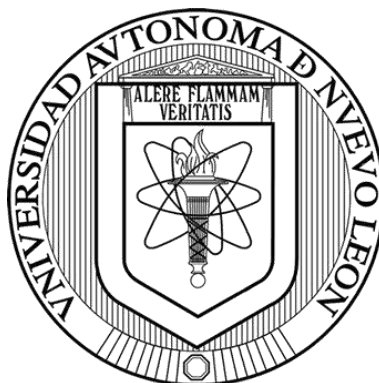


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE EXTRACTOS BOTÁNICOS
Y SU POTENCIACIÓN MEDIANTE SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Por

LBG. Lourdes Michelle Garza Vega

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS BIÓTICOS

2025

EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE EXTRACTOS BOTÁNICOS
Y SU POTENCIACIÓN MEDIANTE SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Comité de Tesis



Dr. Abelardo Chávez Montes
Director de Tesis



Dr. Eduardo Sánchez García
Secretario



Dr. Joel Horacio Elizondo Luévano
Vocal



Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández
Vocal



Dra. Rocío Castro Ríos
Vocal



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de posgrado

**EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE EXTRACTOS BOTÁNICOS
Y SU POTENCIACIÓN MEDIANTE SISTEMAS NANOPARTICULADOS**

Dirección de Tesis



Dr. Abelardo Chávez Montes

Director de Tesis



Dr. Uziel Castillo Velázquez

Codirector de Tesis

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a la Universidad Autónoma de Nuevo León, en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB-UANL) y su Subdirección de Posgrado, por el apoyo institucional brindado durante mi formación académica. Extiendo un especial reconocimiento al Departamento de Química Analítica de la FCB, donde se desarrolló la mayor parte de esta investigación. De igual manera, al Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UANL) por facilitar sus instalaciones y recursos para la realización de etapas cruciales de este estudio.

Expreso mi más profundo agradecimiento al Dr. Abelardo Chávez Montes, quien como mi director de tesis me brindó su invaluable orientación durante todo el proceso de investigación y por facilitar la vinculación con distinguidos investigadores que fueron fundamentales para este proyecto.

Reconozco la destacada participación de cada miembro del comité de tesis, cuyas observaciones y experiencia fueron determinantes en las etapas críticas de la investigación, contribuyendo sustancialmente a este trabajo. En especial quiero agradecer al Dr. Uziel Castillo Velázquez, por su dirección en los fundamentos teóricos y experimentales del trabajo celular. Al Dr. Joel Horacio Elizondo Luévano, por su significativa contribución en el análisis de datos y el suministro de extractos esenciales para la investigación. Así como al Dr. Celestino García Gómez, por su aportación al proporcionar el extracto de ficocianina, componente crucial para este estudio.

Finalmente, agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado mediante la beca CVU 1112052, que permitió la realización de mis estudios de posgrado y la consecución de esta investigación.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estadísticas de cáncer en México.....	2
Figura 2 Planta <i>Argemone mexicana</i>	3
Figura 3 Planta <i>Larrea tridentata</i>	5
Figura 4 Planta <i>Ruta chalepensis</i>	8
Figura 5 Cianobacteria <i>Arthrospira maxima</i>	10
Figura 6 Caracterización de nanopartículas cargadas; Tamaño (nm).....	26
Figura 7 Caracterización de nanopartículas blanco; Tamaño (nm).....	26
Figura 8 Caracterización de nanopartículas cargadas; Potencial ζ (mV)	27
Figura 9 Caracterización de nanopartículas blanco; Potencial ζ (mV)	27
Figura 10 Resultados de IC ₅₀ (µg/ml) de los 4 extractos en la línea celular CaCo-2	28
Figura 11 Resultados de IC ₅₀ del extracto FC en diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales	29
Figura 12 Resultados de IC ₅₀ de FC en su forma libre y nanoparticulada en la línea celular CaCo-2	31
Figura 13 IS del extracto FC utilizando tres líneas celulares sanas como referencia.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efectos y mecanismos de la BBR, en diferentes líneas de cáncer colorrectal.....	4
Tabla 2 Mecanismos de acción de Gob y sus componentes bioactivos	7
Tabla 3 Polímeros naturales y sintéticos	13
Tabla 5 Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de Ruda, Gob, BBR y FC	24
Tabla 6 Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos de Ruda, Gob, BBR, FC y las NP....	25
Tabla 7 Parámetros de formulación y su efecto sobre el tamaño e índice de polidispersidad (PDI) de nanopartículas de PLGA con extracto de FC	25
Tabla 8 ANOVA de una vía para actividad citotóxica de compuestos naturales en línea celular CaCo-2.....	28
Tabla 9 Comparaciones múltiples post-hoc (Prueba de Tukey, $\alpha=0.05$)	29
Tabla 10 Análisis de varianza bidireccional	30
Tabla 11 Valores de IC ₅₀ y comparaciones estadísticas por línea celular	30
Tabla 12 Análisis de varianza para formulaciones de FC en CaCo-2	31
Tabla 13 Comparación de formulaciones mediante prueba de Tukey	32
Tabla 14 Análisis de varianza bidireccional para índices de selectividad	32
Tabla 15 Índices de selectividad del extracto FC	32

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
III JUSTIFICACIÓN.....	15
IV HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
4.1 Hipótesis.....	16
4.2 Objetivo General.....	16
4.3 Objetivos Específicos	16
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Material vegetal y procedencia.....	17
5.2 Reactivos y químicos	17
5.3 Preparación de los extractos	17
5.4 Pruebas fitoquímicas	18
5.5 Actividad hemolítica.....	18
5.6 Elaboración de nanopartículas PLGA	19
5.7 Caracterización de las nanopartículas.....	20
5.8 Ensayos citotóxicos	21
5.9 Diseño experimental	23
VI RESULTADOS	24
6.1. Rendimientos de extracción y análisis fitoquímicos	24
6.2 Actividad hemolítica.....	24
.....	25
6.3 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas	25
6.4 Actividad citotóxica e índice de selectividad	28
VII DISCUSIÓN.....	34
7.1 Rendimiento de extracción y pruebas fitoquímicas	34
7.2 Pruebas de hemólisis	36
7.3 Citotoxicidad en líneas celulares	38
7.4 Nanoencapsulación	43
VIII CONCLUSIÓN	45
IX PERSPECTIVAS	46
X REFERENCIAS	47
XI ANEXOS.....	61
Anexo A. Protocolos detallados de análisis fitoquímico	61

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Compuestos bioactivos

BBR: Berberina

Gob: Gobernadora

FC: Ficocianina

RTM: Rutamarina

CHL: Chalepensina

GRV: Graveolina

NDGA: Ácido nordihidroguaiarético

C-FC: C-Ficocianina

PBP: Ficobiliproteínas

Sistemas de nanoencapsulación

ζ : Potencial zeta

DL%: Porcentaje de carga del fármaco

EE%: Eficiencia de encapsulación

NP: Nanopartículas

NP-C: Nanopartículas Cargadas

NP-B: Nanopartículas Blanco

PDI: Índice de polidispersidad

PEG: Polietilenglicol

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

PVA: Alcohol polivinílico

Cultivo celular y ensayos biológicos

CaCo-2: Células de adenocarcinoma colorrectal humano

CT-26: Células de carcinoma de colon murino

HaCaT: Queratinocitos humanos

HeLa: Células de cáncer cervical humano

HepG2: Células de carcinoma hepatocelular humano

J774: Macrófagos murinos

VERO: Células epiteliales de riñón de mono verde africano

IC₅₀: Concentración Inhibitoria Media

DMEM: Medio de Eagle Modificado por Dubelcco

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

SFB: Suero Fetal Bovino

SI: Índice de selectividad

VC: Viabilidad celular

Análisis y metodología

PCS: Espectroscopía de correlación de fotones

ANOVA: Análisis de varianza

DE: Desviación estándar

DCM: Diclorometano

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETA: Etanol Anhidro

IP: Isopropanol

PBS: Buffer salino fosfatado

Organizaciones

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

OMS: Organización Mundial de la Salud

RESUMEN ESPAÑOL

En esta investigación se evaluó el potencial antitumoral de cuatro compuestos vegetales de interés: Ficocianina purificada a partir de *Arthrospira maxima* (FC), Berberina de *Argemone mexicana* (BBR), extracto de *Ruta chalepensis* (Ruda) y extracto de *Larrea tridentata* (Gobernadora), con énfasis en su encapsulación mediante nanopartículas poliméricas. Los análisis se realizaron tanto en líneas celulares cancerígenas como en líneas celulares sanas para evaluar la selectividad de los tratamientos. El estudio se enfoca en tres tipos de cáncer que se encuentran entre los 10 más importantes a nivel mundial: cáncer colorrectal, cáncer de hígado y cáncer de cuello uterino. Los análisis fitoquímicos revelaron perfiles específicos de metabolitos secundarios para cada extracto. Las pruebas de toxicidad hemolítica demostraron que la ficocianina presentó el mejor perfil de seguridad, con valores consistentemente inferiores al 2.58%, mientras que Ruda mostró la mayor actividad hemolítica (100% a 1000 ppm). La evaluación citotóxica contra células CaCo-2 identificó a la Ficocianina como el agente más potente con un IC_{50} de 10.56 ± 3.28 $\mu\text{g/mL}$, significativamente menor que Ruda (124.73 ± 29.69 $\mu\text{g/mL}$), Berberina (140.85 ± 15.02 $\mu\text{g/mL}$) y Gobernadora (1460 ± 45.13 $\mu\text{g/mL}$). La Ficocianina exhibió una notable selectividad hacia líneas celulares cancerosas colorrectales (CaCo-2, CT-26) y hepáticas (HepG2), manteniendo baja citotoxicidad en células normales. Esta selectividad se evidenció con índices excepcionales utilizando macrófagos J774 como referencia: 95.84 ± 23.36 para CaCo-2 y 94.15 ± 6.11 para CT-26, superando ampliamente el umbral de relevancia clínica ($IS > 3$).

La Ficocianina fue encapsulada exitosamente en nanopartículas de PLGA 50:50, con un tamaño de 180 nm, un índice de polidispersidad de 0.083 y eficiencia de encapsulación del 82.7%. Aunque no se observaron diferencias significativas entre la actividad citotóxica de la Ficocianina libre y nanoencapsulada contra CaCo-2 *in vitro* (IC_{50} de 11.95 ± 3.43 y 20.84 ± 5.01 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), la nanoencapsulación ofrece ventajas potenciales para aplicaciones *in vivo*, como protección contra degradación, liberación controlada y direccionamiento específico a tejidos tumorales.

Los resultados posicionan a la Ficocianina de *A. maxima*, particularmente en su forma nanoencapsulada, como una prometedora alternativa terapéutica para el cáncer colorrectal, combinando alta eficacia con un perfil de seguridad favorable. Este enfoque representa una innovación significativa en el tratamiento del cáncer mediante recursos naturales y tecnologías avanzadas de administración farmacológica.

Palabras clave: Cáncer, Nanopartículas, Extractos.

RESUMEN INGLES

This research evaluated the antitumor potential of four plant compounds of interest: Phycocyanin purified from *Arthrospira maxima* (FC), Berberine from *Argemone mexicana* (BBR), extract of *Ruta chalepensis* (Ruda) and extract of *Larrea tridentata* (Gobernadora), with emphasis on their encapsulation by polymeric nanoparticles. The analyses were performed on both cancer cell lines and healthy cell lines to evaluate the selectivity of the treatments. The study focuses on three types of cancer that are among the 10 most important worldwide: colorectal cancer, liver cancer and cervical cancer. Phytochemical analyses revealed specific secondary metabolite profiles for each extract. Hemolytic toxicity tests showed that phycocyanin presented the best safety profile, with values consistently below 2.58%, while Ruda showed the highest hemolytic activity (100% at 1000 ppm).

Cytotoxic evaluation against CaCo-2 cells identified Phycocyanin as the most potent agent with an IC_{50} of $10.56 \pm 3.28 \mu\text{g/mL}$, significantly lower than Rue ($124.73 \pm 29.69 \mu\text{g/mL}$), Berberine ($140.85 \pm 15.02 \mu\text{g/mL}$) and Governor ($1460 \pm 45.13 \mu\text{g/mL}$). Phycocyanin exhibited remarkable selectivity towards colorectal (CaCo-2, CT-26) and liver (HepG2) cancer cell lines, while maintaining low cytotoxicity in normal cells. This selectivity was evidenced by exceptional indices using J774 macrophages as reference: 95.84 ± 23.36 for CaCo-2 and 94.15 ± 6.11 for CT-26, far exceeding the threshold of clinical relevance ($IS > 3$). Phycocyanin was successfully encapsulated in 50:50 PLGA nanoparticles, with a size of 180 nm, a polydispersity index of 0.083 and encapsulation efficiency of 82.7%. Although no significant differences were observed between the cytotoxic activity of free and nanoencapsulated Phycocyanin against CaCo-2 *in vitro* (IC_{50} of 11.95 ± 3.43 and $20.84 \pm 5.01 \mu\text{g/mL}$, respectively), nanoencapsulation offers potential advantages for *in vivo* applications, such as protection against degradation, controlled release and specific targeting to tumor tissues.

The results position *A. maxima* phycocyanin, particularly in its nanoencapsulated form, as a promising therapeutic alternative for colorectal cancer, combining high efficacy with a favorable safety profile. This approach represents a significant innovation in cancer treatment using natural resources and advanced drug delivery technologies.

Keywords: Cancer, Nanoparticles, Extracts.

I INTRODUCCIÓN

Desde los últimos años el cáncer es una de las enfermedades más críticas a nivel mundial debido a su alta incidencia y mortalidad. Este es un grupo de enfermedades donde las células crecen sin control en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo, y siempre van más allá de sus límites habituales para invadir partes del cuerpo contiguas y/o diseminarse a otros órganos. Según los datos de la OMS, en 2022 se informaron aproximadamente 19,9 millones de incidencias en pacientes con cáncer, lo que provocó aproximadamente 9,7 millones de muertes (Globocan, 2022).

Entre los cánceres más comunes se encuentran el de pulmón, mama y colorrectal, siendo este último el tercer más común en todo el mundo. El cual representa aproximadamente el 9.6% de todos los casos. Este es un tipo de cáncer que afecta el colon y recto, de hecho en 2022 se estima que se produjeron a nivel mundial más de 1,92 millones de nuevos casos y más de 904 mil muertes. En México este es el cáncer con mayor mortalidad, y se diagnostican cerca de 16 mil casos nuevos de cáncer de colon, y de estas mueren aproximadamente 8 mil por año (Figura 1).

En tales circunstancias, es urgente investigar las estrategias de prevención y tratamiento de este tipo de enfermedades. Generalmente el tratamiento de esta enfermedad consiste en cirugía, radioterapia o quimioterapia, las cuales tienen efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes, por lo que se pretende poder desarrollar nuevos tratamientos, enfocándose en una alternativa diferente como lo es en este caso el uso de los recursos naturales como las plantas.

Los productos naturales han sido una de las principales fuentes medicinales a lo largo de la historia, y hasta la fecha se siguen utilizando en la formulación de compuestos farmacéuticos, como analgésicos, antibióticos, antifúngicos, etc., y también como agentes anticancerígenos. Aproximadamente el 60% de los principales medicamentos utilizados en los tratamientos contra el cáncer se producen a base de plantas. Más en los en los países de América latina donde la medicina tradicional representa una alternativa fundamental para el tratamiento de diferentes enfermedades. Actualmente México es uno de los países con mayor número de especies de plantas (31,000), y a nivel mundial este ocupa el segundo lugar en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas. Las

cuales juegan un papel esencial en la salud pública debido a la eficiencia terapéutica que poseen, derivado sus principios activos (Muñetón-Pérez, 2009; Soto *et al.* 2023).

Sin embargo las investigaciones recientes no solo se centran en la búsqueda de nuevos principios activos de las plantas para su uso medicinal, sino que otra característica muy importante es la forma en la que estos pueden suministrarse. Actualmente se utilizan las diferentes formas farmacéuticas como lo son las cápsulas, comprimidos, cremas, infusiones, jarabes, ungüentos, etc. Pero se busca mejorar las terapias farmacológicas modificando la forma en que los principios activos se presentan al organismo, empleando para ello sistemas de liberación controlada de fármacos basados en estrategias de encapsulación. Estas estrategias permiten proteger el fármaco durante su transporte y controlar su liberación en el sitio de acción. De entre los sistemas de encapsulación destacan las nanopartículas poliméricas (NP), las cuales representan un tipo de sistema de liberación controlada que posee características como su capacidad de llegar a su blanco terapéutico y la capacidad de liberar el principio activo de manera controlada, además de reducir significativamente los efectos secundarios y la toxicidad del tratamiento. (Beach *et al.*, 2024; Sune *et al.*, 2024).

Con todo lo visto anteriormente, esta investigación lo que busca es poder realizar un tratamiento innovador contra el cáncer colorrectal, a partir de principios activos de plantas, en un sistema de liberación mediante el uso de NP poliméricas.

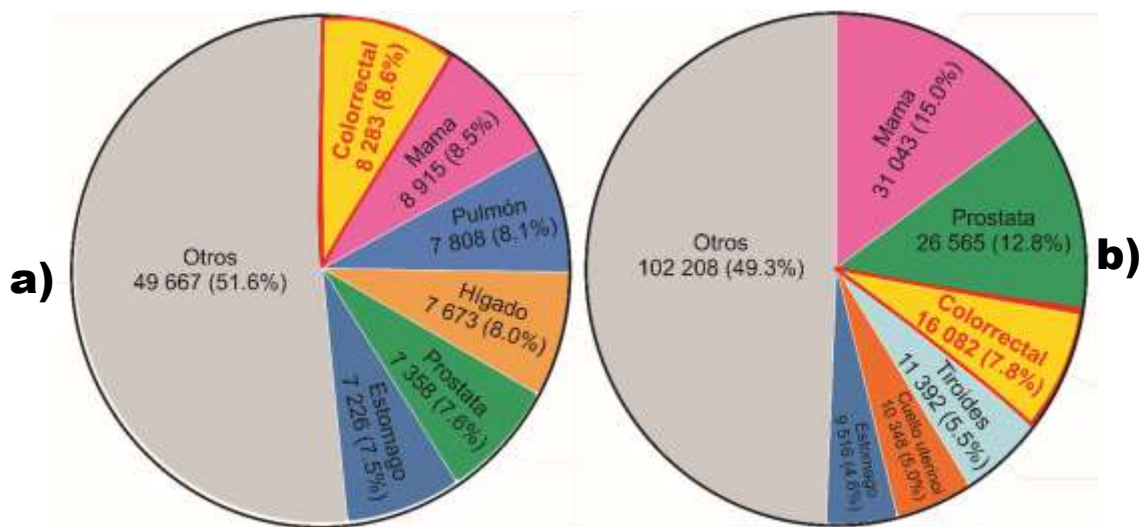


Figura 1 Estadísticas de cáncer en México:
a) Incidencia. b) Mortalidad. (Globocan, 2022).

II ANTECEDENTES

2.1 Berberina

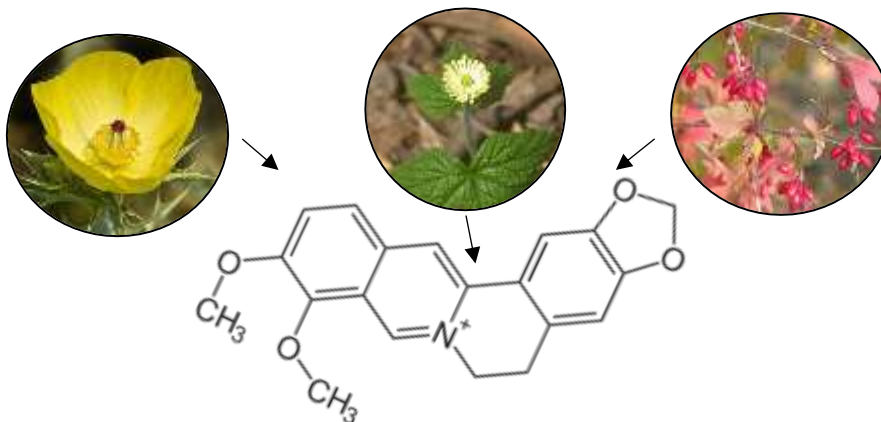


Figura 2 Obtención de Berberina:

Estructura molecular de la berberina, *Argemone mexicana* (amapola mexicana), *Hydrastis canadensis* (sello dorado) y *Berberis vulgaris* (agracejo común). Imagen compuesta elaborada a partir de fotografías de Wikimedia Commons.

La berberina (BBR) es un alcaloide isoquinolínico cuaternario ampliamente distribuido en diversas familias de plantas, incluyendo Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae y Rutaceae (Figura 2). Este compuesto bioactivo se encuentra presente en especies como *Argemone mexicana* L., *Berberis vulgaris*, *Hydrastis canadensis* y *Coptis chinensis*, entre otras (Singh & Katare, 2020). La BBR ha emergido como uno de los alcaloides más estudiados de esta familia debido a sus múltiples propiedades farmacológicas y su potencial terapéutico. Este metabolito ha evidenciado propiedades anticancerígena, antiinflamatoria, antibacteriana, antiparasitaria, antifúngica y antioxidante. Sin embargo, dada la toxicidad inherente de este alcaloide, es necesario realizar investigaciones adicionales para validar sus beneficios y establecer dosis seguras y efectivas para uso humano (Elizondo *et al.*, 2024). Según la literatura, la BBR ha sido ampliamente estudiada en diversas líneas celulares de cáncer. Específicamente en cáncer colorrectal, sus principales mecanismos anticancerígenos abarcan la inhibición de la proliferación celular maligna, la supresión de la metástasis tumoral, la inducción de la muerte celular programada (apoptosis), la activación de procesos de autofagia y la modulación de la microbiota intestinal (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos y mecanismos de la BBR, en diferentes líneas de cáncer colorrectal.

Líneas celulares	Dosis (μM)	Mecanismos y/o Efectos	Referencia
CaCo-2 and LOVO CRC	0, 10, 20, 40, 60, 80	Inhiben la síntesis proteica mitocondrial, el TCA y el transporte respiratorio de electrones	(Tong <i>et al.</i> , 2020)
SW480 and HT-29	0, 25, 50, 100, 200, 400 and 800	Inhiben la proliferación celular Induce la detención del ciclo celular en la fase G0/G1	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
HT29 and HCT116	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100	Inducir la apoptosis celular a través de la modulación del lncRNA Eje CASC2/AUF1/Bcl-2	(Dai <i>et al.</i> , 2019)
DLD-1 and CaCo-2	6.25, 12.5, 25, 50	Modulan la lipogénesis a través de la vía SCAP/SREBP-1	(Liu <i>et al.</i> , 2020)
HCT116 and HT29	10, 20, and 40	Inducir la apoptosis de las células cancerosas. Disminuye la metilación m6A a través de la disminución de β-catenina y el aumento de FTO. Inhibir la proliferación celular mediante la disminución de la ciclina D1 y el aumento de p27 y p21. Induce la detención del ciclo celular en la fase G1/G0.	(Zhao <i>et al.</i> , 2021)
HT-29, HCT116, and SW620	2, 10 and 50	Inhiben la proliferación celular mediante la regulación de la β-catenina	(Nie <i>et al.</i> , 2022)
HCT-8, HCT-116, and HT-29	6.25, 12.5, 25, 50	Suprime la lipogénesis a través de la promoción de la ubiquitinación de SCAP mediada por PLZF Inhibición de la metástasis de células de cáncer de colon	(Liu <i>et al.</i> , 2022)

Numerosos estudios han evidenciado que la BBR presenta una toxicidad limitada en humanos. En un ensayo clínico fase I Thomas *et al.*, 2021, demostraron la seguridad de la berberina incluso en dosis elevadas. Por su parte, Och *et al.*, 2020, confirmaron su baja toxicidad en células sanas. Esta evidencia acumulada sugiere el potencial de la BBR para inhibir tanto el inicio como la progresión del cáncer.

No obstante, Xiong *et al.*, 2022, señalan que su reducida biodisponibilidad oral y baja solubilidad en agua podrían limitar sus efectos anticancerígenos. Adicionalmente, la administración de BBR por vías intramuscular e intravenosa podría desencadenar reacciones anafilácticas. Por consiguiente, este trabajo se enfoca en desarrollar estrategias para optimizar la biodisponibilidad tanto de la berberina como de otros extractos, con el objetivo de potenciar sus propiedades anticancerígenas.

2.2 *Larrea tridentata* (Gobernadora)



Figura 3 Planta *Larrea tridentata*.

Foto por Stan Shebs, licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0.

Larrea tridentata (DC.), comúnmente conocida como Gobernadora (Gob), pertenece a la familia Zygophyllaceae (Figura 3). Esta especie predomina en regiones áridas y semiáridas, siendo nativa de Estados Unidos y México. Su distribución en México abarca los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Hanan-Alipi *et al.*, 2009).

En la medicina tradicional, esta planta cuenta con más de 65 aplicaciones fitoterapéuticas, incluyendo tratamientos para infertilidad, artritis, diabetes, cálculos biliares y renales, así como para aliviar el dolor y la inflamación. La investigación científica ha confirmado sus

propiedades antioxidantes, antitumorales, neuroprotectoras, regeneradoras, antimicrobianas (antibacterianas, antivirales, antifúngicas), antihelmínticas e insecticidas. No obstante, algunos estudios han reportado efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos asociados a ciertos compuestos de la planta (Galvan *et al.*, 2020).

Morales-Ubaldo *et al.* (2022) demostraron que Gob es una fuente rica en compuestos bioactivos, entre los que se incluyen taninos, flavonoides, saponinas, fitoestrógenos y terpenos. Asimismo, se han identificado moléculas bioactivas específicas como ácido elágico, ácido gálico, catequinas, galato de metilo, ácido cinámico, resorcinol, kaempferol, quercetina, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), timol y carvacrol.

No obstante, el mismo estudio de Morales-Ubaldo *et al.* (2022) advierte que diversas fuentes han asociado los productos derivados de Gob con ictericia, hepatitis colestásica y daño hepático, con posible progresión a cirrosis e incluso insuficiencia hepática fulminante. Estas complicaciones se atribuyen a varios de sus componentes fitoquímicos, incluyendo su compuesto principal NDGA, que ha demostrado causar hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en humanos, e incluso letalidad en modelos murinos ($LD_{50} = 75 \text{ mg/kg}$). Por tanto, se requieren investigaciones adicionales para desarrollar estrategias que optimicen sus propiedades farmacológicas, estableciendo una clara relación dosis-respuesta para estos compuestos, así como para elucidar su perfil toxicológico completo y sus mecanismos de acción específicos.

En el estudio de Lambert *et al.* (2005) se evaluó la actividad inhibidora del crecimiento de seis lignanos y una flavanona aislada por primera vez de Gob y hasta ahora no reportada en otros miembros de la familia Zygophyllaceae frente a líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y melanoma. Los resultados mostraron que la flavanona presentó menor actividad inhibitoria en comparación con los lignanos evaluados en las tres líneas celulares. Estos hallazgos sugieren que el extracto crudo podría presentar mayor actividad inhibidora contra la línea celular CaCo-2, ya que la potencia relativa de los lignanos de tipo butano lineal parece correlacionarse positivamente con el número de grupos O-metilo presentes en la molécula.

De acuerdo con la literatura científica, uno de los principales mecanismos de acción anticancerígenos de la Gob es la inhibición de GLUT-1, lo que afecta la absorción de glucosa y la viabilidad celular en líneas celulares leucémicas, como se resume en la siguiente tabla (Tabla 2):

Tabla 2. Mecanismos de acción de Gob y sus componentes bioactivos

Línea celular	Mecanismo de acción	Resultados observados	Autores
Células leucémicas humanas HL-60 y U937	Inhibición de GLUT-1	Inhibición de la absorción de glucosa y viabilidad celular mediante un mecanismo no competitivo	Leon <i>et al.</i> , 2016
Células de cáncer de próstata humano LNCaP, cáncer de páncreas humano AsPc-1 y células de linfoma de Hodgkin humano L428	Potencial quimiopreventivo / Sinergismo	En combinación con etopósido, rapamicina o UCN-01, M4N redujo el contenido de ATP celular y suprimió la expresión de NDUFS1, induciendo la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial	Kimura & Huang, 2016
Células de melanoma humano (HMOVII)	Modulación de la melanogénesis	Aumento de la actividad de la tirosinasa y la síntesis de novo de melanina	Takekoshi <i>et al.</i> , 2014
Células de cáncer de mama humano T47D; Células de cáncer de cuello uterino humano SiHa	Inhibición de la fase G1 del ciclo celular	Detención del ciclo celular en fase G1	Cui <i>et al.</i> , 2008; Gao <i>et al.</i> , 2011

2.3 *Ruta chalepensis* (Ruda)



Figura 4 Planta *Ruta chalepensis*.
Foto por © Hans Hillewaert / CC BY-SA 4.0.

Ruta chalepensis L., comúnmente conocida como Ruda, pertenece a la familia Rutaceae (Figura 4). Esta especie se distribuye principalmente en regiones templadas y tropicales, siendo originaria de la región mediterránea, con presencia en Eurasia, Norte de África y América. Destaca como una de las plantas más relevantes en la medicina tradicional, donde se emplea para el tratamiento de diversas patologías incluyendo asma, reumatismo, artritis, afecciones dermatológicas, trastornos de fertilidad y mordeduras de serpiente. La literatura científica ha documentado sus propiedades antimicrobianas, analgésicas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, diuréticas, sedantes, broncodilatadoras, antioxidantes y anticancerígenas (Terkmane *et al.*, 2017; Coimbra *et al.*, 2020; Abdoul-Latif *et al.*, 2022).

El perfil fitoquímico de Ruda incluye diversos compuestos bioactivos como furanocumarinas, cumarinas, alcaloides (incluyendo alcaloides de quinolina) y flavonoides. Entre estos, destacan las furanocumarinas, particularmente la chalepentina (CHL), rutamarina (RTM) y graveolina (GRV), que han demostrado propiedades citotóxicas (apoptóticas, autofágicas y antiproliferativas), antifúngicas, antimicrobianas, antiparasitarias y antiinflamatorias. Las furanocumarinas constituyen uno de los componentes químicos más significativos en Ruda, y su actividad tóxica en células

eucariotas ha sido ampliamente estudiada, sugiriendo un mecanismo de acción que involucra daño al ADN (Fadlalla *et al.*, 2011; Bazaldúa-Rodríguez *et al.*, 2021; Elizondo-Luévano *et al.*, 2023).

Investigaciones recientes han validado la actividad antineoplásica de esta especie. Elizondo-Luévano *et al.* (2023) evaluaron la actividad citotóxica del extracto metanólico crudo de Ruda, sus fracciones y sus componentes principales (RTM: Rutamarina, CHL: Chalepensina y GRV: Graveolina), demostrando importantes efectos citotóxicos *in vitro* contra células de hepatocarcinoma humano (HEP-G2) y linfoma murino (L5178Y-R), con elevados índices de selectividad en comparación con células de riñón de mono verde africano (VERO) normales y células mononucleares de sangre periférica (PBMC)..

Khelifi *et al.* (2013) evidenciaron la actividad de los extractos metanólicos contra líneas celulares de carcinoma de vejiga humano (RT112), leucemia mielógena humana (K562) y carcinoma laríngeo humano (Hep2). Complementariamente, Acquaviva *et al.* (2011) demostraron la actividad del extracto etanólico contra líneas celulares de cáncer de colon.

Terkmane *et al.* (2017) investigaron los efectos antioxidantes y citotóxicos *in vitro* de extractos volátiles, etanólicos y acuosos de Ruda. Sus resultados revelaron que el extracto etanólico ejerce una potente actividad citotóxica contra diferentes tipos de células cancerosas: células de leucemia de tipo T y células de linfoma de tipo B, sin afectar las células sanguíneas normales.

Adicionalmente, Abdoul-Latif *et al.* (2022) investigaron la actividad anticancerígena de Ruda mediante ensayos *in vitro* contra 13 líneas celulares cancerosas y modelización estadística por análisis de componentes principales. Sus resultados identificaron la 2-undecanona (51.3%) como el compuesto volátil mayoritario y demostraron eficacia citotóxica significativa contra seis líneas celulares: U2OS (osteosarcoma), NCI-N87 (cáncer gástrico), MRC-5 (fibroblastos pulmonares), MIA-Paca2 (cáncer pancreático), JIMT-T1 (cáncer de mama) y HEK293 (células embrionarias de riñón). Estos hallazgos sugieren perspectivas prometedoras para el aprovechamiento del aceite esencial de Ruda como fuente potencial de agentes anticancerígenos naturales.

2.4 *Arthrospira maxima* (Ficocianina)



Figura 5 *Cianobacteria Arthrospira maxima*.

Foto por Stan Shebs, 2003. Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 License.

La *Arthrospira maxima* (S.G.), es una cianobacteria filamentosa unicelular que se clasifica como microalga debido a su contenido de clorofila (Figura 5). Esta especie se desarrolla naturalmente en lagos alcalinos tropicales y subtropicales con altas concentraciones de carbonato y bicarbonato, encontrándose principalmente en el lago de Texcoco, México (Vo *et al.*, 2015). Se cultiva comercialmente para consumo humano y animal, además de ser fuente de aditivos para las industrias farmacéutica y alimentaria.

A. maxima destaca por su facilidad de cultivo y cosecha, así como por su notable producción de ficobiliproteínas (PBP), pigmentos que constituyen aproximadamente el 40% de las proteínas solubles en las cianobacterias. Las PBP son compuestos hidrosolubles y fluorescentes, características que las hacen valiosas como colorantes naturales en alimentos, bebidas saludables y cosméticos. Investigaciones recientes han revelado su potencial en la salud humana gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Park *et al.*, 2022).

Entre las PBP, la Ficocianina (FC) sobresale por su relevancia científica. Este pigmento, el más abundante en el ficobilisoma, se caracteriza por su intenso color azul y un espectro de absorción entre 610 y 620 nm. La FC tiene múltiples aplicaciones: se utiliza como suplemento dietético y colorante natural en la industria alimentaria y cosmética, además

de sus usos en biotecnología como trazador bioquímico. Su aplicación se extiende a técnicas de análisis celular, histoquímica, microscopía de fluorescencia, citometría de flujo e inmunoensayos (Fernández *et al.*, 2023).

Estudios recientes han demostrado el considerable potencial farmacológico de la FC, exhibiendo un amplio espectro de efectos terapéuticos que incluyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, citotoxicidad fotoinducida y capacidad inmunoestimulante (Jiang *et al.*, 2017). En particular, Ravi *et al.* (2015) evaluaron la eficacia antineoplásica de la FC *in vitro* en diversas líneas celulares de cáncer de mama, encontrando que las células triple negativas MDA-MB-231 mostraron mayor sensibilidad al tratamiento (IC_{50} : $5,98 \pm 0,95 \mu M$) en comparación con otras líneas celulares.

2.5 Nanopartículas poliméricas como sistema de liberación de fármacos

Los nanomateriales se definen como materiales con dimensiones entre 1-1000 nm. La nanociencia estudia sus propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas, así como su comportamiento estructural a nivel molecular y sub-molecular. Su potencial transformador permite revolucionar procedimientos médicos y biotecnológicos, haciéndolos más accesibles, económicos, seguros y de fácil administración. Un ejemplo destacable de esta aplicación es el uso de nanopartículas en tratamientos médicos específicos (Hasan, 2015; Jeevanandam *et al.*, 2018).

Los compuestos bioactivos naturales presentan desafíos significativos para su aplicación terapéutica. Suelen ser químicamente inestables y vulnerables a la degradación oxidativa, comprometiendo su integridad molecular. Adicionalmente, su implementación en formulaciones para aplicaciones biológicas se ve limitada por características como baja solubilidad acuosa, escasa biodisponibilidad y reducida estabilidad frente a factores ambientales (pH extremo, temperaturas elevadas, exposición al oxígeno y radiación lumínica). En respuesta a estas limitaciones, la tecnología de encapsulación ha emergido como una solución innovadora que protege y facilita la liberación controlada de estas moléculas bioactivas en sitios específicos y momentos precisos. Este enfoque no solo mejora la solubilidad y minimiza la degradación, sino que también reduce la toxicidad y

optimiza la absorción, permitiendo una respuesta biológica más efectiva derivada del uso terapéutico de diversos metabolitos secundarios (Witika *et al.*, 2021).

Se pueden utilizar varias técnicas de encapsulación para la focalización terapéutica de moléculas bioactivas, destacándose las nano y microcápsulas como los sistemas más funcionales y ventajosos.

Entre las metodologías para su preparación, la técnica de doble emulsión por evaporación sobresale por permitir la fabricación de sistemas particulados con alta eficiencia de encapsulación, especialmente para compuestos hidrofílicos, utilizando una combinación estratégica de fases acuosas y orgánicas.

La principal ventaja de esta técnica radica en la formación de una estructura multicapa que protege eficazmente al principio activo, factor que contribuye significativamente a la estabilidad y liberación controlada del fármaco. Consecuentemente, este método constituye una estrategia óptima para el diseño de partículas poliméricas con aplicaciones terapéuticas avanzadas, particularmente cuando se requiere preservar la integridad de biomoléculas sensibles (Iqbal, 2015).

Los avances en este campo han alcanzado ya la fase de ensayos clínicos, empleando nanopartículas poliméricas cargadas con agentes bioactivos de origen natural. Algunas formulaciones han recibido incluso la aprobación de la FDA, como el caso documentado por Coleman *et al.* (2011), donde nanopartículas estabilizadas con albúmina y paclitaxel completaron exitosamente los ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del cáncer de ovario.

En el ámbito comercial, destacan productos como Genexol PM® y Paclical®, nano-formulaciones de uso médico desarrolladas a partir de extractos naturales que representan la materialización de esta tecnología en soluciones terapéuticas accesibles al paciente (Elmowafy *et al.*, 2023).

La convergencia entre nanotecnología y compuestos bioactivos naturales promete revolucionar las terapias personalizadas y de precisión con niveles sin precedentes de eficacia. Los materiales poliméricos empleados en estas aplicaciones se dividen en naturales y sintéticos (Tabla 3) (Saini *et al.*, 2024):

Tabla 3 . Polímeros naturales y sintéticos

Polímeros Naturales	Polímeros Sintéticos
Quitosano ($(C_6H_{11}NO_4)_n$)	Ácido Poliláctico (PLA) ($(C_3H_4O_2)_n$)
Alginato ($(C_6H_8O_6)_n$)	Policaprolactona (PCL) ($(C_6H_{10}O_2)_n$)
Celulosa ($(C_6H_{10}O_5)_n$)	Polietilenglicol (PEG) ($HO-(CH_2CH_2O)_n-H$)
Gelatina	Ácido Poliglicólico (PGA) ($(C_2H_2O_2)_n$)
Almidón ($(C_6H_{10}O_5)_n$)	Poliacrilatos

Aunque biocompatibles, los polímeros naturales presentan desventajas como variabilidad fisicoquímica, menor resistencia mecánica y degradación acelerada frente a los sintéticos. Como vehículos para agentes anticancerígenos, las nanoformulaciones como nanoemulsiones, nanopartículas poliméricas y nanocápsulas de liberación controlada sobresalen por mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de compuestos fitoquímicos con actividad antitumoral. Estas estructuras encapsulan eficientemente metabolitos secundarios de plantas (terpenos, alcaloides, flavonoides) que normalmente presentan baja solubilidad y biodisponibilidad limitada, permitiendo una liberación controlada en tejidos tumorales específicos (Cadoná *et al.*, 2020; Yildirim *et al.*, 2023).

2.6 Tratamientos de cáncer colorrectal actuales

De acuerdo con la información sobre el cáncer del Instituto Nacional del Cáncer (PDQ, 2022), los tratamientos estándar empleados para abordar el cáncer colorrectal incluyen:

- *Cirugía*: Tratamiento más común que consiste en remover quirúrgicamente el tejido canceroso en todos los estadios del cáncer de colon.
- *Ablación por radiofrecuencia*; Destrucción de células cancerosas usando calor controlado a través de una sonda con microelectrodos.
- *Criocirugía*; Eliminación selectiva del tejido anormal mediante congelación con instrumental especializado.
- *Quimioterapia*; Uso de medicamentos que detienen el ciclo celular canceroso, destruyendo células o impidiendo su multiplicación.
- *Radioterapia*; Aplicación focalizada de radiación de alta energía para eliminar o detener el crecimiento de células cancerosas.

- *Terapia dirigida*; Medicamentos específicos que atacan selectivamente células cancerosas, protegiendo los tejidos normales.
- *Inmunoterapia*; Sustancias que refuerzan o restauran el sistema inmune del cuerpo para combatir el cáncer de forma natural.

No obstante, estos tratamientos convencionales frecuentemente provocan efectos secundarios significativos que afectan tejidos y órganos sanos. Entre estas complicaciones se encuentran: anemia, alopecia, alteraciones dermatológicas, estados confusionales, diarrea, dolor crónico, edemas, estreñimiento, anorexia, fatiga persistente, inflamación orgánica, susceptibilidad a infecciones, neutropenia, linfedema, náuseas y vómitos recurrentes, neuropatía periférica, disfunción cognitiva y problemas de memoria, mucositis oral y faríngea, trastornos del sueño, disfunción sexual, alteraciones urinarias y vesicales, trastornos hemorrágicos, trombocitopenia y síndrome pseudogripal, entre otros.

El protocolo terapéutico habitualmente requiere evaluaciones periódicas para monitorizar la eficacia del tratamiento y determinar con precisión el estadio evolutivo de la enfermedad. Las decisiones clínicas sobre continuar, modificar o suspender un determinado régimen terapéutico se fundamentan en los resultados de estas evaluaciones sistemáticas.

La investigación de Lewandowska *et al.* (2020) analizó exhaustivamente la calidad de vida en pacientes oncológicos sometidos a quimioterapia. Sus conclusiones evidenciaron que todo el proceso patológico, desde el diagnóstico hasta el tratamiento, genera un impacto negativo significativo en la calidad de vida de los pacientes. Este deterioro correlaciona directamente con la modalidad terapéutica implementada y la cronicidad de la enfermedad.

Esta problemática ha impulsado a la comunidad científica y médica a intensificar la búsqueda de alternativas terapéuticas innovadoras caracterizadas por perfiles de toxicidad reducidos y abordajes menos invasivos. El objetivo primordial de estas investigaciones es optimizar la experiencia terapéutica y mejorar sustancialmente la calidad de vida de los pacientes durante y después de los tratamientos oncológicos. La tendencia actual se orienta hacia terapias personalizadas que maximicen la eficacia antitumoral mientras preservan la integridad funcional y el bienestar integral del paciente.

III JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales y microorganismos contienen diversos compuestos bioactivos con potencial terapéutico para múltiples enfermedades, incluido el cáncer. Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer colorrectal representa el tercer tipo de cáncer más común a nivel mundial, y en México presenta una tasa de mortalidad cercana al 50% de los casos reportados. Para abordar esta problemática, las investigaciones actuales se orientan hacia tratamientos innovadores siguiendo principalmente dos estrategias complementarias.

Por un lado, se buscan nuevos principios activos, destacando aquellos de origen natural por su diversidad química y potencial terapéutico. Por otro lado, se investigan nuevas formas de administración de principios activos ya conocidos, mediante sistemas de liberación avanzados, entre los que sobresalen los nano-particulados. Estos sistemas ofrecen ventajas significativas frente a los tratamientos convencionales, principalmente por su capacidad de administración dirigida, acción precisa en células cancerosas y considerable reducción de efectos secundarios.

Esta investigación pretende integrar ambos enfoques, utilizando recursos naturales mexicanos con actividad citotóxica previamente documentada: extractos de *Ruta chalepensis* y *Larrea tridentata*, Berberina y Ficocianina purificada de *Arthrospira maxima*. La selección de estos compuestos se fundamenta en su origen nacional y en evidencia científica previa que documenta su potencial anticancerígeno, constituyendo una exploración sistemática para identificar nuevas moléculas terapéuticas y desarrollar formas innovadoras de administración.

Se propone evaluar estos compuestos tanto en forma libre como encapsulados en nanopartículas poliméricas biodegradables, con especial énfasis en el estudio de su selectividad citotóxica. Este enfoque busca mejorar las propiedades farmacológicas de los compuestos bioactivos y establecer una relación dosis-respuesta más precisa para optimizar su eficacia terapéutica, contribuyendo al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas basadas en recursos naturales mexicanos mediante aplicaciones nanomédicas.

IV HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La exploración selectiva de la flora mexicana seleccionada revelará al menos un extracto con actividad citotóxica significativa contra líneas celulares de cáncer colorrectal, y su posterior nanoencapsulación aumentará considerablemente su eficacia antineoplásica.

4.2 Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de extractos de *Ruta chalepensis* y *Larrea tridentata*, Berberina y Ficocianina purificada de *Arthrospira maxima* sobre líneas celulares de cáncer colorrectal, e incorporar el compuesto más selectivo en nanopartículas poliméricas biodegradables.

4.3 Objetivos Específicos

- Caracterizar los extractos a través de pruebas colorimétricas y ensayos de hemólisis para evaluar su perfil fitoquímico y potencial tóxico.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos obtenidos sobre líneas celulares de cáncer colorrectal mediante ensayos de viabilidad celular MTT.
- Implementar un protocolo de nanoencapsulación para el extracto que demuestre la mayor actividad citotóxica en los ensayos previos.
- Caracterizar las nanopartículas formuladas mediante su tamaño, PDI, potencial Z, EE% y DL%.
- Evaluar la eficacia antineoplásica de las nanopartículas cargadas con el extracto más selectivo mediante ensayos MTT, comparando su actividad con la del extracto libre.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal y procedencia

Las plantas de *Larrea tridentata* y *Ruta chalepensis* se adquirieron en Pacalli ® (pacalli.com.mx; Monterrey, México), previamente identificadas y catalogadas en la investigación de Rodríguez-Garza *et al.* (2023). La Berberina se adquirió directamente de Sigma-Aldrich (B3251-5G Merck, Alemania). La Ficocianina purificada de *Arthrospira maxima* fue proporcionada mediante colaboración con el Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Aguas, Suelos y Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México.

5.2 Reactivos y químicos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico adquiridos de CTR Scientific ® (Monterrey, México). Se emplearon Diclorometano (DCM), Etanol Anhidro (ETA), Isopropanol (IP), Alcohol Polivinílico (PVA), Dimetilsulfóxido (DMSO), Tampón Fosfato Salino (PBS), Medio DMEM (Thermo Fischer, 12800), Suero Fetal Bovino (SFB), enrofloxacin, antibiótico/antifúngico, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromuro), y sulfato de vincristina (Vin). Además los materiales para las pruebas fitoquímicas se adquirieron en Sigma-Aldrich.

5.3 Preparación de los extractos

Para obtener los extractos metanólicos de *L. tridentata* y *R. chalepensis*, las hojas secas de cada planta (500 g) se molieron hasta polvo fino y se sometieron a extracción por maceración (Elizondo-Luévano *et al.*, 2018). Se maceraron 25 g del polvo en 250 mL de metanol absoluto durante 72 horas a temperatura ambiente con agitación ocasional en un agitador orbital (Lab-line, 3508, Lab-line Instruments Inc., Melrose Park, IL, EE.UU.). La mezcla se filtró con papel Whatman n.º 1 y el residuo se sometió a maceraciones sucesivas con metanol fresco hasta obtener filtrados incoloros. Los extractos combinados se concentraron por evaporación a presión reducida a 40°C utilizando un evaporador rotativo (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4003, Heidolph Instruments GmbH & Co KG,

Alemania) y se almacenaron en frascos ámbar a 4°C. El rendimiento del extracto se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

5.4 Pruebas fitoquímicas

El material biológico fue evaluado mediante tamizaje fitoquímico cualitativo para determinar la presencia de metabolitos secundarios, siguiendo los protocolos de Rivas-Morales *et al.* (2016). Se utilizaron 0.5 g de extracto seco por ensayo, realizando las pruebas por triplicado. La identificación se basó en reacciones colorimétricas específicas que producen cambios de coloración, precipitación o fluorescencia característicos para cada grupo de compuestos.

Se evaluaron 8 grupos de metabolitos: alcaloides (reactivo de Dragendorff), quinonas (extracción alcalina), esteroides y triterpenos (reacción de Liebermann-Burchard), flavonoides (reacción de Shinoda), taninos (complexación con FeCl₃), saponinas (índice de espuma), cumarinas (fluorescencia UV) y carbohidratos (reacción de Molisch). Los resultados se expresaron cualitativamente como presencia (+) o ausencia (-).

Los protocolos detallados se describen en el Anexo A.

5.5 Actividad hemolítica

La evaluación de la actividad hemolítica se llevó a cabo bajo los procedimientos existentes detallados en la norma ASTM F756-17, tomando como base la metodología utilizada por Elizondo-Luévano *et al.*, 2020. Para lo cual, se obtuvieron 4 mL de sangre de un voluntario sano, con ayuda del sistema Vacutainer en tubos con EDTA. La sangre fue centrifugada a 2000 ×g por 10 min a 25°C, para retirar el plasma con ayuda de una pipeta Pasteur. La sangre fue lavada al menos en 3 ocasiones en proporción 1:1 con amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4) eliminando los sobrenadantes, para posteriormente preparar una suspensión al 5% v/v en PBS.

Para la evaluación de la hemólisis, la suspensión se incubó con diferentes concentraciones de los tratamientos (50 a 1 000 µg/mL) en viales de 2 mL durante 30 min a 37°C y en ausencia de luz, estos fueron catalogados como tratamientos (Tr). Como control negativo (C-) se utilizaron eritrocitos sin tratamiento y como control positivo (C+) eritrocitos con agua destilada estéril para producir la hemólisis osmótica. La hemólisis se determinó mediante la lectura de absorbancia (Abs) a 540 nm, con un lector de microplacas EPOCH™ (BioTek™, USA). Al terminar de preparar los tratamientos, estos se incubaron a 37±0.5°C por 30 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 15890 ×g por 5 min a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes y 250 µL de estos, se colocaron en una microplaca de 96 pocillos. El sobrenadante fue leído a una densidad óptica (DO) de 540 nm (longitud de onda donde reacciona la hemoglobina) en un lector de microplacas (Epoch).

El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(AbsTr) - (AbsC -)}{(AbsC +) - (AbsC -)} * 100$$

5.5.1 *Consentimiento ético*; El estudio con eritrocitos humanos se realizó bajo la aprobación del comité de ética institucional y bajo el consentimiento de donantes sanos, siguiendo lo establecido en la Norma Técnica Oficial Mexicana ASTM F756-17. No se realizaron estudios con animales.

5.6 Elaboración de nanopartículas PLGA

Las nanopartículas (NP) se obtuvieron mediante un método de doble emulsión basado en la metodología de Chong Cerda *et al.*, 2020, con modificaciones. Se añadieron 300 microlitros de FC disueltos en agua destilada, con una concentración de 100 mg/mL (W1), a una solución de 60 mg de Resomer® RG 755 S, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) en 4 mL de diclorometano (O). Para preparar la emulsión, la mezcla se homogeneizó por sonicación (10 min) (Ultrasonic Branson 2510MT, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). A continuación, se añadió la primera emulsión (W1/O) en 12,5 mL de la fase acuosa externa que contenía 6,5 mL de un sistema disolvente (4,14 mL de ETA: 1,7 mL de IP: 0,66 mL de DCM) y 6 mL de PVA al 8% p/v. Las fases W1/O/W2 formadas se agitaron a 2000 rpm durante 15 min con el agitador mecánico Eurostar Power-B® (IKA-Werke,

Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), a continuación se añadieron 4 mL de PVA al 8% a una velocidad de agitación de 2000 rpm durante 5 min. Por último, se evaporó el disolvente orgánico de la emulsión a presión reducida mediante un rotavapor Heidolph Laborota 4003 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se purificó la suspensión obtenida de partículas poliméricas a 100 rpm a 30°C durante 15 min.

5.7 Caracterización de las nanopartículas

5.7.1 Tamaño, Índice de polidispersidad y Potencial zeta; La caracterización completa de las NP incluyó tres parámetros principales: Tamaño de partícula (en nanómetros), Índice de polidispersidad (PDI) y Potencial zeta (ζ) para evaluar la densidad de carga superficial.

Se tomaron 8 gotas del lote de NP cargadas que se diluyeron en 1 mL de agua destilada y se analizaron mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS) utilizando un Zetasizer Nano-Zs90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), donde se obtuvo el promedio del tamaño de las NP, el cual para administración de fármacos se recomienda que debe ser menor a 200 nm (Öztürk, Kaplan, & Çalış, 2024), y PDI, que debe mantenerse por debajo de 0.1. Las nanopartículas se clasificaron según su potencial ζ como neutras cuando se encontraban entre -10 y $+10$ mV, fuertemente catiónicas cuando superaban los $+30$ mV, o fuertemente aniónicas cuando estaban por debajo de -30 mV (Clogston & Patri, 2010).

5.7.2 Porcentaje de carga y de eficiencia de encapsulación; Para determinar la eficiencia de encapsulación, se tomaron 2-3 mL de cada lote de nanopartículas y se centrifugaron a $53105 \times g$ a $4^{\circ}C$ durante 4 horas en una centrífuga Allegra™ 64R Centrifuge. Tras la centrifugación, se obtuvo un sedimento ("pellet") constituido por las nanopartículas con el extracto encapsulado y un sobrenadante conteniendo el extracto no encapsulado.

El pellet se lavó y resuspendió en agua destilada para liberar el extracto encapsulado, mientras que el sobrenadante se analizó directamente. La cuantificación del extracto tanto encapsulado como libre se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un espectrofotómetro GENESYS 10S (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La

longitud de onda de análisis se determinó mediante un barrido espectral (200-800 nm) del extracto, seleccionando la longitud de onda de máxima absorción.

Se preparó una curva de calibración utilizando soluciones estándar del extracto a concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75 y 3.00 mg/mL. Todas las determinaciones se realizaron en medio acuoso. La eficiencia de encapsulación (EE%) y la carga de fármaco (DL%) se calcularon con base en Alvarez-Sandoval *et al.* (2025) mediante las siguientes fórmulas:

$$EE\% = \frac{EX_{Y_0}}{EX_E} \times 100$$

Donde EX_{Y_0} representa la masa del extracto inicial y EX_E la masa del extracto encapsulado.

$$DL\% = \frac{M_E}{M_N} \times 100$$

Donde M_N corresponde a la masa total de las nanopartículas y M_E a la masa del extracto nanoencapsulado.

5.8 Ensayos citotóxicos

5.8.1 Modelos celulares y fases experimentales; Para evaluar la citotoxicidad de los tratamientos, se implementó un diseño experimental secuencial utilizando múltiples líneas celulares. En la fase inicial, se evaluaron los cuatro tratamientos en células de adenocarcinoma colorrectal humano (CaCo-2). Posteriormente, el tratamiento con mayor actividad citotóxica se seleccionó para su evaluación en seis líneas celulares adicionales: J774 (macrófagos murinos), VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano), HaCaT (queratinocitos humanos), HeLa (células de cáncer cervical humano), HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano) y CT-26 (células de carcinoma de colon murino). Basado en los resultados de selectividad obtenidos, la fase final del estudio se centró en tres líneas celulares específicas: CaCo-2, CT-26 y HaCaT. En esta fase, se evaluaron el tratamiento en su forma libre, y su forma naoparticulada (NP cargadas) en dos gradientes de concentración (300-9.375 y 20-0.625 $\mu\text{g/ml}$) respectivamente.

La línea HaCaT se seleccionó como control no tumoral de origen epitelial, permitiendo una evaluación directa de la selectividad del tratamiento hacia células cancerosas versus células normales del mismo origen tisular. La línea CT-26 se incluyó como modelo murino de adenocarcinoma colorrectal, proporcionando un sistema comparativo al modelo humano representado por CaCo-2.

5.8.2 Condiciones de cultivo celular; Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones estandarizadas en incubadora con atmósfera húmeda estéril (37°C, 5% CO₂). Se empleó medio DMEM (Thermo Fischer, 12800) suplementado con 10% SFB, enrofloxacin al 0.5% y antibiótico/antifúngico al 1%.

5.8.3 Evaluación de citotoxicidad; La evaluación de citotoxicidad se realizó siguiendo la metodología de Elizondo-Luevano *et al.* (2024), con modificaciones. Las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos (10,000 células por pocillo) con medio conteniendo SFB al 2%. Tras 24 horas de incubación para permitir la adherencia celular, se administraron los tratamientos y se incubaron durante 24 horas adicionales. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Se añadieron 150 µL de solución MTT por pocillo, seguido de 3 horas adicionales de incubación. Posteriormente, se decantó el medio, se disolvieron los cristales de formazán producidos por las células metabólicamente activas con 100 µL de DMSO (permitiendo un tiempo de solubilización de 30 minutos), y se cuantificó la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas EPOCH™ (BioTek™, USA), con el software gen 5.

En todos los ensayos se incluyeron controles metodológicos adecuados: sulfato de vincristina (0.1 µM) como control positivo, medio sin tratamiento como control negativo, y control vehículo (solvente de los tratamientos libres o nanopartículas sin carga para las formulaciones nanoencapsuladas). Las lecturas de absorbancia, indicativas de la actividad metabólica mitocondrial, se utilizaron como medida de viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular} = \frac{(OD)_{\text{Tratamiento}}}{(OD)_{\text{Control Negativo}}} * 100$$

5.8.4 *Concentración inhibitoria media (IC₅₀)*; La IC₅₀ se determinó mediante análisis de regresión no lineal utilizando curvas dosis-respuesta, representando el valor de concentración del tratamiento que inhibe el 50% del crecimiento celular.

5.8.5 *Evaluación de selectividad*; Para evaluar la selectividad de los tratamientos hacia las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas, se calculó el índice de selectividad (IS) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de selectividad (IS)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Valor células normales}}{\text{IC}_{50} \text{ Valor células tumorales}}$$

Un valor de IS > 2 indica selectividad moderada hacia células cancerosas, mientras que un IS > 3 indica alta selectividad (Badisa *et al.*, 2009). Este parámetro permite evaluar comparativamente la eficacia y selectividad de los tratamientos hacia células cancerosas frente a células no cancerosas, siendo crucial para determinar el potencial terapéutico de los compuestos evaluados.

5.9 Diseño experimental

Los datos se presentaron como medias ± desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes realizados por triplicado (n=9). Se calculó la media y el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) para todas las determinaciones.

Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar las diferencias en la actividad citotóxica entre los cuatro compuestos evaluados (ficocianina, berberina, extracto de ruda y extracto de gobernadora), utilizando como variable de respuesta el IC₅₀. Se empleó un ANOVA bidireccional para evaluar las diferencias significativas tanto en los valores de IC₅₀ como en el índice de selectividad, analizando la interacción entre compuestos (ficocianina y vincristina) y líneas celulares (J774, VERO, HaCaT, HeLa, HepG2, CaCo-2 y CT-26).

La comparación de la actividad citotóxica entre compuestos nanoencapsulados y libres se realizó mediante ANOVA de una vía, utilizando como variable dependiente el IC₅₀. La concentración inhibitoria media (IC₅₀) se calculó mediante análisis Probit utilizando la herramienta Quest Graph™ IC₅₀ Calculator (AAT Bioquest, Inc., Pleasanton, CA, USA).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

VI RESULTADOS

6.1. Rendimientos de extracción y análisis fitoquímicos

Los rendimientos de extracción revelaron que el extracto de Ruda presentó el mayor rendimiento (28.4%), seguido por el extracto de Gob (24.4%). Los rendimientos de extracción para la FC fueron determinados previamente y reportados en las investigaciones de Ruiz-Hernández *et al.* (2023) y Sada-Borrego *et al.* (2023).

Para el análisis fitoquímico de los extractos, cada uno mostro un perfil único (Tabla 5). Los resultados negativos en la tabla no descartan completamente la presencia de estos metabolitos en las plantas de origen, ya que podrían encontrarse en concentraciones inferiores al límite de detección de las pruebas empleadas.

Tabla 5. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de Ruda, Gob, BBR y FC.

Muestra	LB	CM	BJ	QN	SP	SH	TN	AN	DF
Ruda	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Gob	+	+	+	+	-	+	+	-	-
BBR	-	-	-	-	-	-	-	-	+
FC	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Nota: (+) indica presencia del metabolito; (-) indica ausencia o niveles no detectables. Abreviaturas; LB: Libermann-Burchard (para esteroides y triterpenos), CM: Cumarinas, BJ: Baljet (para sesquiterpenlactonas), QN: Quinonas, SP: Saponinas, SH: Shinoda (para flavonoides), TN: Taninos, AN: Antrona (para carbohidratos) y DF: Dragendorff (para alcaloides).

6.2 Actividad hemolítica

Los ensayos de actividad hemolítica revelaron perfiles específicos para cada muestra evaluada. Se observó que los extractos presentaron diferentes comportamientos dependiendo de su origen y concentración de prueba. Destaca el comportamiento de los extractos de Ruda y Gob con actividad hemolítica considerable a altas concentraciones,

BBR con actividad moderada, y los tratamientos de FC y NP prácticamente nula. La Tabla 6 muestra los porcentajes de hemólisis para todas las muestras evaluadas.

Tabla 6. Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos de Ruda, Gob, BBR, FC y las NP.

µg/ml	Ruda	Gob	BBR	FC	NP blanco	NP cargadas
1000	100 ± 7.93%	69.77 ± 7.25%	4.57± 2.91%	2.58 ± 0.79%	1.00 ± 0.96%	2.43 ± 1.38%
800	13.46 ± 2.59%	61.46 ± 3.22%	3.74± 1.84%	1.78 ± 0.57%	0.98 ± 0.42%	2.20 ± 0.84%
600	0 ± 0.91%	47.76 ± 6.72%	2.62± 1.29%	1.35 ± 0.83%	0.75 ± 0.37%	1.27 ± 1.15%
400	0 ± 0.65%	39.74 ± 4.24%	1.90± 2.30%	0.93 ± 0.61%	0.30 ± 0.18%	0.82 ± 0.63%
200	0 ± 0.13%	6.14 ± 0.90%	1.45± 1.87%	0.66 ± 0.62%	0 ± 0.07%	0.36 ± 0.17%
100	0 ± 0%	3.48 ± 0.89%	2.17± 0.68%	0.25 ± 0.39%	0 ± 0%	0 ± 0.15%

Nota: Los valores representan el porcentaje de hemólisis ± desviación estándar. Clasificación según Mesdaghinia *et al.* (2019): no hemolítico (<2%), ligeramente hemolítico (2-5%), y hemolítico (>5%).

6.3 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas

Se encapsuló el extracto de FC mediante la técnica de evaporación de disolventes en doble emulsión. Se evaluaron diferentes formulaciones variando la concentración del extracto, cantidad de polímero y composición de las fases, como se muestra en la Tabla 7. Además, se evaluó la caracterización fisicoquímica completa de las nanopartículas seleccionadas; Tamaño, PDI, y Potencial z respectivamente (Figura 6, 7, 8 y 9).

Tabla 7. Parámetros de formulación y su efecto sobre el tamaño e índice de polidispersidad (PDI) de nanopartículas de PLGA con extracto de FC.

Formulación	Tamaño y PDI
W1: (300 µL) [400mg/mL] O1: 60 mg PLGA; 4 mL DCM; 1 mL Act; 1mL IP W2: 10 mL PVA; 1.14 mL ETA;1.7 mL IP; 0.66 mL DCM	T: 1815 nm PDI: 0.145
W1: (300 µL) [400mg/mL] O1: 80 mg PLGA; 4 mL DCM W2: 10 mL PVA; 1.14 mL ETA;1.7 mL IP; 0.66 mL DCM	T: 341.8 nm PDI: 0.200
W1: (300 µL) [100mg/mL] O1: 60 mg PLGA; 4 mL DCM W2: 10 mL PVA; 4.14 mL ETA;1.7 mL IP; 0.66 mL DCM	T: 179.3 nm PDI: 0.083
W1: (300 µL) [100mg/mL] O1: 60 mg PLGA + 30 mg PEG; 4 mL DCM W2: 10 mL PVA; 1.14 mL ETA;1.7 mL IP; 0.66 mL DCM	T: 421.7 nm PDI: 0.117
W1: (300 µL) [400mg/mL] O1: 60 mg PLGA; 4 mL DCM W2: 10 mL PVA; 1.14 mL ETA;1.7 mL IP; 0.66 mL DCM	T: 202.3 nm PDI: 0.209

Nota: W1 = fase acuosa interna con extracto; O1 = fase orgánica con polímero; W2 = fase acuosa externa; T = tamaño de partícula; PDI = índice de polidispersidad; DCM = diclorometano; Act = acetona; IP = isopropanol; PVA = alcohol polivinílico; ETA = etanol.

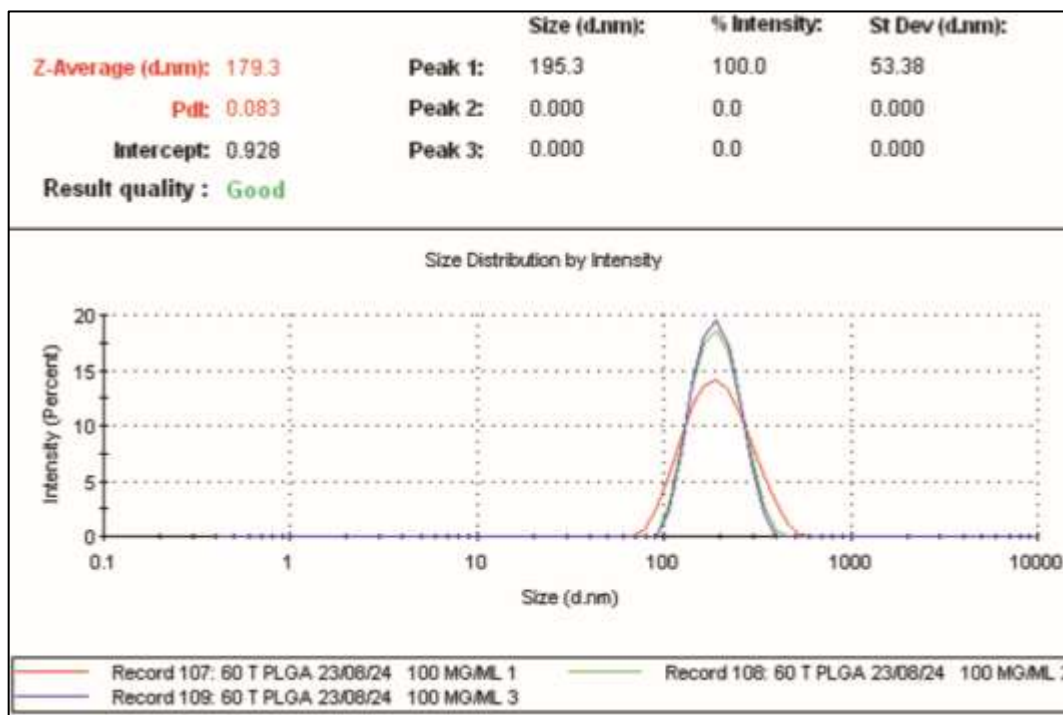


Figura 6 Caracterización de nanopartículas cargadas; Tamaño (nm)

Las nanopartículas de PLGA 50:50 cargadas con FC presentaron un tamaño óptimo de 179.3 nm, con un PDI de 0.083.

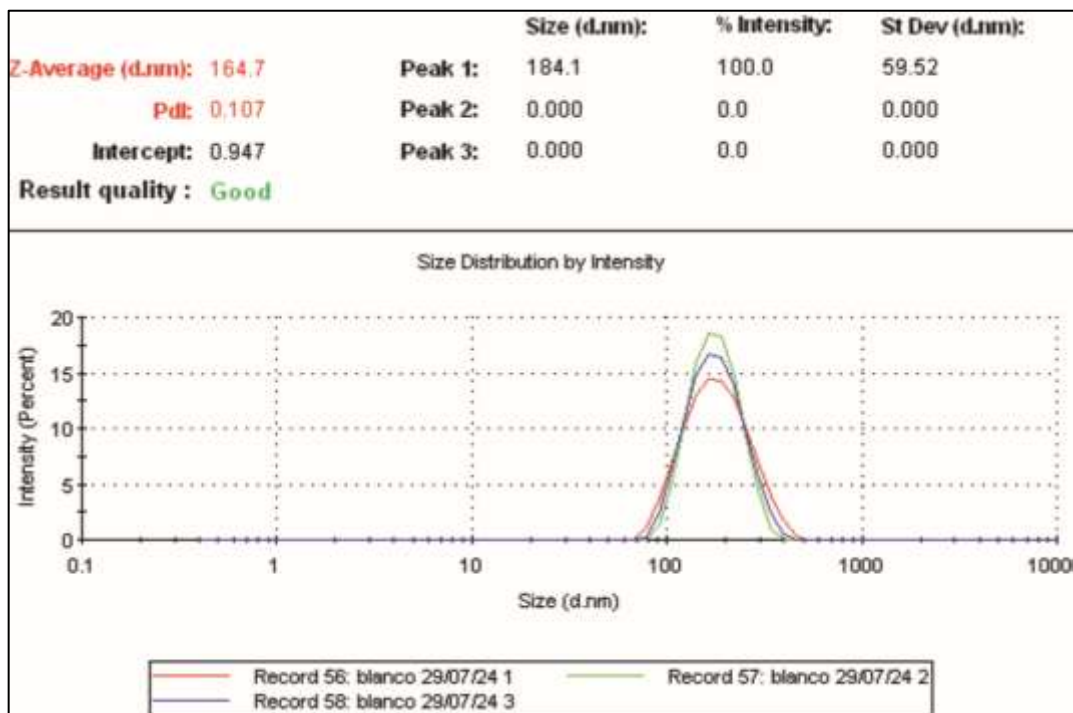


Figura 7 Caracterización de nanopartículas blanco; Tamaño (nm)

Las nanopartículas de PLGA 50:50 blanco presentaron un tamaño óptimo de 164.7 nm con un PDI de 0.107.

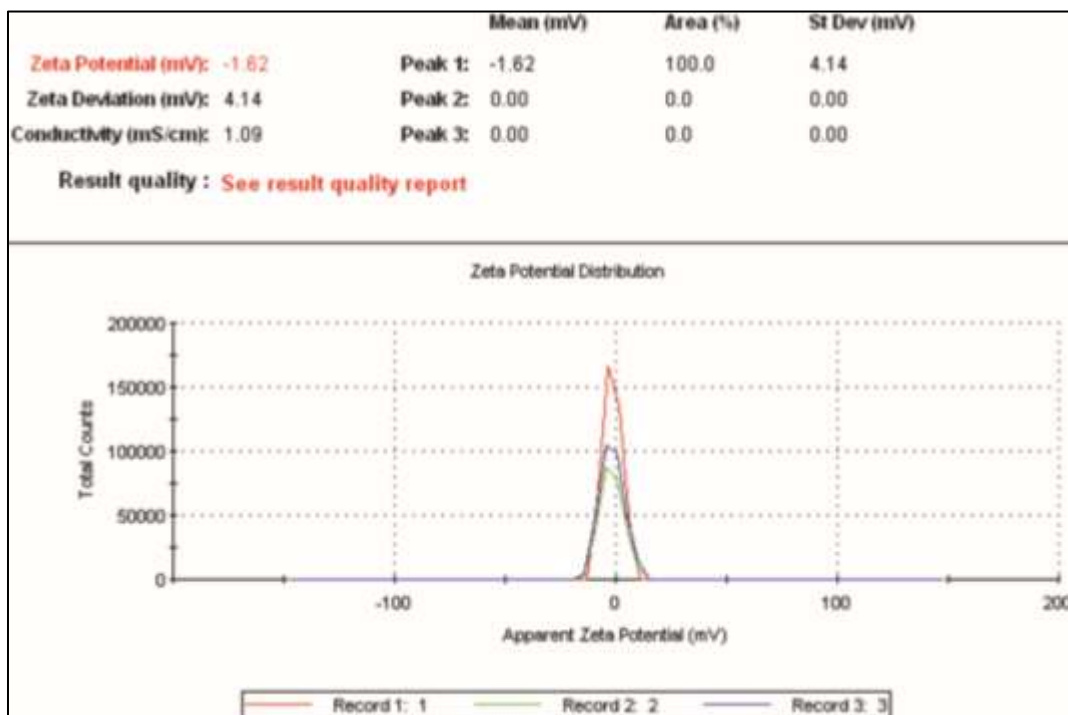


Figura 8 Caracterización de nanopartículas cargadas: Potencial ζ (mV)

Las nanopartículas de PLGA 50:50 cargadas de FC presentaron un potencial zeta de -1.62 mV.

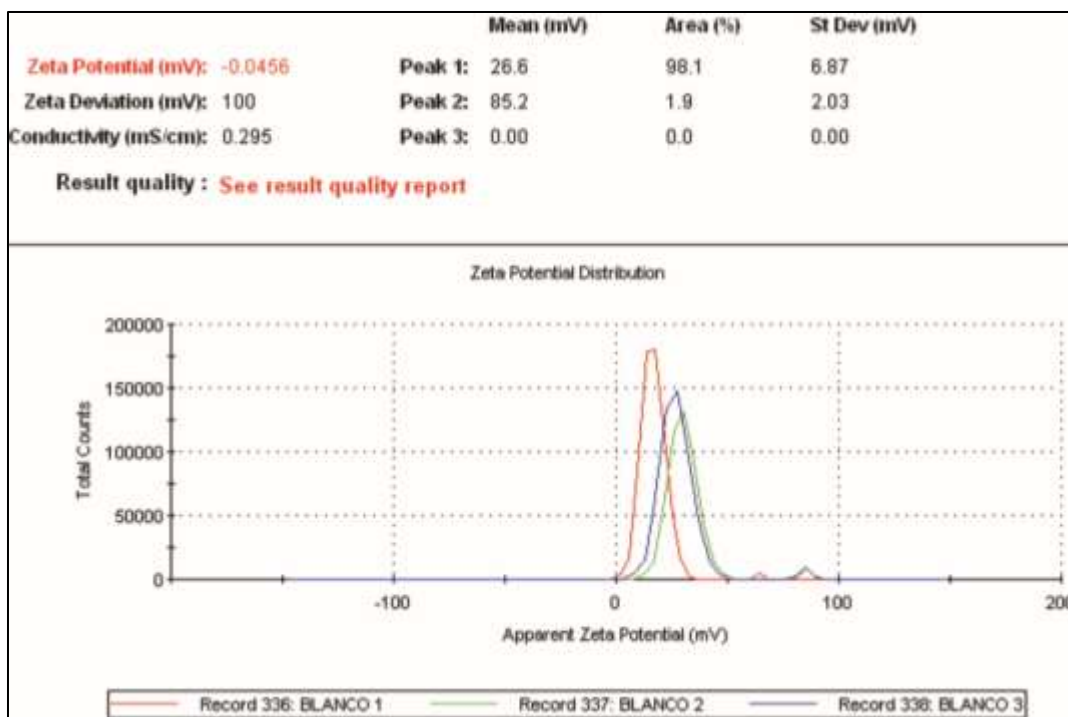


Figura 9 Caracterización de nanopartículas blanco; Potencial ζ (mV)

Las nanopartículas de PLGA 50:50 blanco presentaron un potencial zeta de -0.04 mV.

La EE% del extracto en las nanopartículas fue de 82.7%, indicando una alta retención del principio activo durante el proceso de formulación. El contenido de extracto en las nanopartículas DL% fue de 29.24%, lo que representa una carga significativa del compuesto activo.

6.4 Actividad citotóxica e índice de selectividad

6.4.1 *Evaluación comparativa de extractos en línea celular CaCo-2*; Se evaluó la actividad citotóxica de cuatro extractos (FC, BBR, Ruda y Gob) frente a la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano CaCo-2, determinando sus valores de IC₅₀ de viabilidad mitocondrial (Figura 10). El diseño experimental implementado fue secuencial, iniciando con estas células como fase inicial.

Tabla 8 ANOVA de una vía para actividad citotóxica de compuestos naturales en línea celular CaCo-2.

Parámetro estadístico	Valor	Interpretación
Fuente de variación	Entre grupos	
Grados de libertad	F(3,8)	
Estadístico F	1792.0	Diferencias altamente significativas
Valor p	<0.0001***	Rechaza H ₀
Coeficiente de determinación (R ²)	0.9985	99.85% de la variabilidad explicada
Prueba de homogeneidad	Brown-Forsythe: F=1.606, p=0.2629	Supuesto de homogeneidad de varianzas cumplido

Nota: ANOVA de una vía aplicado para comparar la actividad citotóxica (IC₅₀) de cuatro extractos vegetales. El estadístico F indica diferencias altamente significativas entre tratamientos. La prueba de Brown-Forsythe confirma el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad requerido para la validez del análisis.

Para analizar los extractos libres, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía que reveló diferencias altamente significativas entre los grupos (Tabla 8).

Evaluación de IC₅₀ de compuestos naturales en línea Caco-2

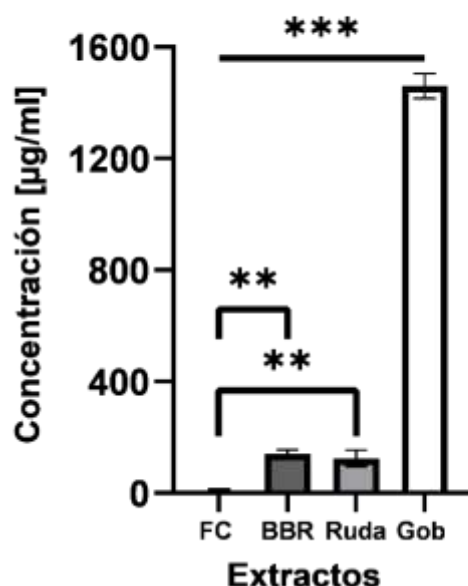


Figura 10 Resultados de IC₅₀ (µg/ml) de los 4 extractos en la línea celular CaCo-2

Significancia; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns=no significativo.
Las líneas horizontales conectan grupos comparados.

Las comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) revelaron que FC presentó una actividad significativamente mayor que BBR y Ruda, y notablemente superior a Gob (Tabla 9). Los valores medios confirman el siguiente orden de potencia citotóxica: FC > BBR $\approx$ Ruda > Gob.

Estos resultados indican que FC requiere una concentración aproximadamente 13 veces menor que BBR y Ruda, y 138 veces menor que Gob para inhibir el 50% del crecimiento celular en la línea CaCo-2, posicionándolo como el extracto con mayor potencial citotóxico entre los evaluados.

Tabla 9 Comparaciones múltiples post-hoc (Prueba de Tukey, $\alpha=0.05$).

Extracto	IC ₅₀ $\pm$ DE ($\mu\text{g/mL}$)	Comparación vs FC	Diferencia de medias	Valor p	Significancia
FC	10.56 $\pm$ 3.28	—	—	—	Referencia
BBR	140.85 $\pm$ 15.02	BBR vs FC	130.29	0.0021	**
Ruda	124.73 $\pm$ 29.69	Ruda vs FC	114.17	0.0047	**
Gob	1460.0 $\pm$ 45.13	Gob vs FC	1449.44	<0.0001	***
—	—	BBR vs Ruda	16.12	0.8931	ns
—	—	BBR vs Gob	1319.15	<0.0001	***
—	—	Ruda vs Gob	1335.27	<0.0001	***

Nota: Valores de IC₅₀ expresados como media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado (n=9). Las comparaciones múltiples fueron ajustadas mediante la prueba de Tukey para controlar la tasa de error. FC demostró la mayor potencia citotóxica con diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás extractos.

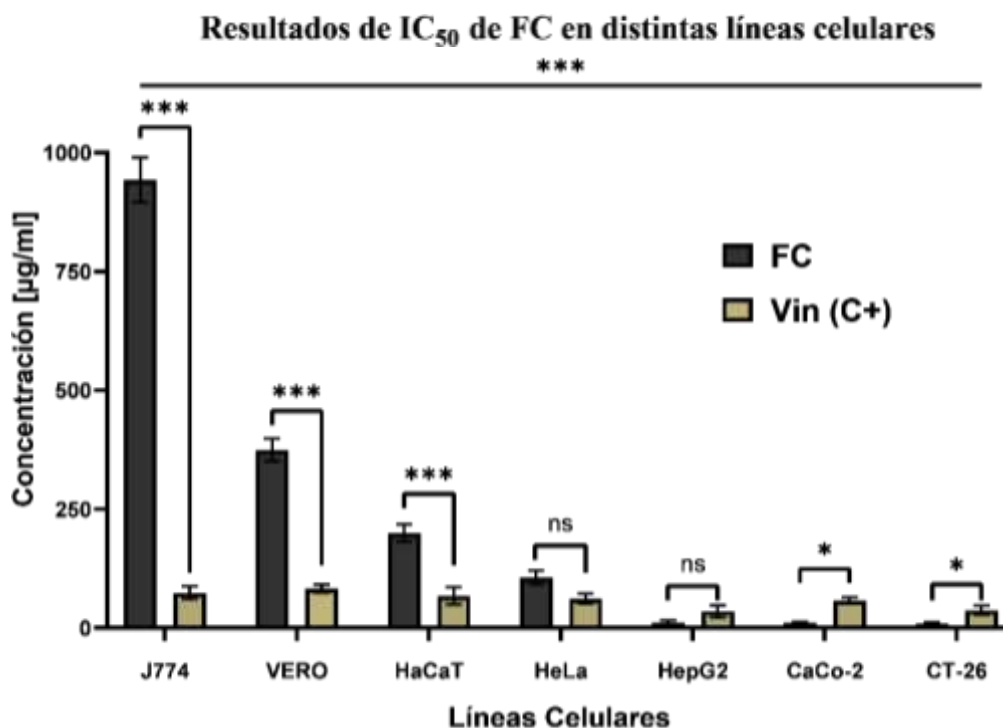


Figura 11 Resultados de IC₅₀ del extracto FC en diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales.

Significancia; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns=no significativo.

Las líneas horizontales conectan grupos comparados.

6.4.2 *Evaluación de selectividad celular del extracto FC*; Posteriormente se evaluó la actividad citotóxica de dos compuestos (FC y Vincristina) frente a siete líneas celulares (J774, VERO, HaCaT, HeLa, HepG2, CaCo-2 y CT-26), determinando sus valores de IC₅₀ (Figura 11).

Tabla 10 Análisis de varianza bidireccional.

Fuente de variación	GL	F	Valor p	% Variabilidad
Tratamiento (FC vs Vincristina)	1	1540.0	<0.0001***	13.63%
Línea celular	6	866.0	<0.0001***	46.00%
Interacción Tratamiento × Línea	6	755.4	<0.0001***	40.12%
Error	28	—	—	0.25%
Total	41	—	—	100.00%

Nota: ANOVA bidireccional evaluando el efecto del tratamiento (FC vs Vincristina), línea celular y su interacción sobre los valores de IC₅₀. GL: Grados de libertad

Para analizar los resultados de FC en distintas líneas celulares, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bidireccional que reveló diferencias altamente significativas tanto para el factor tratamiento, como para el factor línea celular, así como para la interacción entre ambos factores (Tabla 10). El efecto de la línea celular representó el 46.00% de la variabilidad total observada, mientras que el tratamiento explicó el 13.63%, y la interacción entre ambos factores un 40.12%. Estos resultados indican que la respuesta a los tratamientos varía significativamente según la línea celular utilizada.

Tabla 11 Valores de IC₅₀ y comparaciones estadísticas por línea celular.

Línea celular	Tipo celular	FC (µg/mL)	Vincristina (µg/mL)	Ratio FC/Vin	Comparación	Valor p
J774	Macrófagos	942.30 ± 47.29	73.96 ± 11.92	12.74	FC > Vin	<0.0001***
VERO	Riñón normal	374.40 ± 23.43	82.11 ± 11.92	4.56	FC > Vin	<0.0001***
HaCaT	Queratinocitos	199.61 ± 18.73	67.86 ± 11.92	2.94	FC > Vin	<0.0001***
HeLa	Cervical	105.00 ± 14.14	61.01 ± 11.92	1.72	FC ≈ Vin	0.0832 ns
HepG2	Hepático	11.59 ± 4.01	35.39 ± 11.92	0.33	FC < Vin	0.0254*
CaCo-2	Colorrectal	10.25 ± 2.58	58.09 ± 11.92	0.18	FC < Vin	0.0362*
CT-26	Colorrectal	10.03 ± 2.47	37.46 ± 11.92	0.27	FC < Vin	0.0345*

Nota: Valores de IC₅₀ expresados como media ± desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba de Šidák con corrección para múltiples comparaciones. El ratio FC/Vincristina <1 indica mayor potencia de FC, mientras que >1 indica menor potencia.

Las comparaciones múltiples mediante la prueba de Šidák ($\alpha=0.05$) revelaron un patrón diferencial de sensibilidad entre las líneas celulares estudiadas (Tabla 11). Para el extracto FC, se observó una variación de IC₅₀ desde 10.03 µg/mL (CT-26) hasta 942.30 µg/mL (J774), representando una diferencia de aproximadamente 94 veces entre la línea más sensible y la más resistente. El extracto FC exhibió mayor potencia que vincristina

específicamente en líneas de origen hepático (HepG2) y colorrectal (CaCo-2 y CT-26), donde FC mostró valores de IC_{50} aproximadamente 3-6 veces menores. Esta selectividad contrasta con el perfil más uniforme de actividad mostrado por vincristina, sugiriendo mecanismos de acción distintos entre ambos tratamientos.

6.4.3 Comparación entre formulación libre y nanoencapsulada; También se evaluó comparativamente la actividad citotóxica del extracto FC en su forma libre versus nanoencapsulada en la línea celular CaCo-2, que demostró mayor sensibilidad en el análisis previo (Figura 12).

Tabla 12 Análisis de varianza para formulaciones de FC en CaCo-2.

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	Valor p
Entre grupos	2	2,484,443	1,242,221	44,641	<0.0001***
Error	6	167.0	27.83	—	—
Total	8	2,484,610	—	—	—

Nota: ANOVA de una vía comparando tres formulaciones en línea celular CaCo-2. El alto valor de R^2 (0.9999) indica que prácticamente toda la variabilidad observada es explicada por las diferencias entre formulaciones. GL=grados de libertad; SC=suma de cuadrados; CM=cuadrado medio.

Tabla 13 Comparación de formulaciones mediante prueba de Tukey.

Formulación	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Diferencia vs FC libre	IC 95%	Valor p
FC libre	11.95	—	—	—
FC nanoencapsulado (NPTS-C)	20.84	+8.89	-4.33 a +22.10	0.1781 ns
Blanco (NPTS-B)	1,131	+1,119	+1,106 a +1,132	<0.0001***

Nota: Valores de IC_{50} expresados como media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3). La ausencia de diferencias significativas entre FC libre y nanoencapsulado ($p=0.1781$) indica equivalencia de las formulaciones.

IC_{50} de FC libre y nanoparticulado en células Caco-2

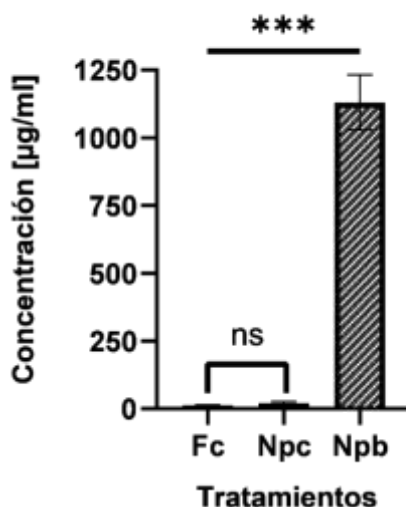


Figura 12 Resultados de IC_{50} de FC en su forma libre y nanoparticulada en la línea celular CaCo-2.

Significancia; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns=no significativo.

Las líneas horizontales conectan grupos comparados.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) unifactorial demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados (Tabla 12). Las pruebas post hoc de Tukey (Tabla 13), indicaron que no existe diferencia significativa entre los valores de IC₅₀ del extracto libre y el nanoencapsulado ($p = 0.1781$), lo que sugiere una eficacia comparable entre ambas formulaciones. Ambas formulaciones presentaron una actividad inhibitoria considerablemente mayor que el control blanco, con diferencias de medias de -1119 y -1110 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.4.4 Determinación de índices de selectividad; Se calcularon los índices de selectividad (IS) del extracto FC utilizando tres líneas celulares no tumorales como referencia: HaCaT (queratinocitos), VERO (células renales) y J774 (macrófagos), frente a cuatro líneas tumorales: HeLa, HepG2, CaCo-2 y CT-26 (Figura 13).

Tabla 14 Análisis de varianza bidireccional para índices de selectividad.

Fuente de variación	GL	F	Valor p	Interpretación
Línea celular tumoral	4	261.43	<0.001***	Diferencias entre líneas tumorales
Línea celular control	2	1198.29	<0.001***	Diferencias entre líneas control
Interacción	8	25.98	<0.001***	Selectividad específica por combinación

Nota: ANOVA factorial evaluando el efecto de la línea tumoral, línea control y su interacción sobre los índices de selectividad. La significancia de la interacción confirma que la selectividad es específica para cada combinación celular, validando el concepto de selectividad diferencial del extracto FC. GL=grados de libertad.

Tabla 15 Índices de selectividad del extracto FC.

Línea tumoral	vs HaCaT	vs VERO	vs J774	Línea de mayor selectividad
HeLa	1.90 $\pm$ 0.06	3.56 $\pm$ 0.26	8.98 $\pm$ 0.64	J774
HepG2	17.61 $\pm$ 3.29	32.89 $\pm$ 5.03	82.81 $\pm$ 12.79	J774
CaCo-2	20.37 $\pm$ 5.44	38.07 $\pm$ 9.22	95.84 $\pm$ 23.36	J774
CT-26	19.94 $\pm$ 1.03	37.40 $\pm$ 2.44	94.15 $\pm$ 56.11	J774

Nota: Índices de selectividad calculados como IC₅₀(línea no tumoral)/IC₅₀(línea tumoral). Valores >3 indican selectividad hacia células tumorales. Los datos representan media $\pm$ desviación estándar. Los valores más altos indican mayor selectividad, siendo J774 la línea de referencia que proporciona los índices más elevados.

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos, indicando que los índices de selectividad varían considerablemente dependiendo de la combinación

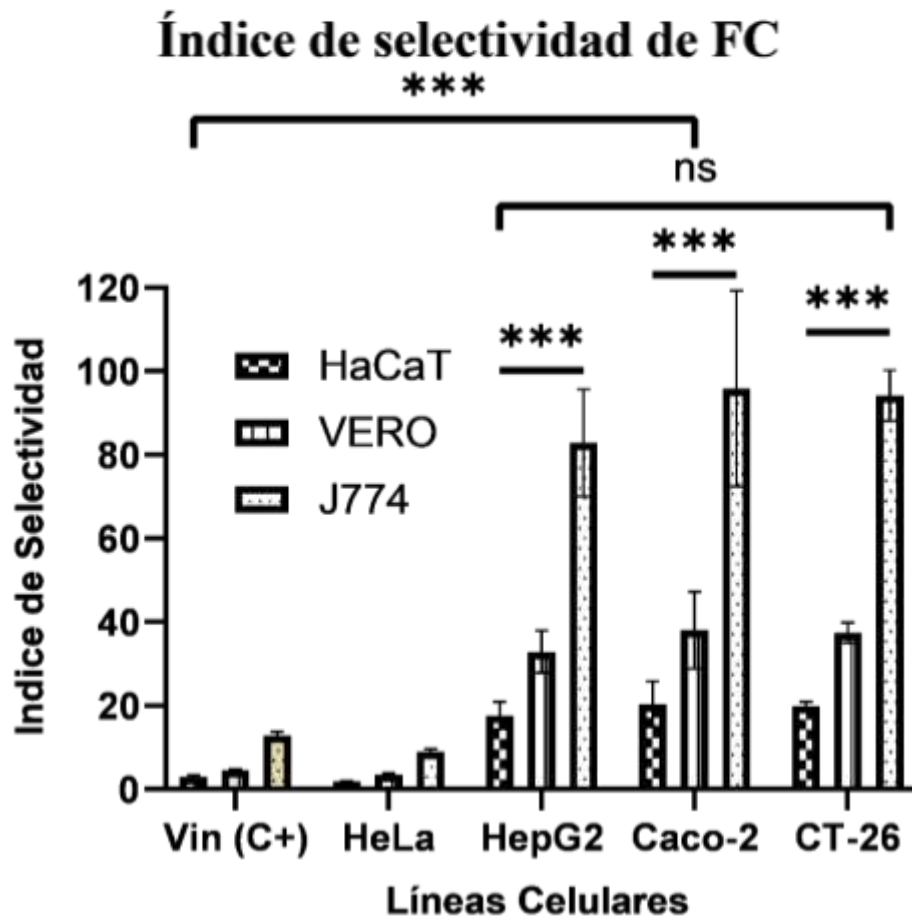


Figura 13 IS del extracto FC utilizando tres líneas celulares sanas como referencia.

Significancia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns=no significativo.

Las líneas horizontales conectan grupos comparados.

específica de líneas celulares evaluadas (Tabla 14). Los análisis post-hoc de Tukey revelaron que las líneas HepG2, CaCo-2 y CT-26 presentaron índices de selectividad significativamente mayores que HeLa en todas las líneas celulares control (*** $p < 0.001$) (Tabla 15). La selectividad más notable se observó utilizando macrófagos J774 como referencia, con valores superiores a 80 para las líneas hepáticas y colorrectales. En comparación con el control positivo vincristina, todas las líneas celulares tumorales, excepto HeLa, mostraron índices de selectividad significativamente superiores (*** $p < 0.001$), sugiriendo un potencial terapéutico prometedor.

Estos resultados demuestran que el extracto FC posee una potente actividad citotóxica selectiva contra células cancerosas, especialmente de origen colorrectal y hepático, manteniendo una toxicidad significativamente menor hacia células normales.

VII DISCUSIÓN

7.1 Rendimiento de extracción y pruebas fitoquímicas

La investigación sobre extractos naturales con potencial terapéutico anticancerígeno representa un campo prometedor para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto en el presente estudio se evaluaron recursos naturales mexicanos con actividad citotóxica previamente documentada: extractos de *Ruta chalepensis* y *Larrea tridentata*, Berberina y Ficocianina purificada de *Arthrospira maxima*. La selección de estos compuestos se fundamenta en su origen nacional y en evidencia científica previa que documenta su potencial anticancerígeno, constituyendo una exploración sistemática para identificar nuevas moléculas terapéuticas y desarrollar formas innovadoras de administración. La extracción metanólica se eligió como método de obtención debido a la polaridad intermedia del metanol, que permite extraer tanto compuestos polares como moderadamente apolares, maximizando así la diversidad de metabolitos secundarios recuperados con potencial bioactividad (Zhang *et al.*, 2018). Como se muestra en la Tabla 5, los resultados revelaron que el extracto de *R. chalepensis* (Ruda), presentó el mayor rendimiento de extracción (28.4%), seguido por *L. tridentata* (Gob), (24.4%). Estos valores son comparables con los reportados por Rodríguez-Garza *et al.* (2023), quienes obtuvieron rendimientos de 19.40% para Ruda y 26.61% para Gob. Las variaciones observadas en los porcentajes de rendimiento son inherentes a este tipo de estudios, ya que factores como el método de extracción, el solvente utilizado, la temporada de recolección y la región geográfica de origen pueden influir en la eficiencia del proceso de extracción (Alotaibi *et al.*, 2018; Velázquez-Martínez *et al.*, 2022).

Los perfiles fitoquímicos presentados en la Tabla 5 para Ruda y Gob mostraron consistencia con estudios anteriores reportados por Alotaibi *et al.* (2018) y Rodríguez-Garza *et al.* (2023). Para Ruda, se detectó la presencia de alcaloides, carbohidratos, cumarinas, flavonoides, esteroides/triterpenos y taninos, así como la ausencia de quinonas y saponinas. En el caso de Gob, se confirmó la presencia de esteroides/triterpenos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, quinonas, flavonoides y taninos, mientras que no se detectaron saponinas, carbohidratos ni alcaloides. La importancia de caracterizar estos

perfiles fitoquímicos radica en establecer una correlación entre la composición química y la actividad biológica observada, ya que diferentes grupos de metabolitos secundarios están asociados con mecanismos específicos de acción anticancerígena. Por ejemplo, los flavonoides y taninos presentes en ambos extractos han demostrado actividad antioxidante y pro-apoptótica, mientras que las cumarinas se asocian con efectos antiproliferativos (Çetinkaya *et al.*, 2022; Abidi *et al.*, 2023). La ausencia de ciertos metabolitos también proporciona información valiosa, ya que permite descartar posibles efectos secundarios o interacciones no deseadas asociadas con esos compuestos específicos.

La Ficocinina purificada aislada de *A. maxima* (FC), únicamente mostró resultados positivos para saponinas según la Tabla 5. La presencia exclusiva de saponinas en esta fracción sugiere que el proceso de purificación basado en buffer de fosfatos con agitación, según las metodologías de Ruiz-Hernández *et al.* (2023) y Sada-Borrego *et al.* (2023), fue efectivo para eliminar la mayoría de los metabolitos secundarios típicamente presentes en *A. maxima*. Este método, optimizado para parámetros como pH, cantidad de biomasa y concentración de buffer para maximizar la concentración y pureza de ficocianina, logró una separación selectiva de compuestos. Es importante mencionar que *A. maxima* naturalmente produce diversos compuestos bioactivos, incluyendo flavonoides antimicrobianos, terpenos, alcaloides, saponinas y quinonas, cuya producción puede incrementarse bajo condiciones de estrés controlado (Ilieva *et al.*, 2024).

Por otro lado, el estándar comercial de Berberina (BBR) mostró únicamente reacción positiva para alcaloides (Tabla 5), resultado que confirma la pureza del compuesto comercial utilizado. La berberina es un alcaloide isoquinolínico bien caracterizado, y la ausencia de otros metabolitos en el análisis fitoquímico valida la calidad del estándar empleado en el estudio. Este resultado permite establecer que cualquier actividad biológica observada puede atribuirse específicamente a la berberina, sin interferencias de otros compuestos.

7.2 Pruebas de hemólisis

Respecto a la actividad hemolítica, nuestros resultados muestran un comportamiento diferencial entre los extractos evaluados (Tabla 6). El extracto de Ruda exhibió una fuerte actividad hemolítica, alcanzando un 100% a 1000 ppm, mientras que a concentraciones inferiores a 600 ppm no mostró actividad hemolítica significativa. Estos resultados son consistentes con los reportados por Rodríguez-Garza *et al.* (2023), quienes obtuvieron un IC_{50} de $738.73 \pm 20.74 \mu\text{g/mL}$. Esto indica que el valor de IC_{50} de nuestro extracto se encuentra dentro del rango esperado (entre 600 y 1000 ppm), confirmando el potencial hemolítico del extracto de Ruda. Las pequeñas variaciones observadas podrían atribuirse a diferencias en la composición fitoquímica de los extractos, influenciada por factores como la región de recolección o el método de extracción empleado (Alotaibi *et al.*, 2018).

Es importante destacar que, según los criterios establecidos por Mesdaghinia *et al.*, (2019), el porcentaje de hemólisis en las muestras se interpreta como: <2% no hemolítico, 2-5% ligeramente hemolítico y >5% hemolítico. Conforme a estos parámetros, nuestros resultados indican que el extracto de Ruda presenta un comportamiento claramente hemolítico a concentraciones superiores a 600 ppm, lo que sugiere precaución en su aplicación terapéutica directa en formulaciones que puedan entrar en contacto con el sistema circulatorio.

Gob también presentó una notable actividad hemolítica, con valores que oscilaron entre 3.48% a 100 ppm hasta 69.77% a 1000 ppm. Estos resultados difieren significativamente de lo reportado por Rodríguez-Garza *et al.* (2023), quienes encontraron un IC_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para este mismo extracto, indicando una actividad hemolítica considerablemente menor. Esta discrepancia podría atribuirse a diversos factores, como diferencias en las condiciones experimentales, en la metodología empleada para la evaluación hemolítica, o variaciones en el contenido de metabolitos secundarios de las muestras. Estudios previos han demostrado que factores ambientales y geográficos pueden afectar significativamente la composición fitoquímica de las plantas, particularmente el contenido de quinonas y flavonoides (Zhao *et al.*, 2021), compuestos que han sido ampliamente asociados con efectos citotóxicos y hemolíticos.

Por otro lado, el extracto de BBR mostró una actividad hemolítica moderada, con valores entre 1.45% y 4.57% en el rango de concentraciones evaluado. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Elizondo-Luévano *et al.* (2021) para la berberina, el principal alcaloide de esta planta, quienes reportaron un $2.8 \pm 0.4\%$ de hemólisis a 100 $\mu\text{g/mL}$, incrementándose significativamente a concentraciones superiores.

Entre todos, fue particularmente notable el comportamiento del extracto de FC (Tabla 6), ya que demostró una nula actividad hemolítica incluso a altas concentraciones, manteniéndose consistentemente por debajo del 2.58% en todo el rango evaluado. Según los criterios anteriormente mencionados este extracto se clasifica como no hemolítico (hemólisis $<2\%$). Esta característica coincide con investigaciones previas de Romy y González (2000), quienes reportaron que la ficocianina, componente principal de *A. maxima*, inhibe significativamente la hemólisis de eritrocitos, presentando una notable actividad antihemolítica.

Basado en su excepcional perfil de seguridad hemolítica demostrado en la Tabla 6, se seleccionó el extracto de *A. maxima* para su nanoencapsulación. Las nanopartículas blancas (sin extracto) y las nanopartículas cargadas con el extracto de *A. maxima* mantuvieron un perfil no hemolítico similar al extracto libre, con valores que no superaron el 2.43% incluso a 1000 ppm. Estos resultados son consistentes con el estándar ASTM E2524-08, que establece que un porcentaje de hemólisis inferior al 5% indica ausencia de daño significativo a los glóbulos rojos (Liu *et al.*, 2021).

Esta notable característica de *A. maxima*, tanto en su forma libre como nanoencapsulada, representa una ventaja significativa para su potencial aplicación terapéutica, particularmente en el contexto oncológico, donde la selectividad constituye un factor crítico para el desarrollo de nuevos agentes. A diferencia de muchos compuestos citotóxicos que presentan efectos secundarios significativos relacionados con la hemólisis, el extracto de *A. maxima* demostró una selectividad excepcional, manteniendo su actividad citotóxica contra células tumorales sin afectar significativamente a los eritrocitos humanos. Este hallazgo es particularmente relevante considerando que uno de los principales desafíos en el desarrollo de agentes antineoplásicos es lograr un equilibrio entre potencia y seguridad (Atanasov *et al.*, 2021).

7.3 Citotoxicidad en líneas celulares

7.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de extractos en CaCo-2; La evaluación comparativa de cuatro extractos naturales (Ficocianina, Berberina, Ruda y Gobernadora) en la línea celular CaCo-2 reveló diferencias estadísticamente significativas en su actividad inhibitoria (Tabla 8), como se observa en la Figura 10. El análisis post-hoc mediante la prueba de Tukey identificó tres grupos estadísticamente distintos (Tabla 9): FC como el grupo más potente, Berberina y Ruda formando un grupo intermedio sin diferencias significativas entre sí, y Gobernadora representando el grupo con menor potencia inhibitoria.

Según los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (Anywar *et al.*, 2022), los extractos se categorizaron como: FC, citotóxico ($IC_{50} = 10.56 \mu\text{g/mL}$, en el rango >10 y $<100 \mu\text{g/mL}$); BBR y Ruda, moderadamente citotóxicos ($IC_{50} = 140.85$ y $124.73 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, en el rango >100 y $<1000 \mu\text{g/mL}$); y Gob, potencialmente no citotóxico ($IC_{50} = 1460 \mu\text{g/mL}$, superior a $1000 \mu\text{g/mL}$). La potencia demostrada por la FC concuerda con los hallazgos de Soliman *et al.* (2024), quienes documentaron efectos antiproliferativos potentes contra diversas líneas celulares cancerosas. Este comportamiento también ha sido observado por diferentes grupos de investigación, quienes demostraron que la ficocianina suprime la vía PI3K/Akt/mTOR (Fosfatidilinositol 3-quinasa/Proteína quinasa B/Diana de rapamicina en células de mamífero) al disminuir la fosforilación de Akt (Ser473), mTOR (Ser2448) y p70S6K (Proteína quinasa ribosomal S6 de 70 kDa), un mecanismo crucial en la regulación de la proliferación celular y la inducción de apoptosis (Muerte celular programada) en células tumorales (Jiang *et al.*, 2017).

La Berberina (BBR), mostró una actividad citotóxica "moderadamente activa" (IC_{50} entre 21 - $200 \mu\text{g/mL}$) con un valor de $140.85 \mu\text{g/mL}$. Su efecto en células CaCo-2 se alinea con los estudios de Tong *et al.* (2020) y Zhang *et al.* (2020), quienes describieron su capacidad para inhibir la proliferación celular y suprimir la metástasis tumoral. Adicionalmente, Kim *et al.* (2018) reportaron que la BBR induce arresto del ciclo celular en fase G2/M y activa vías apoptóticas intrínsecas a través de la regulación de proteínas pro-apoptóticas como

Bax y anti-apoptóticas como Bcl-2. Sin embargo, su menor potencia en comparación con la FC en nuestro estudio podría explicarse por su reducida biodisponibilidad oral y baja solubilidad en agua, como señalan Xiong *et al.* (2022).

El extracto de Ruda (*R. chalepensis*) exhibió un perfil similar, con una actividad citotóxica moderada (IC₅₀ de 124.73 µg/mL). Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Acquaviva *et al.* (2011) y Elizondo-Luévano *et al.* (2023). La actividad citotóxica de la Ruda ha sido atribuida principalmente a compuestos como furanocumarinas y alcaloides; Jiang *et al.* (2018) demostraron que varios fitoquímicos pueden generar un efecto pro-oxidante selectivo en células tumorales, incrementando los niveles de especies reactivas de oxígeno y comprometiendo los sistemas antioxidantes celulares, lo que podría explicar la actividad citotóxica moderada observada en nuestro estudio.

La Gobernadora (*L. tridentata*) presentó la menor actividad citotóxica entre los extractos evaluados (IC₅₀ de 1460 µg/mL), clasificándose como "inactiva" (IC₅₀ > 501 µg/mL) según los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (Anywar, 1972). Aunque nuestros resultados muestran baja actividad del extracto crudo, Lambert *et al.* (2005) identificaron actividad inhibidora en lignanos aislados. Estos compuestos, especialmente el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), han demostrado capacidad para influir en la señalización celular, como documentaron Youngren *et al.* (2005), quienes señalaron que el NDGA inhibe la auto-fosforilación de receptores tirosina quinasa relacionados con la proliferación celular. Este mecanismo sugiere que la purificación e identificación de componentes específicos podría revelar compuestos con mayor potencial terapéutico que el extracto completo.

7.3.2 Selectividad de FC hacia diferentes líneas celulares; Dado el desempeño sobresaliente de la Ficocianina, se amplió su evaluación hacia otras líneas celulares cancerígenas (Figura 11). Los resultados obtenidos (Tabla 10), revelan la notable selectividad hacia células cancerígenas colorrectales (CaCo-2, CT-26) y hepáticas (HepG2) con IC₅₀ cercanos a 10 µg/mL, contrastando con la menor toxicidad en células normales, sugiere que la ficocianina explota vulnerabilidades metabólicas específicas de las células transformadas. Esta selectividad diferencial podría explicarse por el efecto

Warburg donde las células cancerígenas exhiben un metabolismo energético alterado, caracterizado por una mayor dependencia de la glucólisis y una disfunción mitocondrial, lo que podría hacerlas más susceptibles a los efectos pro-oxidantes de la ficocianina (Challagali, 2023).

Estos resultados coinciden con los de Roy *et al.* (2007), quienes demostraron el efecto selectivo de la C-ficocianina en células cancerosas hepáticas HepG2, tanto sensibles como resistentes a doxorubicina. Específicamente, estos autores reportaron que la C-PC (C-ficocianina) indujo apoptosis en células de carcinoma hepatocelular a concentraciones de 40-50 μM (micromolar), mientras que no mostró efectos citotóxicos en hepatocitos primarios de rata hasta concentraciones de 100 μM durante 72 horas. Esta selectividad podría estar relacionada con las características metabólicas particulares de las células transformadas versus las células normales. Fernández-Rojas *et al.* (2014) sugirieron que la FC actúa como un potente agente hepatoprotector mediante la modulación del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, lo que podría explicar su efectividad específica en células hepáticas transformadas.

Simultáneamente, la FC mantuvo baja citotoxicidad en células normales: macrófagos J774 ($942.3 \pm 47.29 \mu\text{g/mL}$), células renales VERO ($374.40 \pm 23.43 \mu\text{g/mL}$) y queratinocitos HaCaT ($199.61 \pm 18.73 \mu\text{g/mL}$). Esta notable selectividad concuerda con Wang *et al.* (2007), pero también estudios como el de Basha *et al.* (2008) reportaron que la C-ficocianina induce muerte celular selectiva en líneas celulares cancerosas mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, mientras que las células normales, con mayor capacidad antioxidante endógena, mantienen su viabilidad frente a este tratamiento.

La línea HeLa presentó una sensibilidad intermedia ($106.00 \pm 14.14 \mu\text{g/mL}$), lo que revela un patrón de sensibilidad diferencial. Bhat y Madyastha (2001) demostraron que la FC puede ejercer efectos antioxidantes y antiproliferativos dependientes del contexto celular, lo que podría explicar la variabilidad en la respuesta entre diferentes líneas celulares. Por otra parte, Czerwonka *et al.* (2018) propusieron que el microambiente tumoral específico de cada tipo de cáncer podría influir significativamente en la eficacia de los compuestos bioactivos, explicando así las diferencias observadas en la sensibilidad celular.

7.3.3 Comparación con vincristina; Al comparar FC con vincristina (control positivo), observamos patrones contrastantes de actividad que sugieren mecanismos de acción distintos (Tabla 11). Vincristina resultó significativamente más potente en líneas normales J774, VERO y HaCaT, mientras que el extracto FC exhibió mayor potencia en líneas HepG2, CaCo-2 y CT-26, con valores de IC_{50} aproximadamente tres veces menores. Esta selectividad específica de FC hacia líneas celulares de origen hepático y colorrectal contrasta con el perfil más uniforme de vincristina. Este fenómeno podría explicarse por los distintos mecanismos de acción de ambos compuestos. La vincristina actúa principalmente como un inhibidor de microtúbulos que interfiere con la mitosis celular, un mecanismo que afecta a todas las células en división rápida, como señalaron Martino *et al.* (2018). En contraste, Jiang *et al.* (2018) demostraron que la FC actúa a través de múltiples vías, incluyendo la regulación del ciclo celular y la modulación de señales pro-apoptóticas, que podrían estar diferencialmente alteradas en distintos tipos de cáncer.

La capacidad de la FC para superar el efecto de vincristina en células específicas resulta prometedora, especialmente considerando el fenómeno de resistencia a fármacos. Liao *et al.* (2016) observaron que la FC puede sensibilizar células resistentes a quimioterapia convencional mediante la modulación de proteínas de resistencia a múltiples fármacos, sugiriendo su potencial como adyuvante en terapias combinadas, ya que modula selectivamente las vías MAPK (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos), aumentando la fosforilación de JNK (Quinasa c-Jun N-terminal) y p38 (Proteína quinasa p38) mientras reduce la de Erk (Quinasa Regulada por Señales Extracelulares), sin alterar los niveles totales de estas proteínas.

7.3.4 Índices de selectividad; La evaluación de índices de selectividad (IS) (Figura 13), reveló valores notablemente elevados para FC, particularmente al utilizar células J774 como referencia. Estos resultados superan significativamente el umbral de relevancia farmacológica ($IS > 3$) establecido por Iñiguez *et al.* (2021), confirmando el potencial terapéutico de este compuesto (Tabla 12 y 13).

La marcada selectividad de FC, definida como la capacidad para inhibir células tumorales preservando la integridad de células normales (Henderson, 1974), puede atribuirse a su

acción específica sobre mecanismos moleculares alterados exclusivamente en células neoplásicas. Jha *et al.* (2024) identificaron que la FC puede distinguir entre células normales y cancerosas mediante la inducción selectiva de especies reactivas de oxígeno en células tumorales, aprovechando las diferencias metabólicas intrínsecas. Por otra parte, Fernández-Rojas *et al.* (2014) evidenciaron que la FC puede ejercer efectos selectivos sobre vías de señalización críticas como NF- κ B (Factor Nuclear kappa B) y rutas de las MAPK, frecuentemente alteradas en células neoplásicas, contribuyendo a su actividad anticancerígena.

Los altos IS observados son especialmente significativos para las líneas de origen colorrectal y hepático, lo que sugiere una afinidad particular de la FC por las características moleculares de estos tipos de cáncer. Kunte y Desai (2018) propusieron que la estructura química única de la FC, con sus cromóforos tetrapirrólicos, le permite interactuar selectivamente con receptores específicos sobre expresados en células tumorales, contribuyendo a su selectividad. Este mecanismo diferencial podría explicar la variabilidad en los índices de selectividad observados entre distintas líneas celulares.

La selectividad observada posiciona a la FC como un candidato prometedor para el desarrollo de terapias dirigidas contra tipos específicos de cáncer, particularmente aquellos de origen colorrectal y hepático, mientras minimiza los efectos adversos en tejidos sanos. Según Ferreira *et al.* (2022), los compuestos con alto índice de selectividad generalmente presentan menor toxicidad sistémica en estudios *in vivo*, lo que refuerza el potencial clínico de la FC como agente terapéutico:

El conjunto de estos resultados destaca el potencial de los extractos naturales, particularmente la Ficocianina, como fuentes de compuestos bioactivos con actividad antineoplásica selectiva. Nuestros hallazgos respaldan la creciente evidencia de que los productos naturales pueden ofrecer alternativas o complementos valiosos a las terapias convencionales contra el cáncer, como sugieren Mena *et al.* (2021), quienes documentaron que los compuestos bioactivos derivados de algas pueden modular múltiples vías de señalización simultáneamente, presentando ventajas sobre fármacos sintéticos de acción única.

7.4 Nanoencapsulación

La estrategia de nanoencapsulación mediante PLGA 50:50 representa un avance metodológico crucial para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad del extracto de FC. Las características físicoquímicas de las nanopartículas resultaron particularmente prometedoras según se detalla en la Tabla 7: un tamaño óptimo de 179.3 nm, un índice de polidispersidad de 0.083 y una eficiencia de encapsulación del 82.7%. Estos parámetros sugieren una formulación altamente uniforme y eficiente, como se evidencia en las caracterizaciones mostradas en las Figuras 6, 7, 8 y 9.

La nanoencapsulación resulta particularmente importante considerando que la C-PC es una proteína fotosensible y termosensible, susceptible de desnaturalización a temperaturas superiores a 45°C (Soliman *et al.*, 2024). El uso de matrices poliméricas como PLGA proporciona una protección efectiva para estos compuestos sensibles debido a su baja toxicidad y alta biocompatibilidad, como señalan Acharya *et al.* (2011) y Bechelli *et al.* (2011). Además, el PLGA cuenta con la ventaja adicional de estar aprobado por la FDA para su uso en sistemas de administración de medicamentos. Los sistemas de nanopartículas de PLGA ofrecen múltiples beneficios terapéuticos. Primero, proporcionan una liberación sostenida y controlada del fármaco, como demuestran Dumbuya *et al.* (2024) en su investigación con disulfiram, un fármaco anticancerígeno limitado por su baja solubilidad y rápido metabolismo. Sus hallazgos revelaron que la encapsulación en PLGA aumentaba significativamente la vida media del fármaco, liberando solo 55-58% después de 12 horas, comparado con el 98% del fármaco libre. Esto permite mantener concentraciones terapéuticas en el torrente sanguíneo durante períodos prolongados y reduce la necesidad de administraciones frecuentes (Khanal *et al.*, 2016). Segundo, estos sistemas mejoran la biodisponibilidad de compuestos con propiedades farmacológicas prometedoras pero limitadas por características físicoquímicas desfavorables. Sherekar *et al.* (2024) confirmaron esta ventaja al demostrar que las nanopartículas de diosgenina presentan mayor biodisponibilidad en experimentos con ratas. Paralelamente, Genatullina *et al.* (2024) documentaron cómo estos sistemas permiten desarrollar formas farmacéuticas innovadoras con acción prolongada mediante transportadores biodegradables. Tercero, debido a su tamaño nanométrico, estas partículas pueden

penetrar tejidos específicos a través de las fenestraciones presentes en el endotelio del cáncer y tejido inflamado, o mediante receptores sobreexpresados por las células diana. Esta característica permite una administración específica de los fármacos, minimizando efectos secundarios en tejidos sanos. Guillén-Meléndez *et al.* (2024) han destacado esta aplicación específica en tratamientos oncológicos, especialmente para cáncer de mama y cervical, donde las nanopartículas de PLGA protegen los compuestos bioactivos contra la degradación, mejoran la solubilidad de moléculas poco solubles y proporcionan un direccionamiento específico hacia las células cancerosas.

Al comparar la actividad citotóxica de la FC libre y nanoencapsulada en células CaCo-2, el análisis unifactorial (ANOVA) (Tabla 14 y 15) no reveló diferencias significativas entre sus valores de IC_{50} (11.95 y 20.84 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; $p = 0.1781$), como se observa en la Figura 12. Esto contrasta con lo esperado según Jespersen *et al.* (2004), quienes indicaron que esta técnica prolonga la vida media de los compuestos sensibles y mejora su capacidad de absorción en el organismo. Sin embargo, esta aparente contradicción podría explicarse por las limitaciones inherentes a los ensayos *in vitro*. La literatura científica reciente ha identificado una importante discrepancia entre resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* en sistemas de nanoencapsulación. Rodell *et al.* (2021), utilizando análogos fluorescentes para medir la ocupación del objetivo terapéutico, descubrieron que aunque los beneficios pueden no ser evidentes en células aisladas, en organismos completos las nanopartículas se acumulan efectivamente en los tejidos tumorales gracias a las células del estroma tumoral. Esta observación sugiere que, a pesar de no mostrar ventajas significativas en nuestros ensayos *in vitro*, la FC nanoencapsulada podría ofrecer beneficios importantes en aplicaciones clínicas. Berger *et al.* (2022) profundizaron en esta discrepancia mediante análisis de la corona de proteínas en las nanopartículas, proponiendo que los modelos *in vitro* convencionales no reproducen adecuadamente las complejas interacciones biológicas que ocurren *in vivo*. Para reducir esta brecha, recomiendan implementar modelos más sofisticados como cultivos celulares tridimensionales y condiciones de flujo que simulen mejor el microambiente fisiológico. Estos hallazgos subrayan la importancia de evaluar las formulaciones nanoencapsuladas en modelos *in vivo* antes de descartar su potencial terapéutico basándose únicamente en resultados de cultivos celulares.

VIII CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra el potencial terapéutico anticancerígeno de extractos naturales, destacando la FC aislada de *Arthrospira maxima*. Los análisis fitoquímicos confirmaron perfiles consistentes con investigaciones previas, validando la presencia de metabolitos secundarios específicos en cada extracto evaluado. La ausencia de actividad hemolítica en el extracto de FC, incluso a altas concentraciones (<2.58%), representa una ventaja significativa frente a otros extractos como *Ruta chalepensis* (Ruda) y *Larrea tridentata* (Gobernadora), que mostraron hemólisis considerable a concentraciones superiores a 600 ppm.

El extracto de FC demostró una actividad citotóxica excepcional contra líneas celulares cancerígenas, particularmente las de origen colorrectal (CaCo-2, CT-26) y hepático (HepG2), con valores de IC₅₀ cercanos a 10 µg/mL, clasificándose como "altamente activo" según los criterios del Instituto Nacional del Cáncer. Más relevante aún fue su notable selectividad, evidenciada por índices de selectividad que superaron ampliamente el umbral considerado como prometedor para desarrollo farmacológico (IS > 3), alcanzando valores de hasta 128.52 cuando se comparó con células normales J774. Este perfil de selectividad superó incluso al de la vincristina, fármaco antineoplásico de referencia.

La estrategia de nanoencapsulación mediante PLGA 50:50 resultó exitosa, generando nanopartículas con características físicoquímicas óptimas (tamaño de 179.3 nm, índice de polidispersidad de 0.083 y eficiencia de encapsulación del 82.7%). Si bien no se observaron diferencias significativas en la actividad citotóxica entre FC libre y nanoencapsulada en ensayos *in vitro*, la formulación nanoparticulada podría ofrecer ventajas importantes en aplicaciones *in vivo*, particularmente en términos de estabilidad, biodisponibilidad y administración dirigida. Estos hallazgos posicionan a la ficocianina de *A. maxima* como un candidato prometedor para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer colorrectal y hepático, con un perfil de seguridad superior al de tratamientos convencionales.

IX PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta investigación abren importantes oportunidades para el desarrollo futuro de la ficocianina como agente terapéutico anticancerígeno. Como siguiente paso, se propone la purificación completa de la proteína para obtener un compuesto de alta pureza que permita realizar una caracterización estructural detallada. Esta caracterización incluirá el análisis de la composición, estructura tridimensional y propiedades fisicoquímicas de la ficocianina, lo que proporcionará información esencial sobre sus mecanismos de acción a nivel molecular. Una vez determinada la estructura completa, será posible identificar los dominios específicos responsables de la actividad anticancerígena selectiva observada en células colorrectales y hepáticas. Este conocimiento permitirá diseñar modificaciones químicas dirigidas en regiones específicas de la proteína para potenciar su actividad biológica, mejorar su estabilidad y optimizar su selectividad hacia células tumorales. Adicionalmente, se continuará perfeccionando los sistemas de nanoencapsulación para mejorar la biodisponibilidad y dirigir el compuesto específicamente a los tejidos diana.

X REFERENCIAS

- Abdoul-Latif, F. M., Elmi, A., Merito, A., Nour, M., Risler, A., Ainane, A., Bignon, J., & Ainane, T. (2022). Essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Djibouti: Chemical analysis and modeling of *in vitro* anticancer profiling. *Separations*, 9(12), 387. <https://doi.org/10.3390/separations9120387>
- Abidi, O., Abdelkafi-Koubaa, Z., Fares-Zagrouba, N., *et al.* (2023). Phytochemical analysis and biological activities of two oil-bearing extracts from fresh *Pistacia lentiscus*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 37(6), 1487-1501. <https://doi.org/10.4314/bcse.v37i6.15>
- Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.10.008>
- Acquaviva, R., Iauk, L., Sorrenti, V., Lanteri, R., Santangelo, R., Licata, A., Licata, F., Vanella, A., Malaguarnera, M., Ragusa, S., & Di Giacomo, C. (2011). Oxidative profile in patients with colon cancer: Effects of *Ruta chalepensis* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(2), 181–191.
- Algirdas. (2005). *Berberis vulgaris* [Fotografía]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Berberis_vulgaris4.jpg
- Alotaibi, S. M., Saleem, M. S., & Al-Humaidi, J. G. (2018). Phytochemical contents and biological evaluation of *Ruta chalepensis* L. growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(4), 504–508. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.008>
- Alvarez-Sandoval, J., Guillen Melendez, G. A., Pérez-Hernández, R. A., Elizondo-Luevano, J. H., Castro-Ríos, R., Kačániová, M., Montes de Oca-Saucedo, C. R., Soto-Domínguez, A., & Chávez-Montes, A. (2025). Antiproliferative effect of methanolic extract of *Vernonia greggii* (Asteraceae) on human tumoral HeLa cells nanoencapsulated into PLGA-nanoparticles. *Materials*, 18(3), 580. <https://doi.org/10.3390/ma18030580>

Anywar, G. U., Kakudidi, E., Oryem-Origa, H., Schubert, A., & Jassoy, C. (2022). Cytotoxicity of Medicinal Plant Species Used by Traditional Healers in Treating People Suffering From HIV/AIDS in Uganda. *Frontiers in toxicology*, 4, 832780. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.832780>

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., International Natural Product Sciences Taskforce, & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

B.navez. (s.f.). Flower of Mexican Poppy (*Argemone mexicana*) [Fotografía]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Argemone_mexicana_flower_2.jpg

Basha, O. M., Hafez, R. A., El-Ayouty, Y. M., Mahrous, K. F., Bareedy, M. H., & Salama, A. M. (2008). C-Phycocyanin inhibits cell proliferation and may induce apoptosis in human HepG2 cells. *The Egyptian Journal of Immunology*, 15(2), 161–167.

Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Quintanilla-Licea, R., Verde-Star, M. J., Hernández-García, M. E., Vargas-Villarreal, J., & Garza-González, J. N. (2021). Furanocoumarins from *Ruta chalepensis* with amebicide activity. *Molecules*, 26(12), 3684. <https://doi.org/10.3390/molecules26123684>

Bechelli, J., Coppage, M., Rosell, K., & Liesveld, J. (2011). Citotoxicidad de extractos de algas en células normales y malignas. *Investigación y Tratamiento de la Leucemia*, 2011, 373519.

Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 262–266. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5195>

Cadoná, F. C., Machado, A. K., Bodenstein, D., Rossoni, C., Favarin, F. R., & Ourique, A. F. (2020). Natural product–based nanomedicine: Polymeric nanoparticles as delivery cargoes of food bioactives and nutraceuticals for anticancer purposes. *En*

Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents (pp. 37–67). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819666-3.00002-X>

Çetinkaya, S., Akça, K. T., & Süntar, I. (2022). Flavonoids and anticancer activity: Structure–activity relationship. En A. Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 74, pp. 81-115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91099-6.00017-7>

Challagali, S. C. (2023). Warburg Effect and its Role in Cancer Cell Metabolism: A Comprehensive Review. *International Journal of Science and Research*. <https://doi.org/10.21275/sr23602104158>

Chong-Cerda, R., Levin, L., Castro-Ríos, R., Hernández-Luna, C. E., González-Horta, A., Gutiérrez-Soto, G., & Chávez-Montes, A. (2020). Nanoencapsulated laccases obtained by double-emulsion technique. Effects on enzyme activity pH-dependence and stability. *Catalysts*, 10(9), 1085.

Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2010). Zeta potential measurement. En *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (pp. 63–70). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6

Coimbra, A. T., Ferreira, S., & Duarte, A. P. (2020). Genus *Ruta*: A natural source of high value products with biological and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113076. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113076>

Coleman, R. L., Brady, W. E., McMeekin, D. S., Rose, P. G., Soper, J. T., Lentz, S. S., Hoffman, J. S., & Shahin, M. S. (2011). A phase II evaluation of nanoparticle, albumin-bound (nab) paclitaxel in the treatment of recurrent or persistent platinum-resistant ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 122(1), 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.03.036>

Cui, Y., Lu, C., Liu, L., Sun, D., Yao, N., Tan, S., Bai, S., & Ma, X. (2008). Reactivation of methylation-silenced tumor suppressor gene p16INK4a by

nordihydroguaiaretic acid and its implication in G1 cell cycle arrest. *Life Sciences*, 82(5-6), 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.11.013>

Czerwonka, A., Kaławaj, K., Sławińska-Brych, A., Lemieszek, M. K., Bartnik, M., Wojtanowski, K. K., Zdzińska, B., & Rzeski, W. (2018). Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.116>

Dai, W., Mu, L., Cui, Y., Li, Y., Chen, P., Xie, H., & Wang, X. (2019). Berberine promotes apoptosis of colorectal cancer via regulation of the long non-coding RNA (lncRNA) cancer susceptibility candidate 2 (CASC2)/AU-binding factor 1 (AUF1)/B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) axis. *Medical Science Monitor*, 25, 730–738. <https://doi.org/10.12659/MSM.912082>

Elizondo, J. H., Garza, L. M., Torres, A. D., Quintanilla, R., & Chávez, A. (2024). Argemone mexicana (Papaveraceae) y berberina - tesoros ocultos de la medicina herbal. *Revista de Ciencias Agroalimentarias y Biotecnología*, 1(1), 5–11. <https://doi.org/10.29105/rcab1.1-3>

Elizondo-Luévano, J. H., Castro-Ríos, R., López-Abán, J., Gorgojo-Galindo, O., Fernández-Soto, P., Vicente, B., Muro, A., & Chávez-Montes, A. (2021). Berberine: A nematocidal alkaloid from Argemone mexicana against Strongyloides venezuelensis. *Experimental Parasitology*, 220, 108043. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108043>

Elizondo-Luévano, J. H., Hernández-García, M. E., Pérez-Narváez, O. A., Castro-Ríos, R., & Chávez-Montes, A. (2020). Berberina, curcumina y quercetina como potenciales agentes con capacidad antiparasitaria. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1241–1249.

Elizondo-Luevano, J. H., Quintanilla-Licea, R., Monroy-García, I. N., Kačániová, M., Castillo-Velázquez, U., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Garza-Vega, L. M., Torres-Hernández, Á. D., & Chávez-Montes, A. (2024). Assessment of anticancer properties

of Argemone mexicana L. and berberine: A comparative study. *Plants*, 13(10), 1374. <https://doi.org/10.3390/plants13101374>

Elizondo-Luévano, J. H., Rodríguez-Garza, N. E., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Romo-Sáenz, C. I., Tamez-Guerra, P., Verde-Star, M. J., Gomez-Flores, R., & Quintanilla-Licea, R. (2023). Cytotoxic, anti-hemolytic, and antioxidant activities of *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) extract, fractions, and isolated compounds. *Plants*, 12(11), 2203. <https://doi.org/10.3390/plants12112203>

Elizondo-Luevano, J. H., Verde-Star, J., González-Horta, A., Castro-Ríos, R., Hernández-García, M. E., & Chávez-Montes, A. (2020). *In vitro* effect of methanolic extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology*, 58(2), 135–145. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.135>

Elmowafy, M., Shalaby, K., Elkomy, M. H., Alsaidan, O. A., Gomaa, H. A. M., Abdelgawad, M. A., & Mostafa, E. M. (2023). Polymeric nanoparticles for delivery of natural bioactive agents: Recent advances and challenges. *Polymers*, 15(5), 1123. <https://doi.org/10.3390/polym15051123>

Fadlalla, K., Watson, A., Yehualaeshet, T., Turner, T., & Samuel, T. (2011). *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks Akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival. *Anticancer Research*, 31(1), 233–241.

Fernández, R., Campos, J., Serra, M., Fidalgo, J., Almeida, H., Casas, A., Toubarro, D., & Barros, A. I. R. N. A. (2023). Exploring the benefits of phycocyanin: From *Spirulina* cultivation to its widespread applications. *Pharmaceuticals*, 16(4), 592. <https://doi.org/10.3390/ph16040592>

Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11, 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>

Ferreira, A. M. D. C., Schneider-Stock, R., & Aiello, F. (2022). Editorial: Design, synthesis, and preclinical testing of innovative anti-cancer compounds with a high level of selectivity of action and low toxicity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 859821. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.859821>

Galván-Rodrigoa, A. A., Reyes-Meloa, K. Y., & Camacho-Corona, M. R. (2020). Lignanos con actividad anticancerígena de *Larrea tridentata*. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*, 2020(Ed. Esp. 1).

Gao, P., Zhai, F., Guan, L., & Zheng, J. (2011). Nordihydroguaiaretic acid inhibits growth of cervical cancer SiHa cells by up-regulating p21. *Oncology Letters*, 2(1), 123–128. <https://doi.org/10.3892/ol.2010.205>

Globocan. (2022). Global Cancer Observatory. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0

Grover, P., Bhatnagar, A., Kumari, N., Narayan Bhatt, A., Kumar Nishad, D., & Purkayastha, J. (2021). C-Phycocyanin-a novel protein from *Spirulina platensis*- *In vivo* toxicity, antioxidant and immunomodulatory studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1853–1859. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.037>

Hanan-Alipi, A. M., Mondragón-Pichardo, J., Heike-Vibrans, & Tenorio-Lezama, P. (2009). *Zygophyllaceae, Larrea tridentata* (Sessé & Moc. ex DC.) Coville Gobernadora. CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias>

Hasan, S. A. (2015). Review on nanoparticles: Their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*, 2277, 2502.

Henderson, J. F. (1974). Biochemical aspects of selective toxicity. En A. C. Sartorelli & D. G. Johns (Eds.), *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents Part I* (pp. 251–282). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65678-1_18

Hillewaert, H. (2008). *Ruta chalepensis* (plant) [Fotografía]. Wikimedia Commons. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ruta_chalepensis_\(plant\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ruta_chalepensis_(plant).jpg)

Ilieva, Y., Zaharieva, M. M., Najdenski, H., & Kroumov, A. D. (2024). Antimicrobial activity of *Arthrospira* (former *Spirulina*) and *Dunaliella* related to recognized antimicrobial bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5548. <https://doi.org/10.3390/ijms25105548>

- Iñiguez-Luna, M. I., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, R. M., Morales-Flores, F. J., Cortes-Cruz, M., Watanabe, K. N., & Cadena-Zamudio, J. D. (2021). Bioprospecting of *Sechium* spp. varieties for the selection of characters with pharmacological activity. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12.
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 173–190. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.057>
- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2004). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 261–266.
- Jha, S., Singh, V. K., Singh, A. P., Gupta, A., Rana, P., & Sinha, R. P. (2024). The radiant world of cyanobacterial phycobiliproteins: Examining their structure, functions, and biomedical potentials. *Targets*, 2(1), 32–51. <https://doi.org/10.3390/targets2010002>
- Jiang, L., Wang, Y., Liu, G., Liu, H., Zhan, R., Yang, K., Yang, C., Zhao, Y., Wang, H., & Li, B. (2018). C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. *Cancer Cell International*, 18, 12. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0511-5>
- Jiang, L., Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y., & Li, B. (2017). Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment. *Journal of Cancer*, 8(17), 3416–3429. <https://doi.org/10.7150/jca.21058>
- Khanal, S., Adhikari, U., Rijal, N. P., Bhattarai, S. R., Sankar, J., & Bhattarai, N. (2016). pH-responsive PLGA nanoparticle for controlled payload delivery of diclofenac sodium. *Journal of Functional Biomaterials*, 7(3), 21. <https://doi.org/10.3390/jfb7030021>
- Khelifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., & Bouajila, J. (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.004>

- Kim, S., Lee, J., You, D., Jeong, Y., Jeon, M., Yu, J., Kim, S. W., Nam, S. J., & Lee, J. E. (2018). Berberine suppresses cell motility through downregulation of TGF- β 1 in triple negative breast cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(2), 795–807. <https://doi.org/10.1159/000487171>
- Kimura, K., & Huang, R. C. (2016). Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid broadly suppresses cancer metabolism and synergistically induces strong anticancer activity in combination with etoposide, rapamycin and UCN-01. *PLoS ONE*, 11(2), e0148685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148685>
- Kunte, M., & Desai, K. (2017). Efecto inhibidor del extracto proteico con C-ficocianina (extracto C-PC) sobre las metaloproteinasas de matriz humana (MMP-2 y MMP-9) en la línea celular de cáncer hepatocelular (HepG2). *Protein Journal*, 36(3), 186–195. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9707-0>
- Lambert, J. D., Sang, S., Dougherty, A., Caldwell, C. G., Meyers, R. O., Dorr, R. T., & Timmermann, B. N. (2005). Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 66(7), 811–815. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.007>
- Leon, D., Parada, D., Vargas-Urbe, M., Perez, A. A., Ojeda, L., Zambrano, A., Reyes, A. M., & Salas, M. (2016). Effect of nordihydroguaiaretic acid on cell viability and glucose transport in human leukemic cell lines. *FEBS Open Bio*, 6(10), 1000–1007. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12106>
- Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Próchnicki, M., Rudzki, S., Laskowska, B., & Brudniak, J. (2020). Quality of life of cancer patients treated with chemotherapy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(19), 6938. <https://doi.org/10.3390/ijerph17196938>
- Li, B., Chu, X., Gao, M., & Li, W. (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells *in vivo* and *in vitro* induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(1), 80–89. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp104>
- Liao, G., Gao, B., Gao, Y., Yang, X., Cheng, X., & Ou, Y. (2016). Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: Role of apoptosis and autophagy. *Scientific Reports*, 6, 34564. <https://doi.org/10.1038/srep34564>

Liu, C., Malinauskas, R., Lu, Q., & Skoog, S. (2021). Assessment of factors impacting material-mediated hemolysis results in the ASTM F756-17 testing standard. Center for Devices and Radiological Health. <https://www.fda.gov/science-research/fda-stem-outreach-education-and-engagement/assessment-factors-impacting-material-mediated-hemolysis-results-astm-f756-17-testing-standard>

Liu, Y., Fang, X., Li, Y., Bing, L., Li, Y., Fang, J., Xian, X., Zhang, W., Li, J., Zhao, Z., & Zhu, Y. (2022). Berberine suppresses the migration and invasion of colon cancer cells by inhibition of lipogenesis through modulation of promyelocytic leukemia zinc finger-mediated sterol-regulatory element binding proteins cleavage-activating protein ubiquitination. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74(9), 1353–1363. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac026>

Liu, Y., Hua, W., Li, Y., Xian, X., Zhao, Z., Liu, C., Zou, J., Li, J., Fang, X., & Zhu, Y. (2020). Berberine suppresses colon cancer cell proliferation by inhibiting the SCAP/SREBP-1 signaling pathway-mediated lipogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 174, 113776. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113776>

Luis coronel. (s.f.). *Hydrastis canadensis* vista general de la planta [Fotografía]. Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4116991>

Martino, E., Casamassima, G., Castiglione, S., Cellupica, E., Pantalone, S., Papagni, F., Rui, M., Siciliano, A. M., & Collina, S. (2018). Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(17), 2816–2826. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.044>

Menaa, F., Wijesinghe, U., Thiripuranathar, G., Althobaiti, N. A., Albalawi, A. E., Khan, B. A., & Menaa, B. (2021). Marine algae-derived bioactive compounds: A new wave of nanodrugs? *Marine Drugs*, 19(9), 484. <https://doi.org/10.3390/md19090484>

Mesdaghinia, A., Pourpak, Z., Naddafi, K., Nodehi, R. N., Alizadeh, Z., Rezaei, S., Mohammadi, A., & Faraji, M. (2019). An *in vitro* method to evaluate hemolysis of human red blood cells (RBCs) treated by airborne particulate matter (PM 10). *MethodsX*, 6, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.01.001>

Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Madariaga-Navarrete, A., Higuera-Piedrahita, R. I., Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., & Zaragoza-Bastida, A. (2022). Phytochemical compounds and pharmacological properties of *Larrea tridentata*. *Molecules*, 27(17), 5393. <https://doi.org/10.3390/molecules27175393>

Muñetón-Pérez, P. (2009). Plantas medicinales: Un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria*, 10(9). <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>

NEUROtiker. (s.f.). Structure of Berberine [Diagrama]. Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3750091>

Nie, Q., Peng, W. W., Wang, Y., Zhong, L., Zhang, X., & Zeng, L. (2022). β -catenin correlates with the progression of colon cancers and berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating the β -catenin signaling pathway. *Gene*, 818, 146207. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146207>

Och, A., Podgórski, R., & Nowak, R. (2020). Biological activity of berberine-a summary update. *Toxins*, 12(11), 713. <https://doi.org/10.3390/toxins12110713>

Öztürk, K., Kaplan, M., & Çalış, S. (2024). Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 666, 124799. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124799>

Park, J., Lee, H., Dinh, T. B., Choi, S., De Saeger, J., Depuydt, S., Brown, M. T., & Han, T. (2022). Commercial potential of the cyanobacterium *Arthrospira maxima*: Physiological and biochemical traits and the purification of phycocyanin. *Biology*, 11(5), 628. <https://doi.org/10.3390/biology11050628>

PDQ. (2022). PDQ Tratamiento del cáncer de colon. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq>

Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jeyakanthan, J., Rayala, S. K., & Venkatraman, G. (2015). Molecular mechanism of

anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, 15, 768. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1784-x>

Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jeyakanthan, J., Rayala, S. K., & Venkatraman, G. (2015). Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, 15(1), 768. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1784-x>

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., *et al.* (2016). Investigación en plantas de importancia médica (pp. 6-33). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.313>

Rodell, C. B., Baldwin, P., Fernandez, B., Weissleder, R., Sridhar, S., & Dubach, J. M. (2021). Quantification of cellular drug biodistribution addresses challenges in evaluating *in vitro* and *in vivo* encapsulated drug delivery. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000125. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000125>

Rodríguez-Garza, N. E., Quintanilla-Licea, R., Romo-Sáenz, C. I., Elizondo-Luevano, J. H., Tamez-Guerra, P., Rodríguez-Padilla, C., & Gomez-Flores, R. (2023). *In vitro* biological activity and lymphoma cell growth inhibition by selected Mexican medicinal plants. *Life*, 13(4), 958. <https://doi.org/10.3390/life13040958>

Romay, C., & González, R. (2000). Phycocyanin is an antioxidant protector against oxidative stress. *Phytotherapy Research*, 14(7), 562-568. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200011\)14:7<562::AID-PTR650>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200011)14:7<562::AID-PTR650>3.0.CO;2-1)

Roy, K. R., Arunasree, K. M., Reddy, N. P., Dheeraj, B., Reddy, G. V., & Reddanna, P. (2007). Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicin-resistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 47(3), 159-167. <https://doi.org/10.1042/BA20060206>

Ruiz-Hernández, Y., Garza-Valverde, E., Márquez-Reyes, J., & García-Gómez, C. (2023). Extracción de ficocianina para uso como colorante natural: optimización por metodología de superficie de respuesta. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 84-91. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.16>

Sada-Borrego, C., García-Gómez, C., Guajardo-Barbosa, C., Márquez-Reyes, J., Nápoles-Armenta, J., & Beltrán-Rocha, J. (2023). Optimización para la extracción de ficocianina de la cianobacteria *Spirulina maxima*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 834-840. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.107>

Saini, L., Dubey, A., Pal, R., Pandey, P., & Mandal, R. K. (2024). Synthetic and natural polymers enhancing drug delivery and their treatment: A comprehensive review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 14(10), 153-165. <https://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/6802>

Shebs, S. (2003). *Arthrospira* [Fotografía]. Wikimedia Commons. <https://es.wikipedia.org/wiki/Arthrospira>

Shebs, S. (2005). *Larrea tridentata* 3 [Fotografía]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Larrea_tridentata_3.jpg

Singh, B., Katare, A.K. (2020). Botanical Sources, Chemistry Aspects and Biological Functions of Berberine: An Updated Critical Review. In: Singh, B. (eds) *Botanical Leads for Drug Discovery*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5917-4_20

Soliman, T. N., Negm El-Dein, A., Abd Al-Diam, S., Allayeh, A., Awad, H., & Flefli, N. S. (2024). Characterization of C-phycocyanin antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumour, and anti-HCoV-229E activities and encapsulation for implementation in an innovative functional yogurt. *Heliyon*, 10(11), e31642. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31642>

Soto, K. M., Pérez Bueno, J. J., Mendoza López, M. L., Apátiga-Castro, M., López-Romero, J. M., Mendoza, S., & Manzano-Ramírez, A. (2023). Antioxidants in traditional Mexican medicine and their applications as antitumor treatments. *Pharmaceuticals*, 16(4), 482. <https://doi.org/10.3390/ph16040482>

Subhashini, J., Mahipal, S. V., Reddy, M. C., Mallikarjuna Reddy, M., Rachamalla, A., & Reddanna, P. (2004). Molecular mechanisms in C-phycocyanin induced

apoptosis in human chronic myeloid leukemia K562 cell line. *Biochemical Pharmacology*, 68(3), 453-462. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.005>

Takekoshi, S., Nagata, H., & Kitatani, K. (2014). Stimulation of melanogenesis by nordihydroguaiaretic acid in human melanoma cells. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 47(5), 203-210. <https://doi.org/10.1267/ahc.14033>

Terkmane, S., Gali, L., Bourrebaba, L., Shoji, K., Legembre, P., Konstantia, G., Bedjou, F. (2017). Chemical composition, antioxidant, and anticancer effect of *Ruta chalepensis*'s extracts against human leukemic cells. *Phytothérapie*, 15(6), 365-372. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1147-7>

Thomas, A., Kamble, S., Deshkar, S., Kothapalli, L., & Chitlange, S. (2021). Bioavailability of berberine: Challenges and solutions. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 51(1), 141-153. <https://doi.org/10.26650/IstanbulJPharm.2021.855340>

Tong, M., Liu, H., Hao, J., & Fan, D. (2020). Comparative pharmacoproteomics reveals potential targets for berberine, a promising therapy for colorectal cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(2), 429-434. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.052>

Velázquez-Martínez, V., Valles-Rosales, D., Rodríguez-Urbe, L., Laguna-Camacho, J. R., López-Calderón, H. D., & Delgado, E. (2022). Effect of different extraction methods and geographical origins on the total phenolic yield, composition, and antimicrobial activity of sugarcane bagasse extracts. *Frontiers in Nutrition*, 9, 834557. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.834557>

Vo, T.-S., Ngo, D.-H., & Kim, S.-K. (2015). Nutritional and Pharmaceutical Properties of Microalgal *Spirulina*. *Handbook of Marine Microalgae*, 299–308. doi:10.1016/B978-0-12-800776-1.00019-4

Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L., & Liu, Z. R. (2007). The recombinant beta subunit of C-phyocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters*, 247(1), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.04.002>

- Witika, B. A., Makoni, P. A., Matafwali, S. K., Mweetwa, L. L., Shandele, G. C., & Walker, R. B. (2021). Enhancement of biological and pharmacological properties of an encapsulated polyphenol: Curcumin. *Molecules*, 26(14), 4244. <https://doi.org/10.3390/molecules26144244>
- Xiong, R. G., Huang, S. Y., Wu, S. X., Zhou, D. D., Yang, Z. J., Saimaiti, A., Zhao, C. N., Shang, A., Zhang, Y. J., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2022). Anticancer effects and mechanisms of berberine from medicinal herbs: An update review. *Molecules*, 27(14), 4523. <https://doi.org/10.3390/molecules27144523>
- Yıldırım, M., Sessevmez, M., Poyraz, S., & Düzgüneş, N. (2023). Recent strategies for cancer therapy: Polymer nanoparticles carrying medicinally important phytochemicals and their cellular targets. *Pharmaceutics*, 15(11), 2566. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112566>
- Youngren, J. F., Gable, K., Penaranda, C., Silverstein, J., Artiss, J. D., & Rude, R. K. (2005). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu receptors and suppresses growth in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94(1), 37-46. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-6939-z>
- Zhang, Y., Liu, X., Yu, M., Xu, M., Xiao, Y., Ma, W., Huang, L., Li, X., & Ye, X. (2020). Berberine inhibits proliferation and induces G0/G1 phase arrest in colorectal cancer cells by downregulating IGF2BP3. *Life Sciences*, 260, 118413. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118413>
- Zhao, Z., Zeng, J., Guo, Q., Pu, K., Yang, Y., Chen, N., Zhang, G., Zhao, M., Zheng, Q., Tang, J., & Hu, Q. (2021). Berberine suppresses stemness and tumorigenicity of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting m⁶A methylation. *Frontiers in Oncology*, 11, 775418. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.775418>

XI ANEXOS

Anexo A. Protocolos detallados de análisis fitoquímico

A.1 Alcaloides

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de HCl 1%. Filtrar y dividir el filtrado en tres porciones iguales. Añadir a cada porción 2-3 gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

Interpretación:

Reactivo de Dragendorff: precipitado naranja-rojizo (+)

Reactivo de Mayer: precipitado blanco-amarillento (+)

Reactivo de Wagner: precipitado marrón (+)

Fundamento: Los alcaloides reaccionan con los reactivos que contienen yodo (Dragendorff, Mayer y Wagner), formando compuestos insolubles que precipitan con colores específicos.

A.2 Quinonas

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 10 mL de éter de petróleo. Filtrar y al filtrado añadir 1 mL de NaOH 10%. Agitar vigorosamente y dejar reposar hasta separación de fases.

Interpretación: Coloración rojiza en la fase acuosa indica presencia de quinonas (+).

Fundamento: Las quinonas se extraen en medio básico desarrollando coloración característica por formación de sales alcalinas.

A.3 Esteroles y triterpenos (Reacción de Liebermann-Burchard)

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de cloroformo. Filtrar y al filtrado añadir 3 gotas de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Observar inmediatamente.

Interpretación:

Color verde-azulado: esteroides (+)

Color rojizo-púrpura: triterpenos (+)

Fundamento: Reacción de deshidratación y oxidación que forma cromóforos específicos para cada tipo de compuesto.

A.4 Flavonoides (Reacción de Shinoda)

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de etanol 70%. Filtrar y al filtrado añadir 0.5 g de magnesio metálico y 5 gotas de HCl concentrado. Observar después de 2-3 minutos.

El magnesio en medio ácido reduce los flavonoides, transformándolos en compuestos coloreados (antocianidinas) que producen las coloraciones rojizas-anaranjadas características.

A.5 Taninos

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de agua destilada. Filtrar y al filtrado añadir 3-4 gotas de FeCl₃ 1%. Observar inmediatamente.

Interpretación: Color verde-azulado o negro-azulado indica presencia de taninos (+).

Fundamento: Formación de complejos coloreados entre grupos fenólicos de los taninos y iones férricos.

A.6 Saponinas (Índice de espuma)

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 10 mL de agua destilada. Filtrar, tomar 1 mL del filtrado y diluir con 9 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente durante 30 segundos y dejar reposar.

Interpretación: Formación de espuma estable >1 cm de altura que persiste por más de 30 minutos indica saponinas (+).

Fundamento: Propiedades tensoactivas de las saponinas que reducen la tensión superficial del agua.

A.7 Cumarinas

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de etanol 70%. Filtrar y dividir el filtrado en dos tubos. A uno de los tubos añadir 0.5 mL de KOH 10%. Observar ambos tubos bajo luz UV (365 nm).

Interpretación: Fluorescencia azul o verde intensa en el tubo con KOH, ausente en el control, indica cumarinas (+).

Fundamento: Las cumarinas desarrollan fluorescencia característica en medio básico por ionización de grupos fenólicos.

A.8 Sesquiterpenlactonas

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de diclorometano. Filtrar y concentrar el filtrado a 1 mL por evaporación suave. Añadir 2 gotas de KOH metanólico 2% y 2 gotas de nitroprusiato de sodio 1%. Observar la secuencia de colores.

Interpretación: Secuencia de coloración roja → violeta → azul indica sesquiterpenlactonas (+).

Fundamento: Hidrólisis básica del anillo lactónico seguida de reacción con nitroprusiato que detecta grupos carbonilo.

A.9 Carbohidratos (Reacción de Molisch)

Procedimiento: Homogenizar 0.5 g de extracto con 5 mL de agua destilada. Filtrar y al filtrado añadir 2 gotas de reactivo de Molisch (α -naftol 5% en etanol). Añadir cuidadosamente 2 mL de H₂SO₄ concentrado por las paredes del tubo, sin mezclar.

Interpretación: Formación de un anillo violeta en la interfase indica carbohidratos (+).

Fundamento: Deshidratación de carbohidratos por ácido sulfúrico formando furfural, que condensa con α -naftol produciendo un compuesto coloreado.