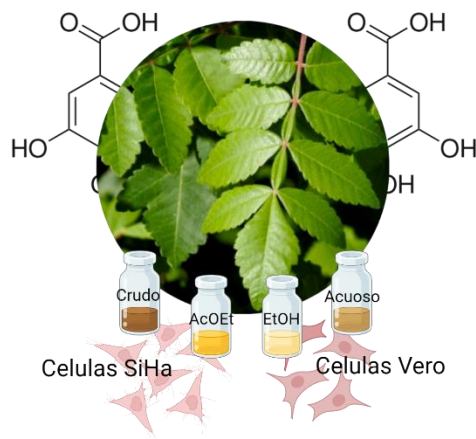


Determinación del contenido de polifenoles del extracto y fracciones de *Bursera tomentosa*, y su efecto en la viabilidad celular sobre células SiHa.

Determination of the polyphenol content of the extract and fractions of *Bursera tomentosa*, and its effect on cell viability on SiHa cells.

Graphical Abstract (GA)



A partir de las hojas de *Bursera tomentosa* se obtuvo el extracto, para ser fraccionado en acetato de etilo, etanol y medio acuoso. Determinando el contenido de polifenoles totales usando el ensayo de Folin-Ciocalteu. Adicionalmente se probó el efecto sobre la viabilidad celular en las líneas celulares SiHa y Vero.

Determinación del contenido de polifenoles del extracto y fracciones de *Bursera tomentosa*, y su efecto en la viabilidad celular sobre células SiHa.

Determination of the polyphenol content of the extract and fractions of *Bursera tomentosa*, and its effect on cell viability on SiHa cells.

Sebastian Camilo Ortiz Perdomo

Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: Dr. Andrés Mauricio Rojas Sepúlveda.

Co dirigido por: Dra. Clara Juliana Durango García.

Resumen

La investigación de productos naturales se mantiene en constante búsqueda de moléculas con actividad biológica, que puedan representar una alternativa a los tratamientos modernos, llevando a la identificación de compuestos, en especies de plantas poco estudiadas, como es el caso de la especie *Bursera tomentosa*. Donde se determinó de forma cualitativa, la presencia de compuestos de tipo triterpenos, flavonoides, fenoles, taninos y alcaloides. Se encontró que el contenido de polifenoles en el extracto crudo es de 129.49 ± 11 mg/g equivalentes de ácido gálico, a través de la prueba Folin-Ciocalteu. En la evaluación de actividad biológica, el extracto y las fracciones de acetato de etilo, etanol y acuosa, frente a la línea celular SiHa, lograron reducir el porcentaje de supervivencia por debajo del 50%, en contraste al efecto sobre la línea celular vero, donde este efecto solo se evidencio para la fracción acetato de etilo. Teniendo en cuenta estos resultados, el siguiente paso en la investigación corresponde a la identificación del mecanismo de muerte celular; apoptosis o necrosis. Así como el aislamiento y caracterización de las fracciones para determinar si la afectación a la viabilidad celular es consecuente al efecto sequito o a una molécula en particular.

Palabras Clave: *Bursera tomentosa*, extracto, polifenoles, Folin-Ciocalteu, viabilidad celular y SiHa.

Abstract

Research on natural products is constantly searching for molecules with biological activity that may represent an alternative to modern treatments, leading to the identification of compounds in little-studied plant species, such as the *Bursera tomentosa* species. Where it was determined qualitatively, by means of phytochemical screening, which has triterpenes, flavonoids, phenols, tannins and alkaloids in its chemical profile. It was found that the polyphenol content in the crude extract is 129.49 ± 11 mg/g equivalents of gallic acid, through the Folin-Ciocalteu test. In the evaluation of biological activity, the extract and the ethyl acetate, ethanol and aqueous fractions, against the SiHa cell line, managed to reduce the percentage of survival below 50%, in contrast to the effect on the vero cell line, where this effect was only evidenced for the ethyl acetate fraction. Taking these results into account, the next step in the investigation corresponds to the identification of the cell death mechanism; apoptosis or necrosis. As well as the isolation and characterization of the fractions to determine if the affectation to cell viability is due to the entourage effect or to a particular molecule.

Keywords: *Bursera tomentosa*, extract, polyphenols, Folin – Ciocalteu, cell viability and SiHa.

1. Introducción

Los compuestos fenólicos son un conjunto de metabolitos sintetizados por las plantas que intervienen en el crecimiento vegetal, desarrollo, comunicación, respuesta al estrés y defensa. Estos compuestos se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático (anillo bencénico), clasificándolos de acuerdo con el esqueleto carbonado; es decir que los compuestos fenólicos se encuentran en diferentes formas desde fenoles simples, ácidos fenólicos, ácido hidroxicinámico, cumarinas, flavonoides hasta formas polimerizadas como lignanos y taninos.

(Mokhena et al., 2016) Su biosíntesis en los organismos vegetales tiene dos rutas de producción; la vía del ácido shikímico y la ruta de los fenilpropanoides. En la primera vía, las reacciones sintetizan los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, donde la tirosina es el principal eslabón del que derivan otros metabolitos secundarios. Mientras que, en los fenilpropanoides, el punto de diversificación en las moléculas es el aminoácido, fenilalanina, que se ve catalizado por la enzima fenilalanina amoníaco liasa (PAL) obteniendo el ácido cinámico, y de allí diversas moléculas de naturaleza fenólica. (Buckner et al., 2016).

Los polifenoles se encuentran entre las especies de consumo humano, tales como las frutas, frutos secos, legumbres, verduras y algunas bebidas, como el vino tinto o el té negro, son las principales fuentes en la dieta (Lin et al., 2016) cuya constante implementación en la alimentación tiene efectos benéficos para la salud, por ejemplo, los polifenoles pueden aceptar electrones para formar el radical fenoxilo, un compuesto moderadamente estable que interrumpe las reacciones de oxidación en cadena dentro de la célula. Generando un efecto antioxidante, protegiendo los componentes celulares del daño oxidativo, y limitando el riesgo de enfermedades asociadas a este tipo de estrés. (Luqman & Rizvi, 2006)(Pandey & Rizvi, 2010).

En las enfermedades coronarias también se ven efectos positivos, ya que algunos polifenoles son inhibidores de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), una oxidación asociada al desarrollo de la aterosclerosis; es decir la acumulación de la placa de ateroma en las paredes de las

arterias. (Vita, 2005) (Aviram et al., 2000). Polifenoles como catequina, isoflavonas de soja, ácido tánico y otras moléculas como, saponinas, afectan la glucemia a través de diferentes mecanismos, tales como la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o de su captación por los tejidos periféricos, generando efectos hipoglucemiantes, usándose potencialmente para controlar la diabetes mellitus tipo 2. (Lin et al., 2016). Por su parte en lo que respecta a enfermedades neurodegenerativas, se asocia que esta familia de moléculas puede proteger contra enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Huntington. Resultados presuntivos de investigaciones epidemiológicas según los hábitos nutricionales a lo largo de su vida en las poblaciones de estudio. (Cory et al., 2018) Mientras la evaluación *in vitro* confirma que dentro de las propiedades de los polifenoles destaca la actividad antiinflamatoria (Kazłowska et al., 2010) , actividad antimicrobiana (Puupponen-Pimia et al., 2001) y actividad antifúngica (Aliyazcoglu et al., 2012) (Elansary et al., 2020). Demostrando el amplio espectro de actividad biológica de los polifenoles, incluyendo el cáncer.

El cáncer se entiende como el conjunto de enfermedades asociadas a la alteración en el control del crecimiento y metabolismo celular. Consecuente de una división descontrolada de las células en el cuerpo del organismo, lo que produce el aumento y eventual propagación de células anormales en el individuo (Hanahan & Weinberg, 2000). Cuando el conjunto de células aberrantes permanece dentro del tejido de origen, se denomina cáncer *in situ*. Por el contrario, si el grupo de células cancerosas invade los tejidos periféricos, se denomina como cáncer invasivo. Esto determina el carácter maligno o no del cáncer (National Institutes of Health (US), 2007). La Aparición y eventual propagación de células cancerosas en el organismo comprometen la salud del mismo, por ello, aunque existen tratamientos para controlar el cáncer en diferentes etapas, su incidencia a nivel mundial mantiene en alerta a la comunidad científica, al buscar constantemente moléculas capaces de inhibir la proliferación de células cancerosas, así como moléculas con potencial preventivo.

Es aquí donde destacan los polifenoles (Guo et al., 2009) (Kampa et al., 2007) ya que han mostrado efectos protectores, reducción del crecimiento y cantidad de tumores sobre líneas celulares humanas en algunos modelos como estómago, colon, hígado, pulmón y tejido mamario por mencionar algunos

de los más representativos. Mostrando que polifenoles como las catequinas, los flavonoides, el resveratrol, la quercetina, los lignanos, entre otros, poseen efectos positivos en el tratamiento del cáncer por medio de mecanismos de acción diferentes, de acuerdo al tipo de molécula (Yang et al., 2001) (Johnson et al., 1994). Ya que los mecanismos de acción difieren según la naturaleza de la molécula y el tipo de células neoplásicas (Cháirez-Ramírez et al., 2021). Entre los principales mecanismos, se describe la modulación de la señalización de las células cancerosas y la progresión del ciclo celular, o la promoción de la apoptosis por medio de la actividad enzimática, así como la afectación en la membrana celular y la eliminación de agentes cancerígenos (Vauzour et al., 2010) (Pandey & Rizvi, 2009).

Uno de los polifenoles que ha demostrado promisorios resultados a tal punto de emplearse como fármaco comercial es la podofilotoxina, un lignano aislado en 1880 por Podwysstozki de la planta norteamericana *Podophyllum peltatum* L. (Ardalani et al., 2017). Un producto natural del cual también destacan sus derivados; el etopósido y tenipósido, quienes presentan actividad biológica contra el cáncer, en específico cánceres de endometrio y ovario (Teoh, 2016). La podofilotoxina se usa para tratar las verrugas carcinogénicas, pues la solución de podofilotoxina al 0.5 se emplea como agente tópico en el tratamiento de verrugas y condilomas genitales en hombres y mujeres. (Claesson et al., 2016) Su efecto se debe a la citotoxicidad que ejerce en el sistema al inhibir la proliferación, alterando el ciclo celular de la célula cancerosa (Shareef et al., 2015). En ensayos *in vitro* provoca la apoptosis e inhibe la proliferación en células HeLa de carcinoma cervical humano, al generar un cambio no solo en el ciclo celular sino en el proteoma de la célula, ya que al menos siete proteínas se muestran reguladas ante la presencia de la podofilotoxina, en comparación con las células control (Wang et al., 2013). Sin embargo, se busca el aislamiento de nuevos derivados de lignanos, que ofrezcan alternativas a la alta citotoxicidad característica de este tipo de polifenol polimerizado, ejemplo de ello es la 4-Dimetil-picropodofilotoxina 7'-O- β -D-glucopiranosido, abreviada como 4DPG, un glucósido de podofilotoxina descubierto en *Sinopodophyllum emodi*, mostrando efectos citotóxicos en células

HeLa, A2 y SH-SY5Y (Zhang et al., 2005) lo que amplía y ratifica la investigación en el ensayo de moléculas nuevas y conjugadas, ya que anteriormente solo se percibía como eficaz a la molécula en su forma pura. Estos avances son importantes para los tratamientos alternativos, puesto que se suele recurrir a citotoxinas tóxicas (Ryan, 2021). Razón por la cual para el 2020 los compuestos derivados de plantas representaron aproximadamente el 75% de todos los fármacos antitumorales aprobados (Franconi et al., 2020).

Los polifenoles presentes en el género *Bursera* spp. destacan por su diversidad (Marcotullio et al., 2018). Puesto que el género está compuesto por al menos 100 especies de árboles aromáticos, cuya disposición geográfica abarca el sur de Estados Unidos, centro américa y el norte suramericano, registros en Brasil y el pacífico suramericano. Este género destaca en la cultura de América latina como elemento mágico religioso en la etnomedicina, ya que producen oleorresinas y aceites esenciales, a los que se les atribuye numerosas propiedades medicinales, entre las cuales se incluye: efecto antimicrobiano, antineoplásico, antiinflamatorio y analgésico consecuente a la composición del aceite y/o extractos obtenidos de la resina, tallo y hojas. Este género posee un perfil químico rico en terpenos, esteroides, lignanos, triterpenos, bilignanos y flavonoides (DeCarlo et al., 2019).

Los ensayos y aislamientos, permiten elucidar nuevos reportes de actividad biológica a núcleos fitoquímicos anteriormente no descritos, como es el caso de los polifenoles polimerizados tipo taninos, ya que por primera vez un extracto rico en taninos de *Hamamelis virginiana* L. tuvo la capacidad de inhibir la infección de VPH16 en un modelo celular *in vitro* (Theisen et al., 2014). Lo que hace promisoría la extensión en investigación y pruebas de actividad biológica en otras moléculas, géneros y especies poco frecuentados, este el caso de la especie *Bursera tomentosa*, una planta perteneciente a el género *Bursera*, que cuenta con escasos reportes en la literatura científica. En comparación con las especies más estudiadas del género, como por ejemplo *Bursera simaruba* (Bah et al., 2014), *Bursera fagaroides* (Rojas-Sepúlveda et al., 2012), *Bursera graveolens* (Robles et al., 2005) entre otras. Aun así, la *Bursera tomentosa* es el objeto de estudio del presente trabajo, ya que es

la tercera especie más abundante en el territorio colombiano según la plataforma Global Biodiversity Information Facility (GBIF) que cuenta con 2184 registros de presencia de la especie entre el año 2000 y enero del 2023 para el territorio colombiano. Este valor representa el 2% de las especies *Bursera* reportadas en el país, ya que el 82% corresponde a *Bursera simaruba* (87.331 registros) y el 16% *Bursera graveolens* (17.168 registros). Pese al bajo porcentaje estadístico, el estado de conservación de la especie *Bursera tomentosa*, se posiciona como un taxón de Preocupación Menor (LC), bajo los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en los reportes del indicador “The Red List” (The IUCN Red List of Threatened Species, 2021)

A esta especie se le conoce comúnmente como “Bálsamo de incienso” en algunas regiones de Cundinamarca, mientras en el Tolima se le llama "tatamaco", la especie es oriunda de las Antillas Menores, Centroamérica, norte de Venezuela y Colombia (Morton, 1981). Empleada a través de la decocción de corteza, para tratar la ciática, afecciones pulmonares, asma, epilepsia y las enfermedades venéreas (DeCarlo et al., 2019). En la medicina tradicional se le atribuyen propiedades curativas a los dolores en la próstata, dolor premenstrual y males relacionados con el cáncer (Kaileh et al., 2007). Los estudios realizados sobre la especie *Bursera tomentosa* se han ejecutado sobre diferentes apéndices de la planta, ya que el aceite esencial de los frutos está compuesto por cis-ocimeno (47,6%), n-nonano (28,2%) y germacreno-D (11,1%) (Moreno, Aparicio, et al., 2010). Es decir, el aceite esencial extraído del fruto por hidrodestilación, se componía de monoterpenos en un 51,6%, hidrocarburos alifáticos al 33,7% y sesquiterpenos con un 14%. Los constituyentes con menor abundancia fueron: Limoneno y Cariofileno al 3.5% y 0.6% respectivamente (Moreno, Aparicio, et al., 2010). En lo que respecta a la corteza, al obtener el aceite esencial se evidenció que el espatulenol representa el 11.4%, globulol 8.9%, un valor similar a la epi- α -cadinol con 8.8 % y cis-ocimeno 7.3%, también biciclogermacreno 6.6%, 1-nonano 6.4% y β -selineno 3.9% (Moreno, Rojas, et al., 2010).

Al evaluar la actividad antibacteriana del aceite obtenido del fruto, este exhibió actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella typhi*, con valores de MIC de 80 µg/mL, 120 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente (Moreno, Aparicio, et al., 2010). Sin embargo el extracto etanólico de corteza y hojas obtenido por un sistema de reflujo, fraccionado con tres solventes (Éter de petróleo, Diclorometano y Acetato de Etilo), mostro inhibición de crecimiento en bacterias Grampositivas; Para *S. aureus* se obtuvo una CMI de 25mg/mL en la fracción éter de petróleo de corteza y extracto total de hojas, mientras para *B. cereus* en la fracción diclorometano y extracto etanólico de hojas presentó una CMI de 1.5 y 2mg/mL, respectivamente (Grupo de Investigación Fitoquímica. GIFUJ, 2000). Por otro lado, las fracciones en diclorometano-metanol con proporciones 9.5:0.5 respectivamente, obtenida de la fracción en acetato de etilo del extracto en éter de petróleo para las hojas, tuvo actividad citotóxica, dando como resultado porcentajes de viabilidad de 3% y 15.3% a una concentración de 30 µg/mL en las líneas tumorales humanas Colo205 y CSC-1595 respectivamente (Camargo et al., 2010). Adicionalmente, partiendo del conocimiento cultural sobre la especie, a la cual se le atribuye propiedades antiinflamatorias, se comprobó que la fracción de diclorometano del extracto en etanol de las hojas tuvo un valor de 39.99% en la inhibición de la inflamación. Actividad que también mostro las fracciones de acetato de etilo del extracto en éter de petróleo de la hojas y corteza, presentaron valores de inhibición de la inflamación con valores de 35.41% y 33.28% (Barreto José, 2009) cabe resaltar que los extractos y las fracciones de *B. tomentosa* a febrero del 2023 no reportan actividad antifúngica (Grupo de Investigación Fitoquímica. GIFUJ, 2000).

Al revisar la información encontrada de la especie *Bursera tomentosa*, se entiende, se describe el aceite esencial de frutos y corteza, mientras el extracto ha sido evaluado por maceración en frío de hojas, corteza y flores en éter de petróleo y posteriormente etanol con un fraccionamiento en columna tipo flash (Camargo et al., 2010), evaluando el efecto citotóxico frente las líneas celulares Colo205 y CSC-1595, cáncer de colon y cáncer de mama respectivamente. De esta forma se pretende probar el extracto obtenido por maceración hidroalcohólica de las hojas de la especie *B. tomentosa*, con un

fraccionamiento líquido-líquido para la fracción acetato de etilo, acompañado de un fraccionamiento en columna (líquido-sólido) para la obtención de la fracción de etanol y acuosa. Con la finalidad de medir su contenido en polifenoles y probar su efecto en la viabilidad celular de otro modelo de cáncer; la línea celular SiHa. Tomando como control la línea Vero.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal.

La especie vegetal se colectó el 04 de marzo de 2022 en el departamento del Huila, en el municipio de Villavieja, a una altitud de 430 m s. n. m. con coordenadas 3°13'08"N 75°13'06"O. La colecta se realizó con la asesoría de un profesional en botánica del herbario de la universidad del Quindío (HUQ), donde el ejemplar fue identificado como *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch. Así mismo se depositado en el HUQ con código de barras: HUQ034433 y código de herbario: 045043.

2.2 Obtención del extracto y fraccionamiento.

El material vegetal recolectado fue separado en hojas y tallos, despreciando este último apéndice. Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente por 15 días. El material vegetal seco fue triturado hasta obtener un material pulverulento. Posteriormente, se tomaron 1600 gramos (1.6 kg) para realizar una extracción por maceración en frío empleando una mezcla de solventes etanol: agua (7:3) durante un periodo de 20 días. Finalizado este periodo de tiempo, el extracto hidroalcohólico se filtró y concentró por medio de un rotaevaporador HEIDOLPH Hei-Vap Core a presión reducida para la recuperación del solvente y concentración de la extracción. Una vez obtenido el extracto se procedió a realizar el fraccionamiento por dos métodos. El primer método consistió en una bipartición, una extracción líquido-líquido, para obtener la fracción de acetato de etilo (AcOEt). El residuo hidroalcohólico de la bipartición fue empleado para el segundo método, un fraccionamiento sólido-líquido, a través de una columna cromatográfica abierta de sílica 60 (0.063 – 0.200 mm) SiO₂ MERCK – MILIPORE para producir las fracciones de etanol (EtOH) y la fracción acuosa.

Una vez obtenido el extracto y sus respectivas fracciones, los diversos volúmenes de muestra fueron secados a 40° C. El extracto y fracciones se almacenaron de forma permanente en refrigeración a 4° C. en condiciones de poca o nula exposición a la luz.

2.3 Análisis fitoquímico.

Este análisis cualitativo consiste en la preparación y obtención del extracto a partir de muestras que son reservorio de metabolitos secundarios, como las hojas, tallos, raíces y/o corteza. Los extractos obtenidos son sometidos a reacciones y mezclas, que, por medio de cambios fisicoquímicos, como precipitación, cambio de pH o coloración, indican la presencia o no de metabolitos secundarios según la prueba. Estos procedimientos están ampliamente descritos en la literatura (E. María Valenzuela et al., 1985) por lo que se aplicaron algunas modificaciones en el empleo y sustitución de reactivos para su ejecución de acuerdo al acceso y disponibilidad (Pant Raj. D, et al., 2017). Teniendo en cuenta que las reacciones de los ensayos son colorimétricas en su mayoría, se decidió hacer un tratamiento de eliminación de clorofilas por medio de carbón activo, para obtener un color más tenue y claro, que permita apreciar el cambio de color. Destacando que las muestras tratadas por blanqueamiento al ser analizadas por cromatografía-espectrometría de masas, reportaron la no disminución significativamente ($p > .05$) de la concentración de fenoles. (Tzima et al., 2020) Por lo que dicho pretratamiento para las pruebas no representa alguna alteración a su composición.

Los extractos decolorados se dividieron en 3 grupos de acuerdo al ensayo de identificación. En porciones de 5 mL (A), 10 mL (B) y 5 mL (C).

Tabla 1: División de los extractos decolorados por grupo de tratamiento según la prueba a realizar.

Fracción	A	B	C
Pruebas	Carotenoides Triterpenos y Esteroides	Flavonoides Antraquinonas Taninos Cumarinas Lactonas terpénicas Saponinas Cardiotónicos	Alcaloides

Para la fracción A se agregaron 2 mL de hexano, agitando fuertemente para extraer los liposolubles, repitiendo un total de 2 veces, reuniendo en otro tubo de ensayo las capas hexánicas empleándose en las reacciones de identificación. La fracción B no tuvo tratamiento previo, mientras la fracción C se acidifico con solución de HCl 10% en porciones de 1 mL hasta dar pH igual o menor a 3.

Carotenoides

Prueba de Salkowski: Se tomaron 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 0.5 mL del extracto/fracción, sin agitar. Observando una coloración azul en la interfase. Tomando como control positivo una solución de Achiote (*Bixa orellana*).

Triterpenos y esteroides

Reacción de Liebermann – Burchard: Se mezclaron 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Para 0.5 mL del extracto/fracción se agregan de 2 a 3 gotas del reactivo recién preparado. Observando cambios de coloración inmediatamente, manteniéndose a 5, 15, 30 y 45 minutos. Tomando como control positivo una solución de Colesterol.

Flavonoides

Prueba de Shinoda: Se tomo un 1 mL de extracto/fracción en una placa excavada y agregaron 0.5 mL de solución de ácido clorhídrico al 10 % después un trozo de cinta de magnesio. Observando coloración rojiza. Tomando como control positivo solución de Quercetina.

Antraquinonas

Prueba de Bornträger – Kraus: Se tomo 1 mL de extracto/fracción y agregó 1 mL de solución de ácido sulfúrico al 20% , 1 mL de solución de peróxido de hidrógeno al 20%. Se calentó por 15 minutos en un baño maría a punto de ebullición. Una vez a temperatura ambiente se agregó 2 mL de tolueno, mezclando fuertemente. Se Tomó 1 mL de la capa orgánica y agregó 1 mL de solución de hidróxido de sodio y amoniaco, Observando una coloración rojiza. Tomando como control positivo solución de ácido Carmínico.

Fenoles

Prueba de cloruro férrico: Para 1 mL de extracto/fracción se agregaron de 2 a 3 gotas de solución de cloruro férrico al 1 %, observando coloración azul o verde. Tomando como control positivo solución de ácido Gálico.

Taninos

Prueba de acetato de plomo: Para 1 mL de extracto/fracción se agregó 1 mL de solución de acetato de plomo al 10 %, observando precipitado o turbidez blanca. Tomando como control positivo una solución de ácido Tánico.

Cumarinas

Ensayo para cumarinas volátiles: Usando un tubo en ensayo para 1 mL de extracto/fracción cubierto con un trozo de papel de filtro empapado en solución diluida de NaOH, se calentó el contenido hasta punto de ebullición por uno o dos minutos. Una vez frío se observaron manchas fluorescentes en el papel de filtro bajo luz UV. Tomando como control positivo una solución de 7-hidroxicumarina.

Lactonas terpénicas (Sesquiterpenlactonas)

Prueba de hidroxamato férrico: Tomando 0.5 mL de extracto/fracción se agregarán 0.5 mL de solución metanólica de clorhidrato de hidroxilamina y 0.5 mL de solución metanólica de hidróxido de potasio, mezclando y calentando en baño maría por 5 minutos. Una vez frío se acidifico con solución de ácido clorhídrico 10% hasta reacción del papel tornasol rojo. Agregando 0.1 mL de solución de cloruro férrico al 1 %, observando coloración magenta.

Saponinas

Prueba de espuma: Para 1 mL de extracto/fracción se agregaron 5 mL de agua. Agitando fuertemente, observando la formación de espuma de al menos 2 cm de altura que se debe mantener por mínimo media hora.

Alcaloides

Para la prueba de alcaloides se emplearon 3 reactivos diferentes para 3 ensayos, tomando 1 mL de extracto/fracción se agregaron de 2 a 3 gotas del respectivo reactivo; Dragendorff, Mayer y Wagner.

Observando que para Dragendorff debe formarse un precipitado, naranja-rojizo. Para el reactivo de Wagner, debe formarse un precipitado marrón-rojizo. Mientras para Mayer se espera un precipitado blanco-amarillento. En los tres reactivos la formación de turbidez es considerada un resultado parcialmente positivo teniendo en cuenta el estado y apariencia inicial de la muestra. Tomando como control positivo para los 3 reactivos una solución de Oxycodona.

2.4 Determinación de polifenoles.

En la determinación del contenido de polifenoles se empleó el método de Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994), con adopciones en proporciones y escala en función del menor consumo de extracto (Bae & Suh, 2007) (Zulkifli et al., 2020). Para este ensayo se realizó la construcción de una curva de calibración compuesta por 7 puntos, con concentraciones entre 25 y 800 mg/ml de ácido Gálico.

En este ensayo para un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadieron 790 µl de agua miliQ, con 10 µl de extracto/fracción y se mezclaron con 50 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu sin diluir. Posterior a un 1 minuto, se añadieron 150 µL de solución carbonato de sodio anhidro (20% m/v) en medio acuoso, conservando la mezcla en oscuridad a temperatura ambiente por 120 min. Transcurrido ese periodo de tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro modelo V-1200 de Mapada Instruments Co., tomando datos por triplicado de cada muestra, calculando la concentración de polifenoles a partir de la curva de calibración con un coeficiente de determinación R^2 0.9972.

2.5 Preparación de las fracciones para el ensayo biológico.

Para medir el efecto sobre la viabilidad celular de las líneas celulares en placas de 96 pozos, se utilizaron 7 concentraciones partiendo de una solución stock de 1.000 µg/ml para el extracto y fracciones. La solución stock se preparó tomando 10 mg en 1.5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) concentrado. Una vez solubilizado se trasvaso a un falcón estéril de 15 ml, aforando a un volumen de 10 ml con PBS estéril (Buffer de Fosfatos) para una concentración final de 1.000 µg/ml.

A partir de la concentración stock se diluyo en serie a concentraciones de 300 µg/ml, 150 µg/ml, 80 µg/ml, 40µg/ml, 20 µg/ml, 10µg/ml y 5 µg/ml para probar su efecto.

2.6 Cultivo celular.

En el diseño experimental se utilizaron dos las líneas celulares, SiHa; una línea celular aislada de fragmentos de una muestra primaria de tejido uterino de una paciente japonesa de 55 años con carcinoma de células escamosas (Friedl et al., 1970). Y la línea celular Vero, un linaje aislado de células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sp.* (Sheets, 2000). El cultivo se realizó en los laboratorios del Centro de investigaciones odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana, proceso llevado a cabo en flasks de 25 cm^2 en medio DMEM Lonza™ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - con 4,5 g de L-glucosa por litro, sin L-glutamina) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 5% antibiótico penicilina-estreptomicina Gibco™ en incubadora al 5% de CO_2 . Una vez alcanzado aproximadamente el 80% de capacidad del flasks se procedió a tripsinizar, realizando un lavado con 2 ml de PBS estéril, para agregar tripsina y activarla a 37 °C durante 7 minutos, la inactivación de la tripsina se realizó agregando medio DMEM completo en proporciones 3:1 DMEM:Tripsina. El material tripsinizado se centrifugó a 1000 RPM por 10 minutos, determinando su concentración por conteo en cámara de Neubauer y ajustando para trasvasar a placas de 96 pozos, mediando una concentración de 6000 células por pozo para Vero y una concentración de 5000 células por pozo para SiHa. La concentración por pozo usada en el ensayo de viabilidad, se determinó realizando una curva de crecimiento, estableciendo la concentración óptima para una confluencia del 80% al 90% en pozo a las 24 hrs. Procediendo a la adición del estímulo (extracto o fracción) a evaluar.

2.7 Ensayo de viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante el método de fraccionamiento guiado para el bioensayo de viabilidad por MTT. (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio), probando las concentraciones empleadas como estímulo entre 5 $\mu g/ml$ y 300 $\mu g/ml$, tomando como control negativo: células + medio de cultivo, Control de solvente: Células en medio de cultivo + DMSO 1%, Control de medio: Medio suplementado sin células y el Control positivo:

Células + Doxorrubicina a 2 mg/mL.

El criterio para el ensayo, se determinó al considerar activas, a aquellas muestras que presentaron un porcentaje de viabilidad igual o inferior al 50% tanto en el modelo SiHa como en Vero.

3 Resultados

El tamizaje fitoquímico permitió detectar de forma cualitativa la presencia de ocho núcleos, que al ser contrastados con la literatura son asociados a diversas actividades biológicas, en especial núcleos de tipo fenol (Cháirez-Ramírez et al., 2021), los cuales son de especial interés en el desarrollo del presente trabajo investigativo. El tamizaje fitoquímico fue realizado para el extracto, las fracciones de Acetato de Etilo, Fracción de Etanol y Acuosa, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 2: Resultados de pruebas cualitativas para la detección de núcleos fitoquímicos por tamizaje.

Nombre de la prueba	Núcleo fitoquímico identificable:	patrón de prueba	Resultados cualitativos			
			Extracto Crudo	Fracción Acetato de Etilo	Fracción Etanólica	Fracción Acuosa
Prueba de Salkowski	Carotenoides	Achote	-	++	-	-
Reacción de Liebermann - Burchard	Triterpenos y Esteroides	Colesterol	-	+	-	-
Prueba de Shinoda	Flavonoides	Quercetina	+	+	+	-
Prueba de borntrager-Kraus	antraquinonas	Ácido Carmínico	-	-	-	-
Prueba de cloruro férrico	Fenoles	Ácido Gálico	++	++	++	+
Prueba de acetato de aluminio	Taninos	Ácido Tánico	+	-	+	+
Ensayo de cumarinas volátiles	Cumarinas	7-Hidroxycumarinas	++	-	-	-
Prueba de Hidroxamato Férrico	Lactonas Terpénicas		-	-	-	-
Prueba de espuma	Saponinas		++	-	++	++
Prueba de Dragendorff			+	+	+	-
Prueba de Mayer	Alcaloides	Oxicodona	++	++	+	+
Prueba de Wagner			++	+	-	+

Se considera como negativo (-) aquellas pruebas que no generaron una reacción acorde al patrón, parcialmente positivo (+) a los cambios físico-químicos con perceptible similitud al patrón, y prueba positiva (++) aquellas con un cambio estable y constante.

Destacando el resultado positivo en la prueba de cloruro férrico para fenoles en todas las muestras, se procedió a determinar el contenido de polifenoles en equivalentes de ácido gálico, por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu, generando una curva de calibración entre 25 mg/L y 800 mg/L de Ácido gálico. Obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) para la relación lineal entre las variables evaluadas de 0,9972.

Tabla 3: Valores de absorbancia de las diluciones para la curva de calibración, obtenidos a una longitud de onda de 750 nm.

Ácido gálico (mg/L)	Absorbancia				
	1	2	3	Promedio	Desviación estándar
25	0,023	0,017	0,016	0,019	0,0038
50	0,031	0,032	0,025	0,029	0,0038
100	0,050	0,057	0,051	0,053	0,0038
200	0,092	0,098	0,099	0,096	0,0038
400	0,190	0,199	0,188	0,192	0,0059
600	0,290	0,284	0,277	0,284	0,0065
800	0,378	0,383	0,386	0,382	0,0040

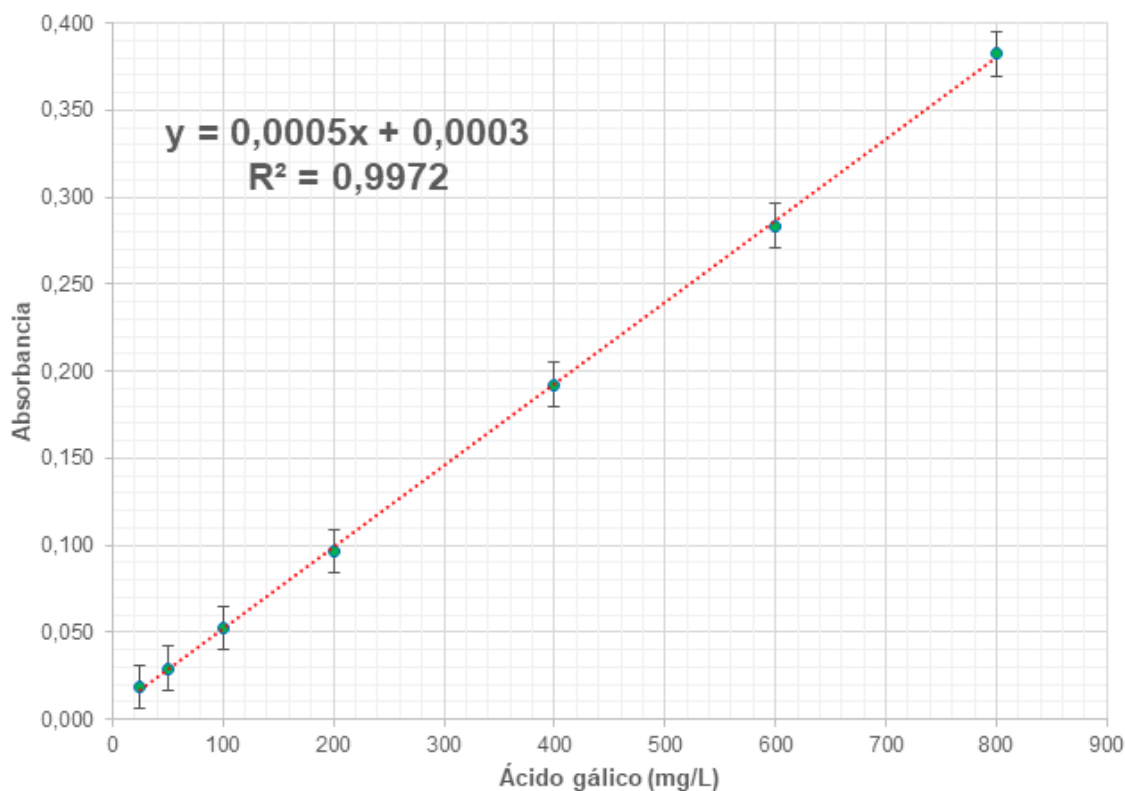


Figura 1: Curva de calibración para la determinación de concentración de polifenoles en extracto y fracciones en equivalente de ácido gálico. La curva de calibración se realizó empleando como patrón 7 soluciones de ácido gálico a concentraciones entre 25 y 800 mg/L

Al reemplazar los valores de absorbancia obtenidos por las muestras; extracto y fracciones, en la ecuación de la recta generada por la curva de calibración, se resolvió la concentración en mg/L.

Ecuación 1: Ecuación de la recta expresada en los valores obtenidos por la curva de calibración, donde Y corresponde a la absorbancia de la muestra, m representa la pendiente y b representa el punto de intersección de la recta con el eje Y

$$y = mx + b$$

$$y = 0,0005x + 0,0003$$

Ecuación 2: Determinación del contenido total de compuestos fenólicos, expresado en mg/g de extracto vegetal en equivalentes de ácido gálico (GAE) por sus siglas en ingles.

$$TPC = \frac{C V DF}{m}$$

Donde C: corresponde a la concentración en mg/L obtenida por la curva de calibración. V: el volumen empleado en la solución de muestra (L), m: representa la masa del extracto en la solución (g) y DF: es el factor de dilución.

Los valores de concentración en mg/L para las muestras, fueron sometidos a la *ecuación 2* (Belew et al., 2021) obteniendo una concentración en mg/g de equivalentes de ácido gálico, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 4: Valores de absorbancia para el extracto y fracciones. Muestras preparadas a una concentración de 5 mg/ml para lectura, Valores obtenidos a una longitud de onda de 750 nm.

concentración muestra [5 mg/mL]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Desviación estándar
CRUDO	0,292	0,342	0,338	0,324	0,028
ACOET	0,381	0,472	0,593	0,482	0,106
ETOH	0,111	0,116	0,119	0,115	0,004
ACUOSO	0,211	0,247	0,274	0,244	0,032

Tabla 5: Determinación de la concentración de polifenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. La concentración se reporta como en mg/g en equivalente de ácido gálico (GAE).

MUESTRA	Total Polifenoles (mg/g) GAE
Crudo	129,40 ± 11
AcOEt	192,68 ± 42
EtOH	46,01 ± 2
Acuoso	97,48 ± 12

Para el ensayo de viabilidad celular se empleó un periodo tiempo de 48 hrs en total. Donde entre las 0-24 hrs se destinó a la siembra y amplificación de células en placa en medio suplementado, esperando una confluencia de $\pm 80\%$ a las 24 hrs, para proceder a la remoción del medio suplementado y reemplazar por medio DMEM sin suplementación adicionando el estímulo a evaluar. Se destaca que la exposición al estímulo se evaluó en deprivación de suero fetal bovino y reducción en la concentración de nutrientes, según los reportes de respuesta por parte de las líneas tumorales en este medio (Mathews et al., 2020)(Morton, 1981)(White et al., 2020)(Ahmadiankia, 2020)(Khajah et al., 2022). Cada pozo se aforó a un volumen total de 100 μl . Entre las 24 hrs y 48 hrs se expuso las células al medio con el estímulo (extracto y fracciones de *B. tomentosa*) generando una respuesta en la línea celular. Respuesta que fue medida a las 48 hrs por el ensayo de la reducción metabólica del tetrazolio a formazán (ensayo de MTT). Los porcentajes de supervivencia de la línea celular Vero frente al estímulo se muestra la *figura 2*, mientras los valores obtenidos para la línea celular SiHa se muestran en la *figura 3*.

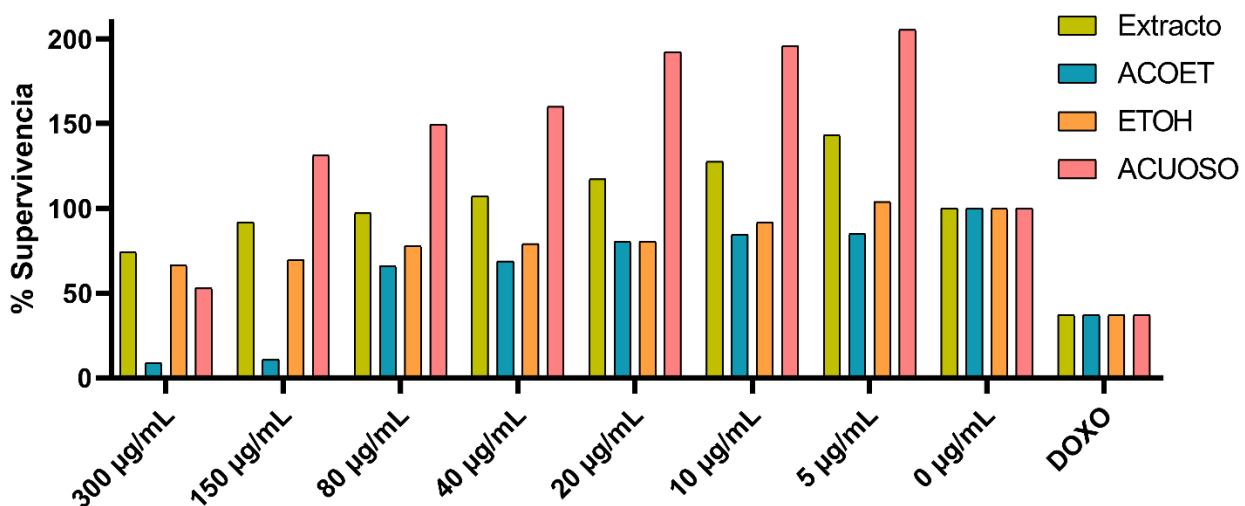


Figura 2: Porcentaje de supervivencia de células VERO frente al extracto y fracciones de B. tomentosa, determinado por el ensayo de MTT a las 24 hrs de respuesta frente al estímulo.

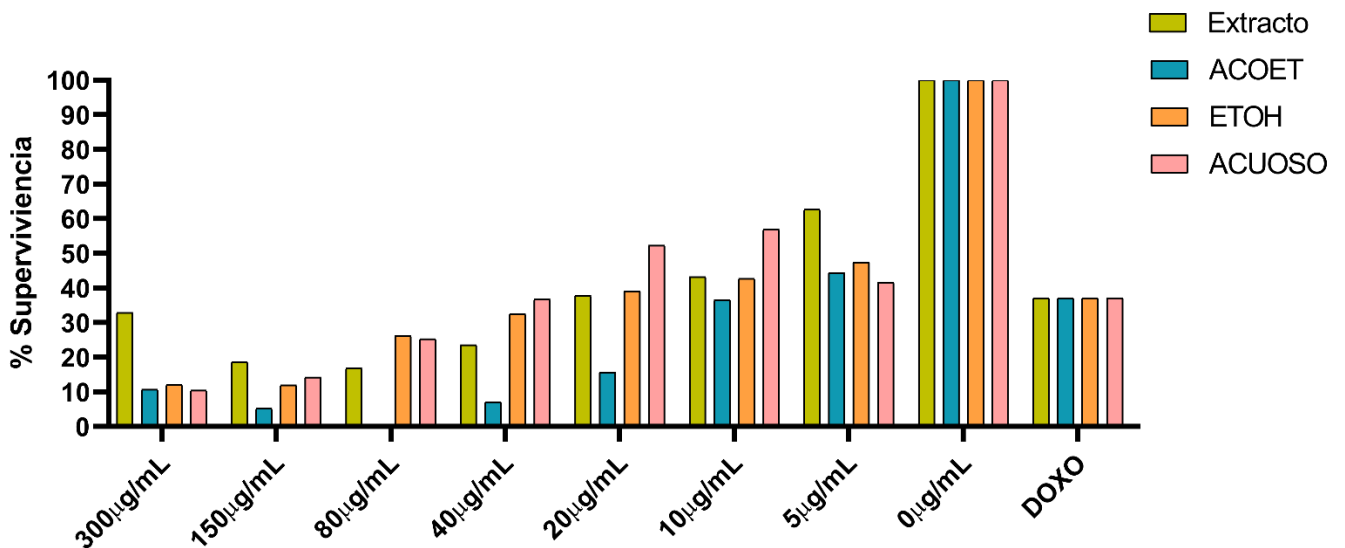


Figura 3: Porcentaje de supervivencia de células SiHa frente al extracto y fracciones de *B. tomentosa*, determinado por el ensayo de MTT a las 24 hrs de respuesta frente al estímulo.

Teniendo en cuenta que se consideró como activa biológicamente a toda muestra capaz de reducir a un valor igual o inferior al 50% de supervivencia, se destaca como en la *figura 2*, la fracción AcOEt tuvo efecto sobre la viabilidad de las células Vero a una concentración de 150 µg/mL al reducir a 10.64 % la supervivencia de la muestra, por su parte la fracción acuosa redujo la supervivencia al 52.91% a una concentración de 300 µg/mL. Efecto logrado a las concentraciones mas altas del ensayo. En comparación con los valores obtenidos para las demás muestras evaluadas sobre Vero, destacando valores de supervivencia por encima del 100% en comparación con el control negativo. En contraste las muestras de extracto y fracciones de *B. tomentosa* sobre el modelo tumoral SiHa, mostraron mayor actividad biológica, ya que el extracto redujo a 43.19 % de supervivencia a 10 µg/mL, la fracción de AcOEt y EtOH genero una supervivencia de 44.41 % y 47.40 % respectivamente a 5 µg/mL, afectación a la viabilidad generada a las concentraciones bajas del ensayo, Sin embargo la fracción acuosa no presento una reducción lineal de la supervivencia, puesto que a 5 µg/mL el porcentaje de supervivencia fue de 41.58 % en comparación con el 56.89 % a 10 µg/mL, la fracción acuosa se mantiene por encima del 50% de supervivencia entre 10 – 20 µg/mL, para luego descender el porcentaje de supervivencia al 36.70 % a 40 µg/mL. Estos resultados para la fracción acuosa en la línea celular

SiHa, así como un valor de supervivencia por encima del 100% para Vero, se asocia, como un efecto de la privación de nutrientes, ya que, consecuente a la polaridad empleada en la maceración (EtOH:Agua 7:3) inicial para obtener el extracto, se esperaba la obtención de azúcares que pudieran funcionar como fuente de energía para las muestras celulares.

4 Conclusiones

Se determinó que el extracto y las tres fracciones probadas de *Bursera tomentosa* poseen actividad biológica sobre la línea celular SiHa, mientras que solo la fracción de acetato de etilo y fracción Acuosa fue biológicamente activa frente a la línea celular vero a concentraciones mayores de 80 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Estos tratamientos lograron reducir por debajo del 50% de supervivencia la población expuesta al estímulo, sugiriendo que el perfil químico contenido en las muestras, tiene la capacidad de alterar el metabolismo celular, afectando su correcto desarrollo, puesto que el ensayo de MTT mide la actividad de la succinato deshidrogenasa en la respiración mitocondrial, al metabolizar el tetrazolio en formazan, lo que proporciona indicios acerca del posible uso terapéutico en carcinoma de células escamosas de tejido uterino.

Se logró describir el perfil químico de forma cualitativa de los diversos núcleos encontrados en el extracto y fracciones de *B. tomentosa*, mediante pruebas de tubo, por la denominada técnica, tamizaje fitoquímico. Encontrando que los fenoles destacan al estar presentes en todas las muestras pese al fraccionamiento.

El contenido total de fenoles para el extracto crudo fue de 129.40 mg/g equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra de *B. tomentosa*, cuyo contenido se distribuyó en las fracciones de forma no uniforme, albergando la mayor concentración de polifenoles en la fracción acetato de etilo.

Consecuente al fraccionamiento, el contenido de polifenoles tuvo menor proporción en la fracción de etanol y acuosa. Lo que sugiere que el contenido más alto, no es, necesariamente, el más significativo, puesto que como se observó, la fracción AcOEt obtuvo los valores más bajos en supervivencia en ambos modelos celulares, cuestionado su comportamiento como fármaco ideal, puesto que, se busca

un efecto selectivo entre células tumorales y no tumorales, por otra parte, un menor contenido de polifenoles para la fracción de EtOH, genero aparente selectividad entre las células control y las células cancerígenas según se apreció en los valores estadísticos de supervivencia. Aun así, se requieren de más pruebas biológicas y estadísticas para denominar a estos valores como significativamente diferentes.

Al probar el efecto de las muestras en la viabilidad, se encontró que el extracto y fracciones, afectan la actividad mitocondrial en porcentajes diferentes acorde a la línea celular. En consecuencia, se debe determinar el mecanismo de muerte; es decir por apoptosis o necrosis celular. Adicionalmente se abre la posibilidad de investigación, respecto la caracterización y evaluación de los componentes individuales que conforman las fracciones AcOEt y EtOH, para determinar si su actividad biológica se debe a una molécula en particular o a un conjunto de metabolitos que generan un efecto en sinergia, para ello se sugiere seguir la polaridad de maceración y el método de fraccionamiento descritos en el presente trabajo.

Agradecimientos

Agradezco a la Coordinación de laboratorios de Docencia de la Universidad Antonio Nariño, a cargo de la PhD(c) Yuly Elien Bernal Rosas, por su colaboración, acompañamiento y asesoría durante la fase experimental del presente trabajo de investigación.

Así mismo, Agradezco al PhD(c) Diego Andrés Castañeda Peláez, por su colaboración acompañamiento e instrucción en el cultivo celular, realizado en los laboratorios del Centro de investigaciones odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana.

A mis directores de tesis el Dr. Andrés Mauricio Rojas Sepúlveda y la Dra. Clara Juliana Durango García, les dedico la frase “Libertad es poder demostrar la responsabilidad que tenemos como personas”, gracias por su confianza en mi proyecto.

Referencias

- Ahmadiankia, N. (2020). In vitro and in vivo studies of cancer cell behavior under nutrient deprivation. *Cell Biology International*, 44(8), 1588–1597. <https://doi.org/10.1002/CBIN.11368>
- Aliyazcoglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E., & Kolayli, S. (2012). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *https://doi.org/10.1080/10942912.2010.551312*, 16(2), 277–287. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.551312>
- Ardalani, H., Avan, A., & Ghayour-Mobarhan, M. (2017). Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 7(4), 285. [/pmc/articles/PMC5580867/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35580867/)
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1062–1076. <https://doi.org/10.1093/AJCN/71.5.1062>
- Bae, S. H., & Suh, H. J. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *Lwt*, 40(6), 955–962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.06.007>
- Bah, M., Gutiérrez-Avella, D. M., Mendoza, S., Rodríguez-López, V., & Castañeda-Moreno, R. (2014). Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of bursera simaruba. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 13(6), 527–536.
- Barreto, J. J. J. (2009). Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta. In *Tesis* (Vol. 1).
- Belew, A. A., Mariam, G. G. /, Hana, W. /, Meshesha, D. S., Akele, M. L., Shumuye Meshesha, D., & Legese Akele, M. (2021). *Evaluation of Total Phenolic, Total Flavonoid Content And Antioxidant Activity of Rhus Vulgaris*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-1207023/V1>
- Buckner, C. A., Lafrenie, R. M., Dénommée, J. A., Caswell, J. M., Want, D. A., Gan, G. G., Leong, Y. C., Bee, P. C., Chin, E., Teh, A. K. H., Picco, S., Villegas, L., Tonelli, F., Merlo, M., Rigau, J., Diaz, D., Masuelli, M., Korrapati, S., Kurra, P., ... Mathijssen, R. H. J. (2016). Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. *Intech, 11*(tourism), 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Camargo, J. E. R., Alfonso, A. N. T., Rojas-Rozo, R. A., Castro, C. de, & Murcia, T. R. de. (2010). Efectos citotóxicos in vitro de extractos y fracciones de Bursera tomentosa (Jacq.) Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4), 588–593. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400019>
- Cháirez-Ramírez, M. H., de la Cruz-López, K. G., & García-Carrancá, A. (2021). Polyphenols as Antitumor Agents Targeting Key Players in Cancer-Driving Signaling Pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 2672. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.710304/BIBTEX>
- Claesson, U., Lassus, A., Happonen, H., Hogstrom, L., & Siboulet, A. (2016). Topical treatment of venereal warts: a comparative open study of podophyllotoxin cream versus solution: *Http://Dx.Doi.Org/10.1258/0956462961918400*, 7(6), 429–434. <https://doi.org/10.1258/0956462961918400>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2018.00087/BIBTEX>
- DeCarlo, A., Dosoky, N. S., Satyal, P., Sorensen, A., & Setzer, W. N. (2019). The Essential Oils of the Burseraceae. In *Essential Oil Research*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8_4

- Elansary, H. O., Szopa, A., Klimek-Szczykutowicz, M., Ekiert, H., Barakat, A. A., & Al-Mana, F. A. (2020). Antiproliferative, Antimicrobial, and Antifungal Activities of Polyphenol Extracts from Ferocactus Species. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 138, 8(2), 138. <https://doi.org/10.3390/PR8020138>
- Franconi, R., Massa, S., Paolini, F., Vici, P., & Venuti, A. (2020). Plant-Derived Natural Compounds in Genetic Vaccination and Therapy for HPV-Associated Cancers. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 3101, 12(11), 3101. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12113101>
- Friedl, F., Kimura, I., Osato, T., & Ito, Y. (1970). Studies on a New Human Cell Line (SiHa) Derived from Carcinoma of Uterus. I. Its Establishment and Morphology. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 135(2), 543–545. <https://doi.org/10.3181/00379727-135-35091a>
- Grupo de Investigación Fitoquímica. GIFUJ. (2000). *PROGRAMA NACIONAL DE CIENCIAS BASICAS INFORME TECNICO FINAL*.
- Guo, W., Kong, E. H., & Meydani, M. (2009). Dietary Polyphenols, Inflammation, and Cancer. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/01635580903285098>, 61(6), 807–810. <https://doi.org/10.1080/01635580903285098>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Johnson, I. T., Williamson, G., & Musk, S. R. R. (1994). Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients? *Nutrition Research Reviews*, 7(1), 175–204. <https://doi.org/10.1079/NRR19940011>
- Kaileh, M., Berghe, W. Vanden, Boone, E., Essawi, T., & Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 510–516. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2007.07.008>
- Kampa, M., Nifli, A. P., Notas, G., & Castanas, E. (2007). Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 159, 79–113. https://doi.org/10.1007/112_2006_0702/COVER
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C. C., Yang, W. C., & Tsai, G. J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.037>
- Khajjah, M. A., Khushaish, S., & Luqmani, Y. A. (2022). Glucose deprivation reduces proliferation and motility, and enhances the anti-proliferative effects of paclitaxel and doxorubicin in breast cell lines in vitro. *PLoS ONE*, 17(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0272449>
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- Luqman, S., & Rizvi, S. I. (2006). Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Research : PTR*, 20(4), 303–306. <https://doi.org/10.1002/PTR.1861>
- Marcotullio, M. C., Curini, M., & Becerra, J. X. (2018). An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera* spp. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1976, 23(8), 1976. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23081976>
- María, E., Silva, V. De, Lilia, C., & García, G. De. (1985). Estudio Químico Preliminar De Algunas Plantas Colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 4(2), 21–24.
- Mathews, E. H., Visagie, M. H., Meyer, A. A., Joubert, A. M., & Mathews, G. E. (2020). In vitro quantification: Long-term effect of glucose deprivation on various cancer cell lines. *Nutrition*, 74, 110748. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2020.110748>
- Mokhena, T., Mochane, M., Tshwafo, M., Linganiso, L., Thekisoe, O., & Songca, S. (2016). Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense An Overview. *Intech*, 225–240. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

- Moreno, J., Aparicio, R., Velasco, J., Rojas, L. B., Usubillaga, A., & Lue-Merú, M. (2010). *Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from Fruits of Bursera tomentosa*.
- Moreno, J., Rojas, L. B., Aparicio, R., Marcó, L. M., & Usubillaga, A. (2010). Chemical composition of the essential oil from the bark Bursera tomentosa (Jacq) Tr & Planch. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 9(6), 491–494.
- Morton, J. F. (1981). *Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan*. Charles C Thomas. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016006682>
- National Institutes of Health (US). (2007). *Understanding Cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270. <https://doi.org/10.4161/OXIM.2.5.9498>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2010). Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytotherapy Research : PTR*, 24 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/PTR.2853>
- Pant, D. R., Pant, N. D., & Saru, D. B. (2017). *Phytochemical screening and study of antioxidant , antimicrobial , antidiabetic , anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from stem wood of Pterocarpus marsupium Roxburgh*. <https://doi.org/10.5455/jice.20170403094055>
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Ka, M., Hko È Nen, È., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494–507. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2001.01271.X>
- Robles, J. et al. (2005). *Triterpenos aislados de corteza de Bursera graveolens (Burseraceae) y su actividad biológica*. 15(4), 283–286.
- Rojas-Sepúlveda, A. M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M. Y. A., Salas-Vidal, E., Marquina, S., Villarreal, M. L., Puebla, A. M., Delgado, J. I., & Alvarez, L. (2012). Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of Bursera fagaroides var. fagaroides. *Molecules*, 17(8), 9506–9519. <https://doi.org/10.3390/molecules17089506>
- Ryan, K. J. (2021). Virus del papiloma y del polioma. In *Sherris. Microbiología médica, 7e*. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1182634539>
- Shareef, M. A., Duscharla, D., Ramasatyaveni, G., Dhoke, N. R., Das, A., Ummanni, R., & Srivastava, A. K. (2015). Investigation of podophyllotoxin esters as potential anticancer agents: Synthesis, biological studies and tubulin inhibition properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 128–137. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.10.050>
- Sheets, R. (2000). *History and Characterization of the Vero Cell Line A Report prepared by CDR Rebecca Sheets, Ph.D., USPHS*.
- Teoh, E. S. (2016). Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia*, 59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5
- The IUCN Red List of Threatened Species. (2021). *Bursera tomentosa*. 12 June 2018. <https://www.iucnredlist.org/species/144255059/144255061>
- Theisen, L. L., Erdelmeier, C. A. J., Spoden, G. A., Boukhallouk, F., Sausy, A., Florin, L., & Muller, C. P. (2014). Tannins from Hamamelis virginiana Bark Extract: Characterization and Improvement of the Antiviral Efficacy against Influenza A Virus and Human Papillomavirus. *PLOS ONE*, 9(1), e88062. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088062>
- Tzima, K., Brunton, N. P., & Rai, D. K. (2020). *Evaluation of the impact of chlorophyll removal techniques on polyphenols in rosemary and thyme by-products*. October 2019, 1–22. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13148>
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. E. (2010). Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients* 2010, Vol. 2, Pages 1106-1131, 2(11), 1106–1131. <https://doi.org/10.3390/NU2111106>
- Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl).

<https://doi.org/10.1093/AJCN/81.1.292S>

- Wang, B., Chen, L., Zhen, H., Zhou, L., Shi, P., & Huang, Z. (2013). Proteomic Changes Induced by Podophyllotoxin in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells. *Http://Dx.Doi.Org/10.1142/S0192415X13500122*, 41(1), 163–175. <https://doi.org/10.1142/S0192415X13500122>
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Oxford: Blackwell Scientific*.
- White, E. S. Z., Pennant, N. M., Carter, J. R., Hawsawi, O., Odero-Marah, V., & Hinton, C. V. (2020). Serum deprivation initiates adaptation and survival to oxidative stress in prostate cancer cells. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68668-x>
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381–406. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NUTR.21.1.381>
- Zhang, Q. Y., Jiang, M., Zhao, C. Q., Yu, M., Zhang, H., Ding, Y. J., & Zhai, Y. G. (2005). Apoptosis induced by one new podophyllotoxin glucoside in human carcinoma cells. *Toxicology*, 212(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2005.04.006>
- Zulkifli, S. A., Salwa, S., Gani, A., & Zaidan, U. H. (2020). Optimization of Total Phenolic and Flavonoid Contents of Defatted Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Seed Extract and Its Antioxidant Properties. *Molecules*, 1–17.