelos animales, especialmente en ratones y ratas (Veshalini *et al.*, 2022). Los estudios *in vitro* tienen ventajas debido a que son económicos, rápidos y fáciles, sin embargo las células cultivadas tienen un valor limitado ya que no pueden predecir efectos en el desarrollo embrionario o fetal humano. Los modelos murinos se utilizan para estudiar los mecanismos de diversas patologías y se obtienen datos precisos para extrapolar a los humanos (Chahardehi *et al.*, 2020). Los modelos de mamíferos, sin embargo, también son laboriosos, costosos y existen dilemas éticos con respecto a las pruebas con animales, por eso, se ha incrementado la búsqueda de modelos relativos de reemplazo para reducir el uso de mamíferos, entre ellos, el pez cebra (Thitinarongwate *et al.*, 2021).

## **El pez cebra como modelo de estudio**

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez de agua dulce, nativo del sureste asiático. El genoma del pez cebra comparte aproximadamente un 70 % de homología con el de humanos. Además, en una comparación del genoma del pez cebra con la base de datos en línea “Herencia Mendeliana en el Hombre (OMIM)” que enlista numerosos genes implicados en enfermedades humanas, se encontró que el 82% de estos genes tienen al menos un ortólogo en el pez cebra (Howe *et al.*, 2013). El pez cebra posee ventajas como organismo modelo sobre otros vertebrados debido a su rápido tiempo de generación y desarrollo de embriones (la organogénesis es esencialmente completa dentro de los primeros 5 días de desarrollo), tamaño pequeño y menor costo en mantenimiento (Haldi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018). Entre los nuevos enfoques, el pez cebra ha surgido como un modelo animal alternativo que busca contar con las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) de los estudios con animales en la investigación (Cassar *et al.*, 2020). Una pareja

de pez cebra adultos pueden generar de 200 a 300 embriones, mientras que una pareja de roedores solo produce de 5 a 10 descendientes por camada. Además, los ensayos con embriones de pez cebra requieren menos tiempo y son menos costosos que los estudios de desarrollo embrionario en ratas y conejos (Jayasinghe y Jayawardena, 2019).

Debido a la capacidad del pez cebra de absorber fácilmente compuestos moleculares pequeños, actúa como un modelo para evaluar toxicidad y efectos teratogénicos de compuestos bioactivos o extractos crudos de plantas (Evangeline *et al.*, 2018). Así, este modelo contribuye a la identificación y descubrimiento de moléculas para el tratamiento de enfermedades humanas. Asimismo, el modelo de embrión de pez cebra se utiliza para evaluar toxicidad: (1) la prueba de toxicidad del embrión del pez cebra (FET), carcinogenicidad, (2) evaluaciones de toxicidad y teratogenicidad para el desarrollo, (3) evaluación de la toxicidad para la reproducción, (4) evaluación de la toxicidad del comportamiento, (5) trastornos endocrinos, (6) toxicidad aguda, (7) neurotoxicidad, (8) óptica (toxicidad ocular), (9) cardiotoxicidad y (10) toxicidad vascular (Hill *et al.*, 2005).

De igual manera, el pez cebra es un modelo alternativo eficiente para estudios neurológicos y de comportamiento. Este modelo tiene todos los componentes para evaluar la neurotransmisión como en vertebrados superiores: GABA, glutamato, dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina y acetilcolina (Orellana-Paucar *et al.*, 2012). Comparte similitudes con la estructura y función del sistema nervioso de los humanos (Audira *et al.*, 2020; Licitra *et al.*, 2021; Robea *et al.*, 2021) y proporciona una plataforma adecuada para la detección eficiente de moléculas inductoras del sueño (Yokogawa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2020). Además, la actividad motora en el pez cebra que se puede afectar por estímulos externos, proporciona otra plataforma para la detección eficiente de moléculas psicoactivas y moduladoras del sueño (Yokogawa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2020).

Las larvas de pez cebra responden al cambio de iluminación y disminuye su actividad motora en presencia de luz y aumenta durante los periodos de oscuridad. Esto se llama tigmotaxis (tropismo positivo hacia la oscuridad) (Alkan *et al.*, 2011). Entre los parámetros conductuales que permiten la evaluación de la



actividad motora de los peces, se incluyen la velocidad de nado, la distancia recorrida, la velocidad angular, la preferencia de tigmotaxis y el rendimiento de alimentación (Suryanto *et al.*, 2022). La variación en estos criterios está relacionada con el estrés externo, el nivel de ansiedad y la neurotoxicidad (Carpăn *et al.*, 2022).

## Justificación

Debido a que las hojas de chipilín no se han analizado ampliamente para la identificación, caracterización, toxicidad, composición nutricional y nutracéutica de sus compuestos bioactivos, en este trabajo nos enfocamos en evaluar la actividad biológica de extractos de hoja de chipilín obtenidos por maceración y de oleoresinas obtenidas por FSC en dos sistemas, *in vitro* (viabilidad celular, crecimiento y diferenciación de la línea celular 3T3-L1) e *in vivo* (embriotoxicidad y locomoción en el modelo del pez cebra), con la finalidad de identificar compuestos bioactivos o fitoquímicos de importancia para la salud humana.

# Hipótesis

Los fitoquímicos de hoja de chipilín ejercen un efecto antiadipogénico en células 3T3-L1 e inducen un fenotipo de sedación en el modelo del pez cebra.

# Objetivos

## Objetivo general

Extraer fitoquímicos de hoja de *Crotalaria longirostrata* por maceración y mediante FSC y evaluar su actividad biológica en los modelos de fibroblastos de ratón 3T3-L1 y pez cebra (*Danio rerio*).

## Objetivos específicos

- Obtener extractos de hoja de chipilín mediante extracción con maceración acuosa y etanólica y mediante FSC.
- Comparar por GC-MS los fitoquímicos presentes en extractos obtenidos por maceración y por FSC.
- Evaluar la actividad de fitoquímicos de los extractos y oleorresinas sobre la viabilidad celular, crecimiento y diferenciación de la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1.
- Evaluar el efecto de exposición a los extractos y oleorresinas, sobre la embriotoxicidad y locomoción en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

# Materiales y métodos

## Material vegetal

Se utilizaron hojas de *Crotalaria longirostrata* (chipilín) proporcionadas por el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Las hojas se secaron durante 2 meses a temperatura ambiente, se trituraron y se eliminaron los restos de tejido en un tamiz malla 100.

## Obtención de aceites esenciales con por maceración

El tejido pulverizado de hoja se maceró en agua, etanol y etanol-agua (1:1), en una relación 1:20 (w/v) durante 24 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, los extractos se filtraron y se centrifugaron a 12000xg por 1 min. Los sobrenadantes se mantuvieron en oscuridad a 4°C para evaluaciones posteriores. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

## Obtención de olerresinas por fluidos supercríticos (FSC)

La hoja pulverizada de chipilín (100 g) se sometió a proceso de extracción dinámica con FSC (Waters Bio-Botanical Extraction System). Las condiciones de la extracción se muestran en la Tabla 2, y se usó como cosolvente etanol al 96%. La oleorresina obtenida se transfirió a botellas de vidrio oscuro y se almacenó a -8°C hasta su análisis.

**Tabla 2. Condiciones de extracción dinámica por fluidos supercríticos.**

Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Flujo de CO <sub>2</sub> (g/min)	% Cosolvente (etanol 96%)
2	40	200	25	5
2	40	250	30	5
2	45	250	30	5
2	45	300	30	5
1.5	45	300	30	0

### **Cuantificación de fenoles totales**

Para la cuantificación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. Brevemente, 20 µL de extracto se mezcló con 780 µL de agua Milli Q, se adicionó 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y la muestra se incubó 10 min en oscuridad. Se añadió 150 µL de solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%. Se mezcló e incubó la muestra durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se utilizó una curva estándar de ácido gálico (0-500 µg/mL) para determinar el contenido de fenoles en las muestras. La absorbancia de los estándares y las muestras se midió a λ 765 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Los resultados se expresaron en µg equivalentes de ácido gálico (EGA) /g muestra de tejido seco (Blainski, Lopes y De Mello, 2013).

### **Cuantificación de flavonoides**

Para la cuantificación de flavonoides se mezcló 200 µL de extracto con 800 µL de solución etanólica de AlCl<sub>3</sub> 2% y se incubaron 10 min en oscuridad. Se utilizó una curva estándar de quercetina (0-100 µg/mL) para determinar el contenido de flavonoides en las muestras. La absorbancia de los estándares y de las muestras se midió a λ 430 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Los resultados se expresaron en µg equivalentes de quercetina(EQ) /g muestra de tejido seco (Segev *et al.*, 2010).

### **Determinación de la capacidad antioxidante**

Se determinó la capacidad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Se depositaron 100 µL de extracto en una microplaca y se adicionó 100 µL de DPPH 400 µM. Se incubó en oscuridad por 30 min. La absorbancia se midió a 517 nm (Segev *et al.*, 2010). Los resultados se expresan como el porcentaje de DPPH reducido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH reducido} = \frac{A_0 - A_m}{A_0} * 100$$

Donde: Am es la absorbancia de la muestra problema y A<sub>0</sub> es la absorbancia inicial de DPPH.

## **Perfil de metabolitos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)**

Los extractos de chipilín se analizaron por GC-MS mediante un Sistema 7820A / 5977E (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.) con una columna capilar HP-5MS (Agilent Technologies) de 30 m de longitud, 250 µm de diámetro interior y 0.25 µm de espesor de la película. 1 µL de muestra se inyectó en modo splitless. La columna se mantuvo a 50°C durante 1 min y la temperatura se programó a 30°C/min a 280°C durante 10 min y luego a 15°C/min a 300°C durante 4 min. Se utilizó helio como gas portador a un caudal de columna constante de 1 mL/min. El espectrómetro de masas funcionó con ionización por impacto de electrones a 70 eV con un intervalo de masas de 45-500 m/z. Los compuestos se identificaron comparando sus tiempos de retención y los espectros de masas con la biblioteca espectral de masas NIST v2.2.

## **Evaluación del potencial antiadipogénico en células 3T3-L1**

Para evaluar el efecto de los extractos se empleó la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón (ATCC CL-173, Manassas, VA, USA). Las células se propagaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 4.5 g/L de glucosa, 158 mg/L de glutamina, 3.7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, suplementado con suero de ternera al 10%, 1000 Unidades de penicilina/mL y 1000 µg de estreptomina/mL (Gibco, Grand Island, NY, USA). Las células se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron 2x10<sup>4</sup> y 2x10<sup>3</sup> células en placas de 24 y 96 pozos para los ensayos de acumulación de lípidos y viabilidad celular, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## **Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad celular en presencia de los extractos de chipilín se evaluó mediante el ensayo del MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MERCK Cell Proliferation Kit) a las 24 y 48 h. El sobrenadante (100 µL) se removió y las células se incubaron con solución de MTT por 4 h a 37°C. Los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a λ 690 nm. La viabilidad celular se expresó en términos de porcentaje respecto al control.

### **Diferenciación adiposa**

Una vez alcanzada la confluencia, las células se sometieron a diferenciación (los extractos se añadieron durante y al término del proceso diferenciación) en DMEM con suero fetal bovino al 10 %, dexametasona 1  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  de 3-isobutil-1 metil xantina y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina (medio de diferenciación). Después de 48 h, se cambió el medio a DMEM al 90 % que contenía FBS al 10 % y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina (medio de mantenimiento). El medio se cambió cada 48 h hasta alcanzar el fenotipo de adipocitos maduros (aproximadamente 12 días). Al finalizar el tratamiento, se realizó una determinación semi cuantitativa de las gotas de lípidos intracelulares, mediante la tinción con rojo oleoso de acuerdo a Martínez-Villaluenga *et al.*, (2010). Los resultados se expresaron como porcentaje de acumulación de lípidos en relación a las células no tratadas con un patrón normal de acumulación de lípidos (100%) (Hwang *et al.*, 2021).

### **Evaluaciones biológicas en el pez cebra (*Danio rerio*)**

#### **Mantenimiento y reproducción de animales**

Los peces cebra adultos de la línea híbrida Tu/AB y Wik (> 6 meses de edad) se mantuvieron en tanques con un sistema de recirculación de agua bajo condiciones estándar de crianza (pH 7.5, conductividad 500-750  $\mu\text{S}$ , a 28°C, ciclo de 12 h luz/oscuridad), alimentados diariamente con cultivo de artemia. Se supervisó cada tercer día el contenido de nitrato, nitrito y amoníaco en agua para mantener las condiciones ideales del medio (Espino-Saldaña *et al.*, 2020a; Valles *et al.*, 2020). La producción de huevos se realizó en una proporción 1:2 de machos y hembras, respectivamente. El protocolo experimental se aprobó por el Comité de Uso y Cuidado de Animales del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo número 95A).



## **Mantenimiento y reproducción de animales**

Las soluciones de trabajo se elaboraron diariamente a partir de las soluciones madre (extractos de hoja de chipilín) disueltas en medio E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>) con 1% de DMSO. En experimentos con embriones y larvas de pez cebra, la concentración de DMSO al 2.5 % fue bien tolerada y no provocó deformidades en el desarrollo (Hallare *et al.*, 2006; Gad, 2011; Alafiatayo *et al.*, 2019; Murugesu *et al.*, 2019). Los grupos control de cada tratamiento se mantuvieron en medio E3 1% DMSO.

## **Prueba de toxicidad crónica en embriones de pez cebra (FET)**

Para investigar el efecto tóxico de los extractos chipilín, se realizó una prueba de toxicidad crónica en embriones de peces (FET) bajo las directrices de la *Guidelines for the Testing of Chemicals* No.236 de la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (OECD, 2006). La prueba de embriotoxicidad permite valorar parámetros de letalidad, subletalidad y teratogénicos dentro de las primeras 120 horas post fertilización (hpf).(von Hellfeld *et al.*, 2020).

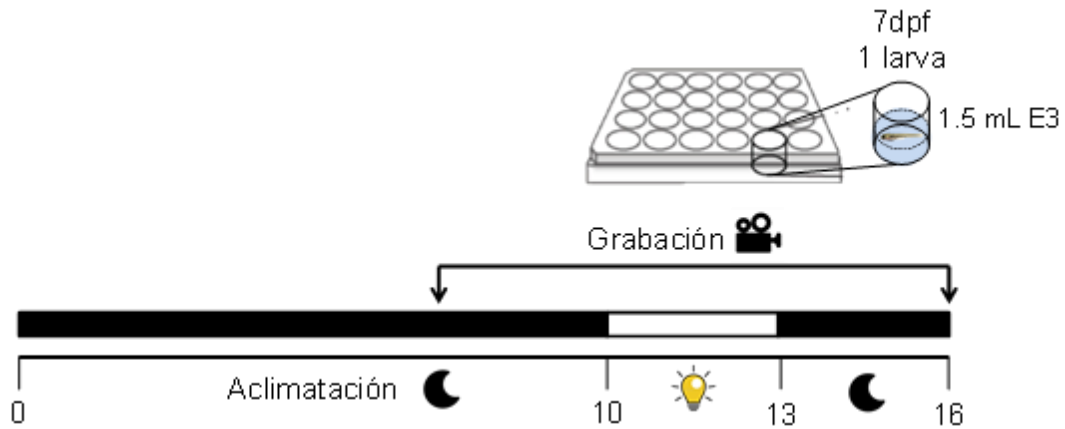
Embriones fecundados (n=20) de 2 hpf se transfirieron a cajas Petri (60 x15 mm) y se incubaron con las diferentes soluciones de trabajo (8 mL). La exposición a las soluciones comenzó desde las 2 hpf y continuó hasta los 5 días post fertilización (dpf), con recambio diario de las soluciones. Las placas se incubaron a 28°C con un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado. (Hermsen *et al.*, 2011; Jomaa *et al.*, 2014; Valles *et al.*, 2020). Los criterios de valoración para los embriones y larvas desde las 24 hasta a las 120 hpf, se realizaron de acuerdo a Selderslaghs *et al.*, (2009). Se monitoreó la coagulación del huevo, la formación de somitas y el desprendimiento de la cola desde las 24 hpf, la formación de edema, la pigmentación y frecuencia cardiaca desde las 48 hpf y la eclosión del embrión, así como la escoliosis, a partir de las 72 hpf. Las concentraciones letales media ( $LC_{50}$ ), se obtuvieron a partir del porcentaje de mortalidad acumulada a las distintas horas de evaluación, frente al logaritmo de las concentraciones (Veeran *et al.*, 2020).

### **Prueba de toxicidad aguda en larvas de pez cebra**

Para evaluar la toxicidad aguda de los extractos, larvas (n=10) de 72 hpf se transfirieron individualmente a una placa de 96 pozos. Se incubaron con una dosis única de 200 µL de las diferentes soluciones de trabajo. Se examinaron cambios en la morfología, la circulación sanguínea y los latidos del corazón a las 0, 1, 3, 5, 7, 12 y 24 h (Ramos *et al.*, 2020). Las placas se incubaron a 28°C con un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **Evaluación de la actividad motora en larvas de pez cebra**

Se evaluó la respuesta de las larvas a transiciones de luz-penumbra acorde al protocolo descrito por Rodríguez-Ortiz y Martínez-Torres (2021). Larvas de 7 dpf (n=16) que habían sido expuestas a las soluciones de trabajo con recambio diario desde las 2 hpf, se depositaron individualmente en una placa de 24 pocillos con 1.5 mL de medio E3. La placa se colocó sobre una cámara de luz y se cubrió con un artefacto cónico negro que sostenía una cámara de video en la parte superior. Las larvas se habituaron a la oscuridad durante 10 min y la grabación comenzó durante los últimos 3 min de este periodo, posteriormente se encendió la luz y continuó la grabación durante 3 min más. Finalmente, se apagó la luz y la grabación finalizó a los 3 min del último periodo en penumbra (Figura 4). Las trayectorias se analizaron con el software EthoVisionXT (Noldus IT, Wageningen, Países Bajos). La locomoción total de las larvas individuales se resumió en tres variables de respuesta: distancia recorrida, velocidad, y latencia al momento de iniciar el movimiento (Liu *et al.*, 2016; Pohl *et al.*, 2019; Valles *et al.*, 2020). El experimento se llevó a cabo por triplicado en un cuarto a 28°C.



**Figura 4. Protocolo de grabación de la motilidad de larvas de pez cebra durante transiciones luz-oscuridad.**

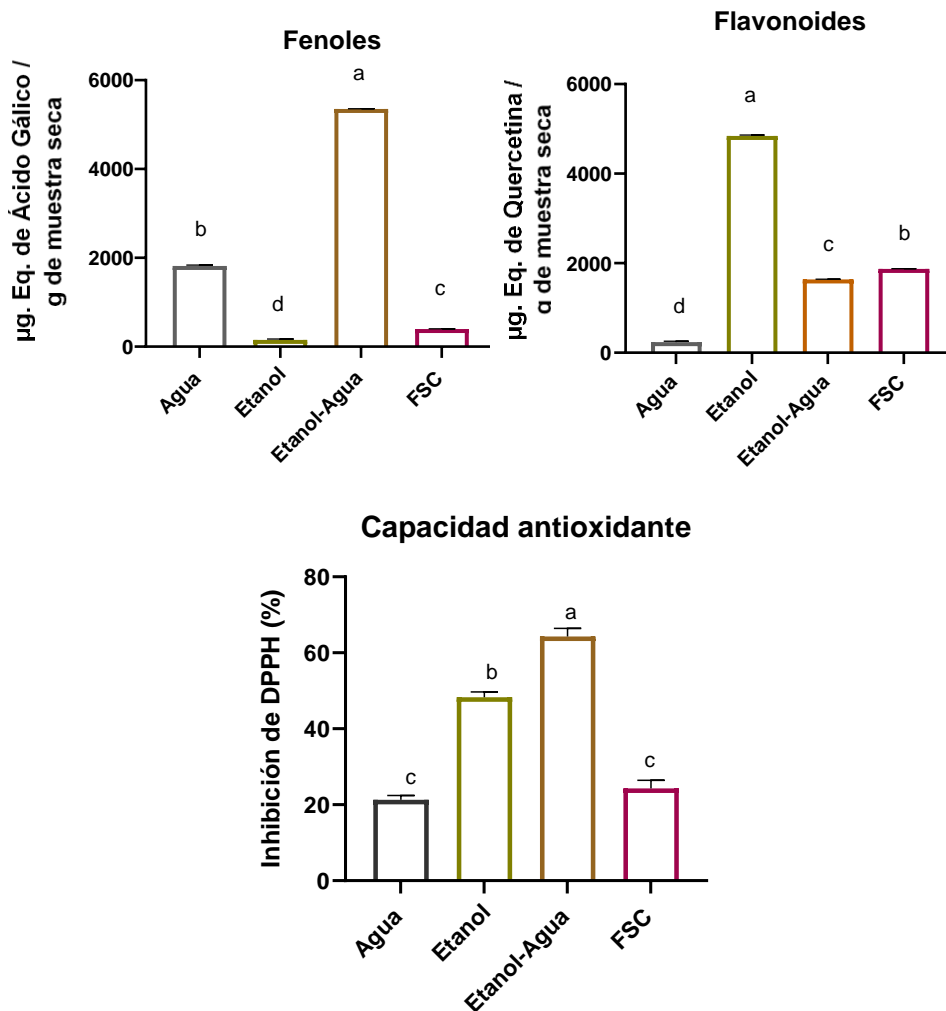
### **Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). La significancia estática se determinó mediante ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ). Las comparaciones por pares se realizaron mediante pruebas de Tukey ( $p < 0.05$ ).

# Resultados

## Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante

Debido a que las actividades biológicas reportadas para el chipilín se atribuyen a los fitoquímicos de sus hojas, evaluamos el contenido de fenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por maceración y FSC mediante métodos espectrofotométricos (Figura 5).



**Figura 5. Cuantificación de fitoquímicos en hojas de chipilín.**

Media aritmética  $\pm$  SD (por triplicado  $n=3$ ). La media aritmética  $\pm$  SD ( $n=3$ ) tiene una diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha =0.05$ ).

El extracto de etanol-agua es el de mayor contenido de fenoles (5345.06 µg EGA/g de peso fresco) y el extracto etanólico es el de menor cantidad (152.98 µg EGA/g de muestra seca). Por el contrario, la fracción etanólica presenta el mayor contenido de flavonoides (4841.3 µg EQ / g de muestra seca) seguido del extracto obtenido por FSC (1870.59 µg EQ / g de muestra seca), y la fracción con la menor cantidad es el agua (234.50 µg EQ / g de muestra seca) (Anexo 1).

El extracto etanólico-acuoso de hojas de chipilín es el que tiene el mayor valor de inhibición del radical DPPH con un valor 64.3%.

### **Perfil de metabolitos**

Con la finalidad de identificar los metabolitos presentes en los extractos de chipilín, se realizó un análisis por GC-MS (Figura 6). Se identificaron 20 compuestos volátiles y semi-volátiles (Anexo 2). El 75% pertenece al grupo de naturaleza lipídica o similares a los lípidos, con polaridad baja o nula, el 20% a los compuestos organoheterocíclicos y el 5% a los fenilpropanoides y policétidos (Tabla 3).

La composición de fitoquímicos de los extractos varía de manera cualitativa y cuantitativa (porcentaje relativo): son 3 compuestos para el extracto acuoso, 10 para el etanólico-acuoso, 15 para el etanólico y 16 para el de FSC. Los extractos con una porción etanólica de baja polaridad, tienen compuestos en común de naturaleza lipídica como el fitol,  $\alpha$ -ácido linoleico, 2-palmitoglicerol, monoestearina y erucamida, entre otros. El ácido palmítico es el único compuesto presente en todas las muestras (Figura 6). El ácido 2,5-difluorobenzoico y el 6-hidroxi-4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidrobenzofuran-2(4H)-ona se detectó solo en las oleorresinas por FSC. La oleorresina de FSC extrae cantidades más altas de escualeno y  $\zeta$ -sitosterol. El extracto de FSC tiene mayor intensidad y pureza en la señal de metabolitos, en comparación con los obtenidos por maceración. Para algunos de los metabolitos identificados se han descrito previamente propiedades biológicas como las propiedades antidiabéticas, inductoras del sueño, antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias.

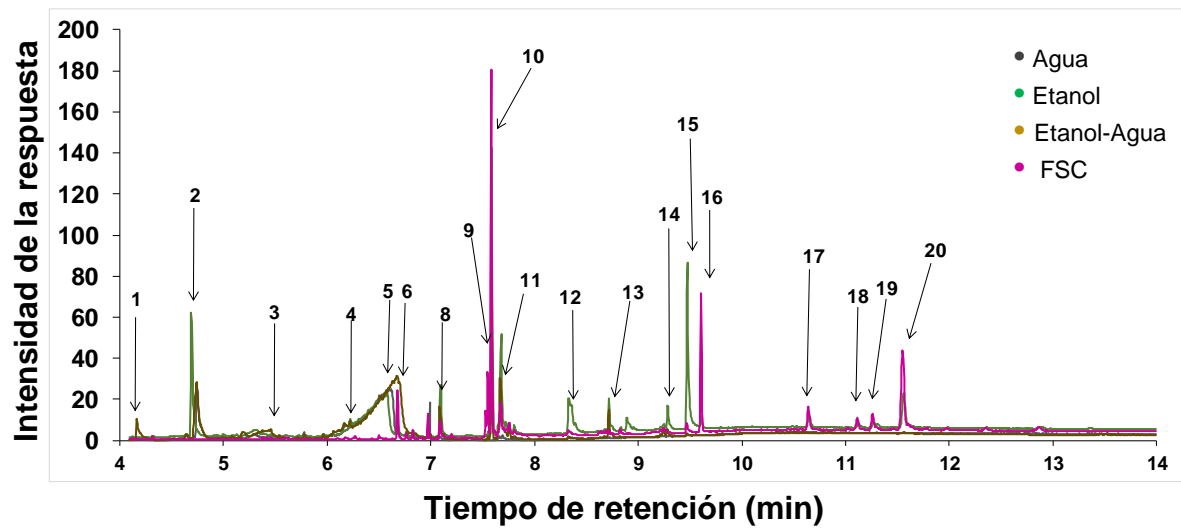


Figura 6. Cromatograma GC-MS de los extractos de hoja de chipilín.

**Tabla 3. Identificación por GC-MS de los metabolitos en los extractos de chipilín.**

Pico	CAS	Nombre	TR	Abundancia relativa (%)				Clasificación	Actividad biológica	Referencias
				Agua	Etanol	Etanol- Agua	FSC			
<b>Fenilpropanoides y policétidos</b>										
3	EPA-357601	Ácido 2,5-difluorobenzoico	5.423				0.02	Dépsidos y depsidonas	Bactericida	Narisety,2013
<b>Compuestos organoheterocíclicos</b>										
1	496162	Cumarán	4.165				0.48	Cumarinas	Antimicrobiano, antioxidante	Jamil <i>et al.</i> ,2019; Sharonova <i>et al.</i> ,2021
2	15211037	Traquelanthamidina	4.693	1.58	2.02	1.87		Pirrolizidinas	nd	nd
4	73410023	6-hidroxi-4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-ona	6.499				0.06	Benzofuranos	Anti-inflamatorio	Jayawardena <i>et al.</i> , 2019
7	82304663	7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona	6.99	0.72			0.01	Butirolactonas gamma	Antimicrobiano	Sharif <i>et al.</i> ,2014

## Lipidos y fitoesteroles

<b>5</b>	EPA-127259	Metilglucosa	6.581	1.92	0.19	1.4		Alcoholes grasos	Hipoglicémico, bactericida	Shamni <i>et al.</i> ,2017
<b>6</b>	504961	Neofitadieno	6.677		0.32		0.73	Sesquiterpenoides	Antimicrobiano, anti-inflamatorio	Bhardwaj,2020; Nishanbaev <i>et al.</i> ,2018
<b>8</b>	57103	Ácido palmítico	7.084	0.02	0.75	0.25	0.41	Ácidos grasos de cadena larga	Antineoplásico, antiviral	Lee <i>et. al.</i> ,2009
<b>9</b>	112630	Metil linoleato	7.527				0.37	Ácidos lineólicos y derivados	Antimicrobiano, antioxidante	Ghahari <i>et. al.</i> , 2017
<b>10</b>	150867	Fitol	7.584		3.1	1.17	5.61	Diterpenoides acíclicos	Antidiabético, inductor del sueño, antioxidante, anti-inflamatorio	Islam,2018; Olofsson <i>et. al.</i> ,2014; Upadhyay <i>et. al.</i> ,2022
<b>11</b>	301008	Ácido $\alpha$ -linoleico	7.673		1.56	0.91	0.74	Ácidos lineólicos y derivados	Antidiabético, antioxidante	Sanders,2017
<b>12</b>	301020	Oleamida	8.328		0.81		0.06	Amidas grasas	Inductor del sueño	Yerlikaya <i>et. al.</i> , 2022;
<b>13</b>	123409	2-Palmitoil glicerol	8.715		0.4	0.26	0.06	Monoacilgliceroles	Antioxidante	Helcman <i>et. al.</i> , 2022
<b>14</b>	123944	Monostearina	9.281		0.3	0.05	0.11	Monoacilgliceroles	Antimicrobiano	Kalainavi <i>et. al.</i> , 2021
<b>15</b>	112845	Erucamida	9.468		2.56	0.02	0.22	Amidas grasas	Inductor del	Kim <i>et. al.</i> , 2018



<b>16</b>	111024	Escualeno	9.605	0.07	2.82	Triterpenoides	sueño Antibacterial, antioxidante, antitumor	Mickymaray, <i>et. al.</i> , 2016
<b>17</b>	59029	Vitamina E	10.641	0.19	0.57	Compuestos derivados vitamina E	Antidiabético, antioxidante, anti-inflamatorio	Abraham <i>et. al.</i> 2018; Xiao <i>et. al.</i> ,2021
<b>18</b>	4651518	Campesterol	11.111	0.02	0.33	Ergosteroles y derivados	Antioxidante, disminución del colesterol y	Li,2022; Prommaban <i>et. al.</i> ,2020;
<b>19</b>	83487	Estigmasterol	11.257	0.07	0.44	Estigmastanos y derivados	colesterol de colesterol de lipoproteínas de baja densidad, efectos neuroprotectores	Sharma <i>et. al.</i> , 2021
<b>20</b>	83476	ç-Sitosterol	11.55	0.78	2.98	Estigmastanos y derivados		

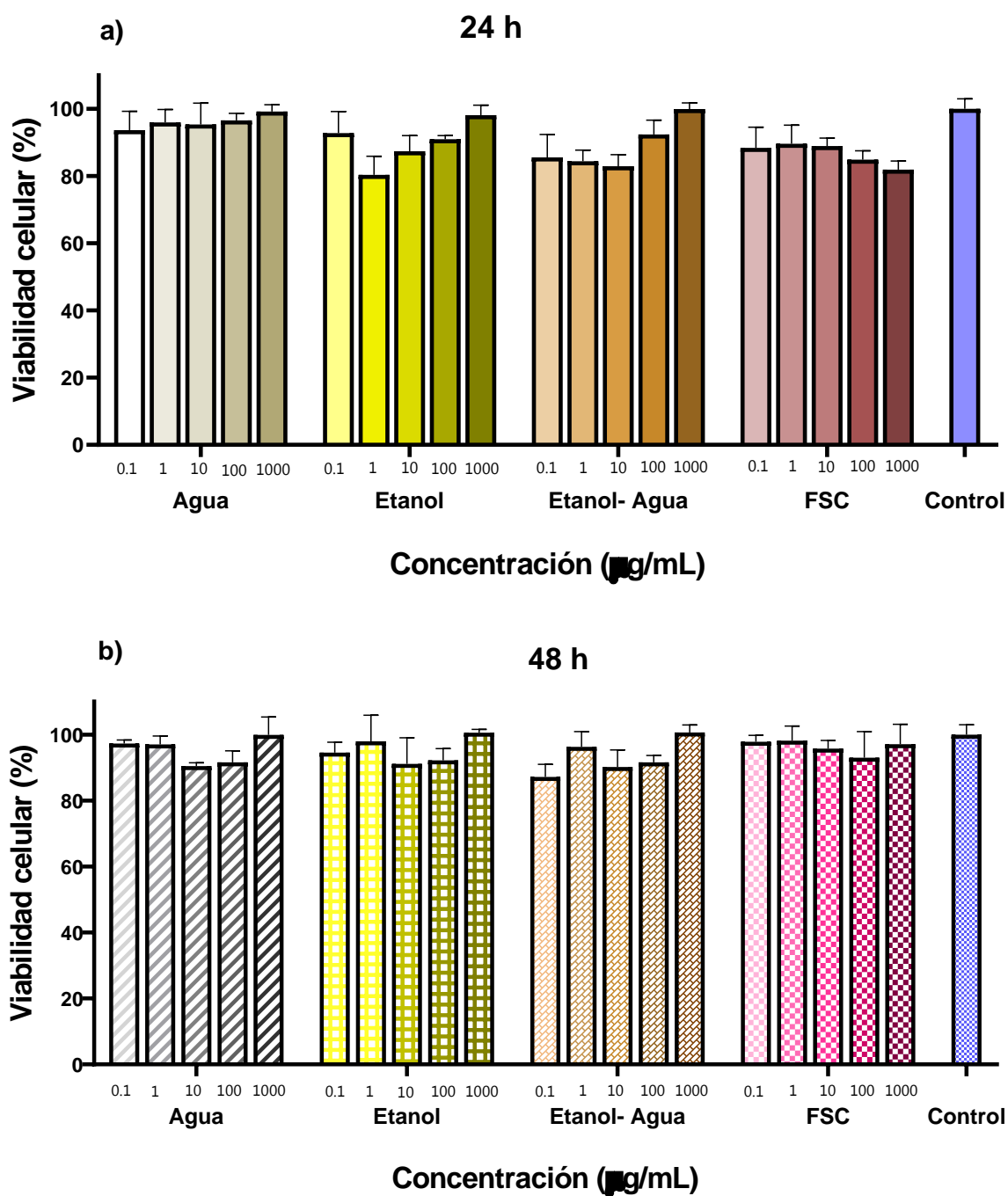
TR= tiempo de retención

ND= no disponible.

## **Ensayos *in vitro* de actividad antiadipogénica en células 3T3-L1**

### **Ensayo de viabilidad celular**

Se evaluó la toxicidad en preadipocitos 3T3-L1 mediante el ensayo MTT para establecer los límites tolerables de exposición de los extractos de chipilín en un modelo celular. Los preadipocitos se trataron con los extractos a una concentración de 0.1, 1.0, 10, 100 y 1000 µg/mL durante 24 h y 48 h. El porcentaje de células viables se determinó respecto a su control (100% viabilidad). Los resultados se clasificaron como graves cuando la viabilidad es  $\leq 30\%$ , moderada (30-60%), leve (60-90%) o no citotóxica ( $> 90\%$ ). A las 24 h, los extractos de etanol-agua y FSC reducen ligeramente la viabilidad de las células. Esto pudo deberse a la adaptación celular al cambio de medio, ya que a las 48 h hubo una recuperación total y ningún extracto tuvo un efecto tóxico sobre la viabilidad de las células hasta una concentración de 1000 µg/mL (Figura 7). Por lo tanto, se eligieron las concentraciones de 1.0, 10, 100 y 1000 µg/mL para el ensayo de diferenciación celular y evaluar si los metabolitos presentes en los extractos tienen un efecto antiadipogénico.



**Figura 7. Ensayo de viabilidad celular de preadipocitos 3T3-L1 en presencia de los extractos de hoja de chipilín a las 24 (a) y 48 h (b).**

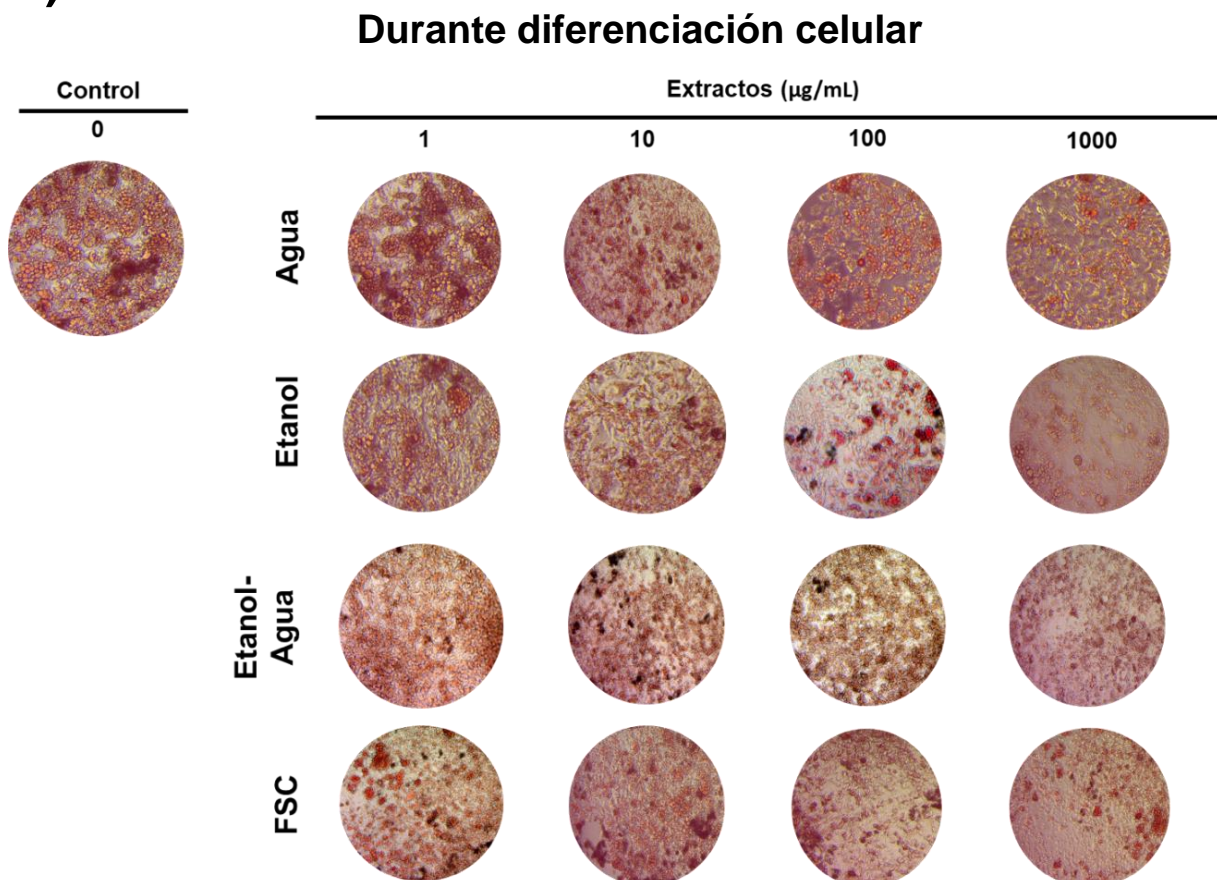
Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD  $\lambda$  490 nm respecto al control.

## Ensayo antiadipogénico

Se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos de hoja de chipilín en la acumulación de lípidos durante (Figura 8A) y después de la diferenciación celular (Figura 8B). Durante la diferenciación, desde 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa el efecto antiadipogénico del extracto acuoso y etanólico acuoso. En los grupos tratados con el extracto etanólico y la oleoresina de FSC se observa una disminución gradual de la acumulación de lípidos desde una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta su máximo efecto en 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

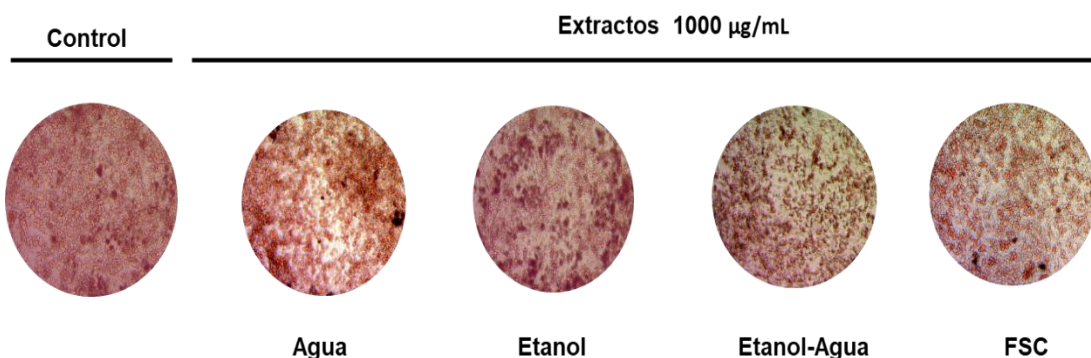
Posterior a la diferenciación, la acumulación y maduración de adipocitos en el grupo control, parece mayor al de las células tratadas con los extractos. Particularmente en el grupo tratado con el extracto etanólico, no todas las células alcanzaron el fenotipo característico de adipocitos maduros que indica mayor inhibición de la adipogénesis.

**A)**



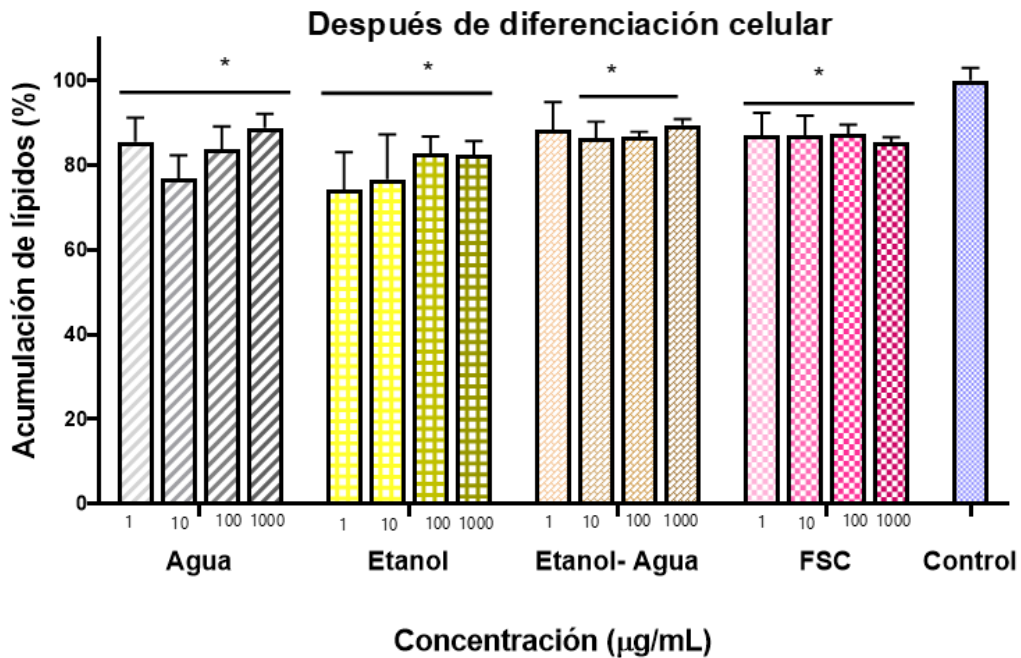
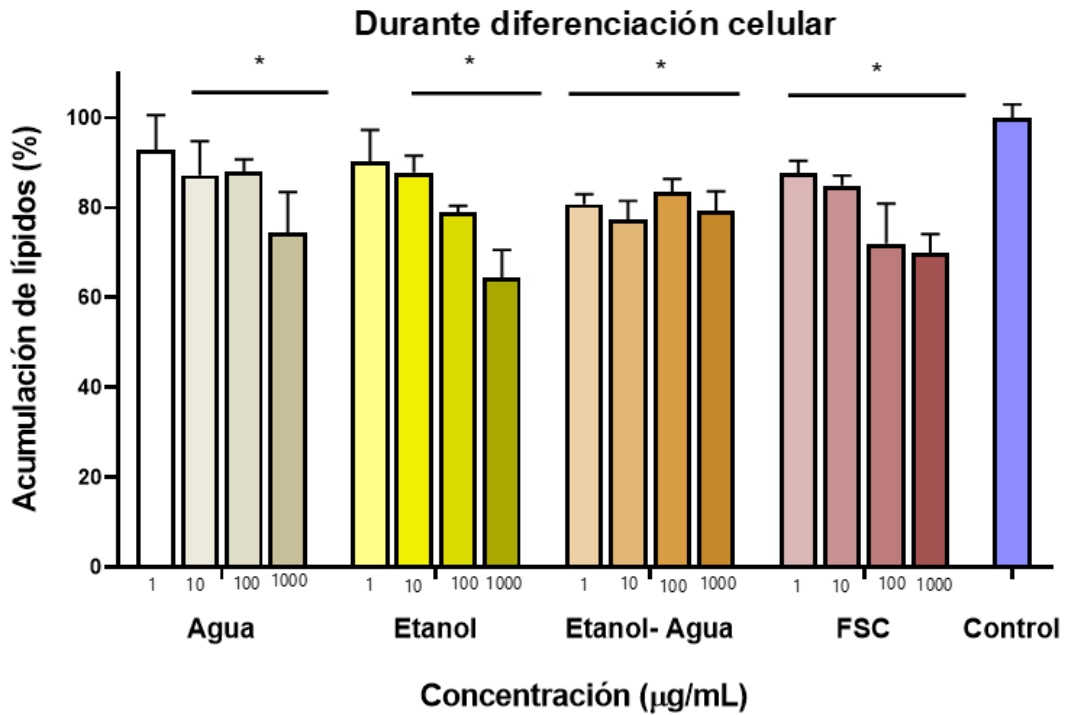
**B)**

## Después de diferenciación celular



**Figura 8. Fotografías al microscopio de células 3T3-L1 en presencia y ausencia de fitoquímicos de hoja de chipilín. A) interacción durante la diferenciación adiposa. B) interacción después de la diferenciación.**

El análisis semicuantitativo con la tinción de rojo oleoso (Figura 9) muestra una disminución en la acumulación de lípidos en células tratadas durante la diferenciación desde concentraciones bajas de 1 µg/mL para la fracción de etanol-agua y FSC y de 10 µg/mL para el extracto acuoso y etanólico. La disminución en la acumulación de lípidos es dosis-dependiente, ya que las concentraciones más altas tienen el mayor porcentaje de inhibición de lípidos de hasta el 35%. En el caso de las células cuyos tratamientos fueron aplicados posterior a la diferenciación celular, los efectos son menores para las concentraciones evaluadas, con un porcentaje alrededor del 20%.



**Figura 9. Diferenciación de células 3T3-L1 en presencia de extractos de hoja de chipilín.**

Ensayo semicuantitativo de acumulación de lípidos por la tinción de rojo oleoso en preadipocitos sometidos a diferenciación en presencia de los extractos de hoja de chipilín durante y después de la diferenciación  $\lambda$  510 nm. Los valores son

expresados como la media aritmética  $\pm$  SD (n=3), diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha =0.05$ ) respecto al control.

## Ensayos en el modelo del pez cebra.

### Prueba de toxicidad crónica en embriones de pez cebra

Para evaluar los riesgos inherentes a la exposición de los extractos de chipilín, se evaluó la toxicidad de los extractos en embriones de peces a exposición continua de diferentes concentraciones (31.25, 62.5, 125, 250 y 750  $\mu\text{g/mL}$ ) desde las 2 hpf hasta los 5 dpf, con recambio diario de las soluciones y monitorización constante.

Los indicadores de toxicidad a las concentraciones de 31.25, 62.5 y 125  $\mu\text{g/mL}$  no son significativamente diferentes respecto al control dentro de los valores permitidos (datos no mostrados), sin embargo, a partir de la concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  se observan anomalías en los embriones desde el primer momento de exposición de los extractos hasta finalizar la evaluación a los 5 dpf (Tabla 4).

**Tabla 4. Parámetros de toxicidad crónica con criterios de valoración letales y subletales en embriones de pez cebra.**

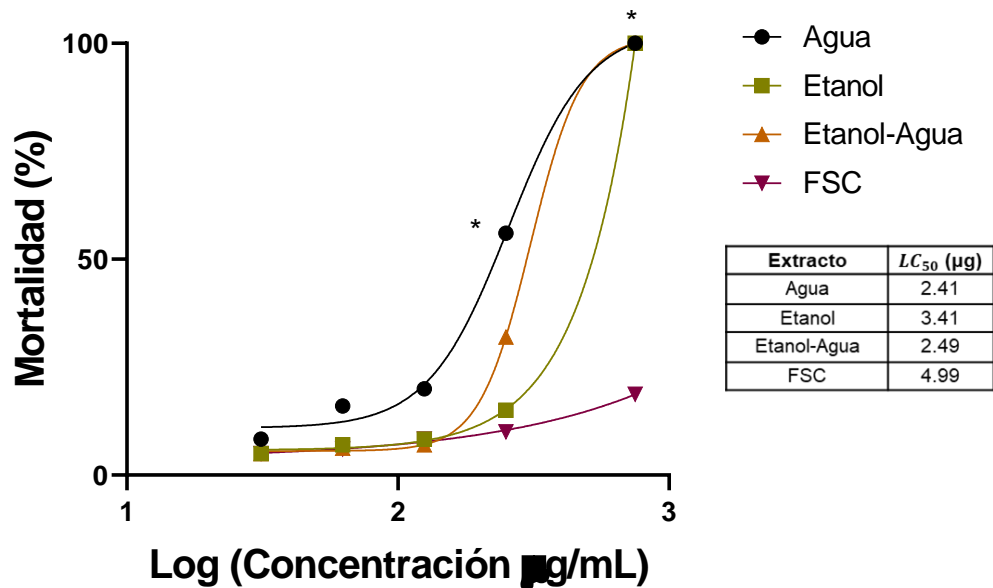
Parámetro	Control	Concentración: 250 $\mu\text{g/mL}$			
		Agua	Etanol	Etanol-Agua	FSC
Coagulación del huevo (%) /8–120 hpf	6 $\pm$ 1	56 $\pm$ 2 *	15 $\pm$ 1	32 $\pm$ 2 *	10 $\pm$ 1
Formación de somitas (%) /24 hpf	100	90	100	90	100
Cola no desprendida (%) /24–96 hpf	0	40 $\pm$ 1 *	0	40 $\pm$ 1 *	0
Eclosión del embrión/48–96 hpf (total %)	100	90 $\pm$ 2	100	60 $\pm$ 2 *	100
Formation de edema (%) /48–96 hpf	0	20 $\pm$ 2 *	0	15 $\pm$ 1 *	0
Escoliosis (%) /48–120 hpf	0	40 $\pm$ 2 *	0	0	0
Pigmentación (%) /24–96 hpf	100	62 $\pm$ 2 *	100	40 $\pm$ 2 *	100
Frecuencia cardiaca/ 24–48 hpf (lat/min)	172 $\pm$ 1	148 $\pm$ 3	168 $\pm$ 2	140 $\pm$ 3	174 $\pm$ 2

Los datos corresponden a los porcentajes al final de la evaluación con los embriones supervivientes. Los valores son expresados como la media aritmética  $\pm$  SD (n=20), en color rojo se resaltan los valores estadísticamente significantes respecto al control de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha =0.05$ ).

A la concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  el efecto tóxico que causó la coagulación del huevo (mortalidad) expresado en porcentaje del extracto acuoso es del 56%, etanol 15%, etanol-agua 32%, y FSC 10%. Una supervivencia  $\geq 75\%$  (o mortalidad  $\leq 35\%$ ) se considera no tóxica (Evangeline *et al.*, 2018), es decir, el extracto acuoso y el etanólico son tóxicos y además inducen algunas malformaciones en el desarrollo embrionario posterior a las 48 hpf como retraso en el desprendimiento de la cola, formación de edema, disminución de la pigmentación y reducción de la frecuencia cardíaca. El extracto acuoso provoca escoliosis (deformidades esqueléticas) y el acuoso-etanólico retrasa la eclosión del embrión.

La concentración letal 50 ( $LC_{50}$ ), es la concentración que provoca la muerte del 50% de los animales de estudio durante un determinado periodo de observación. De acuerdo a las curvas de dosis respuesta para mortalidad de embriones de pez cebra acumulada hasta 120 hpf, el extracto acuoso ( $LC_{50} = 2.41 \mu\text{g/mL}$ ) presenta mayor grado de toxicidad, seguido del extracto etanólico-acuoso ( $LC_{50} = 2.49 \mu\text{g/mL}$ ), etanólico ( $LC_{50} = 3.41 \mu\text{g/mL}$ ) y FSC ( $LC_{50} = 4.99 \mu\text{g/mL}$ ), este último el de menor grado de toxicidad (Figura 10).





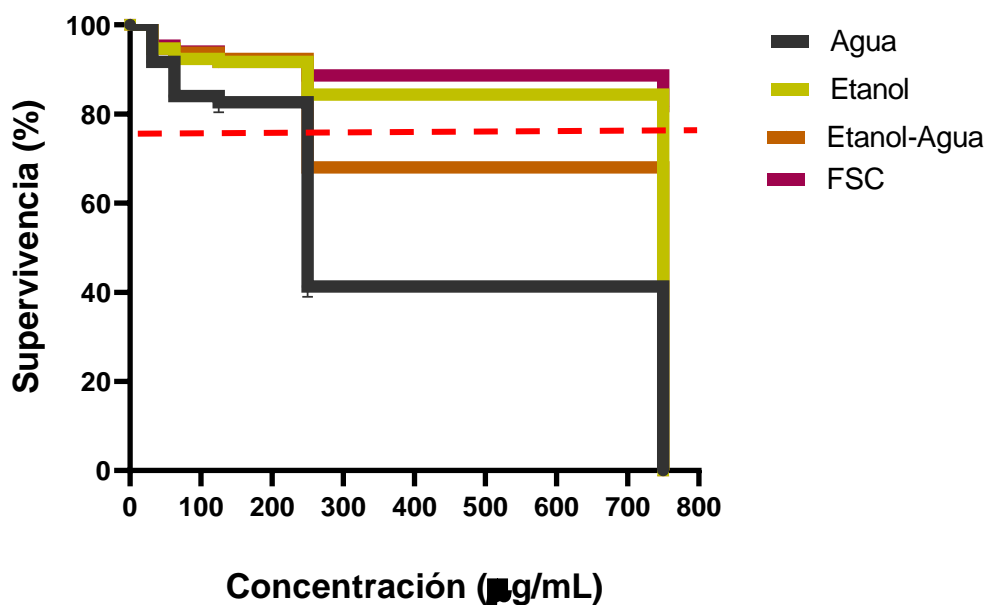
**Figura 10. Mortalidad de embriones de pez cebra acumulada a las 120 hpf en presencia de extracto de chipilín.**

Evaluación desde 31.25, 62.5, 125, 250 a 750 µg/mL La media aritmética (n=20) tiene una diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

Con la concentración máxima de 750 µg/mL, la mayoría de los extractos ocasionan el 100% de mortalidad dentro de las primeras 72 hpf (Tabla 5), sólo el extracto de FSC tuvo una mortalidad del 18.75%, dentro de los parámetros permitidos (Figura 11). Estos resultados indican que el extracto de FSC es el menos tóxico a altas concentraciones en comparación con los otros extractos.

**Tabla 5. Embriotoxicidad acumulada hasta las 120 hpf de extractos de hoja de chipilín en embriones de pez cebra.**

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Agua	Etanol	Etanol-agua	FSC
0	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1
31.25	91.7 $\pm$ 1	94.6 $\pm$ 1.5	94.6 $\pm$ 1.1	95.3 $\pm$ 1.1
62.5	84 $\pm$ 1	92.3 $\pm$ 0.5	93.7 $\pm$ 1	94 $\pm$ 1
125	82.6 $\pm$ 2	91.7 $\pm$ 1	92.3 $\pm$ 0.5	91.7 $\pm$ 1
250	41.3 $\pm$ 2.3	84.3 $\pm$ 0.5	68 $\pm$ 1	88.6 $\pm$ 1.1
750	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	81.2 $\pm$ 0.7

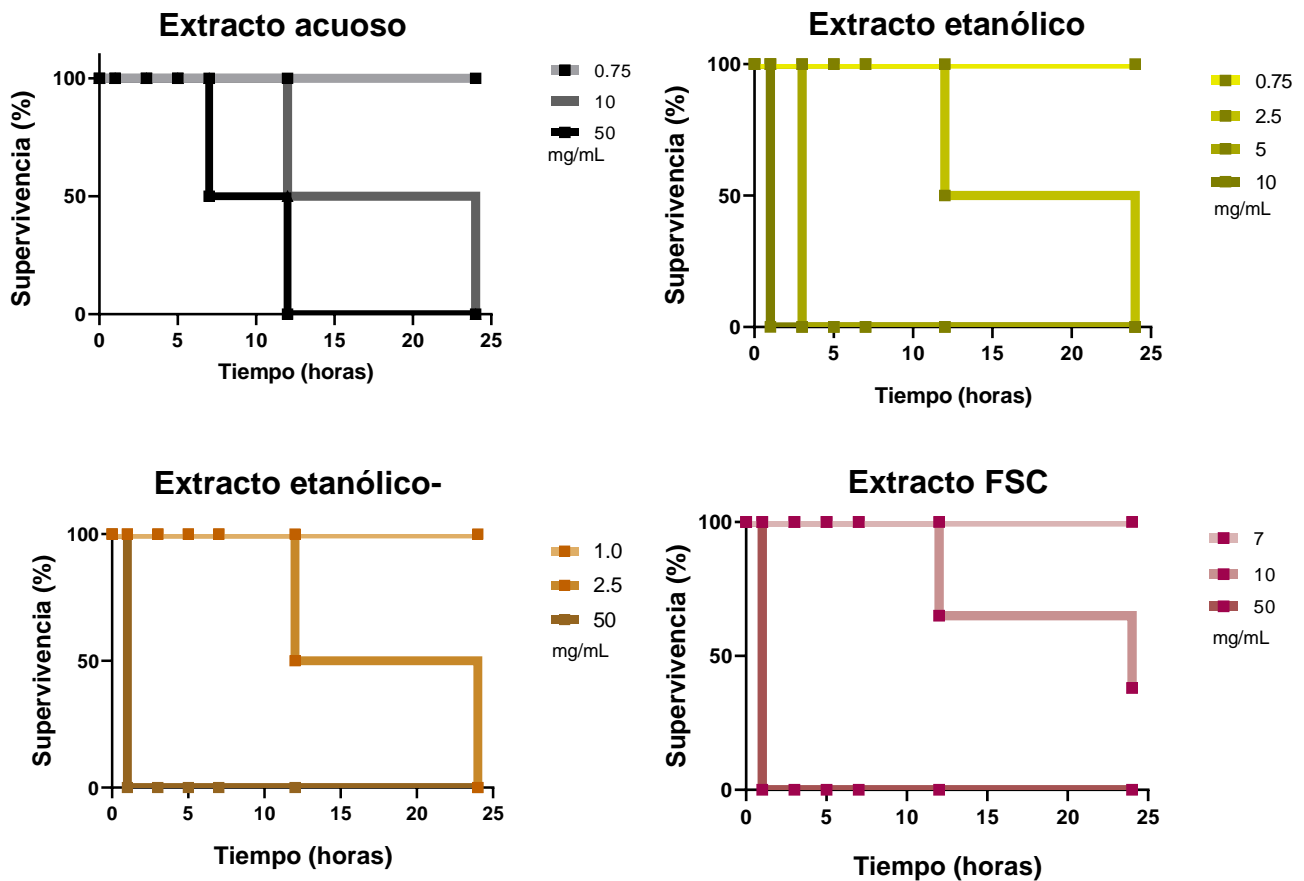


**Figura 11. Embriotoxicidad acumulada hasta las 120 hpf de extractos de hoja de chipilín en embriones de pez cebra.**

#### Prueba de toxicidad aguda en larvas de pez cebra

Para conocer los efectos de una dosis única de los extractos, se evaluó la toxicidad aguda en larvas de 72 hpf al exponer a los individuos a concentraciones

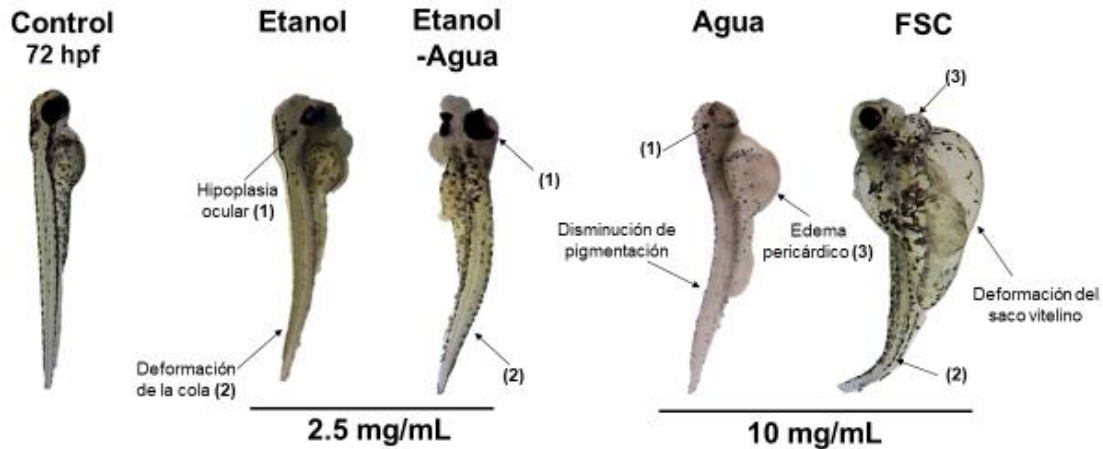
de extractos de hoja de 0.5, 1, 2.5, 5, 7, 10 y 50 mg/L y se evaluaron durante 24 h. En la Figura 12 se observa que la concentración máxima tolerada con el 100% de supervivencia a lo largo de todo el experimento y que no afectó la morfología, latido y circulación sanguínea de la larva es de 0.75 mg/mL para el extracto acuoso y etanólico, 1 mg/mL para el etanólico-acuoso y 7 mg/mL para el de FSC. En comparación con el extracto acuoso y etanólico, el de FSC tiene una tolerancia 10 veces mayor en comparación a los extractos.



**Figura 12. Supervivencia de larvas 72 hpf de pez cebra a los extractos de hoja de chipilín (n=10).**

En la Figura 13 se observan alteraciones en las larvas al exponerlas a una concentración de 2.5 mg/mL del extracto etanólico y etanólico acuoso y de 10 mg/mL para el acuoso y de FSC. Las larvas en su mayoría a las 12 h del experimento presentan una disminución de la supervivencia en un 50% y que

alcanza un 100% de mortalidad al final de experimento a excepción del extracto de FSC (62%) Las concentraciones máximas evaluadas para cada extracto inducen una mortalidad del 100% en las primeras 5 h de evaluación.



**Figura 13. Alteraciones morfológicas a las 12 h de exposición de las larvas de pez cebra a los extractos de hoja de chipilín.**

### **Evaluación de la actividad motora en larvas de pez cebra**

Para constatar el uso etnobiológico del chipilín, se evaluó el comportamiento locomotor de las larvas frente a transiciones de penumbra-luz-penumbra, en presencia de extractos de chipilín (125 µg/mL) desde las 2hpf hasta los 7 dpf. El pez cebra en la condición control tiene un patrón normal de comportamiento que aumenta la distancia recorrida durante las transiciones de penumbra (etapa I y III) y disminuye durante la iluminación (etapa II). Por el contrario, se observa una disminución en ausencia del estímulo luminoso en la etapa I para FSC y I y III para agua/etanol-agua. Esto sugiere un estado sedante en la larva (Figura 14).

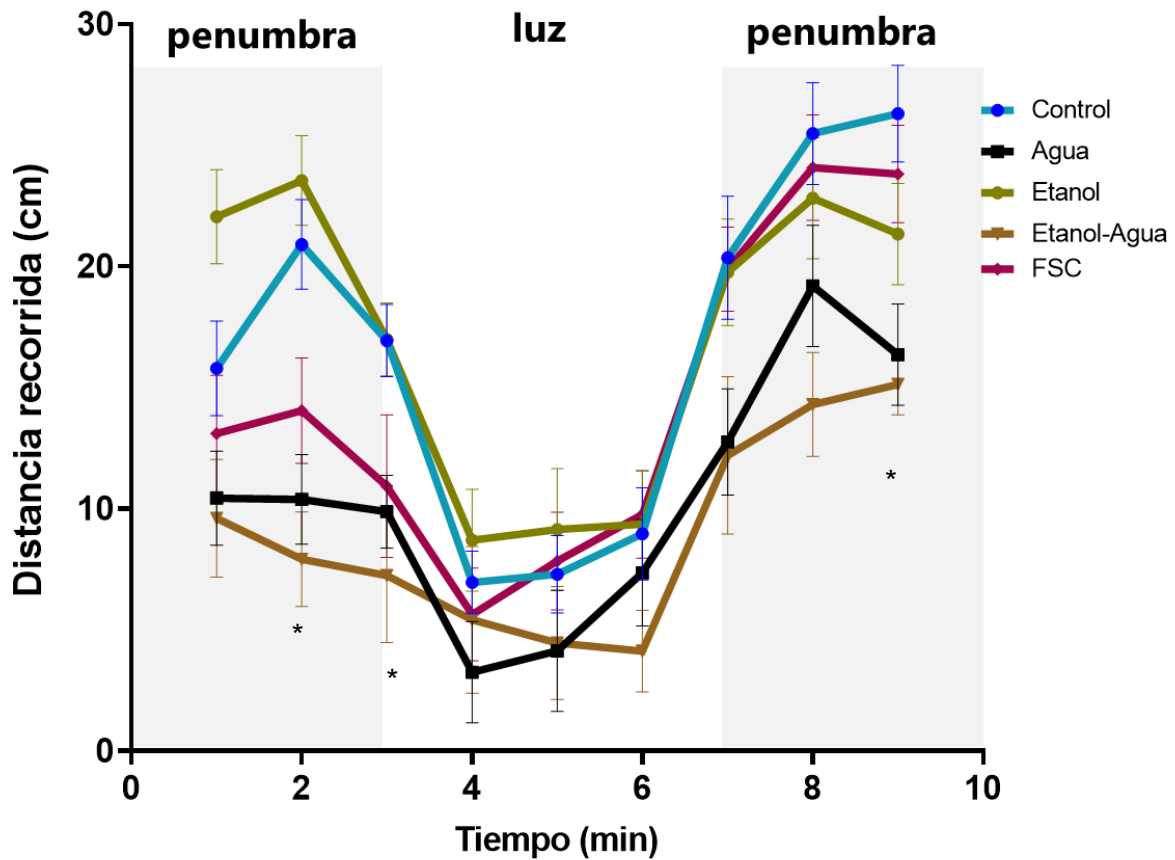
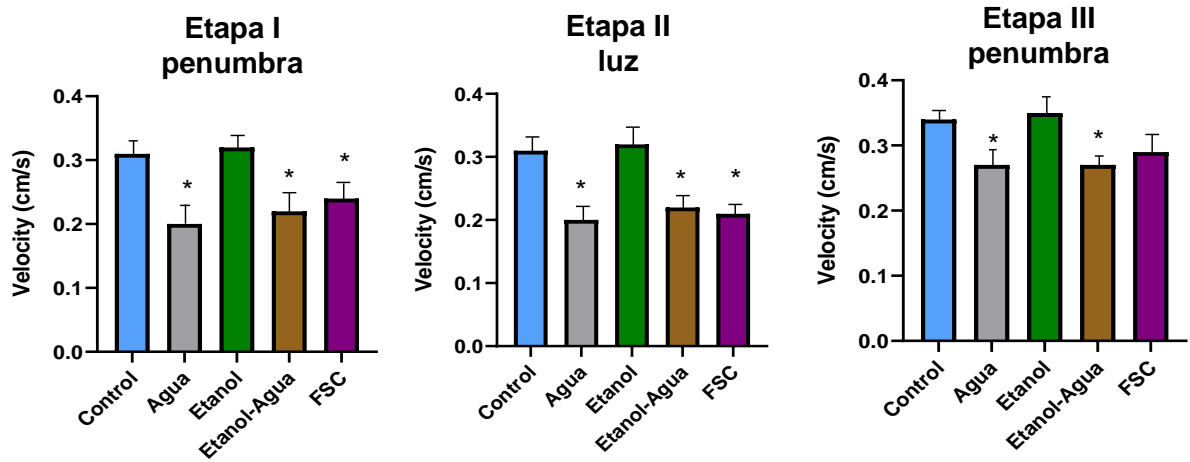


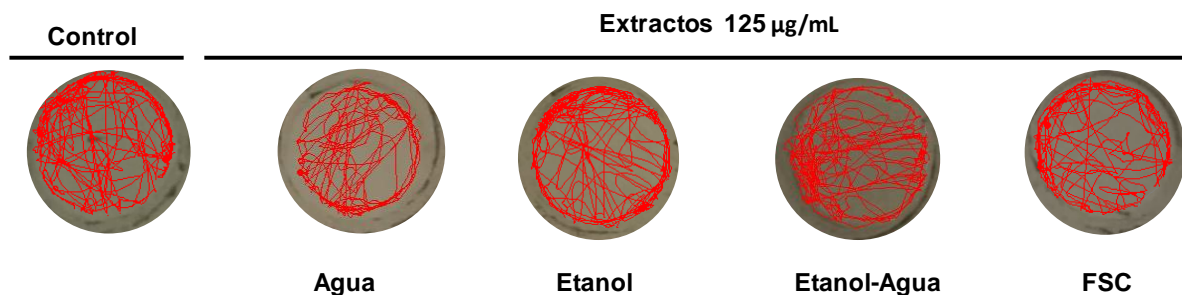
Figura 14. Distancia recorrida (media  $\pm$  SD) a lo largo del tiempo de embriones de pez cebra expuestos a los extractos de chipilín desde las 2hpf hasta los 7dpf.

Además de la distancia, se analizó la velocidad del nado en las larvas (Figura 15). Se observa que la velocidad disminuye (etapa I) en la mayoría de las larvas en estado de sedación. En caso particular del extracto de FSC, la velocidad del nado durante la etapa III es similar a la del control y esto podría indicar la recuperación de la sedación. En cambio, para el extracto acuoso y etanólico-acuoso, el efecto sedante persiste pese a la privación del estímulo luminoso.



**Figura 15. Velocidad del nado durante la evaluación de la actividad motora de larvas expuestas a extractos de hoja de chipilín desde las 2hpf hasta los 7dpf.**

El patrón de movimiento de las larvas (Figura 16) de los grupos tratados son similares al control. Estas variaciones indican un estado sedante que podría atribuirse a la exposición de los extractos y no a una falla en la función cerebral larval, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender a fondo el potencial sedante de las hojas de chipilín.



**Figura 16. Comparación de trayectorias de nado de larvas de 7 dpf de pez cebra expuestas a extractos de hoja de chipilín en la prueba de locomoción.**

# Discusión

## ***Fitoquímicos en extractos de hoja de chipilín***

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se sintetizan en las plantas y poseen propiedades biológicas como la actividad antioxidante (eliminación de radicales libres) (Navarro-Flores *et al.*, 2020). Estos radicales libres se han asociado al envejecimiento prematuro y enfermedades como el cáncer. Los antioxidantes son moléculas muy poderosas para reducir el estrés oxidativo en el cuerpo humano (Mateos-Maces *et al.*, 2020).

El análisis fitoquímico de hojas de chipilín, muestra que los extractos acuosos y etanol-agua presentan el mayor contenido de fenoles. Los fenoles sencillos son solubles en agua y están en la planta en forma de heterósidos. Ambos extractos son ricos en compuestos fenólicos que tienen actividad antioxidante y es probable que la relación que existe entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante sea directamente proporcional, sin embargo, deben realizarse análisis para determinar si es un solo compuesto el que brinda la capacidad antioxidante o la sinergia de los mismos. La sinergia de flavonoides como tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido cítrico ya ha sido reportado (Munguía *et al.*, 2017). El extracto acuoso tiene un contenido de fitoquímicos similar al reportado por Jiménez-Aguilar y Grusak, (2015). Sin embargo, este es el primer trabajo que describe el contenido de fitoquímicos de las fracciones etanólica, etanólica-acuosa y de FSC. Además, el contenido de fitoquímicos es mayor a los documentados para la fracción metanólica.

La solubilidad de los flavonoides depende de la forma en la que se encuentren y del número y clase de sustituyentes: aglicones libres o heterósidos. Los aglicones son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en disolventes orgánicos polares (etanol, metanol). Debido a esto se encuentran en mayor abundancia en los extractos etanólicos. La ligera reducción de la concentración de compuestos fenólicos en el extracto de FSC puede

atribuirse a que la densidad del CO<sub>2</sub> aumenta con la presión y disminuye con la temperatura, y el poder de solvatación del CO<sub>2</sub> aumenta con la densidad y con ello, a densidades más altas, y la adición del cosolvente se podrían haber extraído compuestos de naturaleza polar, con mayor intensidad de la señal y pureza (Pasquel Reátegui *et al.*, 2017).

### ***Perfil de metabolitos***

El uso de técnicas híbridas avanzadas como GC-MS para la identificación de compuestos bioactivos responsables del potencial farmacológico de las plantas, se ha incrementado en las últimas dos décadas debido a sus múltiples ventajas (Basit *et al.*, 2022). En el análisis GC-MS de los extractos de hoja de chipilín, los componentes principales de los extractos etanólicos fueron el fitol, ácido linoleico, oleamida, escualeno, neofitadieno, fitosteroles, palmitoil glicerol, erucamida, metilglucosa y la traquelanthamidina.

En la oleorresina de FSC se identificaron 2 metabolitos únicos, el ácido 2,5-difluorobenzoico (pico 3), al que se le atribuye un potencial bactericida y un derivado benzofurano (pico 4) con actividad antiinflamatoria. Esta actividad antiinflamatoria se evaluó a través de la regulación negativa de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos (Jayasinghe y Jayawardena, 2019).

A los metabolitos identificados se les atribuyen diversas propiedades, por ejemplo, el neofitadieno exhibió una importante actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* en un ensayo de difusión en disco (Ceyhan-Güvensen y Keskin, 2016). En un ensayo in vitro de miocitos de la línea celular de músculo esquelético de rata L6 la metilglucosa aumentó la tasa de transporte de hexosas al incrementar la actividad del transportador GLUT 4 (Shamni *et al.*, 2017). La oleamida administrada de forma periférica en ratones redujo significativamente la latencia del sueño y el tiempo de vigilia, mientras que aumentó el movimiento ocular no rápido y el tiempo total de sueño (Laposky *et al.*, 2001).



El fitol es un alcohol diterpénico acíclico con propiedades antioxidantes. Tiene un efecto anti-inflamatorio y disminuye del estrés oxidativo al inhibir la COX-1 y la COX-2 mediante la supresión de la interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor nuclear kappa B (NF-kB) (Faisal *et al.*, 2022). En la línea celular de monocitos de ratón RAW264.7, el fitol suprimió la generación de ROS y recuperó la expresión de enzimas antioxidantes a través de la regulación del factor de transcripción Nrf2 que regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes (Kim *et al.*, 2022).

El fitol también se asocia en la prevención de enfermedades metabólicas, debido, en parte, a la activación de la heterodimerización del receptor X retinoide alfa (RXRA) con PPAR- $\gamma$ . El fitol en ratones induce menor peso corporal, mayor peso del hígado, hipertrofia hepatocelular, proliferación de peroxisomas, mayor expresión de catalasa y reduce los niveles séricos y hepáticos de triglicéridos, en un 40% y 75%, respectivamente (Olofsson *et al.*, 2014). La acción anticonvulsiva del fitol se demostró en el modelo de ratas de convulsiones inducidas por pilocarpina (parasimpaticomimético) en el que disminuyó las crisis convulsivas tónico-clónicas (de Melo *et al.*, 2019). Se ha propuesto que ejerce su efecto a través de la neurotransmisión GABAérgica y la activación del receptor GABA<sub>A</sub> al unirse a su sitio BZD. El mecanismo anticonvulsivo se confirmó mediante la administración de flumazenil que bloqueó el efecto anticonvulsivo del fitol en el estudio (Zhao *et al.*, 2022).

### ***Ensayo antiadipogénico con la línea celular 3T3-L1***

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa corporal que implica la hipertrofia e hiperplasia de tejido adiposo, conocida como adipogénesis. La adipogénesis es un proceso en el que las células se transforman de preadipocitos a adipocitos a través de un cambio morfológico y bioquímico (Prashar y Patel, 2020; Lim *et al.*, 2021) que conduce a diversas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y la hipertensión (Dincer y Yuksel, 2021; Udomwasinakun, Pirak y Chanput, 2022).

La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 es uno de los modelos *in vitro* más utilizado para estudiar la adipogénesis. La exposición de las células a una combinación de insulina, glucocorticoides y un inductor de la señalización de cAMP desencadena la adipogénesis y modifica la expresión de cientos de genes incluidos diversos factores de transcripción (Kumkarnjana *et al.*, 2018; Haj *et al.*, 2020).

Los compuestos bioactivos derivados de plantas como los polifenoles, los flavonoides y los terpenoides tienen un potencial para inhibir la adipogénesis. Pueden inhibir el desarrollo del tejido adiposo al inhibir la diferenciación de preadipocitos, promover la lipólisis e inducir la apoptosis de los adipocitos existentes (Moreno-Valdespino *et al.*, 2020; Guru *et al.*, 2021). Por lo tanto, la identificación de fitoquímicos que disminuyan la proliferación y la adipogénesis en la etapa temprana de la diferenciación de los adipocitos podrían prevenir o tratar la obesidad y, a su vez, la diabetes tipo 2 (Yu *et al.*, 2013; Pucci *et al.*, 2022). Este trabajo proporciona la primera evidencia *in vitro* de la actividad antiadipogénica en células 3T3-L1 de los extractos de hoja de chipilín, cuya acción podría atribuirse a algunos de los metabolitos identificados como el fitol, metilglucosa y la vitamina E cuya propiedad antidiabética se ha reportado.

Durante la diferenciación celular se obtuvo la misma concentración mínima efectiva para el extracto etanólico-acuoso y de FSC (1 µg/mL) y aunque la cuantificación de fitoquímicos por métodos espectrofotométricos fue mayor para los extractos obtenidos por maceración, la oleorresina de FSC tuvo la misma potencia para disminuir la acumulación de lípidos durante y después de la diferenciación celular.

Aún queda pendiente determinar los cambios en la expresión transcripcional de marcadores de diferenciación por RT-PCR y el análisis LC-MS para la identificación de compuestos diferenciales que desencadenan el efecto observado. No está claro cuánto de la cantidad de compuestos bioactivos se absorbe y desencadena la actividad biológica esperada. La comprensión de sus fases de absorción, metabolismo y eliminación necesita ser estudiada (Boudreau *et al.*, 2019).

### ***El pez cebra como modelo de estudio: evaluación de embriotoxicidad***

El pez cebra se ha constituido como un modelo estándar para la evaluación de biomoléculas con potencial interés farmacológico. Esto se debe a que el análisis filogenético de los genomas humanos y de peces muestran una morfología y fisiología similares de los sistemas nervioso, cardiovascular y digestivo (Chahardehi, Arsad and Lim, 2020).

En este trabajo evaluamos la toxicidad crónica y aguda de los extractos de hoja de chipilín en el modelo del pez cebra. Para la toxicidad aguda se determinó que el extracto acuoso presentó el mayor grado de toxicidad y el de FSC el menor. Las concentraciones máximas toleradas para los extractos en la toxicidad crónica son menores a las alcanzadas en la evaluación de toxicidad aguda. Ramos y colaboradores evaluaron la toxicidad aguda de un extracto hidroalcohólico de chilca (*Baccharis dracunculifolia*) en larvas de 8 dpf; a partir de 0.20 mg/mL la mortalidad era del 25% hasta alcanzar un 100% a una concentración de  $\geq 1$  mg/mL, presentando una tolerancia menor en comparación a las concentraciones evaluadas en este trabajo.

Generalmente los estudios de toxicidad en el modelo del pez cebra se realizan durante los primeros días 5 a 7 días del desarrollo embrionario y son pocos los estudios que evalúan la toxicidad durante el estadio larvario. No hay reportes de una evaluación concomitante de toxicidad aguda y crónica, los cuales son de gran importancia ya que, por lo menos en este trabajo, hay mayor tolerancia a concentraciones altas de los extractos y menor toxicidad cuando se exponen en dosis única al organismo completamente desarrollado. Es por esto que es importante ampliar los ensayos toxicológicos para garantizar un aprovechamiento adecuado de los compuestos bioactivos de plantas.

El efecto de toxicidad de los extractos fue dosis dependiente y el extracto acuoso presentó mayores efectos tóxicos a una concentración menor. Esto podría ser atribuible al efecto sinérgico de metabolitos presentes en esta fracción. Uno de ellos que se encuentra en mayor proporción es la traquelanthamidina que se le han atribuido efectos carcinogénicos y hepatotóxicos, sin embargo en otros

reportes se considera un metabolito inocuo (David *et al.*, 2022). Es importante el fraccionamiento de los extractos vegetales para determinar si el efecto toxicológico es efecto de la sinergia de metabolitos o de uno en particular.

De igual manera, observamos una diferencia en las concentraciones toleradas en los ensayos de toxicidad celular obtenida por el método del MTT (1000 µg /mL) en comparación con el ensayo de toxicidad crónica con embriones (125 µg/mL), las concentraciones en el ensayo de toxicidad aguda fueron similares a las del método del MTT (750 – 1000 µg /mL), esto probablemente atribuible a que cuando se realiza el ensayo celular, la confluencia y maduración de las células es máxima, al igual que el ensayo en larvas. Braunbeck *et al.* (2014) mencionan que los ensayos en cultivos celulares muestran una subestimación de la toxicidad en comparación con los ensayos en embriones de peces hasta de tres órdenes de magnitud. Además, como el método MTT mide la viabilidad celular en términos de actividad reductora de enzimas mitocondriales en células metabólicamente activas (Ghasemi *et al.*, 2021), existen limitaciones del método que pueden conducir a resultados falsos positivos cuando se evalúan con fitoquímicos con potencial reductor intrínseco como antioxidantes y polifenoles (Iqbal *et al.*, 2022). Una alternativa es seleccionar líneas celulares derivadas de tejidos que reflejen el sitio y el modo de acción del objeto de estudio y de esta manera, que las condiciones se parezcan más a la exposición *in vivo*. Con base en estas recomendaciones, Tanneberger *et al.* (2013) demostraron una muy buena correlación entre las concentraciones efectivas observadas en una línea de células branquiales de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (RTgill-W1) y las concentraciones letales agudas en peces.

### ***Ensayos de locomoción en larvas del pez cebra***

El pez cebra es un modelo importante para la investigación de sustancias psicoactivas porque su estructura cerebral, neuroquímica (Nadig *et al.* 2020) y el patrón de sueño/vigilia, es similar al de los humanos (de Melo *et al.*, 2019). Los receptores del ácido gamma-aminobutírico tipo A (GABAA) son los receptores inhibitorios más importantes en el sistema nervioso central (SNC) (Gwedela *et al.*,

2022). Se ha demostrado que la activación de la neurotransmisión GABA-érgica es responsable de disminución del nivel de ansiedad y provoca cambios en las subunidades  $\alpha 1$  y  $2$  de este receptor (Guedes *et al.*, 2023). Esto lo convierte en un blanco principal de la mayoría de los fármacos anestésicos (Szaszkiwicz *et al.* 2021) como las benzodiazepinas (BZD), que modifican alostéricamente la activación del canal de cloruro de GABAA y aumentan su sensibilidad al ligando endógeno (Mundy *et al.*, 2021). Sus principales efectos terapéuticos son la sedación, la hipnosis, la disminución de la ansiedad, la amnesia anterógrada, la relajación muscular central y la actividad anticonvulsiva (Silveira, Santos Rubio y Poletti Martucci, 2022).

En el pez cebra, las variaciones en la locomoción y tigmotaxis son parámetros indicativos de los niveles de ansiedad (Maphanga *et al.*, 2020). Se han propuesto ensayos de comportamiento con larvas de pez cebra que se exponen a transiciones luz-oscuridad para evaluar el efecto de moléculas psicoactivas (Cueto-Escobedo *et al.*, 2022). Durante la transición luz-oscuridad aumenta la actividad locomotora y se atribuye a la elevación del nivel de estrés/ansiedad, mientras que la transición oscuridad-luz disminuye la locomoción (Hill *et al.*, 2005). Se ha reportado que el tratamiento del pez cebra con BZD aumenta la actividad exploratoria en campo abierto, tiene un efecto sedante y disminuye la actividad locomotora (Johnson *et al.*, 2022). Se ha intensificado la búsqueda de moléculas de la medicina tradicional que tengan efectos sedantes (Gressler *et al.*, 2021). Nuestros resultados muestran que el extracto de chipilín obtenido por FSC tiene un efecto sedante parcial, ya que posterior a la exposición al estímulo luminoso (etapa III), su comportamiento es similar al control. El fenotipo sedante total de los extractos acuoso y etanólico-acuoso permanece a lo largo de todo el experimento donde hay una disminución de la actividad motora y velocidad de nado. Se ha descrito la actividad anticonvulsivante de numerosos fitoconstituyentes identificados en los extractos de plantas como el fitol, oleamida, erucamida ácidos fenólicos ácido p-cumárico (Espino-Saldaña *et al.*, 2020b; Widelski *et al.*, 2021) los cuales se unen selectivamente al receptor GABAA y probablemente estén involucrados en el efecto sedante de los extractos. Estos metabolitos pueden

actuar como anticonvulsivos debido a su alta lipofilia que les facilita la penetración a través de la barrera hematoencefálica (Cao *et al.*, 2019; Mendes Hacke *et al.*, 2020). Sin embargo, pese a que nuestros resultados coinciden con el uso etnofarmacológico de esta planta medicinal en la tradición popular, se deben realizar estudios para dilucidar los mecanismos de acción e investigar la participación de otros receptores en el efecto sedante de los extractos. Además, hay que establecer si la sinergia entre los fitoquímicos podría ser, en parte, responsable del efecto sedante, o si se atribuye a un compuesto en particular. También hay que analizar el efecto que tiene tiempo de exposición a las moléculas bioactivas, la concentración utilizada, toxicidad y la restauración total o parcial de la sedación al modificar estos factores.

# Conclusiones

La oleorresina de FSC de hoja de chipilín tiene la misma potencia que los extractos obtenidos por maceración, para contrarrestar el desarrollo del fenotipo de adipocito maduro en la línea celular 3T3-L1 y la disminución de la acumulación de gotas lipídicas.

La oleorresina de FSC tuvo el mayor número de compuestos identificados por GC-MS, así como mayor intensidad de respuesta y pureza.

La oleorresina de FSC tiene el menor impacto en la toxicidad celular y embrionaria.

Las larvas de pez cebra expuestas a la oleorresina de FSC en el ensayo de locomoción, muestran un fenotipo de sedación parcial y el extracto acuoso y etanólico acuoso un fenotipo total de sedación.

# Prospectivas

- Identificación de compuestos no volátiles por cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (UPLC/MS-QTOF-SYNAPT).
- Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa de los marcadores de diferenciación de la línea celular 3T3-L1 durante el ensayo antioadipogénico.
- Evaluación de marcadores moleculares involucrados en el fenotipo sedante en la locomoción de larvas de pez cebra.



## Referencias

- De Aguiar, A. C. *et al.* (2016) 'Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions', *Journal of Supercritical Fluids*, 112, pp. 37–43. doi: 10.1016/j.supflu.2016.02.009.
- Alafiatayo, A. A. *et al.* (2019) 'Teratogenic Effects of Curcuma longa Extract on Zebrafish ( Danio rerio )', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, pp. 1–2.
- Alkan, C., Coe, P. y Eichler, E. (2011) 'Locomotor behaviors in zebrafish (Danio rerio larvae)', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.beproc.2010.12.003.Locomotor.
- Arumugham, T. *et al.* (2021) 'Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications – A review', *Chemosphere*, 271. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129525.
- Audira, G. *et al.* (2020) 'Evaluation of the adverse effects of chronic exposure to donepezil (An acetylcholinesterase inhibitor) in adult zebrafish by behavioral and biochemical assessments', *Biomolecules*, 10(9), pp. 1–24. doi: 10.3390/biom10091340.
- Basit, A. *et al.* (2022) 'Chemical profiling of Justicia vahlii Roth. (Acanthaceae) using UPLC-QTOF-MS and GC-MS analysis and evaluation of acute oral toxicity, antineuropathic and antioxidant activities', *Journal of Ethnopharmacology*, 287, p. 114942. doi: 10.1016/j.jep.2021.114942.
- Blainski, A., Lopes, G. C. y De Mello, J. C. P. (2013) 'Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L.', *Molecules*, 18(6), pp. 6852–6865. doi: 10.3390/molecules18066852.
- Boudreau, A. *et al.* (2019) 'Distinct fractions of an Artemisia scoparia extract contain compounds with novel adipogenic bioactivity', *Frontiers in Nutrition*, 6(March), pp. 1–13. doi: 10.3389/fnut.2019.00018.
- Braunbeck, T. *et al.* (2014) 'The fish embryo test (FET): origin, applications, and future', *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), pp. 16247–16261. doi:

10.1007/s11356-014-3814-7.

- Cáceres, A. y Cruz, S. M. (2019) 'Edible seeds, leaves and flowers as Maya Super Foods: Function and composition', *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 6(1), pp. 2–2. doi: 10.15171/ijpni.2019.02.
- Camarillo-Castillo, F. y Mangan, F. X. (2020) 'Biological nitrogen fixation in chipilin (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a sustainable nitrogen source for commercial production', *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 26(2), pp. 125–141. doi: 10.5154/R.RCHSH.2020.01.002.
- Cao, Y. *et al.* (2019) 'Flumazenil-insensitive benzodiazepine binding sites in GABAA receptors contribute to benzodiazepine-induced immobility in zebrafish larvae', *Life Sciences*, 239(October), p. 117033. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117033.
- Cassar, S. *et al.* (2020) 'Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology', *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), pp. 95–118. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335.
- Castañeda Najarro, B. C. (2017) *Aspectos químicos y bioactivos de dos matrices naturales originarias de El Salvador: "chipilín" y "tenquique"*. Universidad de Salamanca. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/14770>.
- Ceyhan-Güvensen, N. y Keskin, D. (2016) 'Chemical content and antimicrobial properties of three different extracts of *Mentha pulegium* leaves from Mugla Region, Turkey.', *Journal of environmental biology*, 37(6), pp. 1341–46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29261270>.
- Chahardehi, A. M., Arsad, H. y Lim, V. (2020) 'Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants', *Plants*, 9(10), pp. 1–35. doi: 10.3390/plants9101345.
- Chayaratanasin, P. *et al.* (2019) 'Clitoria ternatea Flower Petal Extract Inhibits Adipogenesis and Lipid Accumulation in 3T3-L1 Preadipocytes by Downregulating Adipogenic Gene Expression', *Molecules*, 24(10). doi: 10.3390/molecules24101894.
- Chen, L. *et al.* (2018) 'Comparative cardio and developmental toxicity induced by the popular medicinal extract of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. detected using a zebrafish Tuebingen embryo model', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12906-018-2303-9.

- Chen, Z. *et al.* (2020) 'Effects of tenuifolin on rest/wake behaviour in zebrafish', *Experimental and Therapeutic Medicine*, pp. 2326–2334. doi: 10.3892/etm.2020.8476.
- Čižmek, L. *et al.* (2021) 'Supercritical carbon dioxide extraction of four medicinal mediterranean plants: Investigation of chemical composition and antioxidant activity', *Molecules*, 26(18), pp. 1–18. doi: 10.3390/molecules26185697.
- Córdova-Ballona, L. *et al.* (2022) 'Insectos asociados a *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Fabales: fabaceae) en La Chontalpa, Tabasco, México', *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.30973/aap/2022.8.0081002.
- Cruz-Rodríguez, R. I. *et al.* (2017) 'Antifungal activity of *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. extracts against phytopathogen fungi from maize', *Gayana. Botánica*, 74(ahead), pp. 0–0. doi: 10.4067/s0717-66432017005000102.
- Cruz-Rodríguez, R. I. *et al.* (2020) 'Potential application of *crotalaria longirostrata* branch extract to reduce the severity of disease caused by fusarium', *Agronomy*, 10(4). doi: 10.3390/agronomy10040524.
- Cueto-Escobedo, J. *et al.* (2022) 'Zebrafish as a Useful Tool in the Research of Natural Products With Potential Anxiolytic Effects', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15(January), pp. 1–11. doi: 10.3389/fnbeh.2021.795285.
- Curpăn, A. S. *et al.* (2022) 'A Mini-Review Regarding the Modalities to Study Neurodevelopmental Disorders-Like Impairments in Zebrafish—Focussing on Neurobehavioural and Psychological Responses', *Brain Sciences*, 12(9), p. 1147. doi: 10.3390/brainsci12091147.
- David, J. *et al.* (2022) 'Systematic review of the phytochemical compounds use of *Heliotropium indicum* taking advantage of its advantage in modern medicine', 9(5), pp. 132–136. doi: 10.15406/jabb.2022.09.00300.
- Dincer, Y. y Yuksel, S. (2021) 'Antiobesity effects of phytochemicals from an epigenetic perspective', *Nutrition*, 84. doi: 10.1016/j.nut.2020.111119.
- Espino-Saldaña, A. E. *et al.* (2020a) 'Temporal and spatial expression of zebrafish *mctp* genes and evaluation of frameshift alleles of *mctp2b*', *Gene*, 738(September 2019). doi: 10.1016/j.gene.2020.144371.
- Espino-Saldaña, A. E. *et al.* (2020b) 'Temporal and spatial expression of zebrafish *mctp*

genes and evaluation of frameshift alleles of mctp2b', *Gene*, 738(January). doi: 10.1016/j.gene.2020.144371.

Evangeline, B. *et al.* (2018) 'Non-toxic and non teratogenic extract of Thuja orientalis L. inhibited angiogenesis in zebra fish and suppressed the growth of human lung cancer cell line', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(May), pp. 699–706. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.010.

Faisal, Z. *et al.* (2022) 'Phytochemical profile and food applications of edible flowers: A comprehensive treatise', *Journal of Food Processing and Preservation*, (July), pp. 1–15. doi: 10.1111/jfpp.17061.

Fornereto Soldan, A. C. *et al.* (2021) 'Supercritical fluid extraction of oleoresin from Capsicum annum industrial waste', *Journal of Cleaner Production*, 297. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.126593.

Friday, A. *et al.* (2022) 'Phytochemical, anti nutrient, invitro-protein digestibility and functional properties of (Balanites aegyptiaca (L.) Delile) Aduwa protein meals, Protein Concentrate and Isolate', *Food Therapy and Health Care*, 4(2), p. 10. doi: 10.53388/fthc20220501010.

Gad, S. C. (2011) *Drug Safety Evaluation, Drug Safety Evaluation*. doi: 10.1002/9780470464151.

Gallo, M. (2022) 'Bioactive Compounds from Various Sources: Beneficial Effects and Technological Applications', *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(18). doi: 10.3390/app12188955.

Gandhi, K., Arora, S. y Kumar, A. (2017) 'Industrial applications of supercritical fluid extraction: A review Industrial applications of supercritical fluid extraction: A review', *International Journal of Chemical Studies*, 5(3), pp. 336–340.

García-Campoy, A. H. y Barba de la Rosa, A. P. (2022) 'Extracción por fluidos supercríticos: una alternativa verde', *Saber más*, 63.

Ghasemi, M. *et al.* (2021) 'The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). doi: 10.3390/ijms222312827.

Gressler, L. T. *et al.* (2021) 'Behavioral and histological features of zebrafish following sedation with eugenol or propofol', *Applied Animal Behaviour Science*,

244(September), p. 105482. doi: 10.1016/j.applanim.2021.105482.

- Guedes, J. M. *et al.* (2023) 'Anxiolytic-like Effect in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) through GABAergic System and Molecular Docking Study of Chalcone (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one', *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(1), pp. 1–10. doi: 10.33263/BRIAC131.015.
- Guru, A. *et al.* (2021) 'Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds', *Molecular Biology Reports*, 48(1), pp. 743–761. doi: 10.1007/s11033-020-06036-8.
- Gwedela, M. N. V. *et al.* (2022) 'Anti-seizure effects of medicinal plants in Malawi on pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish larvae', *Journal of Ethnopharmacology*, 284(October 2021), p. 114763. doi: 10.1016/j.jep.2021.114763.
- Haj, G. Al *et al.* (2020) 'A new selective ppar $\gamma$  modulator inhibits triglycerides accumulation during murine adipocytes' and human adipose-derived mesenchymal stem cells differentiation', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), pp. 1–22. doi: 10.3390/ijms21124415.
- Haldi, M. *et al.* (2012) 'Assessment in Zebrafish', (1).
- Hallare, A. *et al.* (2006) 'Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), pp. 378–388. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.07.006.
- Hamuel, J. (2012) 'Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents', *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, pp. 1–33. doi: 10.5772/26052.
- von Hellfeld, R. *et al.* (2020) 'Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos', *Environmental Sciences Europe*, 32(1). doi: 10.1186/s12302-020-00398-3.
- Hermesen, S. A. B. *et al.* (2011) 'Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies', *Toxicology in Vitro*, 25(3), pp. 745–753. doi: 10.1016/j.tiv.2011.01.005.
- Hill, A. J. *et al.* (2005) 'Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity',

- Toxicological Sciences*, 86(1), pp. 6–19. doi: 10.1093/toxsci/kfi110.
- Howe, K. *et al.* (2013) 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*, 496(7446), pp. 498–503. doi: 10.1038/nature12111.
- Hrnčič, M. K. *et al.* (2020) 'Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An overview-phytochemical profile, isolation methods, and application', *Molecules*, 25(1). doi: 10.3390/molecules25010011.
- Hwang, J. M. *et al.* (2021) 'Agastache rugosa extract and its bioactive compound tilianin suppress adipogenesis and lipogenesis on 3t3-L1 cells', *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(16). doi: 10.3390/app11167679.
- Iqbal, Y. *et al.* (2022) 'Extraction and characterization of polyphenols from non-conventional edible plants and their antioxidant activities', *Food Research International*, 157(April), p. 111205. doi: 10.1016/j.foodres.2022.111205.
- Jayasinghe, C. D. y Jayawardena, U. A. (2019) 'Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. doi: 10.1155/2019/7272808.
- Jiménez-Aguilar, D. M. y Grusak, M. A. (2015) 'Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables', *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), pp. 357–364. doi: 10.1007/s11130-015-0512-7.
- Johnson, A. *et al.* (2022) 'Effects of super-class cannabis terpenes beta-caryophyllene and alpha-pinene on zebrafish behavioural biomarkers', *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-022-21552-2.
- Jomaa, B. *et al.* (2014) 'Developmental toxicity of thyroid-active compounds in a zebrafish embryotoxicity test', *Altex*, 31(3), pp. 303–317. doi: 10.14573/altex.1402011.
- Kim, H. J. *et al.* (2022) 'Bioactive Phytochemicals from *Salix pseudolasiogyne* Twigs: Anti-Adipogenic Effect of 2'-O-Acetylsalicortin in 3T3-L1 Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). doi: 10.3390/ijms231912006.
- Kim, K. S. *et al.* (2020) 'Comparative Efficacy of Lobeglitazone Versus Pioglitazone on Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus', *Diabetes Therapy*. doi: 10.1007/s13300-020-00948-1.
- Knez, Ž. *et al.* (2019) 'Are supercritical fluids solvents for the future?', *Chemical*

- Engineering and Processing - Process Intensification*, 141(December 2018). doi: 10.1016/j.cep.2019.107532.
- Kumkarnjana, S. *et al.* (2018) 'Anti-adipogenic effect of flavonoids from *Chromolaena odorata* leaves in 3T3-L1 adipocytes', *Journal of Integrative Medicine*, 16(6), pp. 427–434. doi: 10.1016/j.joim.2018.10.002.
- Laposky, A. D. *et al.* (2001) 'Deletion of the GABAA receptor  $\beta$ 3 subunit eliminates the hypnotic actions of oleamide in mice', *Neuroreport*, 12(18), pp. 4143–4147. doi: 10.1097/00001756-200112210-00056.
- Lee, T. H. *et al.* (2022) 'Comparison of extraction methods of phytochemical compounds from white flower variety of *Melastoma malabathricum*', *South African Journal of Botany*, 148, pp. 170–179. doi: 10.1016/j.sajb.2022.04.026.
- Li, R. *et al.* (2021) 'Advances in supercritical carbon dioxide extraction of bioactive substances from different parts of *Ginkgo biloba* L.', *Molecules*, 26(13), pp. 1–16. doi: 10.3390/molecules26134011.
- Licitra, R. *et al.* (2021) 'In vivo evaluation of cannabis sativa full extract on zebrafish larvae development, locomotion behavior and gene expression', *Pharmaceuticals*, 14(12). doi: 10.3390/ph14121224.
- Lim, S. H. *et al.* (2021) 'Antidiabetic flavonoids from fruits of *Morus alba* promoting insulin-stimulated glucose uptake via akt and amp-activated protein kinase activation in 3t3-l1 adipocytes', *Pharmaceutics*, 13(4). doi: 10.3390/pharmaceutics13040526.
- Liu, X. *et al.* (2016) 'Effects of diphenylhydantoin on locomotion and thigmotaxis of larval zebrafish', *Neurotoxicology and Teratology*, 53, pp. 41–47. doi: 10.1016/j.ntt.2015.11.008.
- López, H. L. *et al.* (2022) 'Methanolic extract of *Crotalaria longirostrata*: Identification of secondary metabolites and insecticidal effect', *Scientia Agropecuaria*, 13(1), pp. 71–78. doi: 10.17268/SCI.AGROPECU.2022.007.
- Manzanero-Medina, G. I. *et al.* (2020) 'Ethnobotany of food plants (quelites) sold in two traditional markets of Oaxaca, Mexico', *South African Journal of Botany*, 130, pp. 215–223. doi: 10.1016/j.sajb.2020.01.002.
- Maphanga, V. B. *et al.* (2020) 'Screening selected medicinal plants for potential anxiolytic activity using an in vivo zebrafish model', *Psychopharmacology*, 237(12), pp.

3641–3652. doi: 10.1007/s00213-020-05642-5.

- Martinez-Mayorga, K. *et al.* (2017) 'Toxicity Assessment of Structurally Relevant Natural Products from Mexican Plants with Antinociceptive Activity', *Journal of the Mexican Chemical Society*, 61(3), pp. 186–196. doi: 10.29356/jmcs.v61i3.344.
- Martinez-Villaluenga, C. *et al.* (2010) 'Peptides from purified soybean  $\beta$ -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain', *FEBS Journal*, 277(6), pp. 1481–1493. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07577.x.
- Martínez Muñoz, A. B. (2012) *Hierba Mora, Chipilín, Jícama y Bledo: para alimentarse con calidad y economía*. Guatemala: Consejo Superior Universitario Centroamericano.
- Mateos-Maces, L. *et al.* (2020) 'Edible leafy plants from Mexico as sources of antioxidant compounds, and their nutritional, nutraceutical and antimicrobial potential: A review', *Antioxidants*, 9(6), pp. 1–24. doi: 10.3390/antiox9060541.
- de Melo, N. C. *et al.* (2019) 'Anxiolytic and antidepressant effects of the hydroethanolic extract from the leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) moldenke: A study on zebrafish (*Danio rerio*)', *Pharmaceuticals*, 12(3). doi: 10.3390/ph12030106.
- Mendes Hacke, A. C. *et al.* (2020) 'Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*)', *Journal of Ethnopharmacology*, 260(April), p. 113036. doi: 10.1016/j.jep.2020.113036.
- Mendez-Trujillo, V. *et al.* (2022) 'Insecticidal Effect of Green Bimetallic Nanoparticles from *Crotalaria longirostrata* on Cotton Mealybug, *Phenacoccus solenopsis*', *Journal of Renewable Materials*, 10(10), pp. 2543–2552. doi: 10.32604/jrm.2022.020965.
- Mopuri, R. e Islam, M. S. (2017) 'Medicinal plants and phytochemicals with anti-obesogenic potentials: A review', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, pp. 1442–1452. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.108.
- Moreno-Valdespino, C. A. *et al.* (2020) 'Bioactive proteins and phytochemicals from legumes: Mechanisms of action preventing obesity and type-2 diabetes', *Food Research International*, 130(February 2019). doi: 10.1016/j.foodres.2019.108905.
- Mundy, P. C. *et al.* (2021) 'The efficacy of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABA AR) subtype-selective positive allosteric modulators in blocking tetramethylenedisulfotetramine (TETS)-induced seizure-like behavior in larval



zebrafish with minimal sedation', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 426(July). doi: 10.1016/j.taap.2021.115643.

Munguía, A. R. *et al.* (2017) 'Propiedades antioxidantes de infusiones de neem (Azadirachta indica) encapsuladas con proteína de soya Antioxidant properties of neem (Azadirachta indica) infusions encapsulated with soy protein', *Issn 2007 - 0705*, 18(1), pp. 167–185.

Murugesu, S. *et al.* (2019) 'Toxicity study on Clinacanthus nutans leaf hexane fraction using Danio rerio embryos', *Toxicology Reports*, 6(February), pp. 1148–1154. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.10.020.

Nadig, A. *et al.* (2020) 'Locomotor Activities of Adult Zebrafish (Danio rerio) Under the Influence of Pranic Energy: Controlled Study', *International Journal of Lakes and Rivers*, 13(1), pp. 43–55. Disponible en: <http://www.ripublication.com/ijlr.htm>.

Nair, S. S., Kavrekar, V. y Mishra, A. (2013) 'Evaluation of In Vitro Anti diabetic Activity of Selected Plant Extracts', *International Journal of Pharmaceutical Science Invention ISSN*, 2(4), pp. 12–19. Disponible en: [www.ijpsi.org](http://www.ijpsi.org).

Navarro-Flores, M. J. *et al.* (2020) 'Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials', *Journal of Food Science and Technology*, 57(11), pp. 4111–4122. doi: 10.1007/s13197-020-04447-w.

OECD (2006) 'Oecd Guideline for the Testing of Chemicals', 2006, pp. 1–11.

Olofsson, P. *et al.* (2014) 'Phytol: A Chlorophyll Component with Anti-inflammatory and Metabolic Properties', in *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 345–359. doi: 10.1007/978-94-017-8953-0\_13.

Orellana-Paucar, A. M. *et al.* (2012) 'Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of Curcuma longa in zebrafish and mouse seizure models', *Epilepsy and Behavior*, 24(1), pp. 14–22. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.02.020.

Organización Mundial de la Salud (2022) *Over one billion obese people globally, health crisis must be reversed*.

Oshadie, G. *et al.* (2017) 'Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants', ~ 29 ~ *American Journal of Essential*

*Oils and Natural Products*, 5(2), pp. 29–32.

- Pasquel Reátegui, J. L. *et al.* (2017) 'Production of Copaiba oleoresin particles from emulsions stabilized with modified starches', *Industrial Crops and Products*, 108(May), pp. 128–139. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.06.027.
- Patra, S. y Nithya, S. (2015) 'Review of Medicinal Plants for Anti-Obesity Activity', *Translational Biomedicine*, 6(3), pp. 1–22. doi: 10.21767/2172-0479.100021.
- Peña-Valdivia, C. B. *et al.* (2022) 'Componentes del rendimiento de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en Guerrero, México', *Polibotánica*, 0(54), pp. 101–121. doi: 10.18387/polibotanica.54.7.
- Pohl, J. *et al.* (2019) 'Embryotoxicity of ozonated diclofenac, carbamazepine, and oxazepam in zebrafish (*Danio rerio*)', *Chemosphere*, 225, pp. 191–199. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.034.
- Prashar, Y. y Patel, N. J. (2020) 'An in vitro approach to evaluate the anti-adipogenic effect of *Myrica nagi* Thunb. Fruit extract on 3T3-L1 adipocyte cell line', *Obesity Medicine*, 18(February). doi: 10.1016/j.obmed.2020.100228.
- Pucci, M. *et al.* (2022) 'Different Seasonal Collections of *Ficus carica* L. Leaves Diversely Modulate Lipid Metabolism and Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes', *Nutrients*, 14(14). doi: 10.3390/nu14142833.
- Ramos, T. R. *et al.* (2020) 'Sobrevivência de larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) expostas ao extrato hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia*', *Research, Society and Development*, 9(9), p. e634997853. doi: 10.33448/rsd-v9i9.7853.
- Randhawa, M. A. *et al.* (2015) 'Green leafy vegetables: a health promoting source', in *Handbook of fertility*. Academic Press, pp. 205–220.
- Rex, G. C. *et al.* (2014) 'Activities of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation', *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(33), pp. 1040–1050. doi: 10.5897/jmpr2014.5488.
- Rivas Larios, J. A. J. (2014) *Determinación nutricional y calidad proteica de dietas a base de maíz y frijol complementadas con tres plantas autóctonas de Guatemala (chipilín, hierbamora y bleado)*. Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias de la Salud.
- Robea, M. A. *et al.* (2021) 'Preliminary results regarding sleep in a zebrafish model of

- autism spectrum disorder', *Brain Sciences*, 11(5). doi: 10.3390/brainsci11050556.
- Rodríguez-Campos, F. *et al.* (1998) 'Efecto del extracto acuoso del chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook & Arnot) en el sueño de la rata', *Quehacer científico en Chiapas*, 1(2), pp. 47–58.
- Rodríguez-Hernández, A. A. *et al.* (2022) 'Sanitary Registries and Popular Medicinal Plants Used in Medicines and Herbal Remedies in Mexico (2001–2020): A Review and Potential Perspectives', *Horticulturae*, 8(5). doi: 10.3390/horticulturae8050377.
- Rodríguez-Ortiz, R. y Matínez-Torres, A. (2021) 'Mutants of the zebrafish k<sup>+</sup> channel hcn2b exhibit epileptic-like behaviors', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). doi: 10.3390/ijms222111471.
- Ruangaram, W. y Kato, E. (2020) 'Selection of thai medicinal plants with anti-obesogenic potential via in vitro methods', *Pharmaceuticals*, 13(4). doi: 10.3390/ph13040056.
- Sagbo, I. J. y Hussein, A. A. (2022) 'Antidiabetic Medicinal Plants Used in the Eastern Cape Province of South Africa: An Updated Review', *Processes*, 10(9). doi: 10.3390/pr10091817.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural pesca y alimentación SAGARPA (2017) *Agrícola Nacional: Arroz*. Disponibl en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256423/B\\_sico-Arroz.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256423/B_sico-Arroz.pdf).
- Segev, A. *et al.* (2010) 'Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Colored Chickpea (*Cicer arietinum* L.)', *Journal of Food Science*, 75(2), pp. 2–6. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01477.x.
- Selderslaghs, I. W. T. *et al.* (2009) 'Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo', *Reproductive Toxicology*, 28(3), pp. 308–320. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.05.004.
- Shamni, O. *et al.* (2017) 'Regulation of GLUT4 activity in myotubes by 3-O-methyl-D-glucose', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(10), pp. 1900–1910. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.06.013.
- Sharma, M. y Kaushik, P. (2021) 'Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36(September), p. 102149. doi: 10.1016/j.bcab.2021.102149.
- Silveira, V., Santos Rubio, K. T. y Poletti Martucci, M. E. (2022) 'Anxiolytic effect of

- Anthemis nobilis L. (roman chamomile) and Citrus reticulata Blanco (tangerine) essential oils using the light-dark test in zebrafish (Danio rerio)', *Journal of Ethnopharmacology*, 298(August), p. 115580. doi: 10.1016/j.jep.2022.115580.
- Suryanto, M. E. *et al.* (2022) 'Evaluation of Locomotion Complexity in Zebrafish after Exposure to Twenty Antibiotics by Fractal Dimension and Entropy Analysis', *Antibiotics*, 11(8). doi: 10.3390/antibiotics11081059.
- Szaszkiewicz, J., Leigh, S. and Hamilton, T. J. (2021) 'Robust behavioural effects in response to acute, but not repeated, terpene administration in Zebrafish (Danio rerio)', *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–17. doi: 10.1038/s41598-021-98768-1.
- Tanneberger, K. *et al.* (2013) 'Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay', *Environmental Science and Technology*, 47(2), pp. 1110–1119. doi: 10.1021/es303505z.
- Thitinarongwate, W. *et al.* (2021) 'Phytochemical and safety evaluations of zingiber ottensii valetton essential oil in zebrafish embryos and rats', *Toxics*, 9(5), pp. 1–17. doi: 10.3390/toxics9050102.
- Udomwasinakun, N., Pirak, T. y Chanput, W. P. (2022) 'Identification of polyphenols in white mugwort (Artemisia lactiflora Wall.) ethanolic extracts and their anti-inflammatory and anti-adipogenic activity potential', *Food Bioscience*, 47(May). doi: 10.1016/j.fbio.2022.101761.
- Valles, S. *et al.* (2020) 'Exposure to low doses of inorganic arsenic induces transgenerational changes on behavioral and epigenetic markers in zebrafish (Danio rerio)', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 396(March). doi: 10.1016/j.taap.2020.115002.
- Vasquez, W. V. *et al.* (2021) 'Supercritical carbon dioxide extraction of oil and minor lipid compounds of cake byproduct from Brazil nut (Bertholletia excelsa) beverage production', *Journal of Supercritical Fluids*, 171(February), p. 105188. doi: 10.1016/j.supflu.2021.105188.
- Veeran, B. *et al.* (2020) 'Phenolic profile of herbal infusion and polyphenol-rich extract from leaves of the medicinal plant antirhea borbonica: Toxicity assay determination in zebrafish embryos and larvae', *Molecules*, 25(19), pp. 1–18. doi: 10.3390/molecules25194482.

- Veshalini, K. *et al.* (2022) 'Phytochemical Screening , In vitro Antioxidant Activities and Zebrafish Phytochemical Screening , In vitro Antioxidant Activities and Zebrafish Embryotoxicity of *Abelmoschus esculentus* Extracts', (July). doi: 10.5530/pj.2022.14.88.
- Widelski, J. *et al.* (2021) 'Coumarins from *seseli devenyense* simonk.: Isolation by liquid–liquid chromatography and potential anxiolytic activity using an in vivo zebrafish larvae model', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), pp. 1–21. doi: 10.3390/ijms22041829.
- Yaqoob, M., Aggarwal, P. y Babbar, N. (2022) 'Extraction and screening of kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel phytochemicals, grown in Punjab, India', *Biomass Conversion and Biorefinery*, (0123456789). doi: 10.1007/s13399-021-02085-6.
- Yokogawa, T. *et al.* (2007) 'Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants', *PLoS Biology*, 5(10), pp. 2379–2397. doi: 10.1371/journal.pbio.0050277.
- Yu, S. Y. *et al.* (2013) 'Phenolic composition, antioxidant activity and anti-adipogenic effect of hot water extract from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed', *Nutrients*, 5(12), pp. 4894–4907. doi: 10.3390/nu5124894.
- Zang, Y. *et al.* (2015) 'The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice', *Food and Function*, 6(3), pp. 834–841. doi: 10.1039/c4fo00844h.
- Zhao, H. *et al.* (2022) 'Phytochemical and pharmacological review of diterpenoids from the genus *Euphorbia* Linn (2012–2021)', *Journal of Ethnopharmacology*, 298(July). doi: 10.1016/j.jep.2022.115574.

# Anexo 1

## Fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de hojas de chipilín

Extracto	Fenoles <sup>1</sup>	Flavonoides <sup>2</sup>	Capacidad antioxidante <sup>3</sup>	Me dia arit mé tica ± SD (po r tripl
<b>Agua</b>	1815 ± 4.7 <sup>b</sup>	234.5 ± 4.3 <sup>d</sup>	21.3 ± 1.1 <sup>c</sup>	
<b>Etanol</b>	153.0 ± 2.7 <sup>d</sup>	4841.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	48.3 ± 1.4 <sup>b</sup>	
<b>Etanol-Agua</b>	5345 ± 5.1 <sup>a</sup>	1630 ± 57 <sup>c</sup>	64.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	
<b>FSC</b>	393.9 ± 5.1 <sup>c</sup>	1870 ± 5.1 <sup>b</sup>	24.3 ± 2.1 <sup>c</sup>	

icado n=3). <sup>1</sup> como µg Eq. de ácido gálico/ g de muestra seca. <sup>2</sup> como µg Eq. de quercetina/ g de muestra seca, <sup>3</sup> método del DPPH, en porcentaje. Las medias aritméticas con letras diferentes por columna tienen una diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

# Anexo 2

## Cromatogramas del análisis GC-MS

