

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES BIOACTIVAS DE *Isostichopus fuscus* CON POTENCIAL MODULADOR DE LA ANGIOGÉNESIS PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS ALTERNATIVAS CLÍNICAS

AUTOR:

CINDY STEFANÍA JARA SANABRIA

Guayaquil - Ecuador

2026

RESUMEN

El presente estudio se enfocó en la evaluación de fracciones obtenidas de la especie de pepino de mar *Isostichopus fuscus*, una especie distribuida a lo largo del Océano Pacífico, incluyendo las costas ecuatorianas y Galápagos. El objetivo principal fue determinar el potencial modulador de la angiogénesis como una posible alternativa terapéutica a futuro para enfermedades crónicas tales como el cáncer y diabetes. Para este proyecto, se desarrollaron tres diseños experimentales que abarcaron: tipo de biomasa (húmeda o seca), tratamiento de extracción (maceración y/o ultrasonido) y fraccionamiento en base a polaridad decreciente (empleando proporciones metanol:cloroformo). Se aplicó una caracterización fitoquímica cualitativa que mostró la presencia predominante de compuestos fenólicos y terpenoides en todas las fracciones. La bioactividad fue evaluada mediante ensayos antioxidantes (DPPH), modelo vegetal *Allium cepa*, modelo *in vitro* de cuatro líneas celulares cancerígenas (HeLa, PC-3, RKO y T47-D) y el modelo *in ovo* de membrana corioalantoidea de embriones de pollo (CAM assay). Adicionalmente, se realizó la identificación de compuestos fenólicos en las fracciones más bioactivas, correspondientes a la polaridad intermedia, mediante análisis UHPLC. Los hallazgos evidenciaron la presencia de compuestos con actividad antioxidante, efectos estimulantes en el crecimiento celular (modelo *Allium cepa* y líneas cancerígenas) y pro-angiogénicos (modelo *in ovo* CAM). Los resultados de este estudio sugieren que las fracciones de *I. fuscus* poseen potencial bioactivo de interés y se consolidan como base para futuras investigaciones.

Bioactividad, pepinos de mar, angiogénesis, fracciones.

ABSTRACT

The present study focused on the evaluation of fractions obtained from species of sea cucumber *Isostichopus fuscus*, a species distributed throughout the Pacific Ocean, including the Ecuadorian coast and the Galápagos Islands. The main objective was the determination of its angiogenesis-modulating potential as a possible future therapeutic alternative, oriented toward chronic diseases such as cancer and diabetes. For the development of this project, three experimental designs were applied, encompassing: type of biomass (wet or dry), extraction treatment (maceration and/or ultrasound), and fractionation based on decreasing polarity (using methanol:chloroform proportions). A qualitative phytochemical characterization was performed, which showed the predominant presence of phenolic compounds and terpenoids in all fractions. Bioactivity was evaluated through antioxidant assays (DPPH), the plant model *Allium cepa*, an in vitro model using four cancer cell lines (HeLa, PC-3, RKO, and T47-D), and the *in ovo* chorioallantoic membrane model of chicken embryos (CAM assay). Additionally, the identification of phenolic compounds in the most bioactive fractions, corresponding to intermediate polarity, was carried out by UHPLC analysis. The findings evidenced the presence of compounds with antioxidant activity, stimulatory effects on cell growth (*Allium cepa* model and cancer cell lines), and pro-angiogenic effects (*in ovo* CAM model). The results of this study suggest that *I. fuscus* fractions possess bioactive potential of interest and are consolidated as a basis for future research.

Bioactivity, sea cucumbers, angiogenesis, fractions.

DEDICATORIA

Infinitas gracias a Diosito por protegerme y darme la fortaleza necesaria día a día para alcanzar cada meta que me he propuesto.

A mi papá, con todo mi amor y gratitud, por enseñarme que el amor de un padre es incondicional. Gracias por acompañarme en cada paso, por motivarme a siempre dar lo mejor de mí y recordarme que el cansancio es momentáneo, pero los frutos del esfuerzo son eternos.

A mi querido profesor Joan Vera, a quien admiro tanto, gracias por brindarme la oportunidad de participar en el desarrollo de este proyecto, que me ha permitido descubrir un mundo nuevo, lleno de conocimiento, hallazgos, retos; un mundo multifacético que me ha enseñado que en la investigación no existen moldes.

A mi estimado Pepe quien ha palpado esta montaña rusa que conlleva la investigación, y quien también con su granito de arena aportó al desarrollo de este proyecto.

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que aportaron de diferentes maneras al desarrollo de este proyecto de investigación.

Expreso un profundo reconocimiento a los Doctores Joan Vera y Paul Guillén por su invaluable enseñanza, orientación y acompañamiento en cada etapa.

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) por la colaboración en los ensayos realizados en las cuatro líneas celulares. Asimismo, al CENAIM por el acceso a los pepinos de mar *Isostichopus fuscus*.

De igual manera, a LAQUINS por permitir el uso del UHPLC, gracias al cual fue posible la identificación de compuestos fenólicos.

Declaración Expresa

Yo, Cindy Stefanía Jara Sanabria acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. El o los estudiantes deberán procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autores/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 20 de marzo del 2026.

Cindy Stefanía Jara Sanabria

EVALUADORES

Ph.D. Joan Vera Villalobos
TUTOR

Ph.D. Cesar Araque Molina
EVALUADOR

Ph.D. Joel Vielma Puente
PRESIDENTE

ABREVIATURAS O SIGLAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
UTPL	Universidad Técnica Particular de Loja
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IL-8	Interlucina 8
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HMOX-1	Hemo oxigenasa-1
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2
ROS	Especies Reactivas al Oxígeno
CAM	Membrana Corioalantoidea
MTT	Ensayo colorimétrico de tetrazolio MTT
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
ANOVA	Análisis de varianza
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
MEM	Medio Esencial Mínimo
F-12	Medio de cultivo Nutrient Mixture F-12
CO ₂	Dióxido de carbono
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LC	Cromatografía Líquida
MS	Espectrometría de Masas
MS/MS	Acoplamiento a Espectrometría de Masas
MN	Molecular Networking
SPE	Extracción en Fase Sólida

VLC	Cromatografía Líquida al Vacío
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluoroacético
ACN	Acetonitrilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
HeLa	Línea celular de carcinoma cervical humano
PC-3	Línea celular de adenocarcinoma de próstata humano
RKO	Línea celular de carcinoma colorrectal humano
T47-D	Línea celular de carcinoma ductal de mama humano
PBS	Solución salina tampón fosfato
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
Notch/DII4	Vía de señalización Notch / Ligando Delta tipo 4
SGLT2	Cotransportador sodio-glucosa tipo 2
WoRMS	Registro Mundial de Especies Marinas
20S	Subunidad 20S del proteasoma

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	2
1.2. Descripción del problema	7
1.3. Objetivos	11
1.3.1. Objetivo General	11
1.3.2. Objetivos Específicos	11
1.4. Hipótesis	11
1.5. Alcance	12
CAPÍTULO 2	13
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1. La angiogénesis: bases biológicas y relevancia clínica	13
2.1.1. Concepto y etapas de la angiogénesis	13
2.1.2. Regulación molecular de la angiogénesis	15
2.1.3. Angiogénesis patológica en enfermedades crónicas	17
2.2. Enfermedades relacionadas con la disfunción angiogénica	18
2.2.1. Angiogénesis en el cáncer	18
2.2.2. Angiogénesis y complicaciones vasculares en diabetes	18
2.2.3. Estrés oxidativo y regulación de la angiogénesis	19
2.3. Fuentes naturales de compuestos bioactivos con potencial terapéutico	20
2.3.1. Importancia de los productos naturales en la biomedicina	20
2.3.2. El ecosistema marino como fuente de compuestos bioactivos	22
2.3.3. Los equinodermos como recurso biomédico	25
2.4. El pepino de mar <i>Isostichopus fuscus</i>	28
2.4.1. Características biológicas y distribución	28
2.4.2. Composición química y metabolitos reportados	29
2.5. Compuestos marinos y su papel en la modulación de la angiogénesis	31
2.5.1. Mecanismos de acción de los compuestos antiangiogénicos	31
2.5.2. Compuestos con efecto proangiogénico	33
2.5.3. Evidencia experimental en modelos celulares y animales	34
2.6. Métodos de obtención y caracterización de fracciones bioactivas	36
2.6.1. Técnicas de extracción y fraccionamiento	36
2.6.2. Métodos cromatográficos y espectroscópicos	37

2.6.3.	Ensayos fitoquímicos cualitativos.....	39
2.7.	Modelos biológicos para la evaluación de la bioactividad.....	41
2.7.1.	Ensayo <i>in vitro</i> en líneas celulares.....	41
2.7.2.	Ensayo de membrana corioalantoidea (CAM)	42
2.7.3.	Interpretación de resultados biológicos.....	42
2.8.	Perspectiva terapéutica de <i>Isostichopus fuscus</i>	43
2.8.1.	Potencial biomédico de metabolitos.....	43
2.8.2.	Retos en la investigación y aplicaciones futuras	44
CAPÍTULO 3.....		45
3.	METODOLOGÍA.....	45
3.1.	Enfoque de la investigación.....	45
3.1.1.	Tipo de investigación.....	45
3.1.2.	Diseño de investigación	45
3.2.	Metodología	46
3.2.1.	Variables.....	46
3.2.1.1.	Variables independientes	46
3.2.1.2.	Variables dependientes.....	46
3.2.2.	Diseño experimental	47
3.2.2.1.	Obtención de extractos y fracciones.....	47
3.2.2.2.	Técnicas de caracterización fitoquímica	47
3.2.2.3.	Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH).....	47
3.2.2.4.	Evaluación biológica.....	48
3.2.2.5.	Análisis químico por técnicas analíticas instrumentales.....	48
3.2.2.6.	Estadística.....	48
3.2.3.	Recolección de datos	49
3.2.3.1.	Métodos y técnicas	49
3.2.3.1.1.	Extracción y fraccionamiento	49
3.2.3.1.2.	Caracterización fitoquímica	50
3.2.3.1.3.	Ensayo de DPPH	52
3.2.3.1.4.	Modelo <i>Allium cepa</i>	54
3.2.3.1.5.	Ensayo <i>In vitro</i> en células cancerígenas.....	55
3.2.3.1.6.	Modelo de membrana corioalantoidea	56
3.2.3.1.7.	Identificación de compuestos fenólicos mediante UHPLC.....	58
3.2.3.2.	Recursos.....	58
3.2.3.2.1.	Equipos	58
3.2.3.2.2.	Materiales	59

3.2.4.	Análisis estadístico	60
3.2.4.1.	Caracterización fitoquímica	60
3.2.4.2.	Ensayo antioxidante DPPH	60
3.2.4.3.	Modelo vegetal <i>Allium cepa</i>	61
3.2.4.4.	Ensayos in vitro en líneas celulares cancerígenas.....	61
3.2.4.5.	Modelo CAM	60
CAPÍTULO 4		62
4.	RESULTADOS	62
4.1.	Obtención de las fracciones por polaridad.....	62
4.2	Caracterización las fracciones	66
4.3	Ensayos de bioactividad en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	75
4.3.1	Modelo de crecimiento radicular <i>Allium cepa</i>	72
4.3.2	Viabilidad celular en líneas cancerígenas.....	82
4.3.3	Modelo de membrana corioalantoidea (CAM).....	87
CAPÍTULO 5		99
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	102
6.	Referencias	105
7.	Apéndices y anexos.....	123

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2. 1 Estructura química de la morfina aislada de <i>Papaver somniferum</i>	21
Figura 2. 2 Estructura química de la quinina aislada de <i>Chinchona spp.</i>	21
Figura 2. 3 Estructura química de la vinblastina aislada de <i>Catharanthus roseus</i>	21
Figura 2. 4 Estructura química de paclitaxel aislado de <i>Taxus brevifolia</i>	21
Figura 2. 5 Estructura química de artemisina aislado de <i>Artemisia annua</i>	22
Figura 2. 6 Estructura química de mentol obtenido de <i>Mentha spp.</i>	22
Figura 2. 7 Estructura química de la salinosporamida A aislada de <i>Salinispora tropica</i>	23
Figura 2. 8 Estructura química de la fucoxantina obtenida de <i>Phaeodactylum tricornutu</i>	23
Figura 2. 9 Estructura química de un fucoidano aislado de <i>Fucus vesiculosus</i>	24
Figura 2. 10 Estructura química de un furanocembranoide aislado de <i>Sacophyton digitatum</i>	24
Figura 2. 11 Estructura química de dolastatina 10 aislada de <i>Dolabella auricularia</i>	25
Figura 2. 12 Estructura química de una holoturina A aislada de <i>Holothuria Scabra</i>	26
Figura 2. 13 Estructura química del espinocromo A aislado de <i>Paracentrotus lividus</i>	26
Figura 2. 14 Estructura química de asterosaponinas aisladas de <i>Asterias amurensis</i>	27
Figura 2. 15 Estructura química de un fucoidano aislado de <i>Isostichopus badionotus</i>	27
Figura 2. 16 Estructura química de un condroitín sulfato fucosilado aislado de <i>Isostichopus badionotus</i>	27
Figura 2. 17 <i>Isostichopus fuscus</i> en tanques de cultivo en CENAIM.	29
Figura 2. 18 Estructura química de latrunculinas A aislada de <i>Latrunculia magnifica</i>	32
Figura 2. 19 Estructura química de araguspongine C aislado de la <i>Xestospongia exigua</i>	32

Figura 2. 20 Estructura química de echinochrome A aislado de <i>Paracentrotus lividus</i> .	33
Figura 2. 21 Estructura química de catunaregin aislado de <i>Catunaregam spinosa</i> .	34
Figura 2. 22 Estructura química de AD0157 aislada de un hongo marino del género <i>Paraconiothyrium</i> .	35
Figura 4. 1 Curva de calibración a partir de Trolox para el desarrollo del ensayo de DPPH.	70
Figura 4. 2 Tasa de crecimiento radicular del modelo <i>Allium cepa</i> para las fracciones provenientes de biomasa húmeda y tratamiento de maceración (primer diseño experimental).	78
Figura 4. 3 Tasa de crecimiento radicular del modelo <i>Allium cepa</i> para las fracciones provenientes de biomasa húmeda y tratamiento de ultrasonido (segundo diseño experimental).	78
Figura 4. 4 Tasa de crecimiento radicular del modelo <i>Allium cepa</i> para las fracciones provenientes de biomasa seca mediante liofilización y tratamiento combinado de maceración y ultrasonido (tercer diseño experimental).	79
Figura 4. 5 Resultados de crecimiento radicular en <i>Allium cepa</i> con análisis estadístico.	80
Figura 4. 6 Resultados mitóticos a 50ppm del modelo <i>Allium cepa</i> para: blanco (a), tratamiento 1.1 M (b), 1.2 M:C (c), 1.3 M:C (d), 1.4 M:C (e), 2.1 M (f), 2.2 M:C (g), 2.3 M:C (h), 2.4 M:C (i), 3.1 M (j), 3.2 M:C (k), 3.3 M:C (l), 3.4 M:C (m).	81
Figura 4. 7 Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular cancerígena HeLa.	83
Figura 4. 8 Resultados de los ensayos de membrana corioalantoidea: Control R1 a 0h (a), 24h (b) 48h (c) y 72h como evaluación adicional (d); el Control R2 a 0h (e) y 24h (f); el Control R3 a 0h (g), 24h (h) y 48h (i); el tratamiento 1.3 M:C R3 a 0h (j) y 24h (k); el tratamiento 1.3 M:C R4 a 0h (l), 24h (m), 48h (n) y 72h (o); el tratamiento 3.3 M:C R1 a 0h (p), 24h (q), 48h (r) y 72h (s); el tratamiento 3.3 M:C R2 a 0h (t) y 24h (u); y el tratamiento 3.3 M:C R4 a 0h (v), 24h (w), 48h (x) y 72h (y).	87

Figura 4. 9 Programa en gradiente para la lectura de compuestos fenólicos.	89
Figura 4. 10 Estándar de ácido gálico con tiempo de retención de 0.89 min	89
Figura 4. 11 Estándar de catequina con tiempo de retención de 3.36 min	90
Figura 4. 12 Estándar de ácido clorogénico con tiempo de retención de 3.48 min	90
Figura 4. 13 Estándar de ácido siríngico con tiempo de retención de 4.03 min. ...	90
Figura 4. 14 Estándar de epicatequina con tiempo de retención de 4.26 min.....	91
Figura 4. 15 Estándar de rutina con tiempo de retención de 5.14 min.	91
Figura 4. 16 Estándar de resveratrol con tiempo de retención de 5.81 min.	91
Figura 4. 17 Estándar de naringenina con tiempo de retención de 6.37 min.	92

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3. 1 Extractos resultantes de los 3 diseños experimentales en muestras de <i>Isostichopus fuscus</i>	50
Tabla 4. 1 Rendimientos obtenidos a partir del diseño experimental de <i>Isostichopus fuscus</i> . 63	
Tabla 4. 2 Resultados de la caracterización fitoquímica en las fracciones provenientes de biomasa húmeda con dos tratamientos distintos: maceración (Mace) y ultrasonido (Ultra). Donde “++” indica presencia fuerte, “+” indica presencia moderada y “-“ausencia de los compuestos.	68
Tabla 4. 3 Resultados de la caracterización fitoquímica en las fracciones provenientes de biomasa seca con dos tratamientos distintos.	69
Tabla 4. 4 Resultados de los ensayos de DPPH.	72
Tabla 4. 5 Tasas de crecimiento (cm/h) resultantes de los tres diseños de experimentos	80
Tabla 4. 6 Porcentaje de viabilidad de células tratadas con extractos de pepino de mar (200 µg/mL) sobre las líneas celulares de cáncer: cérvico uterino (HeLa), próstata (PC-3), mama (T-47D) y colon (RKO).	84
Tabla 4. 7 Contenido de compuestos fenólicos individuales en las fracciones 1.3 M:C y 3.3 M:C de <i>I. fuscus</i> .	96

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas representan uno de los principales retos para el área de salud, debido a su alto costo e impacto tanto en el ámbito económico como en el social. Estas patologías se caracterizan por mecanismos complejos que abarcan alteraciones metabólicas, inflamatorias y celulares que repercuten en la homeostasis natural del cuerpo humano. A pesar de los avances en la medicina hasta la presente fecha, muchas de estas enfermedades se continúan asociando a altas tasas de mortalidad, complicaciones y limitaciones en la eficacia de los tratamientos (Hunter & Reddy, 2013).

En base a esto, la investigación biomédica ha puesto énfasis en la identificación de nuevos compuestos que permitan actuar sobre los mecanismos biológicos claves involucrados en el desarrollo de las enfermedades crónicas, como la angiogénesis alterada, estrés oxidativo e inflamación crónica (Atanasov et al., 2015). El interés por los productos naturales como fuente de compuestos bioactivos ha aumentado con la finalidad de descubrir alternativas terapéuticas más eficaces, biocompatibles y con efectos adversos menores. De forma más específica, los organismos marinos han despertado un marcado interés científico tanto por la diversidad química como la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos (Haque et al., 2022).

Dentro del ecosistema marino, los equinodermos, específicamente los pepinos de mar han sido reconocidos como organismos de alto valor por sus propiedades bioactivas en las cuales destacan las antiinflamatorias, antitumorales, antioxidantes y moduladoras de la angiogénesis. La investigación profunda ha logrado aislar los metabolitos secundarios responsables de dichas bioactividades para un potencial uso en el campo farmacológico. Sin embargo, a pesar del avance en el estudio de especies

provenientes del continente asiático, existe un vacío de información respecto a especies del continente americano, continente que no consume de forma tradicional estos organismos, pero los exportan al continente asiático. *Isostichopus fuscus* es una especie representativa del América y nativa de la costa ecuatoriana, cuyas propiedades no se han investigado en profundidad.

El presente estudio tuvo como propósito evaluar y caracterizar fracciones bioactivas obtenidas de *I. fuscus* en un periodo de 8 meses, con la finalidad de determinar su potencial modulador de angiogénesis y una posible aplicación a futuro como una alternativa terapéutica complementaria en enfermedades catastróficas. Para el desarrollo de este estudio, se empleó una metodología experimental que abarca procesos de extracción y fraccionamiento químico, así como la evaluación biológica *in vitro* en líneas cancerígenas, e *in vivo* en *Allium cepa* y membrana corioalantoidea, sumado al análisis estadístico para la significancia del efecto angiogénico en los modelos.

1.1. Antecedentes

Las enfermedades catastróficas y metabólicas crónicas están en aumento según lo indican las estadísticas mundiales. Entre ellas, el cáncer es una de las principales causas de muerte, se estima que para el 2040 se llegará a tener hasta 29.9 millones de casos nuevos, así mismo las muertes que se relacionan a esta enfermedad aumentarán a 15.3 millones (Castillo et al., 2022). Desde principios de los años noventa se ha evidenciado la disminución en la tasa de mortalidad, pero a pesar de que estas tendencias indican que hay avances contra esta enfermedad, también aparecen los cánceres altamente agresivos. Estos tumores se caracterizan por un crecimiento rápido, metástasis acelerada y resistencia alta a los tratamientos convencionales. A nivel molecular, se evidencia la sobreexpresión de proteínas oncogénicas y mutaciones que activan vías de proliferación, generando una señalización celular descontrolada que requieren combinaciones terapéuticas complejas con resultados limitados debido al rápido desarrollo de resistencia farmacológica (Espinosa-Yépez, 2025).

En Ecuador, entre el 2014 y 2022 se registraron 101.637 muertes por cáncer. Los tipos de cancer con mayor impacto son el cáncer gástrico que está asociado a un diagnóstico tardío; los cánceres de cuello uterino, útero y mama, que presentan alta prevalencia y carga significativa de mortalidad potencialmente evitable dependiendo de la etapa de detección; cáncer de próstata, frecuente en hombres de edad avanzada; las leucemias con alta incidencia en población joven y cáncer de tiroides cuyo impacto en mortalidad se ha relacionado con los sobretamientos y complicaciones (Espinosa-Yépez, 2025). Los estudios señalan que la categorización de cáncer altamente agresivo sumado al diagnóstico tardío, complicaciones quirúrgicas, variabilidad de calidad de tratamientos y la dificultad de implementación de terapias modernas o complementarias contribuye a que cánceres potencialmente tratables evolucionen hacia formas más agresivas (Solis-Pazmino et al., 2021).

Desde el punto de vista económico, el tratamiento oncológico en Ecuador representa una carga financiera importante. En el sector privado, un paquete completo de quimioterapias, que depende del tipo de cáncer, estadio y combinación farmacológica, puede oscilar entre \$4000 y \$40000 (Nussinov et al., 2025). A pesar de que el sector público abarca una gran parte de los gastos en estos tratamientos, aun persisten los gastos indirectos significativos como medicamentos complementarios, alimentación especializada, transporte y alojamiento (Mino et al., 2024). El impacto del cáncer también repercute en el círculo familiar debido a la pérdida de ingresos por incapacidad laboral del paciente o el fuerte peso económico sobre los cuidadores que pueden incurrir en endeudamientos, venta de bienes y hasta el deterioro de la estabilidad económica en el hogar. Adicionalmente, también se generan consecuencias a nivel emocional y social, caracterizadas por el estrés, ansiedad, depresión tanto en el paciente como en quienes forman su entorno (Santucci et al., 2020). Estas consecuencias enfatizan la necesidad de continuar con investigaciones y mejoras terapéuticas y farmacológicas.

En cuestiones de tratamientos contra el cáncer, tanto la quimioterapia y radioterapia producen una serie de efectos secundarios adversos que repercuten significativamente en la calidad de vida, los cuales incluyen: anemia, caída del cabello, cambios en piel, uñas, peso, inflamación de órganos, deterioro del sistema inmunológico, lesiones a la piel, entre otros (Majeed & Gupta, 2025). Estas complicaciones surgen debido al daño colateral que estas terapias causan en tejidos sanos, puesto que las células sanas cercanas a las células cancerosas también se ven afectadas. Además, la toxicidad acumulada por estas terapias también puede abarcar complicaciones a largo plazo como fibrosis pulmonar, cardiotoxicidad y mayor susceptibilidad a infecciones. Por lo que, es necesario buscar estrategias que permitan contrarrestar los efectos secundarios y mejorar la tolerancia a los tratamientos convencionales (Castillo Marina, 2015; Zugazagoitia et al., 2016).

La búsqueda de alternativas de origen natural ha cobrado relevancia por el interés en compuestos que puedan ser capaces de modular los mecanismos asociados al cáncer, como la proliferación, apoptosis, angiogénesis, con la finalidad de su implementación en el campo biomédico con una mejor tolerancia y complementar tratamientos convencionales. En base a lo anterior, el ecosistema marino se ha consolidado como una fuente en crecimiento de investigación (especialmente en equinodermos) por la diversidad sus metabolitos bioactivos, que resulta ser mayor que la reportada en especies terrestres, lo que refuerza su valor en el desarrollo de nuevos fármacos (M. Ahmad et al., 2025).

En la actualidad, una fracción importante de los fármacos de origen marino están orientados en oncología. Se reporta que el 71% de los medicamentos de origen marino aprobados se emplean contra el cáncer y que un 85% de los medicamentos en desarrollo, a partir de fuentes marinas, están orientados al tratamiento del cáncer, evidenciando la prioridad de investigación en esta área (Alves & Diederich, 2023).

Entre los compuestos anticancerígenos de origen marino, se encuentran: trabectedina, derivada de un tunicado y empleada para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos en estadio avanzado (Pereira et al., 2019); eribulina, sintetizada a partir de esponjas marinas y usada en el tratamiento del cáncer de seno metastásico (Swami et al., 2015); también conjugados anticuerpo-fármaco, cuya finalidad es administrar un fármaco extremadamente tóxico con un daño adverso mínimo, como brentuximab vedotina sintetizado de la dolastatina 10 proveniente de un molusco marino que se aplica a pacientes adultos con linfoma de Hodgkin clásico (Haque et al., 2022; Jimenez et al., 2023).

Por otro lado, la diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por presentar niveles altos de glucosa en la sangre, producto de alteraciones en la insulina (Banday et al., 2020). Uno de sus principales efectos secundarios es el desarrollo de úlceras diabéticas, las cuales se originan a partir de la interacción entre factores metabólicos, inflamatorios y vasculares. Estas lesiones de tejidos se asocian a procesos de inflamación crónica de bajo grado, estrés oxidativo e isquemia, lo que limita la adecuada cicatrización y favorece la destrucción progresiva de los tejidos afectados (Markakis et al., 2016).

El desequilibrio de los mecanismos antioxidantes en pacientes diabéticos promueve el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que contribuye a la resistencia a la insulina y complicando los cuadros clínicos como el pie y la retinopatía diabética. Como consecuencia, la angiogénesis requerida para la reparación tisular resulta alterada, lo que genera vasos inmaduros, disfuncionales o insuficientes. (Schwartz Adriana et al., 2019).

Actualmente, se conoce que el método más viable para el control y manejo de las úlceras diabéticas se basa en estrategias para mejorar la circulación, con el objetivo de restaurar el flujo sanguíneo necesario para la cicatrización. (Tabuenca Nuria, 2024). Cabe recalcar que el aspecto inflamatorio que se encuentra inmerso en la diabetes también repercute en la circulación

sanguínea de modo que, al reducir la inflamación, se promueve la revascularización. En este contexto, medicamentos como los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) han demostrado beneficios al controlar la glucosa y reducir el riesgo cardiovascular; sin embargo, su uso puede ocasionar efectos secundarios leves a graves como: dolor muscular, acidez, taquicardia, e hipoglucemia, lo que limita su tolerancia en pacientes (Navarro et al., 2022).

La angiogénesis, definida como la formación de nuevos capilares y vasos sanguíneos a partir de la proliferación de células endoteliales preexistentes, es un proceso esencial para la cicatrización de heridas; no obstante, si dicha angiogénesis se altera, contribuye tanto a la progresión tumoral como al desarrollo de complicaciones microvasculares de la diabetes. Este equilibrio angiogénico está estrechamente influenciado por el estrés oxidativo, liberación de citocinas proinflamatorias y la disfunción endotelial característica de la diabetes (Martínez José & Herrera, 2006).

Ante estas limitaciones terapéuticas, el desarrollo de terapias complementarias que sean capaces de modular la angiogénesis y estimular la regeneración celular podría aportar beneficios significativos tanto en el tratamiento del cáncer, por la inhibición del crecimiento tumoral y estimulación de la recuperación de células sanas afectadas por las terapias, como en el manejo de la diabetes debido a la inhibición de la angiogénesis dañina que causa afecciones microvasculares y regulación de la angiogénesis focalizada para cicatrización de heridas, para mejorar la calidad de vida de los pacientes y optimizar la efectividad de los tratamientos, además de reducir complicaciones a largo plazo. En este contexto, los animales marinos han emergido como una fuente prometedora de compuestos bioactivos. Especialmente, los polisacáridos de origen marino, como los fucoidanos derivados de algas pardas y los condroitín sulfatos fucosilados aislados de pepinos de mar, han demostrado efectos antidiabéticos, antioxidantes y anti-inflamatorios, además de la regulación de la angiogénesis asociada con la cicatrización de heridas en modelos

preclínicos (Akl et al., 2025; Gong et al., 2021; Gunathilaka et al., 2020; Zhu et al., 2020).

De igual manera, se han identificado péptidos bioactivos de origen marino con capacidad para inhibir enzimas digestivas esenciales para el mejoramiento de la captación de la glucosa, mecanismo base para el tratamiento de la diabetes, pero con menor toxicidad en comparación a los fármacos antidiabéticos convencionales (Lu et al., 2022).

A partir de esto, el estudio de bioactividad proveniente de *Isostichopus fuscus*, especie representativa de Ecuador y la cual no ha sido investigada a profundidad, adquiere especial importancia. Se sugiere que sus compuestos podrían regular mecanismos claves en la angiogénesis, tal como se ha evidenciado en otras especies de pepino de mar, cuyos metabolitos secundarios como saponinas triterpénicas, polisacáridos sulfatados y péptidos bioactivos, han demostrado efectos moduladores de la angiogénesis, promoviendo la cicatrización de heridas y protección endotelial en modelos experimentales (Kumar et al., 2023; Olivera-Castillo et al., 2025; Zhao et al., 2018). El presente trabajo aborda esta problemática mediante la evaluación y caracterización de fracciones bioactivas, con la finalidad de establecer su potencial bioactivo y aportar evidencia científica que sustente investigaciones futuras.

1.2. Descripción del problema

En la actualidad se buscan alternativas naturales para el tratamiento de enfermedades que permitan mitigar los efectos secundarios de la medicina convencional. Diversas especies terrestres han sido investigadas para identificar compuestos con bioactividad anticancerígena, antiinflamatoria, hipoglucemiante, antibacteriana y antifúngica, con potencial para emplearse como tratamientos o terapias complementarias. Por ejemplo, los alcaloides aislados de *Catharanthus roseus* y los dipertenos de *Taxus spp.*, son compuestos anticancerígenos de origen vegetal que han sido estudiados profundamente y de los cuales se han formulado medicamentos como

Vincristina y Paclitaxel, respectivamente (Alqahtani F. et al., 2019; Quijano-Hernández Israel et al., 2015). Por otro lado, extractos de plantas medicinales y metabolitos aislados, alcaloides como la berberina aislada principalmente de *Berberis vulgaris*, han sido evaluados en el control glucémico en modelos inducidos a diabetes (Och et al., 2020; Salleh et al., 2021). Adicionalmente, las actividades antibacterianas y antifúngicas de metabolitos secundarios aislados de plantas como *Azadirachta indica* y *Allium sativum* han sido reportado y se emplean como agentes anti-infecciosos (Islas et al., 2020; Madrigal Redondo et al., 2021).

A pesar de que la investigación en especies terrestres es extensa y que el número de especies registradas en ecosistemas terrestres supera al de las marinas, el ambiente marino representa una oportunidad relevante debido a que constituye el ecosistema menos explorado del planeta. Hasta el año 2023, se han descrito más de 242,000 especies válidas, y se siguen descubriendo un promedio de 2,332 especies por año, lo que sugiere que una proporción significativa de la biodiversidad oceánica permanece aún sin documentar (Bouchet et al., 2023).

Este limitado conocimiento taxonómico del ecosistema marino se refleja en su diversidad química, puesto que desde hace un poco más de 50 años se iniciaron los estudios en productos naturales de origen marino, lo cual ha permitido el aislamiento de más de 14,000 metabolitos provenientes de macro- y microorganismos marinos. Este avance evidencia la amplia diversidad química y sugiere la existencia de numerosos compuestos con potencial aplicación en el ámbito médico y biotecnológico (Pérez Aida, 2014).

El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos reportó que el 4% de las especies marinas examinadas contenían componentes con actividad antitumoral (Mendoza José, 2016). En este contexto, diversos invertebrados marinos han aportado compuestos de relevancia en el campo biomédico, como es el caso de la citarabina, aislada de la esponja *Cryptotheca crypta* (filo Porifera) con actividad antitumoral, y sirvió de base para el desarrollo de

agentes terapéuticos en oncología (D. J. H. Lee et al., 2025; Suryaprabha et al., 2021).

Por otro lado, el filo Equinodermata, constituido por aproximadamente 7,000 especies (Arnone et al., 2015; Pawson David L., 2007), ha sido reconocido como una fuente relevante de metabolitos secundarios con potencial biomédico. Entre los metabolitos secundarios más ampliamente reportados en el filo Equinodermata se encuentran las saponinas triterpénicas, principalmente abundantes en Pepinos de mar, así como ceramidas glicosiladas y otros glicolípidos, descritos más a menudo en estrellas de mar y otros equinodermos (Bordbar et al., 2011; Kalinin, 2021). No obstante, la estructura de estos metabolitos y su actividad biológica varían según la clase taxonómica (Gómez-Archila et al., 2014).

Dentro de los equinodermos, los pepinos de mar han adquirido un gran interés comercial y son populares en Asia y el Medio Oriente por los nutrientes y propiedades curativas que se le atribuyen como antioxidantes, regenerativas, antiinflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, además de su potencial en el tratamiento de enfermedades como la diabetes y osteoporosis. La actividad antioxidante se ha relacionado con efectos antiangiogénicos y antiproliferativos, y a su vez por mejorar la regulación de la insulina, debido a que estos compuestos reducen el estrés oxidativo causado por los radicales libres (Misgiati et al., 2024).

A pesar del crecimiento de los hallazgos de compuestos bioactivos del ecosistema marino, la mayoría de las investigaciones abarcan a especies pertenecientes al continente asiático, lo que ha permitido un avance significativo en el conocimiento químico y potencial bioactivo de dichos organismos. Sin embargo, esto a su vez ha dejado un vacío importante en el estudio y caracterización de especies representativas del continente americano, como las que pertenecen al género *Isostichopus*, las cuales tienen una gran relevancia ecológica, comercial y económica (Gianasi et al., 2021).

Una de las especies más comercializadas es *Isostichopus fuscus* la cual está regulada en el Ecuador (Resolución 203, Ministerio de Ambiente de Ecuador), y es apreciada por su alto valor gastronómico, medicinal y nutricional. Su capacidad regenerativa la convierte en una fuente prometedora de compuestos bioactivos para el desarrollo de medicamentos cicatrizantes y regenerativos (Bordbar et al., 2011). Aunque existen investigaciones sobre distintas especies de pepino de mar pertenecientes a la clase Holothuroidea, en las que se han evaluado metabolitos secundarios con potencial bioactivo, la información específica sobre la bioactividad de los metabolitos provenientes de *Isostichopus fuscus* continúa siendo escasa, lo que evidencia la necesidad de profundizar su estudio.

En este contexto, investigaciones realizadas en especies relacionadas han demostrado la presencia de metabolitos con actividades biológicas relevantes. Estudios en *Isostichopus badionotus*, han identificado compuestos con bioactividades antiangiogénicas (Pérez-Vega et al., 2013), anti-inflamatorias (Olivera-Castillo et al., 2020), (Olivera-Castillo et al., 2014), antivirales (Marques et al., 2016), antioxidantes (Pastrana et al., 2016), antitrombóticas (S. Chen et al., 2012) y antibacteriales (N.S Mariana et al., 2009). De manera similar, en otras especies de pepinos de mar se ha reportado que metabolitos como saponinas triterpénicas y polisacáridos sulfatados pueden modular procesos angiogénicos. Compuestos como frondoside A, aislado de *Cucumaria frondosa* (Adrian & Collin, 2018), holothurin A, B y B3 provenientes de *Holothuria scabra* (Wargasetia et al., 2020), así como extractos y fracciones ricas en saponinas de *Apostichopus japonicus* (Dai et al., 2020), han demostrado efectos antiangiogénicos y reguladores de la angiogénesis en modelos experimentales, lo que resalta el potencial terapéutico de este grupo de equinodermos.

A pesar de estos antecedentes, no se ha reportado estudios orientados a evaluar la actividad moduladora de la angiogénesis en fracciones obtenidas de *Isostichopus fuscus*, específicamente en especímenes provenientes de la

costa ecuatoriana. Este vacío de conocimiento justifica la realización del presente estudio, con la finalidad de caracterizar sus compuestos bioactivos y evaluar su potencial biológico. Este enfoque permitirá ampliar el conocimiento desde un punto de vista químico y se contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas menos agresivas para el tratamiento de enfermedades crónicas, con un impacto positivo en la calidad de vida de los pacientes.

¿Presentan las fracciones de *Isostichopus fuscus* actividad moduladora de la angiogénesis asociada a su composición química, con potenciales aplicaciones terapéuticas?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar fracciones de *Isostichopus fuscus* obtenidas mediante técnicas de extracción, como maceración y ultrasonido, para la determinación de su actividad moduladora de la angiogénesis con potencial aplicación terapéutica.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Obtener fracciones de las muestras de *Isostichopus fuscus* mediante técnicas de extracción y fraccionamiento basado en polaridad.
- Caracterizar las fracciones obtenidas mediante pruebas fitoquímicas.
- Determinar la bioactividad de las fracciones caracterizadas mediante ensayos en líneas celulares cancerígenas (HeLa, PC-3, RKO y T47-D), modelos de angiogénesis.

1.4. Hipótesis

La caracterización y evaluación biológica de fracciones de *Isostichopus fuscus* permite la identificación de su potencial modulador de la angiogénesis, como posibles candidatos en el desarrollo de estrategias clínicas para enfermedades de alto impacto social.

1.5. Alcance

- El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), espacios que cuentan con las condiciones necesarias para el procesamiento de organismos marinos durante un periodo de 8 meses. Para la obtención de las muestras se trabajó con tres diseños experimentales que incluían como variables el tipo de muestra (base húmeda o liofilizada), tratamiento de extracción (maceración y ultrasonido) y tipo de fraccionamiento en proporciones de disolvente de polaridad decreciente que corresponden a: Metanol, Metanol:Cloroformo 7:3, Metanol:Cloroformo 5:5 y Metanol:Cloroformo 7:3. La bioactividad de las fracciones se evaluó mediante ensayos biológicos *in vitro* en líneas celulares cancerígenas: cérvico uterino (HeLa), próstata (PC-3), colon (RKO) y mama (T47-D) con la finalidad de evaluar el porcentaje de viabilidad celular. Además, se realizó la evaluación de la angiogénesis *in vivo* empleando el modelo de membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de ave y se aplicó el modelo vegetal *Allium cepa*, donde se evaluó longitud de las raicillas y la mitosis. Se establecieron los criterios de interpretación para cada una de las pruebas analíticas y biológicas realizadas y se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos (ANOVA) y post hoc Tukey con el objetivo de determinar actividad biológica significativa. Posteriormente se realizó la identificación de compuestos presentes mediante UHPLC.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La angiogénesis: bases biológicas y relevancia clínica

2.1.1. Concepto y etapas de la angiogénesis

El sistema vascular es una red multifunción que se encarga de la irrigación de los órganos del cuerpo con los objetivos de oxigenación tisular, suministro de nutrientes y eliminación de desechos metabólicos (Kupinski, 2022). La vasculatura se genera tanto por la vasculogénesis como la angiogénesis. La vasculogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células precursoras o endoteliales (Payne et al., 2024), mientras que la angiogénesis genera nuevos vasos sanguíneos desde vasos sanguíneos preexistentes (Koning et al., 2022). Un proceso angiogénico alterado puede afectar en la cicatrización de heridas y contribuir al desarrollo, progresión y complicación de diversas patologías, como las enfermedades cardiovasculares, retinopatía diabética y el cáncer. En el contexto tumoral, la angiogénesis desempeña un papel central en el crecimiento, invasión y proliferación metastásica (Zarychta & Ruszkowska-Ciastek, 2022).

La brotación angiogénica es un proceso muy importante tanto para el desarrollo de órganos y tejidos como de procesos fisiopatológicos como la reparación tisular, regeneración, fibrosis y cáncer (Potente et al., 2011). El primer paso de la brotación es la degradación de la membrana basal vascular que envuelve a las células endoteliales, lo cual genera una desestabilización del revestimiento endotelial. Durante el desarrollo de esta etapa inicial, diversos factores proangiogénicos inician su participación, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual es uno de los inductores más importantes de la activación endotelial. En condiciones patológicas, especiales en condiciones de hipoxia, el aumento de VEGF contribuye a la generación de vasculatura anómala, lo cual ocasiona daño vascular. El desarrollo de enfermedades catastróficas como el cáncer y

diabetes tienen como eje principal el daño vascular (A. Ahmad & Nawaz, 2022).

Tras este proceso de desestabilización y la activación de las células endoteliales, el brote inicia a través de la invasión de la matriz extracelular por “tip cells”. Este tipo de células poseen bajas tasas de proliferación y un alto porcentaje de migración, estas características permiten la inhibición del fenotipo “tip cell” en células adyacentes, de modo que se pueda controlar la topología de la red (Blanco & Gerhardt, 2013; Gerhardt H, 2003; Mack & Iruela-Arispe, 2018; Yetkin-Arik et al., 2019).

Durante esta fase, la migración de las “tip cells”, además de depender de las señales químicas, también depende de los mecanismos mecánicos, en los cuales la reorganización del citoesqueleto de actina, la contractilidad que depende de la miosina II y la formación de protrusiones de membrana desempeñan un rol fundamental (Huveneers & Phng, 2024).

El VEGF, además de promover la activación de las células endoteliales, también establece gradientes espaciales que permiten la migración de las “tip cells” y a su vez, regulan el comportamiento de las células circundantes mediante la vía de señalización Notch/Ligando Delta tipo 4 (Notch/DII4) lo que contribuye a la ramificación (Karamysheva, 2008). Los gradientes de VEGF actúan acorde a las señales mecánicas del entorno, como la rigidez y plasticidad de la matriz extracelular. Dichos gradientes se encargan de modular la adhesión célula-matriz, así como la migración de las células endoteliales durante la angiogénesis (Zakirov et al., 2021).

Las “tip cells” que están inmersas en la matriz extracelular, pueden entrar en contacto físico con células parenquimatosas. La penetración del parénquima genera una estructura similar a un cordón que se desarrolla hasta convertirse en un tubo cerrado en su extremo (Iyer et al., 2012). Durante la invasión, la formación de filopodios y lamelipodios altamente dinámicos permite que las “tip cells” exploren el entorno, proceso que se genera tanto por la

polimerización de actina como por el aumento de la presión hidrostática intracelular (Kondrychyn et al., 2025).

Las “tip cells” inducen un fenotipo de “stalk cell” en las células endoteliales adyacentes para seguir desarrollando el brote (Gerhardt et al., 2003). Ambos tipos de células exhiben fenotipos del tipo migratorio y proliferativo, respectivamente, lo cual es requerido para el desarrollo normal del brote hasta su formación. Las “stalk cells” responden a las señales de VEGF y a las fuerzas mecánicas transmitidas por las uniones celulares, lo cual es esencial para la elongación del brote y la reorganización coordinada del endotelio (Ghaffari et al., 2015) .

La maduración endotelial ocurre cuando los nuevos vasos formados comienzan a estabilizarse. La estabilización depende del depósito de una nueva membrana basal y del reclutamiento de células murales que se adhieren al brote en formación y aportan soporte mecánico (Barriga & Mayor, 2019) (Dudley & Griffioen, 2023). Finalmente, la presión luminal y el flujo sanguíneo inducen fuerzas mecánicas sobre las uniones endoteliales, lo que refuerza la barrera vascular y contribuyen tanto a la estabilidad estructural como a la funcionalidad del vaso recién formado (Gebala et al., 2016; Kotini et al., 2022).

2.1.2. Regulación molecular de la angiogénesis

Las células endoteliales pueden activar la angiogénesis debido a su capacidad innata de poder dividirse rápidamente ante estímulos fisiológicos. Se conoce que las moléculas que interfieren como reguladores proangiogénicos corresponden a: los factores de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1 y FGF-2), factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β), factor de crecimiento de hepatocitos HGF- β , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la angiogenina, interleucina-8 (IL-8) y las angiopoyetinas. En contraste, los principales inhibidores de la angiogénesis

son la angioastatina, la endostatina y la trombospodina (Z.-L. Liu et al., 2023; Vimalraj, 2022; Y.-R. Yun et al., 2010).

Sin embargo, solo algunos de estos factores influyen directamente en células endoteliales en cultivo. Actualmente, se ha llegado a la conclusión que la regulación central angiogénica depende principalmente de la cascada de señalización mediada por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Esta premisa se basa en las propiedades biológicas de este factor de crecimiento (A. Ahmad & Nawaz, 2022).

El VEGF promueve la degradación de la matriz extracelular (activación), proliferación, migración y formación tubular en las células endoteliales. Esta molécula es un potencial precursor de la angiogénesis en modelos experimentales *in vivo* (J. S. Lee et al., 2006), (Z. Chen & Tzima, 2009) y previene la apoptosis en células endoteliales (Hanahan & Folkman, 1996). VEGF actúa principalmente mediante VEGFR-1 y VEGFR-2, que regulan la permeabilidad vascular y participan en procesos de cicatrización de heridas y regeneración del endometrio (Ferrara et al., 1998; Inoue et al., 1998; Nissen et al., 1998).

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) fue uno de los primeros factores angiogénicos descubiertos y promueve la proliferación y producción de uroquinasa, una serina proteasa que convierte el plasminógeno en plasmina, y que permite degradar la matriz extracelular, así como la invasión y migración de las células endoteliales durante las fases iniciales de la angiogénesis (M. Rusnati & M. Presta, 2007). Después de establecerse la red vascular inicial, otros factores adquieren un papel predominante para la regulación y estabilidad de los vasos sanguíneos. En este contexto, las angiopoyetinas se encargan de la regulación de las fases posteriores de la angiogénesis, actuando sobre receptores endoteliales proangiogénicos y antiangiogénicos con la finalidad de activar y regular la señalización para promover la estabilización vascular (Maduración) (Leong & Kim, 2020).

Con respecto a los factores que inhiben la angiogénesis, estos impiden la adquisición del fenotipo angiogénico. La angiostatina domina el plasminógeno, mientras que la endostatina se une directamente a uno de los receptores de VEGF de modo que se bloquea la fosforilación de la tirosina en el receptor endotelial, lo que inhibe la proliferación celular y proteínas antiapoptóticas. Finalmente, la trombospodina reduce la respuesta del VEGF, promueve la apoptosis de endotelio, acelera la angiogénesis y el crecimiento tumoral en casos cancerígenos (Ionescu et al., 2022; Liekens et al., 2001).

2.1.3. Angiogénesis patológica en enfermedades crónicas

La angiogénesis descontrolada es una característica patológica del crecimiento tumoral, metástasis, retinopatías, inflamación crónica. VEGF tiene un papel principal por su participación en la angiogénesis puesto que participa en la vasodilatadora de la microvasculatura muscular, y la alteración de dicha respuesta genera la resistencia a la insulina y enfermedades crónicas (Wagenmakers et al., 2016).

El VEGF es un factor clave en la aparición y desarrollo de distintas enfermedades crónicas y degenerativas. A pesar de que el aumento de su presencia favorece a procesos regenerativos, también puede ocasionar efectos perjudiciales cuando este se incrementa sin control.

El exceso de VEGF promueve el crecimiento del tumor en pacientes con cáncer, mientras que en diabetes se suscita la retinopatía diabética. Adicionalmente, la elevada presencia de VEGF está asociada a una mayor actividad de enfermedades autoinmunes y cuadros graves en el ámbito cardiovascular como insuficiencia cardíaca (Avila-Gonzalez N. et al., 2024)

Se evidencia como la angiogénesis no regulada puede ocasionar consecuencias severas en ambas enfermedades crónicas. Por ello, la investigación de reguladores angiogénicos es esencial para prevenir el desarrollo de dichas enfermedades hasta sus etapas más críticas, como la

metástasis en el cáncer y la retinopatía o el pie diabético en pacientes diabéticos.

2.2. Enfermedades relacionadas con la disfunción angiogénica

2.2.1. Angiogénesis en el cáncer

La angiogénesis influye en el crecimiento tumoral, según se ha evidenciado en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Folkman et al., 1989). En el ámbito del cáncer, la primera etapa que se evidencia es la fase prevascular, la cual puede durar años en desarrollarse. La siguiente etapa corresponde a la fase vascular que inició con la angiogénesis y que conlleva un crecimiento tumoral rápido porque recibe oxígeno y los nutrientes necesarios, pero aún no incurre en la metástasis (Z. Huang, 2004). Sin embargo, los nuevos vasos sanguíneos que se originan con la angiogénesis permiten que las células tumorales migren hacia el torrente sanguíneo.

A mayor número de células tumorales en la sangre, mayor es la probabilidad que logren colonizar un órgano diana (Vartanian & Weidner, 1994). Es importante la capacidad angiogénica de las células tumorales para desencadenar la metástasis. La angiogénesis estimula el crecimiento del depósito metastásico en el órgano, así como el proceso de dispersión (Weidner et al., 1991).

2.2.2. Angiogénesis y complicaciones vasculares en diabetes

En diabetes, un proceso proangiogénico descontrolado puede ocasionar la formación excesiva de vasos sanguíneos inmaduros en la retina, lo que desemboca en retinopatía diabética. Por otro lado, la antiangiogénesis contribuye a una cicatrización ineficiente de heridas debido a la formación deficiente de vasos sanguíneos (Cheng & Ma, 2015).

La cicatrización es esencial para restaurar el tejido después de una lesión y se conforma de 4 fases: a) La hemostasia, que es la contracción de los vasos sanguíneos y la formación de un tapón para detener el sangrado e impedir el ingreso de patógenos; b) La inflamación se encarga de la eliminación de

agentes patógenos y de la preparación del tejido para su reparación; c) La proliferación es la formación del tejido nuevo y la revascularización por acción de la angiogénesis; d) remodelación en el cual las células que participaron sufren apoptosis y las metaloproteinasas estabilizan el nuevo tejido (Rodrigues et al., 2019).

En diabetes, la cicatrización se ve afectada porque la hiperglicemia crónica genera complicaciones a nivel macro y micro en la vascularización, lo cual reduce la angiogénesis y el flujo sanguíneo hacia la lesión y a su vez los nutrientes y procesos de reparación implícitos (Stable García, 2023).

2.2.3. Estrés oxidativo y regulación de la angiogénesis

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio de la capacidad antioxidante interna y está relacionada con la causa y pronóstico de muchas enfermedades vasculares. La angiogénesis está correlacionada con el estrés oxidativo, por lo que su regulación puede favorecer tanto una angiogénesis adecuada como la regeneración tisular (Sinha & Dabla, 2015).

El estrés oxidativo conduce a la producción y acumulación de especies reactivas al oxígeno (ROS). Una elevada concentración de ROS es dañina para los tejidos, induce disfunción endotelial y favorece el desarrollo de angiogénesis patológica, asociada a procesos inflamatorios crónicos (Komatsu et al., 2008; Martinez-Outschoorn et al., 2010). En contraste, una exposición baja a ROS activa rutas de señalización intracelular como las medidas por VEGF, el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas vías promueven una angiogénesis fisiológica y esencial para la regeneración tisular (Di Meo et al., 2016; J. Yun et al., 2009)

Esto indica que el equilibrio antioxidante es un regulador crítico en la angiogénesis fisiológica y patológica, y que su alteración o descontrol puede desarrollar enfermedades crónicas (Y. J. Huang & Nan, 2019).

2.3. Fuentes naturales de compuestos bioactivos con potencial terapéutico

2.3.1. Importancia de los productos naturales en la biomedicina

Los productos naturales, entendidos como metabolitos producidos por organismos vivos, son una de las principales fuentes de compuestos bioactivos con potencial terapéutico y medicinal. Estos metabolitos son producidos por plantas terrestres, microorganismos (bacterias y hongos) y organismos marinos, los cuales actúan como fuentes primarias de productos naturales y empleados en el área farmacéutica (Newman & Cragg, 2020). Los metabolitos secundarios cumplen funciones ecológicas primordiales, como la defensa química, competencia entre especies y su interacción con el entorno, lo que explica su diversidad estructural y funcional (Pichersky & Lewinsohn, 2011; Theis & Lerdau, 2003).

Entre los metabolitos secundarios más estudiados se encuentran los alcaloides y terpenoides. Dentro de los alcaloides, se encuentran la morfina (Figura 2.1), aislada de *Papaver somniferum* y que se emplea clínicamente como un analgésico opioide (Krishnamurti & Rao, 2016); la quinina (Figura 2.2), aislada de la corteza de *Chinchona spp.* y utilizada como un antipalúdico (Jovanovic Aleksandar & Krajnovic Dusanka, 2022); y la vinblastina (Figura 2.3) aislada de *Catharanthus roseus*, usada como un agente antineoplásico en quimioterapia (Nguyen et al., 2023). Mientras que, en los terpenoides, se incluyen compuestos como el paclitaxel (Figura 4), un diterpeno aislado originalmente de *Taxus brevifolia* y empleado principalmente en el tratamiento del cáncer de mama y ovario (Alqahtani F. et al., 2019); la artemisinina (Figura 5), un sesquiterpeno aislado de *Artemisia annua* con acción antipalúdica en terapias combinadas (Yin et al., 2025); y el mentol (Figura 6), un monoterpeno obtenido de *Mentha spp.* y utilizado históricamente por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias de forma tópica (Melo et al., 2024).

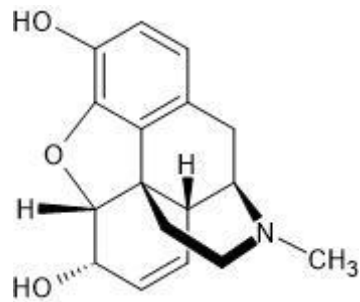


Figura 2. 1 Estructura química de la morfina aislada de *Papaver somniferum*.

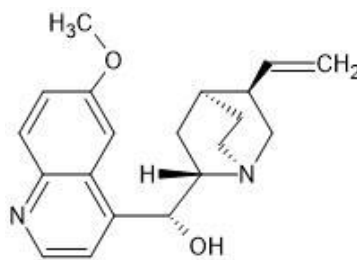


Figura 2. 2 Estructura química de la quinina aislada de *Chinchona spp.*

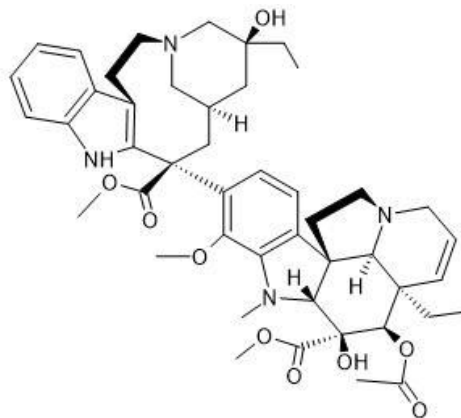


Figura 2. 3 Estructura química de la vinblastina aislada de *Catharanthus roseus*.

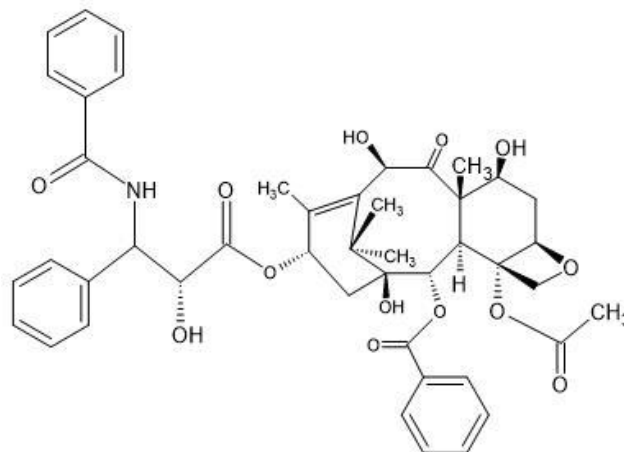


Figura 2. 4 Estructura química de paclitaxel aislado de *Taxus brevifolia*.

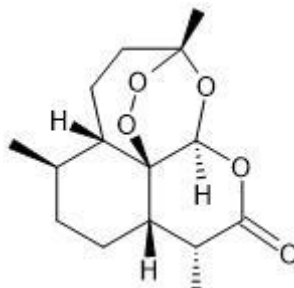


Figura 2. 5 Estructura química de artemisina aislado de *Artemisia annua*.

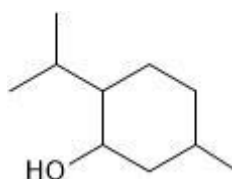


Figura 2. 6 Estructura química de mentol obtenido de *Mentha spp.*

En los últimos años, los ecosistemas marinos han adquirido especial interés como fuentes de nuevos productos naturales, debido a su elevada biodiversidad y a las condiciones ambientales variadas. Sin embargo, la explotación de especies y la sostenibilidad son desafío que representa la obtención de productos naturales. Debido a esto ha incrementado el interés por el desarrollo de estrategias alternativas de producción, como el cultivo controlado, síntesis química y semisintética, con el objetivo de garantizar un suministro continuo de los metabolitos que permita continuar con la investigación y desarrollo farmacéutico (Atanasov et al., 2015; Vaishnav & Demain, 2011).

2.3.2. El ecosistema marino como fuente de compuestos bioactivos

La biodiversidad marina representa una fracción fundamental de la biodiversidad global y una fuente en auge de compuestos bioactivos. A pesar de las 242,000 especies reportadas hasta el 2023 por WoRMS, hay proyecciones actuales que indican que el número total de especies marinas, incluyendo las que no han sido registradas hasta el momento, podrían situarse entre 0.3 (Costello et al., 2012, 2014) y 2.2 millones (Bouchet et al., 2023; Mora et al., 2011). Estas cifras entre la biodiversidad conocida y la

estimada posiciona al ambiente marino como reservorio de futuros metabolitos secundarios por descubrir con posibles aplicaciones terapéuticas (Y. Li et al., 2025).

Diversos grupos de organismos marinos han sido ampliamente investigados por su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos. En bacterias marinas como *Salinispora tropica* se aisló la salinosporamida A (Figura 2.7), un potente inhibidor de la proteasoma 20S y que ha estado en ensayos clínicos de fase 1 para el tratamiento del cáncer (Reed et al., 2007).

En microalgas, la diatomea *Phaeodactylum tricornutu* destaca como fuente de fucoxantina (Figura 2.8), un pigmento con efecto antioxidante y antiinflamatorio reportado (Khaw et al., 2022), mientras que, en las macroalgas, *Fucus vesiculosus* son una fuente principal de fucoidano (Figura 2.9), un polisacárido sulfatado con amplia investigación, de la cual se ha reportado actividad anticancerígena (Bhuyan et al., 2023).

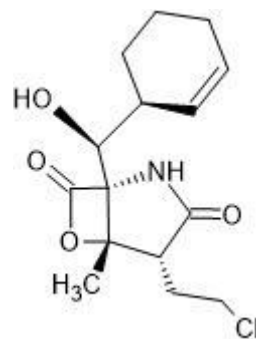


Figura 2. 7 Estructura química de la la salinosporamida A aislada de *Salinispora tropica*.

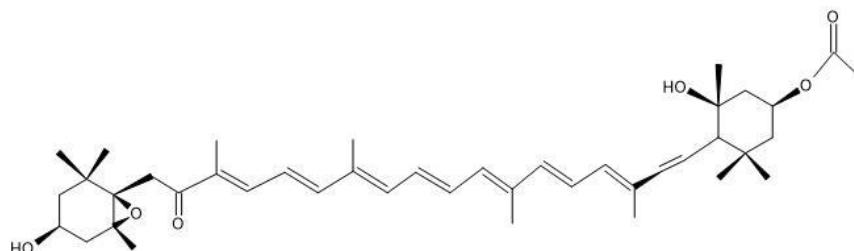


Figura 2. 8 Estructura química de la fucoxantina obtenida de *Phaeodactylum tricornutu*.

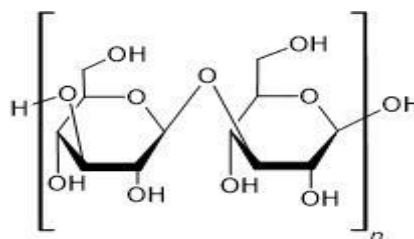


Figura 2. 9 Estructura química de un fucoidano aislado de *Fucus vesiculosus*.

Entre los invertebrados marinos, los octocorales blandos como *Sacophyton digitatum* son fuentes importantes de diterpenos cembranoides, los cuales se han evidenciado actividad antiinflamatoria y citotóxica, como es el caso del furanocembranoide (Figura 2.10) con actividad anticancerígena (Nurrachma et al., 2021). Finalmente, en moluscos, la libre de mar *Dolabella auricularia* ha sido reportado como fuente de dolastatina 10 (Figura 2.11), un péptido con alta actividad anticancerígena y base de desarrollos farmacológicos hasta la presente fecha (Gao et al., 2021).

Dentro de este amplio contexto de la biodiversidad y potencial marino, los equinodermos se distinguen como un grupo de suma importancia, debido a la especificidad funcional de sus metabolitos secundarios (Gomes et al., 2016), que se abordará en la siguiente sección.

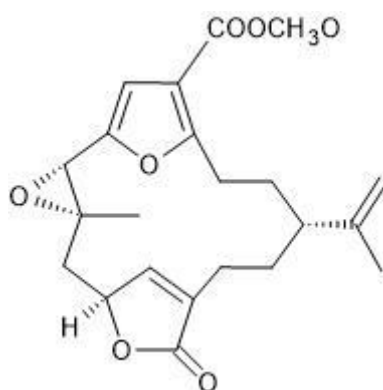


Figura 2. 10 Estructura química de un furanocembranoide aislado de *Sacophyton digitatum*.

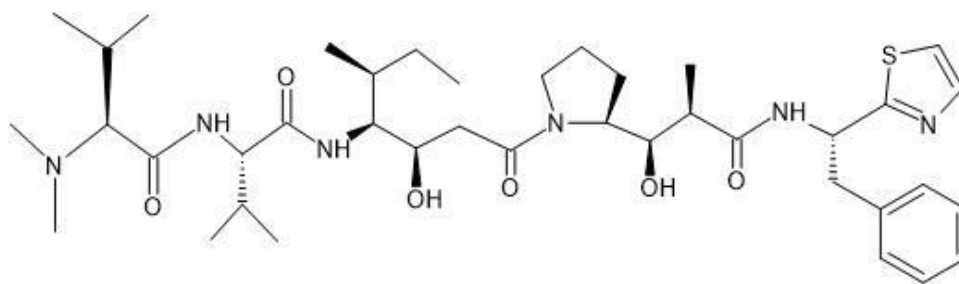


Figura 2. 11 Estructura química de dolastatina 10 aislada de *Dolabella auricularia*.

2.3.3. Los equinodermos como recurso biomédico

Dentro del amplio rango de especies marinas productos de metabolitos bioactivos, los equinodermos se han consolidado como un recurso de alto valor. En los últimos años, más de 2000 nuevos compuestos se han aislado de equinodermos (Carroll et al., 2022). Este filo abarca más de 7500 especies distribuidas alrededor de los océanos y se dividen en cinco diferentes clases: Asteroidea (estrellas de mar), Holothuroidea (pepinos de mar), Ophiuroidea (estrellas frágiles), Echinoidea (erizos de mar) y Crinoidea (Lirios de mar) (Schierwater & DeSalle, 2021).

Tanto los pepinos de mar como las estrellas marinas se emplean en la medicina tradicional por ser fuentes de compuestos bioactivos (Zhang et al., 2006) (Yang et al., 2011). Los pepinos de mar son el grupo de equinodermos con mayor relevancia y los más estudiados desde el punto de vista farmacológico por su amplio espectro para el tratamiento de enfermedades como asma, artritis, hipertensión, entre otros en la medicina tradicional (Bordbar et al., 2011).

La composición química de las especies dentro de este filo son la principal razón de sus propiedades. Se ha atribuido la bioactividad a moléculas llamadas metabolitos secundarios, los cuales se han identificado en los extractos de algunas especies de este filo. Por ejemplo, en los pepinos de mar predominan los glicósidos triterpénicos sulfatados, como la holoturina A (Fig. 2.12) aislado de *Holothuria Scabra* con potencial anticancerígeno al inducir a la apoptosis a las células tumorales (Wargasetia et al., 2020). En los erizos del mar, los metabolitos más característicos son los pigmentos

naftoquinónicos, como es espinocromo A (Figura 2.13), aislado principalmente de *Paracentrotus lividus*, con bioactividad antibacterial, antiinflamatoria y citoprotectora (Brasseur et al., 2017). Las estrellas de mar y ofiuras poseen principalmente asterosaponinas (Figura 2.14), aisladas de especies como *Asterias amurensis*, *Asterina pectinifera* y *Ophiura sarsii*, con propiedades antiinflamatorias y citotóxicas (Stonik et al., 2020). Adicionalmente, varios equinodermos contienen polisacáridos sulfatados, como el fucoidano (Figura 2.15) y el condroitin sulfato fucosilado (Figura 2.16) aislados de pepinos de mar como *Isostichopus badionotus*, *Holothuria scabra*, *Holothuria hilla* y *Paracaudina chilensis*, los cuales exhiben actividad anticoagulante, antitrombótica, antiinflamatorios, antioxidantes, antihiperlipidémicos y anticancerígenos (Chahed et al., 2020; Olivera-Castillo et al., 2014; Pérez Aida, 2014; Shi et al., 2016; L. Zhao et al., 2018)

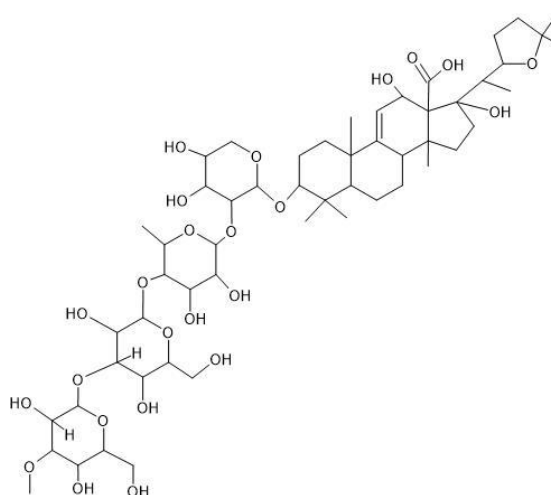


Figura 2. 12 Estructura química de una holoturina A aislada de *Holothuria Scabra*.

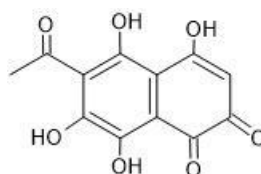


Figura 2. 13 Estructura química del espinocromo A aislado de *Paracentrotus lividus*.

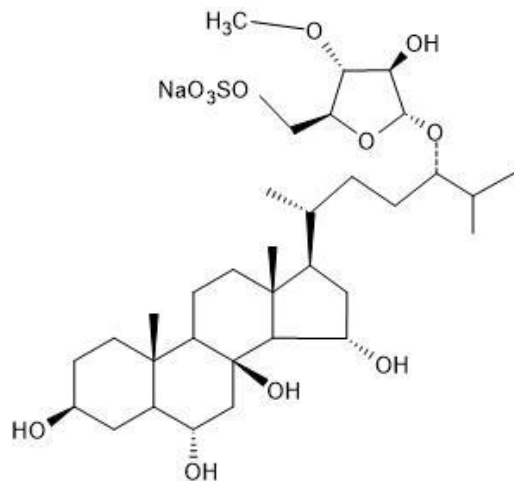


Figura 2. 14 Estructura química de asterosaponinas aisladas de *Asterias amurensis*.

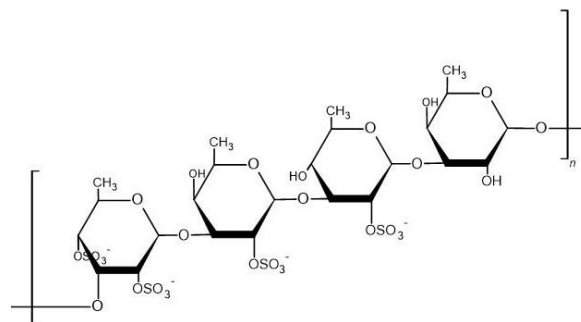


Figura 2. 15 Estructura química de un fucoidano aislado de *Isostichopus badionotus*.

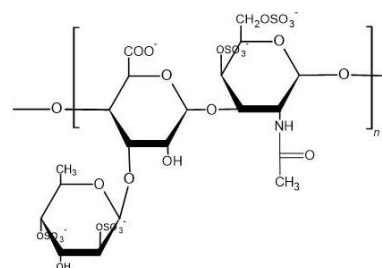


Figura 2. 16 Estructura química de un condroitín sulfato fucosilado aislado de *Isostichopus badionotus*.

Los metabolitos secundarios varían entre especies y dependen tanto de condiciones de hábitat, así como la etapa de desarrollo. Actualmente, se sigue investigando y aislando metabolitos secundarios a partir de especies marinas para la evaluación de sus propiedades biológicas ante un rango amplio de enfermedades. El mecanismo de acción de dichos metabolitos es

de gran interés para el desarrollo de nuevos tratamientos (Popov et al., 2022).

2.4. El pepino de mar *Isostichopus fuscus*

2.4.1. Características biológicas y distribución

Los pepinos de mar pueden ser clasificados taxonómicamente en base a sus características como la forma del cuerpo, morfología de los pies y tentáculos, siendo estos últimos la principal característica para su identificación. En los niveles taxonómicos más altos, el orden se basa en la forma del cuerpo, características de los tentáculos y en la posición tanto de la boca como del ano, mientras que en los niveles inferiores se basa en la forma y el arreglo espicular (Pawson, 1970).

El género *Isostichopus* se caracteriza por cuerpos delgados que pueden llegar a alcanzar 25cm en la etapa adulta, además de la presencia de hasta 20 papilas romas en los laterales y en la región dorsal (Deichmann Elisabeth, 1954). Este género comprende a las especies: *Isostichopus badionotus*, *Isostichopus sp. aff. badionotus* e *Isostichopus fuscus* (Fig 5).

Isostichopus fuscus es un organismo alargado epibentónico que puede llegar a medir desde 19 a 25cm y pesar desde 100 hasta 410g en etapas adultas, por lo cual se le ha atribuido el nombre de “Pepino de mar gigante” en el sector pesquero.

Esta especie se encuentra distribuida a lo largo del océano pacífico (Maluf, 1988) y suele vivir en zonas marinas someras (Herrero-Pérezrul et al., 1999), hasta aproximadamente 40m de profundidad. Su preferencia por arrecifes de coral y hábitats rocosos la convierte en la especie de pepino de mar más común en aguas costeras (Herrero-Pérezrul et al., 1999) a lo largo de las costas de Baja California, México y Ecuador, incluyendo islas como Galápagos, Socorro, Cocos y Revillagigedo (Matthew James, 2013).

Esta especie es la única con valor comercial en el Ecuador, sin embargo, la pesca ilegal disminuyó drásticamente la cantidad de especímenes en las

Islas Galápagos, por lo que se estableció la Resolución No. 0000203 del Ministerio del Ambiente que establece las normas para la pesca legal y controlada de *Isostichopus fuscus* en la Reserva Marina de Galápagos. En esta Resolución se establece cuotas de capturas, tallas permitidas (al menos 20cm) y los requisitos para los pescadores.



Figura 2. 17 *Isostichopus fuscus* en tanques de cultivo en CENAIM.

2.4.2. Composición química y metabolitos reportados

Los pepinos de mar han demostrado tener compuestos bioactivos como saponinas, triterpenos, condroitin sulfato fucosilados, fucoidanos, entre otros. Sin embargo, un mayor porcentaje de estos compuestos reportados provienen de especies de continentes orientales, mientras que especies como *Isostichopus fuscus* que se encuentra distribuida a lo largo de las costas del continente americano no se dispone de mucha información.

Isostichopus badionotus es la especie más estudiada de su género. Se ha evidenciado metabolitos bioactivos como fucoidanos con potencial antihiperlipidémico capaces de regular enzimas clave del metabolismo lipídico (Hu et al., 2022). Además, han demostrado tener efecto antioxidante por la capacidad de sus grupos sulfatados para secuestrar radicales libres (Guo et al., 2014), y actividad antiinflamatoria que se relaciona con la inhibición de vías e inhibición de citocinas proinflamatorias (Wang et al., 2016).

Así mismo, el condroitin sulfato fucosilado es el metabolito más aislado en esta especie que posee actividad antiviral, asociado principalmente a la

capacidad de unirse a proteínas virales, bloqueando la entrada en células hospedadoras. Esta actividad ha sido reportada *in vitro* en rangos de 1 – 100 µg/mL, dependiendo del virus y características estructurales del polisacárido (Vabret et al., 2020) (Zoepfl et al., 2021) (Niu et al., 2024). También ha demostrado potencial antiparasitario, específicamente contra *Plasmodium falciparum*, donde concentraciones en el rango de 10 – 50 µg/mL inhiben procesos de adhesión y desarrollo del parásito (Marques et al., 2016), es anticoagulante bajo y más seguro que la heparina no fraccionada puesto que no activa el factor XII que puede generar efectos adversos. Esta actividad se ha observado en ensayos de coagulación *in vitro* a concentraciones de 5 – 50 µg/mL (Chen et al., 2011) (Li et al., 2016). Finalmente, se le atribuye efecto anticancerígeno, demostrado en líneas celulares de carcinoma colorrectal (HT-29) y adenocarcinoma pulmonar (A549), donde concentraciones de 25–200 µg/mL inducen de apoptosis y regulación de la angiogénesis (He et al., 2014)

Hasta la actualidad, los estudios sobre *Isostichopus fuscus* se han centrado en la evaluación de extractos crudos y fracciones proteicas en relación con su actividad proteolítica y potencial antioxidante (Hernández-Sámano & Hernández-Ledesma, 2015). La actividad proteolítica ha sido evaluada mediante ensayos enzimáticos *in vitro*, donde extractos de la pared corporal de *I. fuscus* mostraron actividad significativa en concentraciones de 0.1-1.0 mg/mL, evidenciando la capacidad de hidrolizar proteínas complejas y transformarlas en péptidos de menos peso molecular, lo cual es importante para procesos de digestión y regeneración tisular (Hernández A. et al., 2015).

Por otro lado, el potencial antioxidante de *I. fuscus* está vinculado a la capacidad de compuestos para neutralizar ROS, lo que contribuye a la reacción del daño oxidativo. En ensayos como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y poder antioxidante reductor férrico (FRAP), se ha reportado que una concentración de 0.5-5 mg/mL de extractos acuosos y proteicos neutralizan ROS de forma dosis dependiente. Estos resultados sugieren la disminución del daño

oxidativo y un papel protector frente al estrés oxidativo (Hernández-Sámano & Hernández-Ledesma, 2015).

Como se puede evidenciar, es necesario profundizar las investigaciones sobre *I. fuscus* con la finalidad de aislar metabolitos, evaluar bioactividad en diferentes campos y sintetizar productos que aporten al campo medicinal como se ha realizado antes en otras especies marinas.

2.5. Compuestos marinos y su papel en la modulación de la angiogénesis

2.5.1. Mecanismos de acción de los compuestos antiangiogénicos

En los últimos años, se han estudiado y desarrollado inhibidores de angiogénesis con la finalidad de reducir el desarrollo tumoral y prevenir la metástasis. Sin embargo, diversos estudios muestran que la resistencia terapéutica y la toxicidad interfieren en la eficacia de inhibidores angiogénicos (Bergers & Hanahan, 2008; Verheul & Pinedo, 2007).

En base a esto, los compuestos marinos han demostrado un gran potencial para la inhibición de la angiogénesis, al interferir con vías clave de señalización asociadas a VEGF y con un potencial de citotoxicidad bajo.

Un estudio sobre esponjas marinas provenientes del Mar Rojo demostró que las latrunculinas A (Figura 2.18) y B, aisladas de *Latrunculia magnifica* y *Negombata magnifica* inhiben la formación de estructuras tubulares endoteliales en ensayos in vitro de angiogénesis utilizando células endoteliales humanas (HUVEC), a concentraciones bajas de 10-100 nM, mostrando baja toxicidad (H. Ebrahim & El Sayed, 2016). En este mismo estudio, el alcaloide macrocíclico araguspongine C (Figura 2.19), aislado de la *Xestospongia exigua*, fue reportado como un inhibidor selectivo de las quinasas proangiogénicas como PLK1, lo que contribuye a la reducción de señales intracelulares que promueven la proliferación y migración endotelial. Esta actividad fue observada in vitro con valores de IC₅₀ de 0.5-2 µM (Ebrahim & El Sayed, 2016).

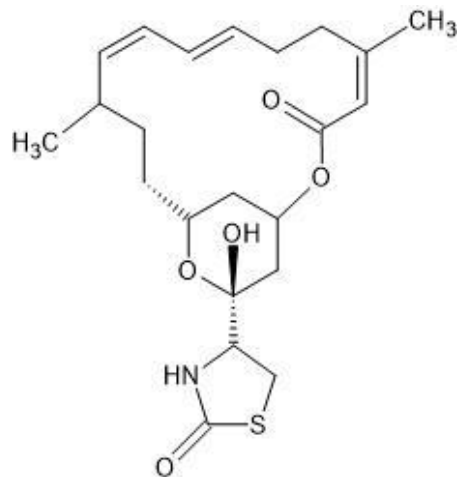


Figura 2. 18 Estructura química de latrunculina A aislada de *Latrunculia magnifica*.

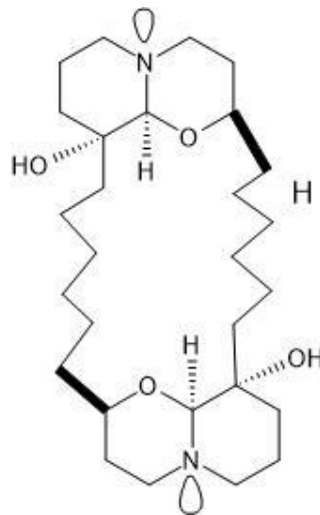


Figura 2. 19 Estructura química de araguspongine C aislado de la *Xestospongia exigua*.

Otro factor que influye en la angiogénesis es el estrés oxidativo. El factor inducible por hipoxia (HIF) es el responsable de la regulación oxidativa y es el precursor de trastornos patológicos (Zimna & Kurpisz, 2015). La Heme oxigenasa-1 (HMOX-1) es un gen regulado por Nrf2, un factor de transcripción que regula la producción de proteínas antioxidantes, antiinflamatorias y detoxificantes (Mukaigasa et al., 2012), que protege en contra del estrés oxidativo, reduce la muerte celular y regula la inflamación (Loboda et al., 2016). Por su parte, VEGF es un regulador de la angiogénesis inducida por hipoxia, que mantiene un equilibrio entre la oxigenación y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Jin et al., 2019).

Abeer A. Khamis et al. identificaron familias de metabolitos bioactivos tipo naftoquinona como echinochrome A (Figura 2.20) y spinochrome A y E, así como compuestos fenólicos y flavonoides provenientes de la concha del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Estos metabolitos, actuando en conjunto, regularon el estrés oxidativo mediante la alteración del equilibrio redox celular debido al aumento de óxido nítrico y malondialdehído, y disminuyendo la actividad del superóxido dismutasa y catalasa. Este mecanismo de acción se asoció con una regulación negativa del Nrf2/HMOX-1 y redujo la expresión de HIF-1 α y su gen diana VEGF, lo cual resultó en una disminución significativa de la angiogénesis en condiciones de hipoxia (Khamis et al., 2025).

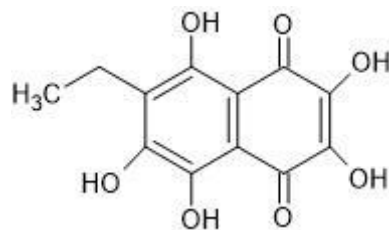


Figura 2. 20 Estructura química de echinochrome A aislado de *Paracentrotus lividus*.

2.5.2. Compuestos con efecto proangiogénico

Diversos compuestos marinos han demostrado la capacidad de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la activación regulada de vías proangiogénicas, sin incurrir a la angiogénesis patológica que es característica del cáncer. Entre los mecanismos evaluados, se encuentra la inducción de VEGF y citocinas proinflamatorias como TNF- α , cuya activación favorece a las etapas iniciales de cicatrización (Boujhoud et al., 2025).

Los mecanismos proangiogénicos van de la mano con el control del estrés oxidativo para prevenir el daño tisular en altos niveles. Los niveles de VEGF, mediadores inflamatorios y la regulación del balance redox permite el desarrollo de una angiogénesis funcional (Carson & Clarke, 2018).

El modelo de membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de ave es un modelo ampliamente utilizado para la evaluación *in vivo* de la angiogénesis debido a la alta vascularización, respuesta rápida a estímulos angiogénicos, accesibilidad y costos. En el aspecto proangiogénico, se espera que el compuesto a evaluar incremente la densidad vascular, cantidad de ramificaciones y longitud de capilares y el número de puntos de intersección.

La CAM permite correlacionar los mecanismos moleculares de los compuestos naturales con potencial proangiogénico con los efectos sobre la red vascular, aportando evidencia para procesos de regeneración y cicatrización (Zakaria et al., 2024).

2.5.3. Evidencia experimental en modelos celulares y animales

Diversas investigaciones han reportado el efecto angiogénico y antiangiogénico de compuestos marinos. Un ejemplo es el estudio desarrollado por Liu et al. en donde se aisló y evaluó catunaregin de especies provenientes de la especie de manglar *Catunaregam spinosa*. El ensayo *in vitro* con células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) evidenció la capacidad inhibitoria de catunaregin de fenotipos angiogénicos inducidos por VEGF que incluyen: migración celular, invasión y formación tubular. Esta capacidad se le atribuye a la disminución de la fosforilación de Akt y eNOS, los cuales son los principales mediadores de señalización proangiogénica (Liu et al., 2014).

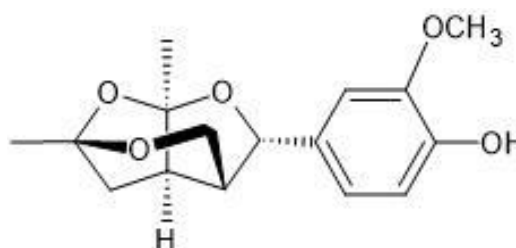


Figura 2. 21 Estructura química de catunaregin aislado de *Catunaregam spinosa*.

Los resultados de ensayos *in vivo* con embriones de pez cebra (*Danio rerio*), mostró la reducción de nuevos vasos sanguíneos en el desarrollo embrionario, lo cual está asociado con un efecto antiangiogénico. Finalmente se realizó un ensayo de herida abierta que exhibió la capacidad cicatrizante

del compuesto sin repercutir en el crecimiento del tejido lo que indica alta selectividad (Liu et al., 2014).

García-Caballero et al. evaluaron la actividad angiogénica del metabolito marino AD0157, pirrolindiona aislada de un hongo marino del género *Paraconiothyrium*. El modelo *in vivo in ovo* de CAM evidenció que el metabolito inhibió el crecimiento vascular en dosis dependientes debido a la reducción de densidad capilar y desviación de vasos sanguíneos.

Así mismo, AD0157 inhibió la neovascularización embrionaria en embriones transgénicos de pez cebra a concentraciones 1-5 μM sin alteraciones morfológicas significativas ni letalidad embrionaria, lo que sugiere un efecto tóxico bajo. Los autores concluyeron que el mecanismo antiangiogénico se basa en la inhibición de la fosforilación de Akt y de la vía ERK1/2, también que induce la apoptosis endotelial que depende de caspasas (García-Caballero et al., 2014).

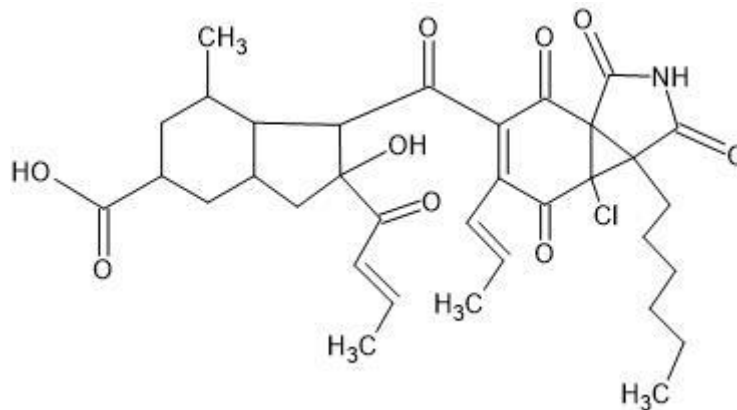


Figura 2. 22 Estructura química de AD0157 aislada de un hongo marino del género *Paraconiothyrium*.

Así mismo, Ye et al., demostraron la capacidad inhibitoria de una lisozima aislada de la bacteria marina *Pseudoalteromonas sp* (Ye et al., 2008). En modelos *in vitro*, este compuesto inhibió la proliferación de células endoteliales (ECV304) en una forma dosis-dependiente, sin generar efectos citotóxicos significativos sobre las células no endoteliales lo que sugiere alta selectividad sobre la vasculatura. En modelos *in vivo in ovo* CAM se confirmó la capacidad antiangiogénica en donde la lisozima inhibió significativamente

la formación de vascularización y redujo el número de ramificaciones vasculares hasta un 85%. Finalmente, en modelos de animales, después de la administración sistémica de la lisozima marina, se evidenció una reducción significativa del crecimiento tumoral (Sarcoma 180 y Hepatoma 22) en ratones (Ye et al., 2008).

Estos resultados evidencian el potencial de los compuestos marinos como reguladores de la angiogénesis de forma selectiva y con abaja toxicidad sistémica.

2.6. Métodos de obtención y caracterización de fracciones bioactivas

2.6.1. Técnicas de extracción y fraccionamiento

La extracción sólido-líquido (SLE) es uno de los métodos fundamentales y la técnica analítica más implementada para la obtención de metabolitos a partir del tratamiento de matrices sólidas a través de la partición de los analitos de interés entre las dos fases involucradas: matriz sólida y disolvente. El proceso SLE posee tres mecanismos esenciales: la penetración del disolvente en la matriz sólida, difusividad de los analitos desde la matriz hasta el disolvente y la solubilidad de los analitos en el disolvente (Priego-Capote, 2021).

Estos mecanismos permiten seleccionar disolventes orgánicos de diferente polaridad, con la finalidad de extraer metabolitos de interés según su afinidad química.

La separación y purificación se puede realizar mediante técnicas cromatográficas como la extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida. En estas técnicas, los analitos se retienen o eluyen en base a su polaridad, capacidad de adsorción y partición.

Entre los mecanismos de retención tanto en SPE como en la cromatografía líquida, la polaridad relativa entre la fase móvil y la fase estacionaria es determinante para la selectividad del proceso (Andrade-Eiroa et al., 2016).

La partición es un mecanismo de retención que predomina en SPE donde se aplica los fundamentos de la extracción líquido-líquido sobre procesos de distribución o partición de los solutos entre la muestra líquida y el líquido que yace en la fase estacionaria (Huck & Bonn, 2000).

El fundamento en SPE es el mismo que se emplea para la cromatografía líquida al vacío (VLC) con la finalidad de obtener fracciones ricas en metabolitos de diferentes polaridades, lo cual permitiría una evaluación de bioactividad más específica.

VLC se considera un tipo de cromatografía en capa fina preparativa puesto que se lleva a cabo sobre gel de sílice o alúmina (adsorbentes). Las columnas empacadas para VLC se pueden utilizar para la misma o separaciones similares, después de un completo lavado con metanol y el retiro del material polar descompuesto en la parte superior del adsorbente (Hostettmann et al., 1998). En VLC, la elución en gradiente es altamente efectiva y se puede implementar tanto para pequeñas como grandes cantidades de mezclas (Maurya, 2018).

2.6.2. Métodos cromatográficos y espectroscópicos

El aumento de la complejidad en muestras a analizar, la necesidad de análisis rápidos y la reducción de costos en reactivos a largo plazo promovieron el desarrollo de la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC). El UHPLC es una técnica avanzada de cromatografía líquida que provee cromatogramas de alta resolución y reproducibilidad según los tiempos de retención. Esta técnica permite separaciones que son relevantes en áreas farmacéuticas, metabolómica e investigación (X. Wang et al., 2014).

El desempeño cromatográfico está relacionado con la reducción del tamaño de partícula en la fase estacionaria, puesto que el uso de partículas menores a 2 μm , requiere un incremento del número de platos teóricos y consecuentemente reduce significativamente los tiempos de análisis.

El acoplamiento de UHPLC a la espectrometría de masas (MS) representa una gran ventaja en términos de caracterización química de mezclas complejas (múltiples compuestos coexistiendo), como es el caso de muestras provenientes de especies marinas, ya que fusiona la alta eficiencia cromatográfica del UHPLC con la detección selectiva del MS.

La ventaja principal del acoplamiento UHPLC-MS es la reducción de la complejidad de la muestra que analiza el espectrómetro de masas, lo que a su vez reduce las probabilidades de competencia y efectos de supresión iónica. La resolución cromatográfica mejorada (mejor definición en los tiempos de retención) facilita el ingreso de los analitos al detector de masas mejor distribuidos, lo que permite una detección e identificación de compuestos más confiable (Panuwet et al., 2016).

Se concluye que el acoplamiento UHPLC-MS es una técnica analítica integrada que permite obtener alta resolución, rapidez, sensibilidad y reproducibilidad, parámetros importantes para una caracterización química eficiente y confiable de muestras complejas (Guillarme & Veuthey, 2017).

Adicionalmente, los avances en la bioinformática han logrado mejorar la investigación en el campo de los productos naturales por la capacidad de desarrollar descubrimientos eficientes de nuevos componentes. Molecular Networking (MN) MS/MS es un enfoque prometedor en el análisis de mezclas complejas de productos naturales, lo que lo ha convertido en una revolución en el aislamiento de compuestos.

Esta herramienta bioinformática organiza los espectros de fragmentación en redes moleculares en base a la similitud estructural. MN MS/MS permite la visualización de familias de metabolitos asociados, detección de análogos estructurales y la relación con compuestos reportados con anterioridad. El objetivo es transformar los datos obtenidos a partir de UHPLC-MS en mapas químicos interpretables en forma de nodos (metabolitos) y sus respectivas conexiones (patrones de fragmentación). Los datos biológicos y funcionales

en esta herramienta permiten correlacionar la estructura química con la bioactividad.

La combinación de UHPLC-MS y Molecular Networking MS/MS es una forma robusta de relacionar perfiles químicos de matrices complejas con funciones biológicas, lo que representa una herramienta primordial en la investigación actual de productos naturales (Fox Ramos et al., 2019).

2.6.3. Ensayos fitoquímicos cualitativos

Los ensayos fitoquímicos cualitativos son la etapa inicial para la detección de familia de compuestos en el análisis de productos naturales. Estas pruebas se basan tanto en la formación de precipitados como en los cambios de color que se producen por la interacción de los compuestos presentes en el extracto y reactivos involucrados (Vargas Mamani, 2024).

Los alcaloides son compuestos orgánicos (aminas) de origen natural. La mayoría de estos son de naturaleza básica, con excepciones (neutras o débilmente ácidas). Entre las pruebas más empleadas para la detección de alcaloides se tiene la prueba de Dragendorff, el cual produce un precipitado naranja o rojizo debido a la reacción de estos compuestos nitrogenados con complejos de bismuto-yoduro (Parrales Alay & Villamar Pibaque, 2022). Así mismo, Mayer es una prueba que confirma la presencia de alcaloides mediante la formación de un precipitado blanco o cremoso. El reactivo de Wagner al entrar en contacto con la muestra, la formación de un precipitado naranja o morado indicará la presencia de estos compuestos (Vargas Mamani, 2024).

La detección de terpenoides y esteroides se realiza mediante las pruebas de Salkowski y Liebermann-Burchard, que se basan en reacciones de oxidación y sulfonación con cambios de color característicos. En la reacción de Salkowski, el cambio del color de amarillo a rojo o morado indica la presencia de un núcleo esteroideal. Mientras que en la reacción de Liebermann-Burchard, la aparición de una coloración verde, azul o morada, se asocia a la presencia de esteroides y triterpenos (Abdel-Rahman et al., 2019a).

En el ámbito antioxidante se tiene a los fenoles, cuyo mecanismo de acción consiste en la donación de electrones para neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS). Así mismo, los flavonoides son un subgrupo de los fenoles de alto interés en el campo medicinal. La presencia de estos compuestos se realiza mediante el ensayo con cloruro férrico (FeCl_3) que genera un tono azul, verde o violeta como consecuencia de la formación de complejos entre el hierro y los grupos hidroxilo fenólicos (Klangmanee & Athipornchai, 2019).

Las saponinas son metabolitos secundarios con alta aplicación en el sector biomédico. Estos compuestos poseen naturaleza anfipática lo cual les confiere propiedades tensoactivas. Estas pueden ser detectadas mediante la formación de espuma debido a su capacidad tensoactiva, De forma general estas pruebas cualitativas permiten obtener un perfil fitoquímico preliminar del extracto, el cual funciona como base para optimizar el fraccionamiento y determinar pasos posteriores (Saxena et al., 2023).

Los glucósidos cardiotónicos son metabolitos secundarios de alto valor medicinal y usados en la cardioterapia para pacientes con insuficiencia cardíaca (Marshall, 1964). Dentro de las pruebas fitoquímicas se tiene a Keller-Killani, la cual al entrar en contacto con el metabolito objetivo presenta una coloración verde oscura que indica la presencia de desoxiazúcares en glucósidos cardiotónicos (Lima et al., 2016) .

Este conjunto de metabolitos secundarios con bioactividad asociada contribuye a las especies como un mecanismo de defensa y así mismo a las propiedades bioactivas de los extractos, lo que hace de los ensayos fitoquímicos cualitativos, un paso inicial relevante para profundizar su investigación.

2.7. Modelos biológicos para la evaluación de la bioactividad

2.7.1. Ensayo *in vitro* en líneas celulares

El uso de líneas celulares como modelos *in vitro* es una herramienta fundamental para la evaluación de diferentes aspectos de compuestos con potencial terapéutico, puesto que permite el estudio de problemas de relevancia clínica como patologías, estudios de cribado y viabilidad celular. A pesar de que los cultivos primarios son la representación más cercana del tejido objetivo, son los más complejos debido a las altas exigencias en condiciones para su mantenimiento y eficacia. Es por esto, que se opta por trabajar con líneas celulares inmortalizadas, las cuales son más estables y permiten la disponibilidad de material celular ilimitado. Las líneas celulares inmortalizadas representan alta reproducibilidad y son útiles para estudios de toxicidad, selectividad y elección de compuestos bioactivos. A pesar de que puedan presentar problemas de estabilidad, siguen siendo la mejor opción en ensayos *in vitro* y la alternativa más empleada en la investigación (Allen et al., 2005).

La citotoxicidad es la capacidad de un agente para producir alteraciones en procesos celulares esenciales, lo que conduce a la disminución de la viabilidad celular hasta su muerte. La concentración inhibitoria media (IC_{50}) es una medida cuantitativa que indica la concentración necesaria para reducir en un 50% la viabilidad. Los ensayos como bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Alamar Bue, fosfatasa ácida, entre otros, permiten la obtención de curvas dosis-respuesta, a partir de las cuales se puede cuantificar el IC_{50} y la selectividad, otorgando información crucial para la comparación de la eficacia de distintos compuestos en términos de citotoxicidad frente a líneas celulares. Los modelos celulares *in vitro* permiten predecir efectos farmacológicos y tóxicos potenciales previo a ensayos *in vivo* (Damiani et al., 2019).

2.7.2. Ensayo de membrana corioalantoidea (CAM)

CAM es un modelo utilizado para la evaluación de la angiogénesis debido a la red vascular que se desarrolla durante la incubación del ave. La CAM se forma por la fusión del corión y el alantoides, entre los días 4 y 5 de incubación, lo que genera una membrana altamente vascularizada que tiene la función de proporcionar oxígeno y nutrientes al embrión (Y. Wang et al., 2025).

Una vez desarrollada la CAM, se puede acceder a esta *in ovo*, mediante una ventana en la cáscara, o *ex ovo*, retirando la cáscara y colocando la CAM en una caja Petri. Ambos métodos permiten la aplicación de fracciones, extractos o compuestos sobre la superficie vascular y el posterior análisis de efectos sobre la misma como patrón de ramificación, densidad y longitud de los vasos sanguíneos a través de la observación macroscópica y análisis cuantitativo de parámetros vasculares (Dohle et al., 2010).

Hamburger y Hamilton en 1951 establecieron un protocolo técnico detallado en embrión de pollo y en especial en el modelo CAM. Durante los primeros días de desarrollo, el embrión no ha completado el sistema nervioso por lo que lo convierte en un modelo éticamente aceptable acorde a las normativas internacionales y respalda su implementación en estudios preclínicos como el modelo CAM. El sistema inmunológico del embrión no está completamente desarrollado durante las primeras etapas de incubación (hasta el día 9 de incubación) lo que permite la colocación de tejidos o biomateriales sin rechazo inmunológico significativo. El embrión de *Gallus gallus domesticus* es un modelo experimental *in vivo* para la evaluación de la angiogénesis debido a su rápido desarrollo, accesibilidad y bajo costo (Hamburger & Hamilton, 1951).

2.7.3. Interpretación de resultados biológicos

La respuesta angiogénica observada en el modelo CAM sea como estimulación del desarrollo vascular (proangiogénico) o inhibición

(antiangiogénico), puede correlacionarse con el potencial terapéutico de los extractos o fracciones en las cáncer o úlceras diabéticas. La respuesta antiangiogénica se asocia con efectos antitumorales, debido a que el desarrollo y migración tumoral depende directamente de la neovascularización que le permita aprovechar nutrientes y oxigenación. Ante agentes antiangiogénicos, el modelo CAM ha mostrado una reducción de la densidad vascular, ramificaciones capilares y generación de zonas avasculares, lo cual comprueba el alto potencial como anticancerígenos (Tufan & Lale Satiroglu-Tufan, 2005).

En condiciones de hiperglucemia, se evidencia una angiogénesis significativamente reducida debido a la disminución de la proliferación endotelial y un aumento de apoptosis, características de úlceras diabéticas y deficiencia en la cicatrización. La implementación de factores que activen la vía de VEGF pueden revertir parcialmente la deficiencia vascular y esto se interpretaría como una respuesta proangiogénica con potencial para reparación y tratamiento de úlceras. CAM permite interpretar si un extracto o fracción presenta un perfil proangiogénico o antiangiogénico con posibles aplicaciones ante patologías neoplásicas, lo cual hace de CAM una herramienta preclínica confiable (DiMarco Giovana et al., 2008).

2.8. Perspectiva terapéutica de *Isostichopus fuscus*

2.8.1. Potencial biomédico de metabolitos

Diversos estudios reportan que los pepinos de mar con una fuente importante de metabolitos con alto valor en el campo biomédico, de los cuales destacan las saponinas triterpénicas, polisacáridos sulfatados, glicosaminoglicanos, péptidos y lípidos bioactivos, que han sido asociados con actividad antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antiangiogénicas, entre otros (Bordbar et al., 2011).

En el caso de la especie *Isostichopus fuscus*, se ha evidenciado que las fracciones proteicas provenientes de los tentáculos pueden emplearse para

liberar péptidos con alto potencial antioxidante (Hernández-Sámano & Hernández-Ledesma, 2015).

En una investigación más profunda sobre estos péptidos, se concluyó que reducen el estrés oxidativo, el cual es el precursor de patologías crónicas que se relacionan a la inflamación, daño vascular y envejecimiento celular (Hossain, Dave, et al., 2022).

A pesar de que no se dispone de más información sobre bioactividad en esta especie, se tiene como referencia a *I. badionotus*, que pertenece al mismo género y ha mostrado bioactividad en diferentes áreas (Olivera-Castillo et al., 2025; Pérez-Espadas et al., 2014; Pérez-Vega et al., 2013). Se propone que los compuestos bioactivos de pepinos de mar podrían utilizarse como terapias complementarias en contra de patologías como el cáncer y diabetes.

2.8.2. Retos en la investigación y aplicaciones futuras

A pesar del creciente interés en metabolitos secundarios provenientes de fuentes naturales, en específico de especies marinas no exploradas a profundidad como *Isostichopus fuscus*, una gran parte de las evidencias disponibles sobre biodiversidad marina se basan en estudios *in vitro* e *in vivo*, mientras que hay ausencia de ensayos en los humanos lo que limita su aplicación en el ámbito terapéutico.

La estandarización de las etapas desde la extracción hasta la caracterización química se convierte en uno de los retos principales. Esta fase debe complementarse con evaluaciones de citotoxicidad sistemática, además de estudios de mecanismos de acción y la biodisponibilidad del recurso o síntesis química, en especial teniendo el objetivo de desarrollar fármacos complementarios.

Por otro lado, se tiene la regulación de esta especie en el Ecuador, limitando su acceso por lo que se debería potenciar programas de cultivos sostenibles de la misma.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

El presente capítulo describe la metodología empleada para el desarrollo de la investigación, la cual es del tipo aplicada y experimental, con un eje central de la obtención de conocimiento con potencial aplicación terapéutica. A continuación, se detalla el tipo y diseño del estudio, variables consideradas, los procedimientos experimentales y las técnicas utilizadas para la recolección y análisis de los datos, lo que permitió evaluar la bioactividad de las fracciones obtenidas de *Isostichopus fuscus*.

3.1. Enfoque de la investigación

3.1.1. Tipo de investigación

Este estudio es de tipo **aplicado**, debido a que busca la generación de nuevo conocimiento con potencial aplicación en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas a partir de compuestos de fuentes marinas. Así mismo, se encuentra dentro del marco **experimental** puesto que se manipulan variables independientes, como el tratamiento de extracción y polaridad de las fracciones obtenidas de acuerdo con la proporción de solventes empleada, bajo condiciones controladas, como el tiempo y temperatura de los tratamientos, para evaluar el efecto sobre variables biológicas según el modelo de ensayo.

3.1.2. Diseño de investigación

El diseño de la investigación es experimental, ya que se aplicaron dos tipos de tratamientos de extracción y cuatro tipos de fraccionamiento a la biomasa de *I. fuscus* con el objetivo de evaluar su efecto sobre la bioactividad y modulación de la angiogénesis. Este diseño se fundamenta en la necesidad de establecer relaciones entre la composición química de las fracciones obtenidas y la bioactividad.

3.2. Metodología

3.2.1. Variables

Se consideran variables independientes y dependientes, en base al diseño experimental y los tres modelos biológicos empleados, bajo condiciones controladas de laboratorio.

3.2.1.1. Variables independientes

Las fracciones *I. fuscus* fueron obtenidas a partir de condiciones experimentales que incluyen el tipo de muestra (base húmeda o seca por liofilización), el tipo de tratamiento (maceración y/o ultrasonido) y el sistema de extracción empleando solventes de polaridad decreciente correspondientes a: metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5 y metanol:cloroformo 3:7.

3.2.1.2. Variables dependientes

Estas variables corresponden a la respuesta biológica generadas por las fracciones evaluadas:

- En el modelo vegetal *Allium cepa* se evaluó el crecimiento radicular que es la medición de la longitud de las raicillas y la actividad mitótica mediante el conteo de células en la mitosis, comparado con un control negativo de agua destilada.
- En los ensayos en líneas celulares cancerígenas se midió el porcentaje de viabilidad, obtenido a partir de ensayos en líneas celulares de cervicouterino (HeLa), próstata (PC-3), colon (RKO) y mama (T47-D), comparado cada tratamiento frente a un control positivo de Doxorubicina.
- En el modelo de membrana corioalantoidea (CAM) se registraron los cambios cualitativos de la angiogénesis, a partir de la presencia o ausencia de modificaciones vasculares, así como mayor o menor cercanía al área de exposición, en comparación a un control negativo de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

3.2.2. Diseño experimental

Con el fin de evaluar rigurosamente el potencial bioactivo de las fracciones obtenidas de *Isostichopus fuscus*, se estableció un diseño experimental que integra procedimientos químicos y biológicos bajo un mismo marco metodológico. Este diseño permite seguir un flujo secuencial (desde la obtención del material y su fraccionamiento, hasta su evaluación en modelos celulares, vegetales y embrionarios) asegurando que cada etapa aporte información clave para interpretar la actividad moduladora de la angiogénesis. A continuación, se describen las fases del diseño y los métodos empleados.

3.2.2.1. Obtención de extractos y fracciones

Se desarrollaron tres diseños experimentales, combinando tipo de biomasa (base húmeda o seca por liofilización) y tratamiento de extracción (maceración y/o ultrasonido). Cada diseño se sometió a proceso de fraccionamiento secuencial mediante polaridad decreciente, basado en principios de partición líquido-líquido. Generando 12 fracciones finales, las cuales se concentraron por rotaevaporación a una temperatura $\leq 35^{\circ}\text{C}$ para preservar la estabilidad de los compuestos bioactivos.

3.2.2.2. Técnicas de caracterización fitoquímica

Las fracciones obtenidas fueron sometidas a una caracterización fitoquímica preliminar mediante ensayos cualitativos estándar, con el fin de identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes:

- Alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner, Hager.
- Fenoles: NaOH-ácido, FeCl_3 , prueba de Ixora.
- Terpenoides: Salkowski.
- Saponinas: prueba de espuma.
- Esteroides: Liebermann-Burchard.
- Glucósidos: Keller-Kilani y método NaOH/amonio.

3.2.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH)

La capacidad antioxidante de las fracciones se determinó mediante el ensayo de captura del radical libre DPPH. Las lecturas se realizaron a 517

nm y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del radical (% Radical Scavenging) y equivalentes de Trolox (μM).

3.2.2.4. Evaluación biológica

La bioactividad de las fracciones se evaluó mediante tres modelos complementarios:

- Modelo vegetal *Allium cepa*: Determinación del crecimiento radicular (día 0 al día 3) y determinación de genotoxicidad mediante fijación, hidrólisis, tinción con orceína y microscopía.
- Ensayos in vitro en líneas celulares: Se evaluó viabilidad a 200 $\mu\text{g/mL}$ sobre líneas HeLa, PC 3, RKO y T47 D mediante MTT, comparadas con un control positivo de doxorrubicina (1.5 μM).
- Modelo CAM (*in ovo*): Se emplearon huevos fertilizados, verificando la viabilidad embrionaria y aplicando fracciones a 50 ppm sobre venas secundarias. Se registró angiogénesis a 24 y 48 h posteriores a la aplicación de forma cualitativa a nivel macroscópico.

3.2.2.5. Análisis químico por técnicas analíticas instrumentales

El análisis de las fracciones bioactivas se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC), utilizando una columna C18 a 280, 307 y 367 nm. La identificación de compuestos se ejecutó por la comparación con los tiempos de retención y cromatogramas de los estándares fenólicos comerciales, que incluyen ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido sinrínico, epicatequina, p-cumárico, rutina, resveratrol, quercetina, naringenina y kaempferol.

3.2.2.6. Estadística

Se aplicarán análisis estadísticos de ANOVA y Tukey para *Allium cepa*, media para DPPH y líneas celulares, y análisis descriptivo para CAM.

3.2.3. Recolección de datos

3.2.3.1. Métodos y técnicas

La obtención de datos se llevó a cabo mediante los siguientes modelos experimentales, desarrollado en distintos periodos de tiempo de acuerdo con la naturaleza de cada ensayo:

3.2.3.1.1. Extracción y fraccionamiento

Se desarrollaron tres diseños experimentales considerando dos tipos de biomasa de *I. fuscus*: biomasa húmeda, con un porcentaje de humedad de 92,43 %, y biomasa seca-liofilizada, con un contenido de humedad aproximado del 2 %. A partir de estos materiales, se aplicaron los siguientes tratamientos de extracción: (1) biomasa húmeda sometida a maceración, (2) biomasa húmeda con tratamiento por ultrasonido y (3) biomasa liofilizada sometida a un tratamiento de ultrasonido y maceración.

Con el objetivo de obtener metabolitos según su afinidad química, se realizó un fraccionamiento secuencial mediante un gradiente decreciente de polaridad, empleando sistemas de solventes en las siguientes proporciones: metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5, metanol:cloroformo 3:7 y cloroformo. No obstante, la fracción obtenida únicamente con cloroformo fue descartada debido a la baja cantidad de material recuperado, lo que impedía su utilización en los ensayos posteriores.

Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron filtradas y concentradas mediante rotoevaporación, empleando presión reducida y una temperatura máxima de 35 °C, con el fin de preservar la estabilidad de los compuestos bioactivos. Todos los procesos de fraccionamiento se realizaron por duplicado, con el objetivo de optimizar la cantidad de fracción obtenida. Como resultado final, se obtuvieron doce fracciones, las cuales fueron utilizadas en las evaluaciones biológicas posteriores.

Tabla 3. 1 Extractos resultantes de los 3 diseños experimentales en muestras de *Isostichopus fuscus*

Biomasa	Tratamiento	Disolventes	Extracto
Húmeda	Maceración	Metanol	1.1 M
		M:C 7:3	1.2 M:C
		M:C 5:5	1.3 M:C
		M:C 3:7	1.4 M:C
	Ultrasonido	Metanol	2.1 M
		M:C 7:3	2.2 M:C
		M:C 5:5	2.3 M:C
		M:C 3:7	2.4 M:C
Liofilizada	Maceración + Ultrasonido	Metanol	3.1 M
		M:C 7:3	3.2 M:C
		M:C 5:5	3.3 M:C
		M:C 3:7	3.4 M:C

3.2.3.1.2. Caracterización fitoquímica

La caracterización fitoquímica se realizó con el objetivo de identificar de manera cualitativa los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *I. fuscus*. El análisis se llevó a cabo mediante pruebas colorimétricas y de precipitación, empleando reactivos específicos para tipo de ensayo. Se empleó 40µL de solución 100ppm por cada una de las fracciones de pepino de mar obtenidas.

Cada ensayo se realizó por duplicado en tubos de ensayo con el fin de corroborar la reproducibilidad de las observaciones y los resultados se registraron de manera cualitativa, clasificándose como positivo (+) o negativo (-) de acuerdo con los criterios de cada ensayo.

Alcaloides

Método Dragendorff

Se colocó 1.5ml HCl al 1% y 3 gotas del reactivo de Dragendorff. La presencia de un precipitado de color rojo anaranjado está asociado a la presencia de alcaloides.

Método Mayer

Se agregó 1.5ml de etanol y 3 gotas del reactivo de Mayer. La presencia de un precipitado crema es un resultado positivo a alcaloides.

Método Wagner

Se colocó 2 gotas del reactivo de Wagner. La presencia de un precipitado marrón rojizo o un cambio de color en la interfase es un resultado positivo.

Método Hager

Se colocó 2 gotas del reactivo de Hager. Un precipitado o coloración amarilla es positivo a alcaloides.

Fenoles

Prueba NaOH-ácido

Se agregó 1.5mL de etanol y 3 gotas de solución de NaOH al 10%. La coloración amarilla o anaranjada indicó la presencia de flavonoides. Se realizó una confirmación con 5 gotas de ácido clorhídrico 1% hasta que el pH volvió a ser neutro entre 6-7, la desaparición del color confirmó la presencia de flavonoides.

Test de FeCl₃

Se agregó 1 mL de FeCl₃ al 5% a la solución de pepino de mar. Un color verde oscuro, negro o azul sugirió la presencia de compuestos fenólicos.

Prueba de Ixora

Se añadió 2 gotas del extracto de Ixora al tubo de ensayo. El cambio de color a amarillo, anaranjado o rojo indicó un resultado positivo.

Terpenoides

Salkowski

Se colocó 0.5mL de cloroformo a la muestra y agregar cuidadosamente 0.5mL de ácido sulfúrico concentrado. El color marrón-rojizo en la interfase indicó la presencia de terpenoides.

Saponinas

Prueba de la espuma

Se añadió 1.5mL de agua destilada y agitar vigorosamente durante 3 minutos. Si al calentarse en baño maría, aún persiste la espuma entonces es un positivo a la presencia de saponinas.

Esteroides

Método de Liebermann-Burchard

Se añadió 0.5mL de ácido acético a la muestra, se enfrió la solución en baño de hielo y se agregó cuidadosamente 0.5mL de ácido sulfúrico concentrado. El desarrollo y cambio de un color violeta a azul o verde azulado estaba asociado la presencia de un anillo esteroideo.

Glucósidos antraquinónicos

Método con hidróxido de sodio y amonio

Se empleó 0.4mL de hidróxido de sodio 5% y 0.4mL de amoniaco 2%. La coloración rojiza es un positivo y un verde negativo.

Glucósidos cardiotónicos

Método de Keller-Kilani

Se añadió 0.5mL del reactivo Keller-Kilani a cada fracción. Un anillo marrón o rojizo indicaba positivo

3.2.3.1.3. Ensayo de DPPH

La actividad antioxidante de las fracciones de *I. fuscus* se evaluaron mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH), en base a la capacidad de los compuestos antioxidantes para reducir el radical estable DPPH a 517nm.

Las fracciones de pepino de mar se prepararon a una concentración final de 100ppm en solución metanólica. Posteriormente se sometieron a ultrasonido por un tiempo de 10 min, seguidas de centrifugación por 5 minutos a 5000rpm y se recuperó el sobrenadante que sería empleado para el ensayo antioxidante.

Se empleó Trolox como estándar antioxidante de referencia. Para esto se preparó una solución madre Trolox a 1000 μ M en metanol, a partir de la cual se obtuvieron soluciones estándar con concentraciones comprendidas entre 5 y 300 μ M, utilizando el mismo solvente. Estas soluciones se emplearon para la construcción de la curva de calibración de 14 puntos, adicionalmente del blanco y el control.

La solución madre se preparó a partir de 1.537mg en 25mL de metanol para obtener una concentración de 156 μ M a partir de su peso molecular de 394.32g/mol, solución que se empleará como el agente oxidante en el ensayo.

Para el montaje del ensayo en microplacas por cuatriplicado, que tendrá un volumen final por pocillo de 200uL, se tomó en cuenta el blanco que estuvo compuesto de 200uL de metanol, un control de 50uL que correspondía a la mezcla de los solventes usados junto a 150uL de DPPH y finalmente las 50uL de las muestras con 150uL de DPPH. Tener en consideración que el DPPH se colocó al final puestos que todos debieron cumplir con un tiempo de incubación de 30 min en oscuridad. Para la correcta obtención de los resultados del ensayo antioxidante DPPH, las mediciones de absorbancia se realizaron a 517 nm utilizando un lector de microplacas, generando los valores iniciales en unidades de absorbancia (ABS).

Cada muestra, estándar, blanco y control fueron analizados por cuatriplicado. A partir de los cuatro valores de absorbancia obtenidos, se seleccionaron tres valores de absorbancia que presentaron la menor desviación estándar, con el fin de eliminar valores aberrantes. Para esto, se calculó la absorbancia promedio y su correspondiente desviación estándar. Así mismo, se analizó la curva de calibración construida con el estándar Trolox, evaluando la linealidad de los puntos. En este proceso, se

eliminaron puntos aberrantes con el objetivo de obtener un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.993, garantizando la confiabilidad en la curva de calibración.

A partir de la absorbancia promedio obtenida para cada muestra, los valores fueron convertidos tanto a concentración equivalente de Trolox (μM Trolox), mediante interpolación en la curva de calibración, como al porcentaje de captura del radical DPPH (% Radical Scavenging), a partir del promedio en absorbancia de la muestra comparado con el promedio del control. Este procedimiento permitió estandarizar el tratamiento de los datos y asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *I. fuscus*.

3.2.3.1.4. Modelo *Allium cepa*

Este modelo se empleó para evaluar el efecto de las fracciones sobre el crecimiento y la proliferación celular vegetal. El desarrollo experimental del modelo *Allium cepa* se realizó durante los meses de septiembre a octubre. Los modelos *Allium cepa* se dejaron reposar inicialmente sobre agua de la llave durante 3 días para promover su crecimiento natural hasta que las raicillas obtengan una longitud mayor a 1cm para iniciar con el ensayo. Las soluciones de tratamiento se prepararon a una concentración final de 50ppm, utilizando agua destilada como solvente. Para cada tratamiento se colocaron 50mL de solución a 50ppm en tubos falcon. En total se evaluaron doce extractos y un blanco que contenía agua destilada, en los cuales cada *Allium cepa*, representaba un sistema experimental.

Se rotularon 5 a 6 raicillas por cada modelo *Allium cepa* y se registró la longitud inicial de las raicillas en el día 0 y la longitud final en el día 3 con la finalidad de medir el crecimiento radicular basándose en la diferencia de crecimiento entre dicho intervalo de tiempo. Para el análisis estadístico, se seleccionaron los 3 valores de crecimiento radicular por sistema

experimental que presentaban la menor desviación estándar, garantizando mayor consistencia en los resultados.

La presencia de genotoxicidad se evaluó al tercer día, posterior a la medición del crecimiento radicular. Para esto, se cortó 1 cm del extremo terminal de las raicillas rotuladas y se sometieron a un proceso de fijación en una solución ácido acético:etanol 1:3 por 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron lavadas con agua destilada en un intervalo de tiempo de 1 min por lavado. Después del lavado, las muestras se sometieron a hidrólisis ácida empleando HCl 5N por 20 min. Así mismo, se lavaron las muestras. Una vez observada la translucidez del tejido, se secaron las muestras y se cortaron 2mm del extremo terminal, los cuales se tiñeron con orceína por 10 min y se secaron para remover el exceso. Se colocaron las muestras en el sistema portaobjetos y cubreobjetos y se dispersaron con la ayuda de un borrador-goma con golpes suaves. Finalmente se llevaron las muestras al microscopio y se capturaron las imágenes para el conteo de células en mitosis y células totales.

3.2.3.1.5. Ensayo *In vitro* en células cancerígenas

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron en colaboración con la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), empleando líneas celulares humanas de cáncer cervicouterino (HeLa), próstata (PC-3), colon (RKO) y mama (T47-D). La evaluación tuvo el objetivo de determinar el efecto de las fracciones obtenidas de *I. fuscus* sobre la viabilidad celular, que se expresó como porcentaje con respecto al control de Doxorubicina.

Las cuatro líneas celulares fueron tratadas con las fracciones a una concentración final de 200 µg/mL, seleccionada para comparar los tratamientos de extracción y fraccionamiento. Se analizaron diez extractos correspondientes a las fracciones: metanol, metanol:cloroformo 7:3 y metanol:cloroformo 5:5 a partir de la biomasa húmeda con tratamiento de maceración; metanol, metanol:cloroformo 7:3 y metanol:cloroformo 5:5 a partir de la biomasa húmeda con tratamiento de ultrasonido; y finalmente

metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5 y metanol:cloroformo 3:7 a partir de la biomasa seca liofilizada con tratamiento de maceración y ultrasonido. Como control positivo se utilizó doxorubicina a 1.5 μ M, con el fin de validar la respuesta biológica del ensayo frente a un agente antineoplásico de referencia.

Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular respecto al control de Doxorubicina. Esta técnica permitió una evaluación cuantitativa de la respuesta celular y fue utilizada como criterio para la selección de las fracciones más bioactivas para el siguiente ensayo.

3.2.3.1.6. Modelo de membrana corioalantoidea

El modelo de membrana corioalantoidea se desarrolló empleando huevos fertilizados (criollos) bajo condiciones controladas con el objetivo de evaluar cualitativamente el efecto angiogénico de las fracciones bioactivas obtenidas de *I. fuscus*. Los huevos fueron incubados a una temperatura constante de 37.5°C durante ocho días, con la punta ancha del huevo hacia arriba (posición del saco respiratorio) y la punta pronunciada hacia abajo, sumado de movimiento constante sin volteo puesto que la punta ancha siempre debe mirar hacia arriba. En el día 8 de incubación, se debe verificar la viabilidad del embrión empleando un ovoscopio para identificar la presencia de vascularización e iniciar la preparación del modelo CAM *in ovo*.

Todas las manipulaciones se realizaron a temperatura ambiente para evitar un choque térmico y se utilizaron utensilios esterilizados. Sin voltear el huevo, se colocó povidona yodada para desinfectarlo cuidadosamente y se dejó secar por completo. Posteriormente se realizó una perforación en la punta inferior del huevo y con la ayuda de una jeringa sin aguja se extrajo cuidadosamente 1mL de albúmina, con el fin de reposicionar al embrión a la parte central del huevo. El orificio fue sellado utilizando Parafilm y cinta adhesiva. A continuación, se hizo un orificio en la parte superior (punta ancha), evitando tener contacto directo con la membrana que protege al sistema de vascularización. La superficie expuesta fue irrigada con solución

salina tamponada con fosfato (PBS) para facilitar la visualización de los vasos sanguíneos, identificando tanto las venas más prominentes como las de menor grosor. En la zona donde se localizaron vasos finos, se realizó un corte minúsculo y con la ayuda de pinzas se retiró cuidadosamente la membrana protectora del sistema vascular. Finalmente, la ventana fue cubierta con Parafilm y el huevo se reincubó durante 24 horas adicionales, con el objetivo de verificar que el embrión se encontrara en condiciones óptimas previo a la aplicación de los tratamientos.

En el día 9 de incubación, se confirmó la viabilidad del embrión mediante la observación de movimiento y/o latidos. Para los ensayos se prepararon soluciones a una concentración de 50 ppm en solución PBS, utilizando las fracciones más bioactivas de *Isostichopus fuscus*, seleccionadas con base en los resultados obtenidos en los ensayos in vitro de citotoxicidad y en el modelo *Allium cepa*. Se trabajaron con las fracciones obtenidas a partir del sistema metanol:cloroformo 5:5, debido a su bioactividad y compatibilidad con el modelo CAM.

El diseño experimental se conformó por doce embriones, de los cuales: cuatro embriones fueron tratados con PBS como control negativo, cuatro embriones tratados con la fracción metanol:cloroformo 5:5 obtenida a partir de biomasa liofilizada con tratamiento de maceración y ultrasonido, y cuatro embriones tratados con la fracción metanol:cloroformo 5:5 obtenida a partir de biomasa húmeda mediante maceración. Las fracciones metanol:cloroformo 3:7 no fueron evaluadas, ya que requieren el uso de DMSO al 1 % para su disolución, solvente no compatible con embriones de ave debido a su alta sensibilidad.

Para la aplicación del tratamiento, se colocaron 5 µL de la solución a 50 ppm sobre un disco soporte, el cual fue dispuesto cuidadosamente sobre una vena secundaria prominente del embrión. Tras la aplicación, los huevos se reincubaron durante 24 horas, tiempo después del cual se verificó nuevamente la viabilidad del embrión.

La angiogénesis se evaluó de forma cualitativa, registrando la presencia o ausencia de modificaciones vasculares con respecto al día 0 del tratamiento y al control negativo, también se registraron los cambios en la densidad y cercanía de los vasos sanguíneos al área de exposición. Este modelo se justificó por su capacidad para evaluar procesos angiogénicos en un sistema altamente vascularizado y sensible.

3.2.3.1.7. Identificación de compuestos fenólicos mediante UHPLC

Las fracciones secas bioactivas se diluyeron hasta una concentración final de 200 ppm, se filtraron a través de membranas de 0.22 µm y se transfirieron a viales adecuados para su análisis cromatográfico. Las muestras se analizaron por triplicado mediante UHPLC en modo gradiente, utilizando una columna C18 Waters (2.1 × 100 mm, 1.7 µm de diámetro de partícula). La identificación y caracterización de compuestos polifenólicos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV con estándares de referencia comerciales, que permitieron la obtención de una curva de calibración con un R² mayor a 0.99. La detección se llevó a cabo mediante un detector UV-Vis empleando los canales de 280 nm, 307 nm y 367 nm, seleccionados de acuerdo con los máximos de absorción característicos de los polifenoles analizados. Los estándares utilizados incluyeron ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido siríngico, epicatequina, ácido p-cumárico, rutina, resveratrol, quercetina, naringenina y kaempferol.

3.2.3.2. Recursos

3.2.3.2.1. Equipos

- Balanza analítica Sartorius
- Balanza Mettler PE 2000
- Balanza Mettler Toledo AB204
- Estufa Barnstead

- Vortex Genie Scientific Industries
- Baño ultrasonido Fisher Scientific
- Rotoevaporador IKA HB-eco
- Liofilizador LABCONCO
- Refrigerador/Congelador General Electryc GSMT2LEB
- HPLC preparativo JASCO UV-4070

3.2.3.2.2. Materiales

- Hielo seco
- Columna Acquity UHPLC C18 1.7 μm 2.1*50mm
- Agua tipo 1
- Agua destilada
- Acetonitrilo, pureza \geq 99.9% grado HPLC.
- Metanol, pureza \geq 99.9% grado HPLC.
- Ácido trifluoroacético (TFA), pureza \geq 99.9% grado HPLC.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9%
- Cloroformo 99.8% grado reactivo
- Ácido clorhídrico al 1%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Etanol absolutos grado reactivo
- Hidróxido de sodio al 10%
- Hidróxido de sodio al 5%
- Amoniaco al 2%
- Solución de cloruro férrico al 5%
- Ácido acético glacial
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Hager
- Reactivo de Ixora
- Reactivo de Keller-Kilani
- Estándar Trolox
- Estándar DPPH

3.2.4. Análisis estadístico

3.2.4.1. Caracterización fitoquímica

Los resultados se registraron como datos cualitativos (presencia fuerte, moderada o negativo), por lo que se expusieron de manera descriptiva en tablas y no requirieron análisis estadístico inferencial.

3.2.4.2. Ensayo antioxidante DPPH

Los datos del ensayo DPPH se obtuvieron como absorbancia a 517 nm y se procesaron para calcular: (1) concentración equivalente de Trolox (μM Trolox) mediante interpolación en la curva de calibración, y (2) % Radical Scavenging en comparación con el control. Cada condición se midió por cuatuplicado, y para el procesamiento final se seleccionaron tres réplicas con menor desviación estándar, reportándose los resultados como media \pm DS.

3.2.4.3. Modelo vegetal *Allium cepa*

Para el análisis del crecimiento radicular, inicialmente se registraron 5–6 raicillas por cada modelo de *Allium cepa* que representaba un tratamiento y el blanco; sin embargo, para minimizar el efecto de valores aberrantes, se seleccionaron tres valores de crecimiento radicular por tratamiento, en base a los que presentaron la menor desviación estándar. Con estos valores, se compararon los tratamientos frente al control negativo (agua destilada).

Cuando se evaluaron las diferencias entre tratamientos se aplicó ANOVA de una vía (factor: tipo de fracción), y en los casos donde el ANOVA indicó diferencias significativas, se empleó la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples entre pares de tratamientos.

3.2.4.4. Ensayos in vitro en líneas celulares cancerígenas

Los ensayos se expresaron en porcentaje de viabilidad celular, comparado con el control positivo de Doxorubicina, y se reportaron como media \pm DS. Se compararon las respuestas de las cuatro líneas celulares: HeLa, PC-3, RKO y T47-D, entre las fracciones evaluadas.

Este ensayo fue desarrollado por la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

3.2.4.5. Modelo CAM

Debido a que la evaluación en el modelo CAM se basó en observaciones cualitativas como la presencia o ausencia de modificaciones vasculares, así como de la cercanía relativa de vasos en el área de exposición, no se aplicaron pruebas inferenciales paramétricas. Los resultados se analizaron de manera descriptiva, comparando los grupos experimentales frente al control negativo (PBS), y registrando las observaciones a las 48H de tratamiento en comparación al tiempo inicial.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de las fracciones por polaridad.

Con el fin de comparar el efecto del estado de la biomasa y del tratamiento de extracción sobre el rendimiento, se fraccionó *I. fuscus* con metanol y con mezclas metanol:cloroformo (M:C) en distintas proporciones, a partir de biomasa húmeda (maceración; ultrasonido) y biomasa seca (maceración + ultrasonido). A continuación, se resumen los rendimientos obtenidos y los patrones por polaridad observados.

Se empleó un peso inicial de biomasa húmeda de 750g para el tratamiento por maceración y la misma cantidad de biomasa para el tratamiento de ultrasonido. La biomasa húmeda presentó un alto contenido de humedad (92.4%), lo que correspondía a un peso corregido de 56.775 g para cada tratamiento, mientras que la biomasa seca mediante liofilización (55.8g) poseía un contenido de humedad bajo (2%) con un valor inicial corregido de 54.684g. El fraccionamiento por polaridad se llevó a cabo empleando metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5 y metanol:cloroformo 3:7.

El metanol tuvo un mayor rendimiento de forma general en todos los fraccionamientos, el cual extrae metabolitos polares. Los rendimientos fueron 31.45%, 28.54 y 27.58% para las fracciones metanólicas de biomasa húmeda con tratamiento maceración (fracción 1.1), biomasa húmeda con tratamiento ultrasonido (fracción 2.1) y biomasa seca con tratamiento combinado (fracción 3.1) respectivamente. Estos valores al encontrarse cercanos, en comparación a los demás resultados obtenidos, sugieren que ni el tipo de biomasa o el tratamiento poseen un efecto significativo sobre el rendimiento general de la obtención de la fracción metanólica como se puede evidenciar en los siguientes casos.

Por otro lado, las fracciones obtenidas mediante diferentes proporciones de M:C exhibieron un comportamiento diferente. En biomasa húmeda, los rendimientos oscilaron entre 0.23% y 5.56%, siendo la proporción M:C 7:3 con tratamiento por ultrasonido (fracción 2.2) la que mostró el mayor rendimiento. En la biomasa seca se obtuvo el mayor rendimiento con respecto a la proporción M:C 7:3 (fracción 3.2) lo que sugiere que el efecto de liofilización, donde se trabaja con presión reducida, sumado al ultrasonido facilitó la ruptura de las estructuras de la matriz y la liberación de compuestos intermedicamente polares, evidenciado en un rendimiento de 20.32%.

De forma general se obtuvo mayor cantidad de masa en las fracciones intermedias M:C 5:5 y 3:7 cuando se empleó biomasa liofilizada y la combinación de tratamientos, en comparación con la biomasa húmeda. En conjunto se puede observar que el solvente empleado en el fraccionamiento es el principal factor que determinó el rendimiento.

Tabla 4. 1 Rendimientos obtenidos a partir del diseño experimental de *Isostichopus fuscus*.

Biomasa	Peso inicial (g)	Peso inicial corregido (g)	Tratamiento	Solventes	Peso de fracciones (g)	Rendimiento (%)
Húmeda	750	56.775	Maceración	M	17.8574	31.45%
				M:C 7:3	1.4134	2.49%
				M:C 5:5	1.2821	2.26%
				M:C 3:7	0.1703	0.30%
	750	56.775	Ultrasonido	M	16.2020	28.54%
				M:C 7:3	3.1591	5.56%
				M:C 5:5	0.8946	1.58%
				M:C 3:7	0.1325	0.23%
Seca	55.8	54.684	Maceración + Ultrasonido	M	15.0815	27.58%
				M:C 7:3	11.1097	20.32%
				M:C 5:5	1.3671	2.50%
				M:C 3:7	0.5914	1.08%

En el fraccionamiento, el metanol mostró los mayores rendimientos, con valores de 27.58% a 31.45%, en los tres diseños experimentales. Las demás proporciones de solventes obtuvieron rendimientos en descenso correspondientes a 20.32% a 2.49% para M:C 3:7, 1.58 a 2.50% para M:C 5:5 y finalmente 1.08% a 0.23% para la M:C 3:7. Ghaffar & Perveen (2025) demostraron que la elección de solventes influencia significativamente ($p < 0.05$) tanto en el rendimiento como en el contenido fenólico y propiedades antioxidantes, los autores concluyeron que el agua y el metanol (solventes polares) son los más efectivos para alcanzar altas tasas de rendimiento en masa. Este comportamiento concuerda con lo reportado en la revisión bibliográfica de Lee et al. (2024), quienes indican que el metanol presenta mayor fuerza solvente y un rango de solubilidad más amplio en comparación a otros solventes, incluso del mismo rango de polaridad como etanol y agua. Spigno et al. (2007) indican que la elevada capacidad del metanol para formar enlaces de hidrógeno tanto como donador como receptor, favorece la obtención de compuestos polares y semipolares como flavonoides, terpenoides, compuestos fenólicos y vitaminas.

En revisiones generales de pepinos de mar, se describe que la matriz (cuerpo, intestinos o gónadas) contiene distintas clases de metabolitos y macromoléculas complejas que son extractables según el tipo de solventes empleados, lo cual influye en el rendimiento del extracto y en la bioactividad. Bordbar et al. (2011) mencionan, a partir de su revisión, que estas especies poseen metabolitos altamente polares, extraídos con agua, metanol o buffer acuoso, como aminoácidos, péptidos, polisacáridos sulfatados y proteínas estructurales. Asimismo, describen la presencia de metabolitos polares a semipolares, implementando sistemas de metanol y etanol, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y triterpenos. Finalmente se reportan metabolitos semipolares a apolares, combinación de solventes menos polares, como lípidos, esteroides y glicoesfingolípidicos.

Estos antecedentes respaldan que el sistema de solventes determina el tipo y la diversidad de metabolitos recuperados, de modo que solventes de alta polaridad como el metanol, promueva la obtención de altos rendimientos totales debido a su amplio rango más que la selectividad de un grupo metabólico en específico. Mientras que con respecto a las mezclas M:C que obtuvieron rendimientos menores y más variables en biomasa húmeda, pero aumentaron de forma marcada en biomasa seca a partir del tratamiento combinado, se puede analizar desde el estado de la biomasa (húmeda o seca) y el tratamiento implementado. Nowak & Jakubczyk (2020) mencionan que la liofilización remueve el agua de la matriz y la vuelve más porosa, lo que facilita la penetración del solvente y a su vez la liberación de compuestos que se puedan encontrar retenidos. Este punto explicaría el aumento de los rendimientos máxicos entre los dos estados de la biomasa. (Kadam et al., 2015) indican que el ultrasonido puede mejorar la extracción al promover la ruptura de la matriz, mejorando la transferencia de masa, el ultrasonido se ha reportado como un mecanismo para aumentar rendimientos de compuestos bioactivos en matrices marinas.

El solvente es el factor dominante en donde el metanol recuperó mayor cantidad de masa, mientras que la liofilización sumada a un tratamiento combinado, pero con mayor énfasis en ultrasonido, favoreció la recuperación de mayor porcentaje de fracciones intermedias.

4.2 Caracterización las fracciones

Los resultados de la caracterización fitoquímica de las fracciones obtenidas a partir de la biomasa húmeda, bajo los tratamientos de maceración (Mace) y ultrasonido (Ultra), evidenciaron un perfil fitoquímico similar entre ambos tratamientos (Tabla 4.2). En ninguna de las fracciones analizadas, independientemente de su polaridad, se detectó la presencia de alcaloides, puesto que todas las pruebas realizadas (Dragendorff, Mayer, Wagner y Hager) mostraron resultados negativos. De igual manera, no se evidenció la presencia de esteroides, glucósidos antraquinónicos ni glucósidos cardiotónicos, lo que sugiere la ausencia de estos tipos de metabolitos secundarios en las fracciones provenientes de biomasa húmeda.

Al comparar estos resultados con los obtenidos a partir de la biomasa seca (Tabla 4.3), se observa un comportamiento similar, puesto que tampoco se detectó la presencia de alcaloides, esteroides, glucósidos antraquinónicos ni glucósidos cardiotónicos en ninguna de las fracciones provenientes de este tercer diseño experimental. Estos resultados cualitativos indicarían que el tipo de biomasa, húmeda o seca, no influye en la presencia de estos grupos de metabolitos secundarios.

Por otro lado, se exhibió una presencia fuerte de compuestos fenólicos (++) en todas las fracciones evaluadas, en base a los resultados cualitativos provenientes de las pruebas de NaOH ácido, cloruro férrico e Ixora. Dicha presencia persistió en los tipos de biomasa, tratamientos y en los diferentes grados de polaridad de las fracciones, posicionando a los fenoles como los metabolitos principales presentes en *I. fuscus*.

Así mismo, los terpenoides estuvieron presentes en las fracciones obtenidas de forma moderada (+), observándose una mayor intensidad (++) en la proporción de solventes M:C 5:5 para ambos tipos de biomasa y tratamientos. Este comportamiento fue consistente en ambos tipos de biomasa, lo que sugiere que un sistema de extracción y fraccionamiento de polaridad intermedia favorece la obtención de este grupo de metabolitos.

En el caso especial de las saponinas mediante la prueba de la espuma, se observó una respuesta positiva con intensidad baja en las fracciones obtenidas a partir de biomasa seca, de las cuales la fracción metanólica tuvo mayor persistencia en la espuma, llegando a ser moderada (+). La formación de espuma fue limitada y de escasa estabilidad, lo que sugiere una presencia baja de compuestos con actividad tensioactiva en las fracciones analizadas. Las fracciones provenientes de biomasa húmeda presentaron una respuesta menos evidente e incluso ausente, como en las fracciones más apolares, mostrando fracciones con apariencia más cristalina. La mayor señal observada en la biomasa seca se puede atribuir al proceso de liofilización, el cual favorece la concentración y disponibilidad de compuestos anfipáticos, evidenciado en la textura lipídica (presencia de grasas) de la fracción metanólica proveniente de la biomasa seca, en comparación a la textura cristalina asociada a presencia de sales de las fracciones de biomasa húmeda. Estos resultados son consistentes con una detección cualitativa limitada de saponinas en las fracciones de *I. fuscus* y sugieren que el proceso de secado de la biomasa podría favorecer la concentración o extracción de este tipo de metabolitos secundarios.

De forma general, los resultados de la caracterización fitoquímica indican que las fracciones de *I. fuscus* se encuentran dominadas principalmente por compuestos fenólicos, seguidos terpenoides, el cual depende de la polaridad y por último de saponinas de forma limitada. Los demás grupos de metabolitos secundarios no fueron evidenciados en los ensayos cualitativos. Con la finalidad de profundizar el grupo de metabolitos con mayor presencia en las fracciones y acorde a la disponibilidad de recursos, se realizó un ensayo de DPPH.

Tabla 4. 2 Resultados de la caracterización fitoquímica en las fracciones provenientes de biomasa húmeda con dos tratamientos distintos: maceración (Mace) y ultrasonido (Ultra). Donde “++” indica presencia fuerte, “+” indica presencia moderada y “-” ausencia de los compuestos.

Compuestos	Método	M		M:C 7:3		M:C 5:5		M:C 3:7	
		Mace	Ultra	Mace	Ultra	Mace	Ultra	Mace	Ultra
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hager	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenoles	NaOH ácido	++	++	++	++	++	++	++	++
	FeCl3	++	++	++	++	++	++	++	++
	Ixora	++	++	++	++	++	++	++	++
Terpenoides	Salwoski	+	+	+	+	++	++	+	+
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides	Lieberman Burchard	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucósidos antraquinónicos	NaOH y Amonio	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucósidos cardiotónicos	Keller Kilani	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4. 3 Resultados de la caracterización fitoquímica en las fracciones provenientes de biomasa seca con dos tratamientos distintos.

Compuestos	Método	M	M:C 7:3	M:C 5:5	M:C 3:7
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-
	Hager	-	-	-	-
Fenoles	NaOH ácido	++	++	++	++
	FeCl ₃	++	++	++	++
	Ixora	++	++	++	++
Terpenoides	Salwoski	+	+	++	+
Saponinas	Prueba de la espuma	++	+	+	+
Esteroides	Lieberman Burchard	-	-	-	-
Glucósidos antraquinónicos	NaOH y Amonio	-	-	-	-
Glucósidos cardiotónicos	Keller Kilani	-	-	-	-

Ensayo de DPPH

La capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de *I. fuscus* fue evaluada mediante el ensayo DPPH, cuantificando la capacidad de captura de radicales libres y expresando los resultados como porcentaje de inhibición (% Radical Scavenging) y como concentración equivalente de Trolox (μM). Para el desarrollo del ensayo, se empleó una curva de calibración a partir de la implementación de Trolox como estándar, la cual obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 0.99 ($R^2 = 0.9931$), asegurando una adecuada linealidad y confiabilidad del método (Figura 4.1).

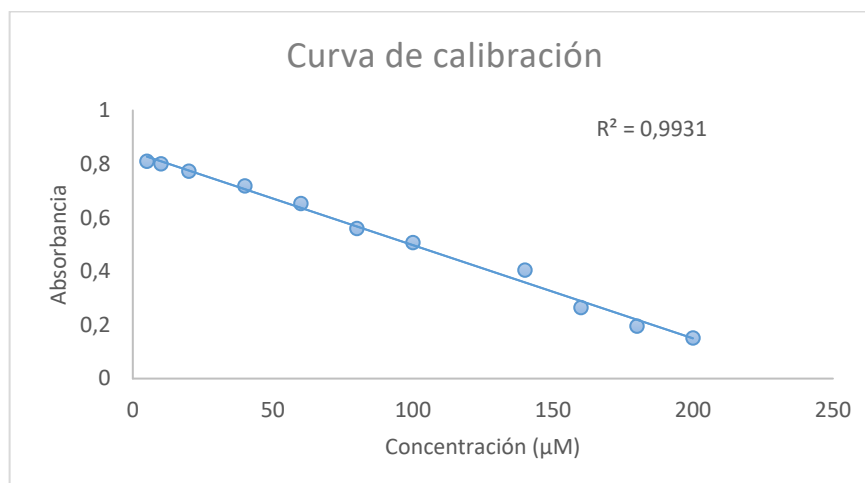


Figura 4. 1 Curva de calibración a partir de Trolox para el desarrollo del ensayo de DPPH.

Los resultados obtenidos en la tabla 4.4 indicaron que la capacidad antioxidante de las fracciones varió en función del tipo de biomasa, tratamiento de extracción y proporción de solventes utilizados. Las fracciones provenientes de biomasa húmeda exhibieron un comportamiento similar entre sí, sugiriendo que el tratamiento de maceración y ultrasonido no influye significativamente. Sin embargo, si se evidenció una marcada diferencia en las capacidades antioxidantes en base a la polaridad de las fracciones, demostrando que las fracciones de polaridad intermedia M:C 5:5 obtuvieron el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH (21%), correspondiente a una concentración equivalente de 47,810 μM de Trolox, evidenciando la mayor capacidad antioxidante entre las fracciones evaluadas.

En la biomasa húmeda, las fracciones de polaridad intermedia alta M:C 7:3 mostraron valores intermedios de actividad antioxidante, entre 13% y 14%, mientras que las fracciones obtenidas empleando a partir de metanol presentaron los valores más bajos de actividad antioxidante, con porcentajes de inhibición comprendidos entre 7% y 8%, independientemente del tratamiento de extracción empleado. Por motivos de cantidad de muestra no se realizó los ensayos en las fracciones menos polares como M:C 3:7 por lo que no fue posible evaluar su comportamiento.

En el caso de las fracciones provenientes de la biomasa liofilizada, obtenidas mediante ultrasonido, se registró una menor capacidad antioxidante en comparación con la biomasa húmeda, con porcentajes que oscilaban entre 5% y 8% con respecto a la captura de radicales libres. La fracción M:C 7:3 presentó una respuesta ligeramente superior dentro de este grupo. Estos resultados sugieren que el estado físico de la biomasa y el tratamiento previo pueden influir en la presencia de los compuestos asociados a la actividad antioxidante.

Los resultados concuerdan con la información obtenida a partir de la caracterización fitoquímica, en la cual se evidenció una marcada presencia de compuestos fenólicos en todas las fracciones. Estos hallazgos son respaldados por el ensayo DPPH, el cual indica que, a pesar de la presencia generalizada de compuestos fenólicos, las fracciones obtenidas con solventes de polaridad intermedia M:C 5:5 presentan la mayor capacidad de captura de radicales libres. Con base en ambos ensayos, se evidencia que las fracciones de polaridad intermedia provenientes de biomasa húmeda poseen una mayor capacidad antioxidante, así como una presencia significativa de terpenoides.

Tabla 4. 4 Resultados de los ensayos de DPPH.

Biomasa	Tratamiento	Proporción	Promedio de absorbancia	Concentración final (μM Trolox)	% Radical Scavenging
Húmeda	Mace	M	0,749	17,619	8%
		M:C 7:3	0,699	32,000	14%
		M:C 5:5	0,638	49,333	21%
	Ultra	M	0,753	16,381	7%
		M:C 7:3	0,704	30,476	13%
		M:C 5:5	0,643	47,810	21%
Seca	Mezcla	M	0,747	18,095	8%
		M:C 7:3	0,752	16,857	7%
		M:C 5:5	0,770	11,714	5%

Perfil fitoquímico y actividad antioxidante (DPPH): análisis y contraste con estudios publicados.

La caracterización fitoquímica de *I. fuscus* evidenció una presencia fuerte de fenoles (++) en todas las fracciones, independientemente del tipo de biomasa y del tratamiento. Este hallazgo concuerda con estudios que reportan que los pepinos de mar contienen una fracción fenólica relevante asociada a efectos antioxidantes y citoprotectoras (Ayubi et al., 2024). Asimismo, la presencia de terpenoides demostró dependencia de la polaridad del sistema de solventes, donde la presencia fuerte correspondió a las fracciones de polaridad intermedia (M:C 5:5), mientras que las saponinas fueron detectadas principalmente en la biomasa seca, con mayor presencia en la fracción metanólica, lo que coincide con los estudios que indican que los procesos de secado, como la liofilización pueden favorecer a la concentración y liberación de metabolitos anfipáticos en matrices marinas (Bordbar et al., 2011; Olivera-Castillo et al., 2020).

Los pepinos de mar son reconocidos por su contenido fenólico, los cuales han sido asociados a una elevada capacidad antioxidante. Por ejemplo, Althunibat et al. (2009) compararon el potencial antioxidante, mediante el ensayo DPPH, entre tres especies de pepinos de mar oriundos de Malasya correspondientes a *Holothuria leucospilota*, *Holothuria scabra* y *Stichopus*

chloronotus. En dicho estudio, los autores evaluaron un sistema de solvente acuoso frente a uno orgánico, observando que los extractos acuosos presentaron la mayor capacidad de eliminación del radical DPPH, siendo *S.chloronotus* la especie con el valor más alto (80.58%) en comparación con las especies *H. scabra* (77.46%) y *H. leucospilota* (64.03%).

La revisión bibliográfica realizada por Hossain, Yeo, et al. (2022) ha reportado que distintas partes del cuerpo de pepinos de mar, como el cuerpo, tentáculos, gónadas y vísceras, contienen cantidades significativas de compuestos fenólicos y en diferentes proporciones. Los autores mencionan que la distribución de compuestos fenólicos y otros metabolitos antioxidantes dependen de la especie, tejido y el sistema de solventes empleado, lo que puede generar variaciones en la fracción que exhibe mayor actividad antioxidante. En el caso de *I. fuscus*, la elevada actividad captadora de radicales que se observó en las fracciones de polaridad intermedia M:C 5:5 puede estar asociada a la coexistencia de compuestos fenólicos con otros metabolitos de la misma polaridad que podrían contribuir de manera sinérgica a la actividad antioxidante.

Cabe indicar que el ensayo de DPPH responde ante compuestos con capacidad para neutralizar radicales libres mediante la donación de electrones y/o átomos de hidrógeno, mecanismo que depende de la estructura del antioxidante (Brand-Williams et al., 1995; Prior et al., 2005). Los metabolitos como los compuestos fenólicos poseen una elevada capacidad captadora de radicales debido a la presencia de grupos hidroxilo y sistemas conjugados que son capaces de neutralizar los radicales libres. En este contexto y de forma más explícita, la mayor actividad DPPH que se observa en las fracciones de polaridad intermedia provenientes de biomasa húmeda de *I.fuscus* puede explicarse por la concentración por polaridad de metabolitos medianamente polares con capacidad donadora de electrones como compuesto anfipáticos, los cuales se obtienen de sistemas de solventes con polaridad intermedia (Abdel-Rahman et al., 2019b). En la revisión de Gutiérrez-del-Río et al. (2021) donde se analizan terpenoides y

polifenoles como antioxidantes naturales para la preservación de alimentos, se detalla que tanto los terpenoides como los polifenoles tienen la capacidad de captar radicales libres, secuestrar metales prooxidantes que aceleran la oxidación y disminuir la formación de productos rancios en alimentos. Estos artículos refuerzan la idea de que la mayor actividad observada en las fracciones intermedia se debe a la concentración y variedad de antioxidantes naturales que reaccionaron en el ensayo de DPPH.

La diferencia de valores entre la biomasa húmeda y seca se puede deber por las diferencias reales de composición tras procesamiento como la liofilización, en la cual hay un descenso de presión y al efecto mecánico del ultrasonido. En la biomasa liofilizada se observó un aumento del rendimiento en ciertas fracciones, lo cual sugiere una mayor eficiencia de extracción y co-extracción de metabolito. Sin embargo, la actividad antioxidante medida en el ensayo DPPH fue menor que la observada en la biomasa húmeda. Este comportamiento puede explicarse en primer lugar por un efecto de dilución, donde el incremento de la masa extraída refleja la presencia de compuestos adicionales que no contribuyen significativamente a la captura del radical DPPH, disminuyendo la concentración antioxidante por unidad de masa, lo que influye más que el rendimiento másico total (Bordbar et al., 2011; Hossain, Dave, et al., 2022).

Como segundo punto a considerar, Coşkun et al. (2024) indican que la liofilización puede afectar de manera variable al contenido fenólico y consecuentemente, a la actividad antioxidante según la matriz y las condiciones del proceso, mientras que, a pesar de que la extracción asistida por ultrasonido puede incrementar el rendimiento másico, también puede modificar la estabilidad de compuestos sensibles. Por ejemplo, Macura et al. (2019) compararon las técnicas de liofilizado y secado por aire con la finalidad de deshidratar zanahorias moradas. A pesar de que la liofilización no produjo cambios en el contenido de carotenoides y antocianinas, en comparación al secado por aire, si redujo el contenido de los compuestos fenólicos totales de las zanahorias moradas. Hu et al. (2024), concluyeron

que en algunos casos la liofilización puede no ser la mejor técnica para preservar las propiedades bioactivas en comparación al secado por microondas que incrementó la retención de componente bioactivos.

En tercer lugar, también hay la posibilidad de que haya una coexistencia de múltiples metabolitos y estos generen interacciones entre sí, como efectos sinérgicos o antagónicos, lo que puede repercutir en los resultados en comparación a fracciones que contengan la misma polaridad. La presencia simultánea de compuestos fenólicos junto con terpenoides, saponinas y otros metabolitos pueden generar interacciones químicas que interfieran en la actividad antioxidante global. Szerlauth et al. (2023) investigaron el comportamiento de dos antioxidantes moleculares: galato y NADH. El galato se caracteriza por tener una actividad antioxidante fuerte mientras que el NADH una actividad moderada, pero cuando se unen en determinadas proporciones, generan un efecto antioxidante fuerte (sinergia) que simplemente la suma de ambos de forma individual. Sin embargo, determinadas combinaciones pueden generar efectos antagónicos. Hidalgo et al. (2010) compararon la actividad antioxidante de flavonoides individuales y cuando se mezclan en pares, y demostraron que determinados pares de flavonoides redujeron la actividad antioxidante esperada, lo que indicó un efecto antagonista, es decir una menor capacidad de capturar radicales DPPH en comparación a los compuestos por separados. Por lo tanto, matrices complejas a pueden mostrar menor actividad antioxidante.

4.3 Ensayos de bioactividad en modelos *in vivo* e *in vitro*

4.3.1 Modelo de crecimiento radicular *Allium cepa*

Los resultados del modelo *Allium cepa* (Figura 4.2-4.4) evidencian un incremento de la tasa de crecimiento radicular a lo largo del tiempo de exposición (0 a 72h) para los tratamientos evaluados. Este comportamiento sugiere que, a mayor tiempo de exposición, mayor es el crecimiento promedio radicular y que por lo tanto ninguna de las fracciones inhibió el crecimiento radicular ni tuvo efectos citotóxicos. Por el contrario, varias

fracciones del extracto de *I. fuscus* mostraron un efecto estimulante marcado, promoviendo la elongación radicular y sugiriendo un incremento en la actividad mitótica que se acentúa a las 72h de exposición.

En la Figura 4.2 se muestran los resultados del primer diseño experimental, correspondiente a los modelos tratados con fracciones provenientes de biomasa húmeda, tratamiento de maceración y combinación de solventes: metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5 y metanol:cloroformo 3:7 (tratamientos 1.1 M, 1.2 M:C, 1.3 M:C y 1.4 M:C), se observó un comportamiento diferente entre las fracciones evaluadas. El tratamiento 1.4 M:C presentó los mayores valores de crecimiento radicular promedio, alcanzando hasta 5.5 veces más crecimiento que el control negativo a las 72h. Asimismo, este tratamiento exhibió una pendiente más pronunciada de 0.0379 cm/h (Tabla 4.5), lo cual indica una mayor velocidad de elongación radicular y un efecto estimulante evidente sobre el crecimiento celular. Los tratamientos 1.3 M:C y 1.1 M mostraron un comportamiento estimulante de intensidad media a alta desde el inicio hasta las 72h de duración del ensayo. La pendiente del tratamiento 1.3 M:C (0.0304 cm/h) superó ligeramente al tratamiento 1.1M (0.0271 cm/h) y ambos alcanzaron valores de crecimiento promedio de hasta 4 veces mayores que el control, lo que sugiere una actividad biológica moderada a alta. Sin embargo, el tratamiento 1.2 M:C presentó el menor efecto estimulante, siendo 2 veces mayor al control negativo a las 72h. Este resultado indica una menor capacidad estimulante en comparación a las demás fracciones. Los resultados del primer diseño experimental sugieren que la fracción 1.4 M:C posee o hay una mayor concentración de compuestos con mayor potencial para estimular la elongación radicular y la actividad mitótica, seguida por las fracciones 1.3 M:C y 1.1 M.

En la Figura 4.3 se muestran los resultados del segundo diseño experimental, correspondiente a las evaluaciones de las fracciones provenientes de biomasa húmeda, tratamiento de ultrasonido y combinación de solventes: metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5 y

metanol:cloroformo 3:7 (tratamientos 2.1 M, 2.2 M:C, 2.3 M:C y 2.4 M:C), se evidenció nuevamente un efecto estimulante del crecimiento radicular. La fracción 2.4 M:C promovió un crecimiento radicular promedio hasta 5 veces superior que el control negativo a las 72h, y a su vez se obtuvo la mayor tasa de crecimiento igual a 0.0342 cm/h en comparación a los demás tratamientos y el control (0.0067 cm/h), lo que sugiere un marcado efecto estimulante de crecimiento radicular. El tratamiento 2.3 M:C mostró un crecimiento promedio aproximadamente 4 veces mayor al control negativo, con un patrón de crecimiento similar al observado en el tratamiento 2.1 M. Por otro lado, el tratamiento 2.2 M:C obtuvo el menor efecto estimulante con una pendiente de 0.0125 cm/h en comparación a los demás tratamientos.

La Figura 4.4 representa los resultados del tercer diseño experimental en *Allium cepa* con fracciones provenientes de biomasa seca, tratamiento combinado y combinación de solventes: metanol, metanol:cloroformo 7:3, metanol:cloroformo 5:5 y metanol:cloroformo 3:7 (tratamientos 3.1 M, 3.2 M:C, 3.3 M:C y 3.4 M:C). En este grupo experimental se observó el mayor efecto estimulante de los 3 diseños experimentales. La fracción 3.4 M:C promovió 6 veces más el crecimiento promedio radicular a las 72h en comparación al control negativo. Adicionalmente, el tratamiento obtuvo la mayor pendiente con un valor de 0.0421 cm/h, lo que sugiere una mayor actividad biológica asociada a esta fracción. Los tratamientos 3.3 M:C y 3.2 M:C también mostraron un efecto estimulante importante, con valores de crecimiento promedio aproximadamente 5 veces superiores al control con pendientes similares entre sí (0.0329 cm/h) y elevadas con respecto al control negativo que reflejan la presencia de actividad biológica significativa. A pesar de que en el tratamiento 3.1 M mostró aumento en el crecimiento promedio radicular, este fue el más bajo del diseño e incluso cercano al control negativo, lo que sugiera una menor capacidad estimulante.

Por otro lado, los tratamientos correspondientes a metanol puro y algunas combinaciones M:C 7:3 presentaron valores de crecimiento más bajos, en

comparación al control, lo que indica una menor actividad biológica bajo las condiciones evaluadas.

Estos resultados evidencian que las fracciones obtenidas con sistemas solventes de polaridad intermedia a baja como M:C 5:5 y M:C 3:7 y, son las más bioactivas en el modelo *Allium cepa*, promoviendo de manera significativa el crecimiento radicular y con ausencia de genotoxicidad (Figura 4.6). Este efecto sugiere la presencia de compuestos bioactivos con capacidad estimulante del crecimiento celular, de acuerdo con los resultados fitoquímicos previamente obtenidos.

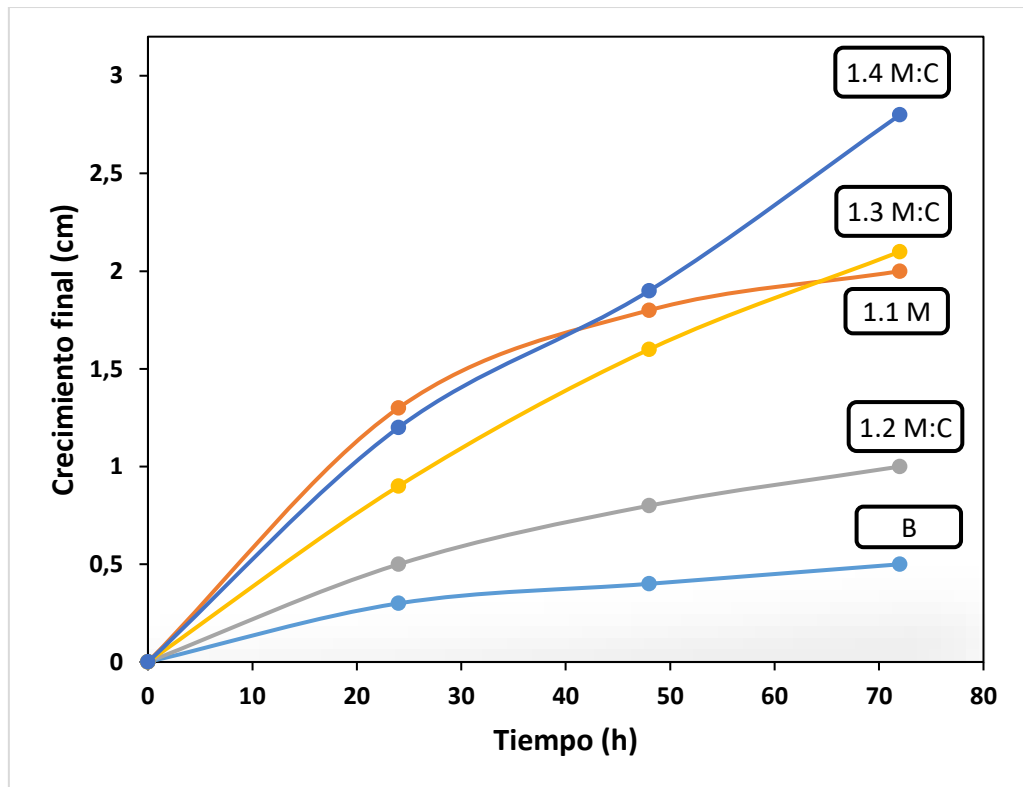


Figura 4. 2 Tasa de crecimiento radicular (cm/h) del modelo *Allium cepa* para las fracciones provenientes de biomasa húmeda, tratamiento de maceración y combinación de solventes: metanol (tratamiento 1.1M), metanol:cloroformo 7:3 (tratamiento 1.2 M:C), metanol:cloroformo 5:5 (tratamiento 1.3 M:C) y metanol:cloroformo 3:7 (tratamiento 1.4 M:C).

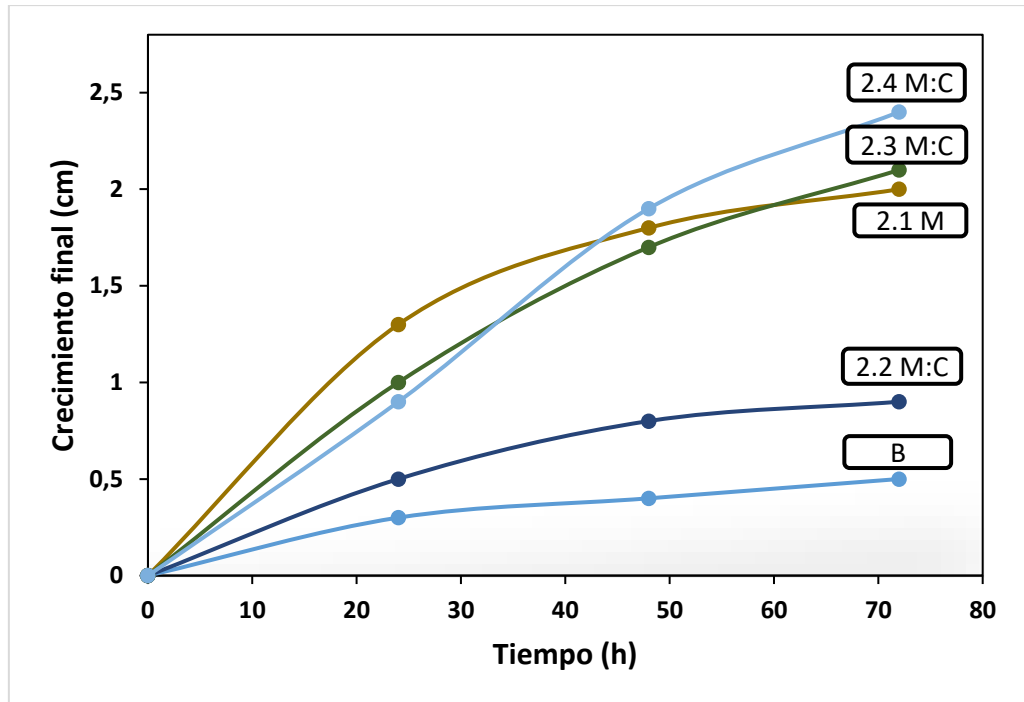


Figura 4. 3 Tasa de crecimiento radicular (cm/h) del modelo *Allium cepa* para las fracciones provenientes de biomasa húmeda, tratamiento de ultrasonido y combinación de solventes: metanol (tratamiento 2.1M), metanol:cloroformo 7:3 (tratamiento 2.2 M:C), metanol:cloroformo 5:5 (tratamiento 2.3 M:C) y metanol:cloroformo 3:7(tratamiento 2.4 M:C).

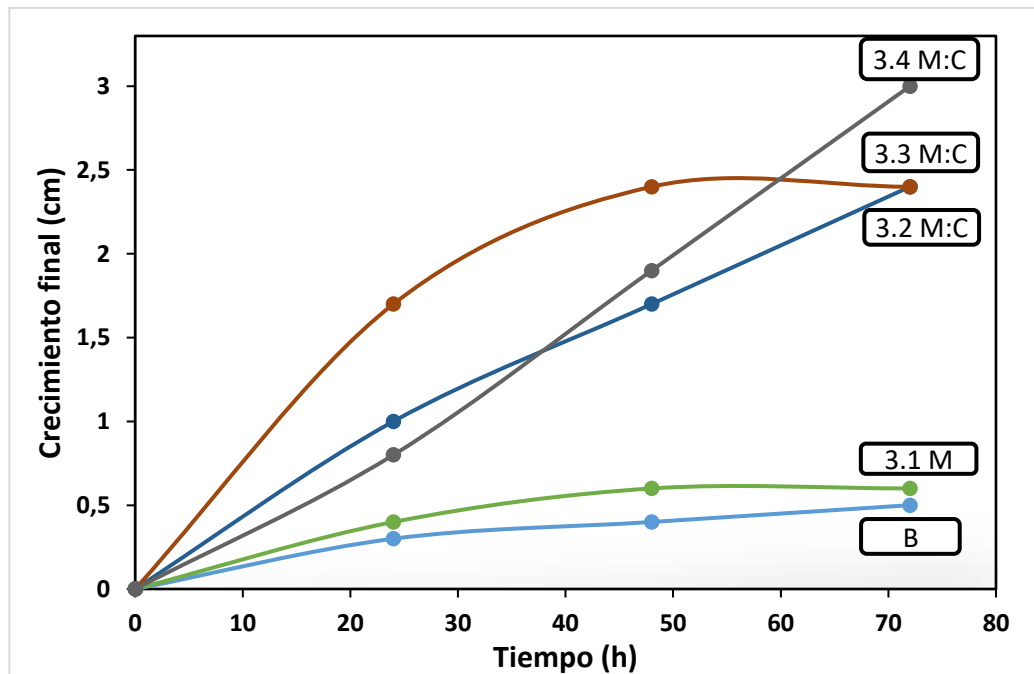


Figura 4. 4 Tasa de crecimiento radicular (cm/h) del modelo *Allium cepa* para las fracciones provenientes de biomasa seca mediante liofilización, tratamiento combinado de maceración-ultrasonido y combinación de solventes: metanol (tratamiento 3.1M), metanol:cloroformo 7:3 (tratamiento 3.2 M:C), metanol:cloroformo 5:5 (tratamiento 3.3 M:C) y metanol:cloroformo 3:7(tratamiento 3.4 M:C).

Tabla 4. 5 Tasas de crecimiento (cm/h) resultantes de los tres diseños de experimentos

Tratamiento	Fracción	Tasa de crecimiento (cm/h)
1.1 M	M	0.02708
1.2 M:C	M:C 7:3	0.01375
1.3 M:C	M:C 5:5	0.02917
1.4 M:C	M:C 3:7	0.03792
2.1 M	M	0.02708
2.2 M:C	M:C 7:3	0.01250
2.3 M:C	M:C 5:5	0.02916
2.4 M:C	M:C 3:7	0.03416
3.1 M	M	0.00833
3.2 M:C	M:C 7:3	0.03292
3.3 M:C	M:C 5:5	0.03292
3.4 M:C	M:C 3:7	0.04208
Blanco		0.00667

El análisis estadístico de la tasa de crecimiento radicular promedio (Figura 4.5), realizado mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey, confirmó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). La agrupación de medias a través de letras (a, b y c) permitió discriminar los tratamientos en base al efecto estimulante sobre el crecimiento radicular en el modelo. Los tratamientos se ubicaron en categorías como “a” y “b” mientras que el control negativo en la categoría “c”, manteniéndose como referencia basal del crecimiento natural del modelo.

Los tratamientos 1.1 M, 1.3 M:C, 1.4 M:C, 3.2 M:C, 3.3 M:C y 3.4 M:C se agruparon en la categoría “a”, indicando que promovieron una tasa de crecimiento radicular significativamente mayor que el control negativo. Dentro de este grupo, el tratamiento 3.4 M:C presentó el valor de crecimiento promedio radicular más elevado, seguido por 1.4 M:C, lo que coincide con las pendientes más pronunciadas observadas en las Figuras 4.2 y 4.4. Este patrón sugiere que las fracciones obtenidas mediante un fraccionamiento de polaridad intermedia a baja, como la proporción M:C 5:5 y 3:7 poseen o

acumulan mayor cantidad de compuestos con capacidad bioestimulante, evidenciado por promover significativamente del crecimiento radicular.

Las fracciones 1.2 M:C, 2.1 M, 2.2 M:C, 2.3 M:C, 2.4 M:C y 3.1 M se agruparon en la categoría “b”, lo que indica un crecimiento radicular significativamente mayor que el control, pero con menor efecto que la categoría “a” (fracciones más bioactivas), lo que representa un efecto estimulante moderado. Este comportamiento puede interpretarse como una respuesta positiva, aunque limitada, posiblemente asociada a una menor concentración de compuestos activos.

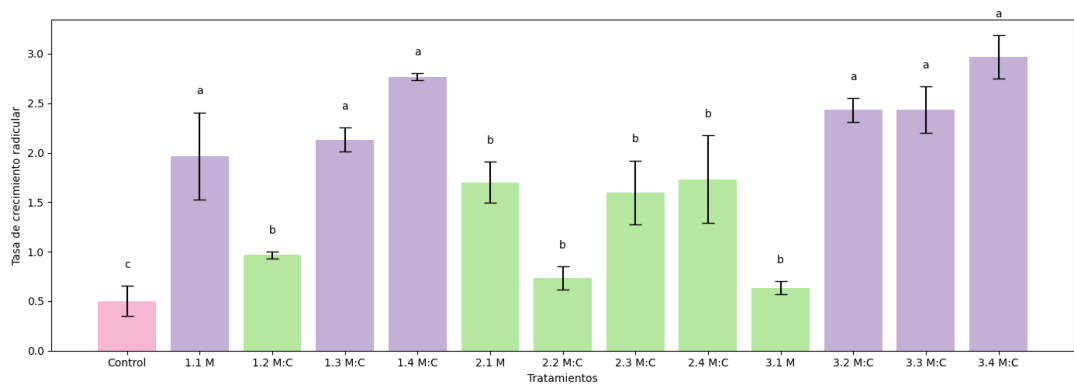


Figura 4. 5 Resultados de crecimiento radicular en *Allium cepa* con análisis estadístico.

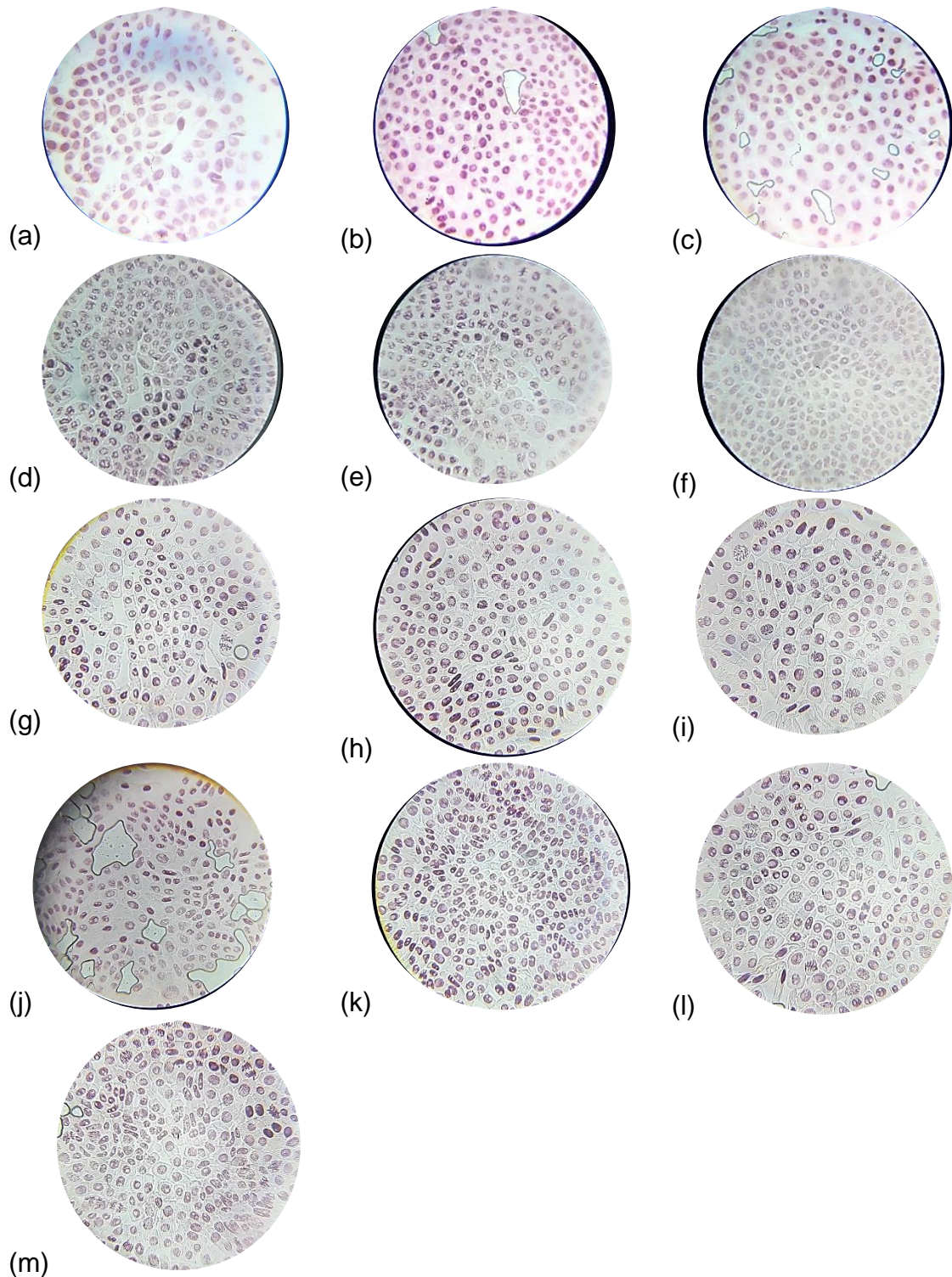


Figura 4. 6 Resultados mitóticos a 50ppm del modelo *Allium cepa* para: blanco (a), tratamiento 1.1 M (b), 1.2 M:C (c), 1.3 M:C (d), 1.4 M:C (e), 2.1 M (f), 2.2 M:C (g), 2.3 M:C (h), 2.4 M:C (i), 3.1 M (j), 3.2 M:C (k), 3.3 M:C (l), 3.4 M:C (m)

4.3.2 Viabilidad celular en líneas cancerígenas

Los resultados de viabilidad celular en las 4 líneas celulares HeLa, PC-3, RKO y T47-D con los extractos de *I. fuscus* a una concentración de 200 µg/mL se presentan en la Tabla 4.6. Las fracciones evaluadas no evidenciaron una disminución de la viabilidad celular en ninguna de las líneas analizadas, puesto que se registraron valores cercanos o superiores al 100% en la mayoría de los tratamientos, lo que indica una ausencia de efecto citotóxico.

En la línea celular HeLa, los porcentajes de viabilidad oscilaron entre $102.5 \pm 6.43\%$ y $118.21 \pm 1.38\%$ (Figura 4.7), destacándose un incremento en la viabilidad celular en varias fracciones, principalmente en aquellas obtenidas con proporciones de M:C. Así mismo, se observó que en la línea PC-3 los valores de viabilidad variaron entre $101.55 \pm 6.36\%$ y $119.01 \pm 4.38\%$, exhibiendo que las fracciones promovieron el crecimiento celular en base a los resultados mostrados y con respecto al control.

En el caso de la línea RKO, los tratamientos mostraron porcentajes de viabilidad entre $94.81 \pm 1.15\%$ y $114.23 \pm 1.79\%$, manteniéndose, en forma general, valores por encima del 100%, lo que confirma la baja respuesta citotóxica de las fracciones evaluadas sobre esta línea celular. De igual manera, la línea T47-D presentó valores de viabilidad que oscilaron entre $79.10 \pm 0.98\%$ y $109.32 \pm 4.87\%$. A pesar de que se observó una disminución en la viabilidad celular para la fracción proveniente de biomasa húmeda M:C 7:3, esta no alcanzó niveles comparables con el control positivo.

El tratamiento con doxorrubicina ($1.5 \mu\text{M}$), empleado como control positivo, produjo una marcada reducción en la viabilidad celular en todas las líneas evaluadas, con valores de $62.44 \pm 2.18\%$ en HeLa, $47.53 \pm 2.13\%$ en PC-3, $25.05 \pm 1.45\%$ en RKO y $54.30 \pm 2.13\%$ en T47-D, lo que confirma la sensibilidad de los ensayos y la adecuada respuesta de las líneas celulares al agente citotóxico de referencia

En conjunto, estos resultados indican que, a la concentración evaluada, los extractos de *I. fuscus* no presentan actividad citotóxica relevante frente a las líneas celulares de cáncer analizadas.

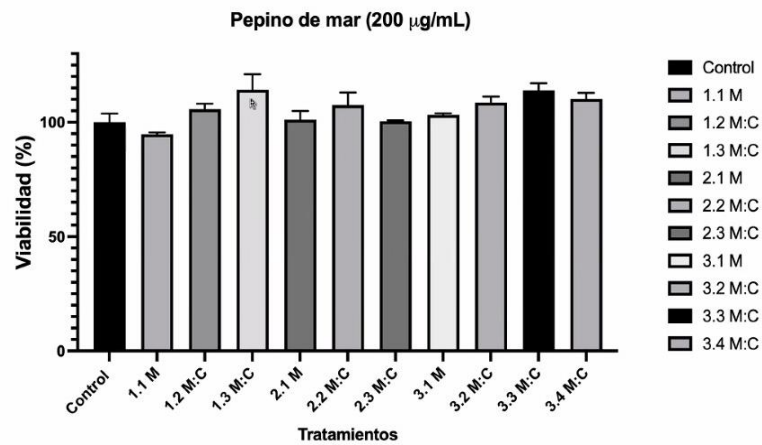


Figura 4. 7 Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular cancerígena HeLa.

Tabla 4. 6 Porcentaje de viabilidad de células tratadas con extractos de pepino de mar (200 µg/mL) sobre las líneas celulares de cáncer: cérvico uterino (HeLa), próstata (PC-3), mama (T-47D) y colon (RKO).

Tratamientos	HeLa	PC-3	RKO	T47-D
1.1 M	104.25 ± 5.91	109.23 ± 2.51	94.81 ± 1.15	92.22 ± 1.42
1.2 M:C	109.23 ± 8.41	109.16 ± 6.64	105.75 ± 4.15	91.49 ± 7.19
1.3 M:C	118.21 ± 1.38	116.07 ± 6.63	114.23 ± 1.79	106.83 ± 1.74
2.1 M	105.38 ± 5.05	117.68 ± 4.77	101.16 ± 6.48	101.00 ± 6.84
2.2 M:C	102.35 ± 6.43	102.52 ± 4.00	107.50 ± 9.59	79.10 ± 0.98
2.3 M:C	113.63 ± 1.39	119.01 ± 4.38	100.49 ± 0.58	103.30 ± 7.04
3.1 M	104.11 ± 2.15	102.30 ± 3.77	103.26 ± 1.01	93.12 ± 8.03
3.2 M:C	107.44 ± 6.43	104.74 ± 8.79	108.65 ± 4.47	109.32 ± 4.87
3.3 M:C	102.55 ± 7.72	101.55 ± 6.36	113.98 ± 5.41	105.38 ± 5.49
3.4 M:C	113.24 ± 0.70	118.26 ± 5.92	110.23 ± 4.58	93.30 ± 2.50
Dox 1.5 µM	62.44 ± 2,18	47.53 ± 2.13	25.05 ± 1.45	54.30 ± 2.13

4.3.3 Modelo de membrana corioalantoidea (CAM)

Se desarrolló el experimento por cuatuplicado debido a que las condiciones ambientales de los embriones repercutieron en la viabilidad del experimento como la temperatura de la incubadora y el flujo de aire.

Se hicieron ensayos con las fracciones más bioactivas que corresponden a la fracción obtenida a partir de biomasa húmeda con tratamiento de maceración y polaridad intermedia (1.3 M:C) y la fracción proveniente de biomasa seca mediante liofilización con tratamiento combinado (maceración y ultrasonido) y polaridad intermedia (3.3 M:C). Para el desarrollo del método se procedió a preparar un control negativo de consistía en patrón buffer fosfato (PBS).

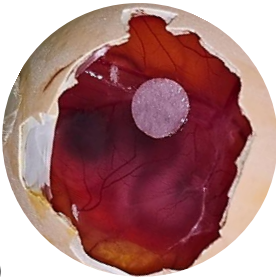

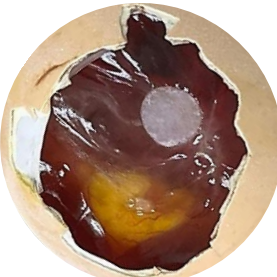
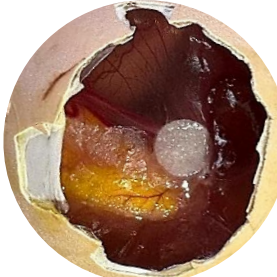
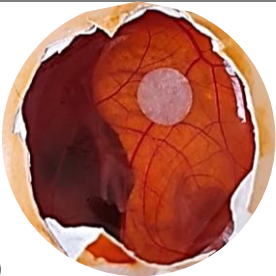
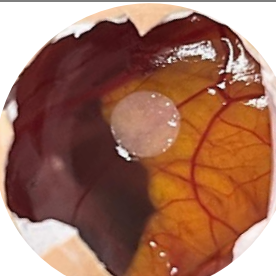
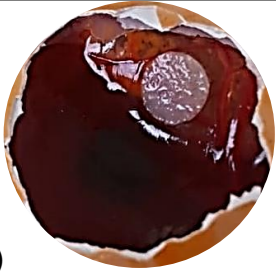
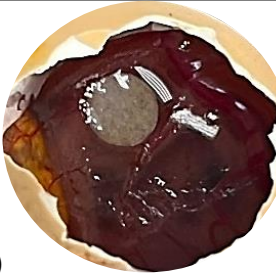
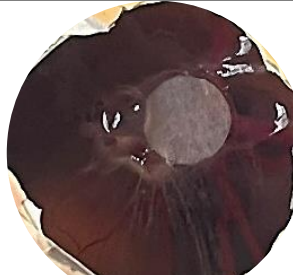
Se evaluaron doce modelos de membrana corioalantoidea, distribuidos en cuatro controles, 4 modelos con tratamiento 1.3 M:C y 4 modelos con tratamiento 3.3 M:C, a los cuales se les dio seguimiento hasta las 72h que corresponde al día 11 de incubación. No todos los embriones alcanzaron las 48h de observación como se lo estipulaba en el procedimiento, debido a la tasa de mortalidad que conlleva este experimento, sin embargo, se logró obtener un duplicado en los resultados hasta las 48h de tratamiento.

En los controles, se evidenció que el Control R1 mostró pérdida parcial de translucidez del tejido y un aspecto opaco localizado alrededor del disco que contenía el control negativo PBS (Figura 4.8b), esta alteración superficial en el tejido se pronuncia más con el paso de los días como se puede observar a las 72h (Figura 4.8c) y 4 (Figura 4.8c), de forma adicional se observa un

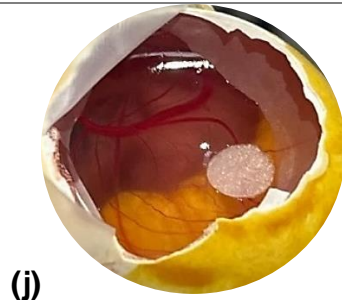
desarrollo vascular normal el cual mantiene su misma orientación y densidad con respecto al inicio (Figura 4.8a). En el Control R2 se evidencia un mismo patrón, con una pérdida de la luminosidad de la membrana CAM a las 24h (Figura 4.8f) con respecto a las 0h (Figura 4.8e) y un ligero engrosamiento de una vena secundaria sin reorganización general de la red vascular ni una tendencia diferente hacia el disco con el control negativo, sin embargo, se dejó de hacer seguimiento debido a la muerte del embrión. En el caso del Control R3, el disco embrionario se posicionó en una zona de vascularización pronunciada (Figura 4.8g) para una mejor visualización, sin embargo, a las 24h (Figura 4.8h) se evidenció una opacidad pronunciada sobre la CAM y una formación anormal de un tejido alrededor del disco (Figura 4.8i) sumado al aumento de opacidad lo que impedía una correcta visualización de la red vascular pero se logró ver (con dificultad) la misma orientación de la red vascular pronunciada con respecto a las 24h. El Control R4 no se muestra por muerte del embrión antes de las 24h de tratamiento.

En el grupo tratado con 1.3M:C, se trabajó con cuatro embriones. La primera y segunda réplica no fueron registradas debido a muerte embrionaria al primer día. La tercera réplica del grupo evidenció un cambio en la dirección de la vascularización con orientación hacia el disco en las 24h (Figura 4.8k) en comparación al inicio (Figura 4.8j), además de un engrosamiento de la vena principal y un aumento en las ramificaciones de venas terciarias provenientes de una vena secundaria asociada al disco, sin embargo, se observa una ligera pérdida de la luminosidad en la CAM. En la cuarta réplica se logró registrar cambios hasta más allá de las 48h planteadas en la metodología, donde se observó un engrosamiento de la vena secundaria desde las 24h (Figura 4.8m), posteriormente hubo un cambio de orientación de la vena principal hacia el disco a las 24h (Figura 4.8n) y la cual se hizo más pronunciada a las 72h (Figura 4.8o). Adicionalmente, se observó una convergencia y engrosamiento de venas alas 48h, así como un aumento de la presencia de ramificaciones vasculares (densidad vascular) en la zona aledaña al disco a las 72h

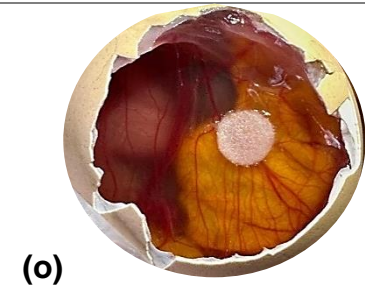
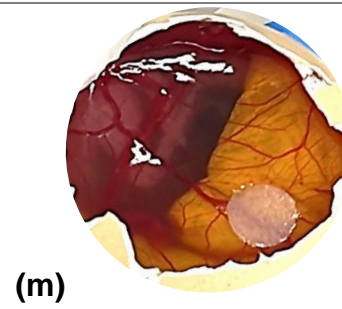
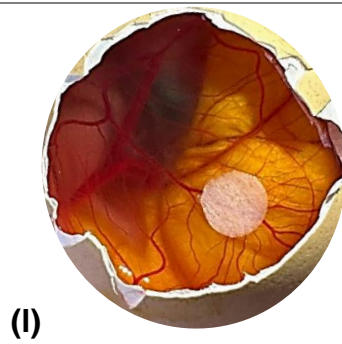
En el grupo tratado con 3.3 M:C, se evaluaron 4 embriones, de los cuales dos de los cuales llegaron más allá de las 48h de experimentación. En la primera réplica de este grupo se observó desde las 24h (Figura 4.8q) un cambio de dirección de las venas secundarias con orientación hacia el disco con tratamiento. A las 48h (Figura 4.8r) a pesar de que el embrión tuvo un cambio de posición que se asocia al movimiento constante durante su desarrollo, se mantuvo una confluencia de venas secundarias hacia el disco, mientras que a las 72h (Figura 4.8s) se observó venas de mayor calibre y un crecimiento rápido del embrión indicando la fecha tope de ensayos. En la segunda réplica del grupo se mostró engrosamiento de las venas principales de la red vascular, así como un cambio de orientación hacia el disco con el tratamiento a las 24h (Figura 4.8t) en comparación al día 0 (Figura 4.8u), sin embargo, no se pudo dar seguimiento en a las 48h por muerte embrionaria. La tercera réplica no pudo ser analizada debido a muerte embrionaria en el primer día. La cuarta réplica registró un cambio de orientación en la vena principal con dirección hacia el disco a las 24h (Figura 4.8w) en comparación a las 0h (Figura 4.8v), se observó un engrosamiento pronunciado de una vena principal que se posiciona bajo el disco a las 72h (Figura 4.8x) y 3 (Figura 4.8y), sin embargo, ya se empieza a visualizar opacidad en este día adicional de ensayo.

Tratamiento	Tiempo de ensayo (h)			
	0	24	48	72 (adicional)
Control R1	 (a)	 (b)	 (c)	 (d)
Control R2	 (e)	 (f)		
Control R3	 (g)	 (h)	 (i)	

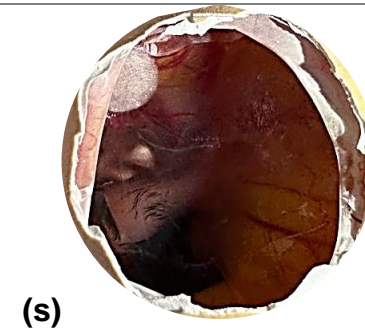
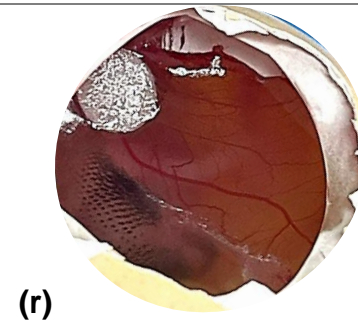
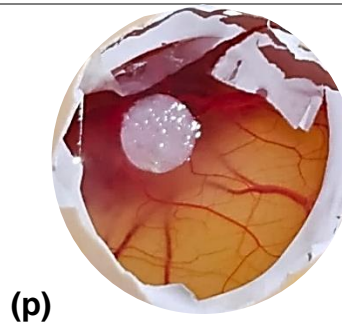
1.3 M:C R3



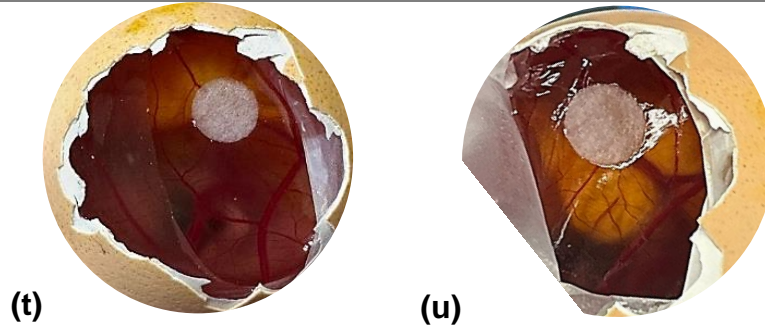
1.3 M:C R4



3.3 M:C R1



3.3 M:C R2



3.3 M:C R4

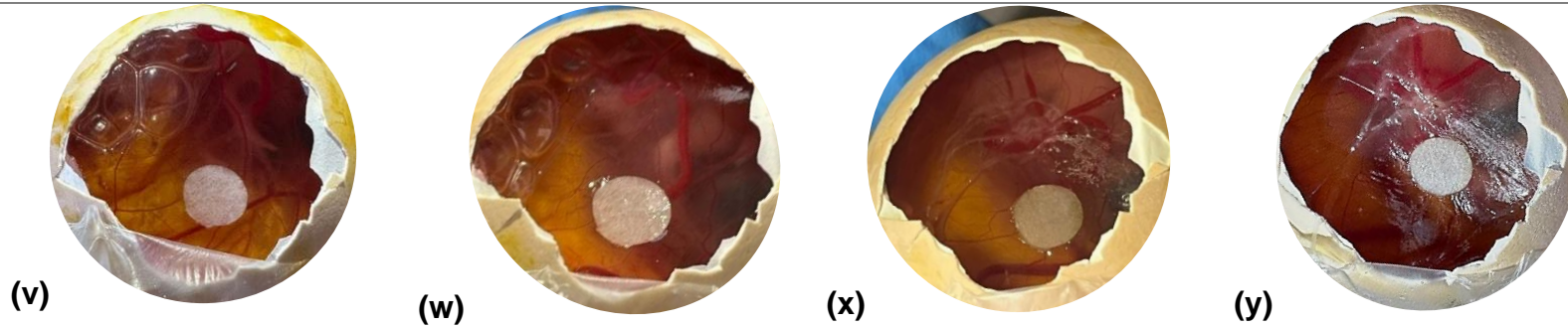


Figura 4. 8 Resultados de los ensayos de membrana corioalantoidea: Control R1 a 0h (a), 24h (b) 48h (c) y 72h como evaluación adicional (d); el Control R2 a 0h (e) y 24h (f); el Control R3 a 0h (g), 24h (h) y 48h (i); el tratamiento 1.3 M:C R3 a 0h (j) y 24h (k); el tratamiento 1.3 M:C R4 a 0h (l), 24h (m), 48h (n) y 72h (o); el tratamiento 3.3 M:C R1 a 0h (p), 24h (q), 48h (r) y 72h (s); el tratamiento 3.3 M:C R2 a 0h (t) y 24h (u); y el tratamiento 3.3 M:C R4 a 0h (v), 24h (w), 48h (x) y 72h (y).

Identificación de compuestos fenólicos en las fracciones bioactivas

Después de la determinación de las fracciones bioactivas, mediante los ensayos biológicos, se procedió al análisis cromatográfico de las fracciones 1.3 M:C (biomasa húmeda con tratamiento de maceración) y 3.3 M:C (biomasa seca liofilizada con tratamiento combinado), las cuales habían sido previamente caracterizadas cualitativamente mediante análisis fitoquímico.

Curva de calibración y linealidad del método

La cuantificación de los compuestos fenólicos presentes se realizó mediante curvas de calibración que se construyeron a partir de un mix de polifenoles de concentración final de 100 ppm, preparado en solución metanólica al 0.2% de ácido fórmico. El mix incluyó ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido siríngico, epicatequina, rutina, resveratrol, y naringenina. A partir de este mix se elaboraron siete niveles de concentración (0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 20 ppm) empleando el mismo disolvente.

Se utilizó la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) Acquity Premier/MassLynx con detector de matriz de fotodiodos (PDA) para la caracterización de los compuestos fenólicos. La separación y detección de los compuestos fenólicos se realizaron utilizando una columna Acquity Premier BEH C18 1.7 μ m, 2.1x100mm, 1/pk y con PDA. La fase móvil estuvo compuesta por una combinación de 4 solventes: 0.1% de ácido fórmico en agua tipo 1 (Fase A), metanol grado HPLC (Fase B), agua tipo 1 (Fase C) y por último acetonitrilo (Fase D).

El análisis se realizó mediante un programa en gradiente el cual inició con 95% de fase A y 5% de fase D, manteniéndose hasta 1.11 min, seguido por una disminución de la fase A hasta 5% y un aumento de la fase D hasta 90% en el minuto 8.34 lo que permitiría la elución de compuestos fenólicos de diferente polaridad. Posteriormente, el sistema se equilibra hasta llegar a las condiciones iniciales en el minuto 9.73 previo a la siguiente inyección. El flujo se mantuvo en 0.5 mL/min con un volumen de inyección de 2 μ L (Figura 4.8).

	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.500	95.0	0.0	0.0	5.0	Initial
2	1.11	0.500	95.0	0.0	0.0	5.0	6
3	2.78	0.500	85.0	5.0	0.0	10.0	6
4	4.17	0.500	75.0	5.0	0.0	20.0	6
5	5.00	0.500	60.0	5.0	0.0	35.0	6
6	5.56	0.500	50.0	5.0	0.0	45.0	6
7	8.34	0.500	5.0	5.0	0.0	90.0	6
8	8.61	0.500	95.0	0.0	0.0	5.0	6
9	9.73	0.500	95.0	0.0	0.0	5.0	6
10							
11							
12							
13							
14							
15							

Figura 4. 9 Programa en gradiente para la lectura de compuestos fenólicos.

Las curvas de calibración obtenidas para cada compuesto mostraron una adecuada relación lineal con un R^2 cercano a 0.99 para cada compuesto. Se analizaron los cromatogramas correspondientes a los estándares individuales del mix de polifenoles (Figura 4.10 - 4.17) con el fin de validar los tiempos de retención y determinar longitudes de onda óptimas para la detección de cada compuesto. El análisis de los cromatogramas permitió seleccionar los canales de lectura con mejor resolución, específicamente longitudes de 280, 307 y 367 nm. Con base a esta validación, se procedió al análisis de los compuestos fenólicos presentes en las fracciones bioactivas.

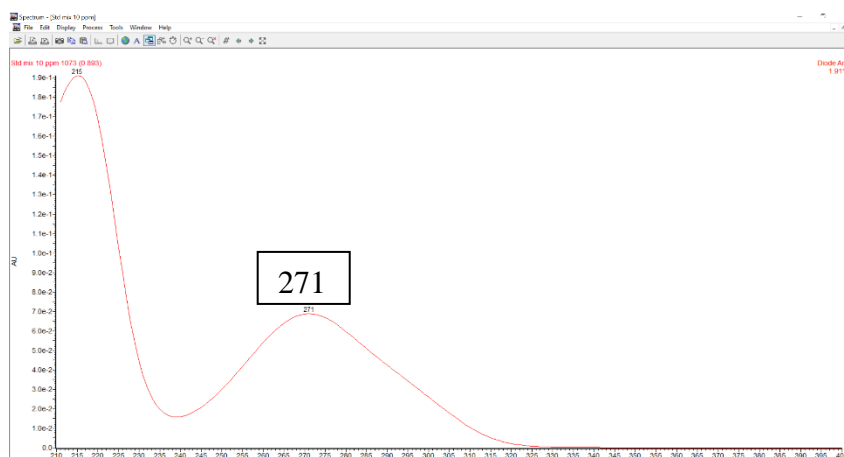


Figura 4. 10 Estándar de ácido gálico con tiempo de retención de 0.89 min

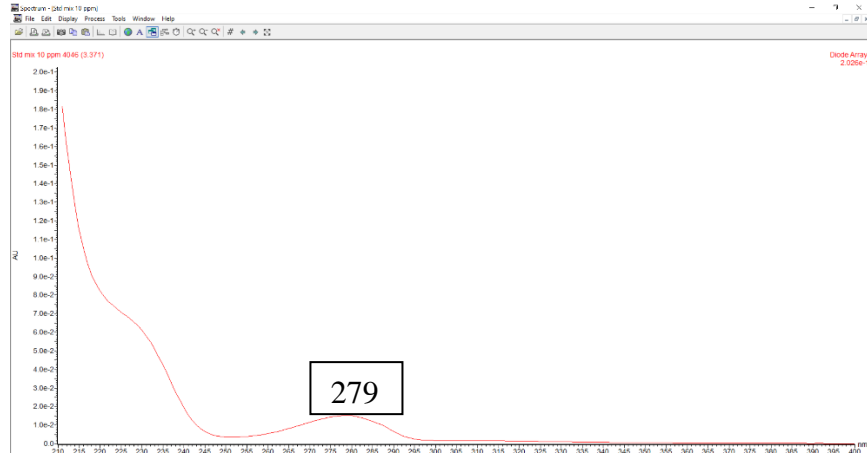


Figura 4. 11 Estándar de catequina con tiempo de retención de 3.36 min

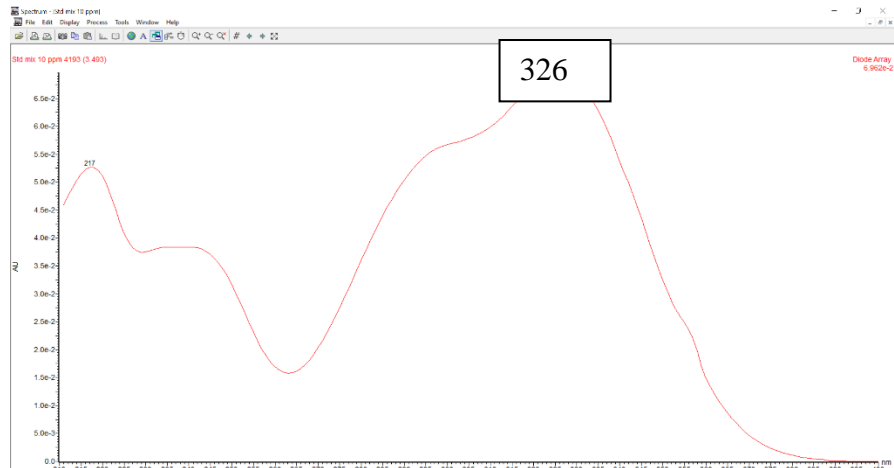


Figura 4. 12 Estándar de ácido clorogénico con tiempo de retención de 3.48 min

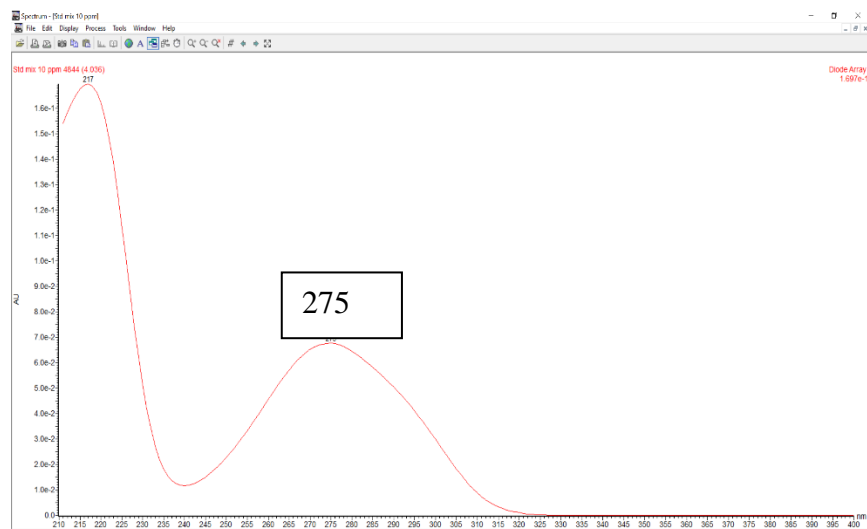


Figura 4. 13 Estándar de ácido siríngico con tiempo de retención de 4.03 min.

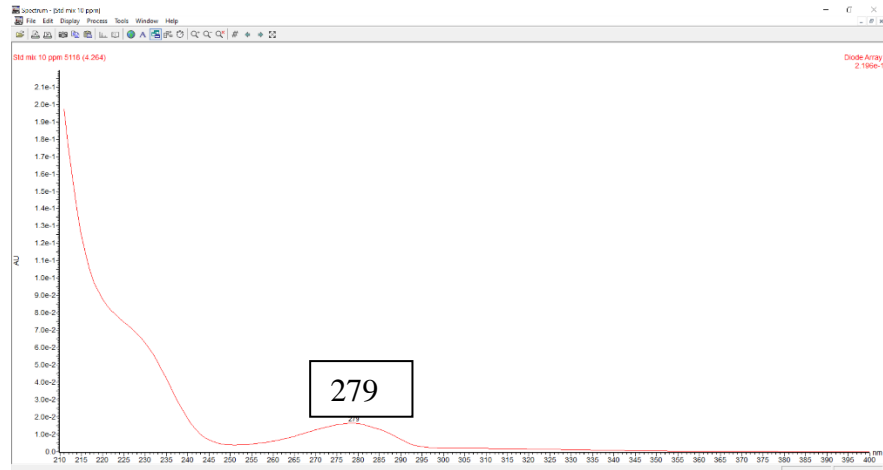


Figura 4. 14 Estándar de epicatequina con tiempo de retención de 4.26 min.

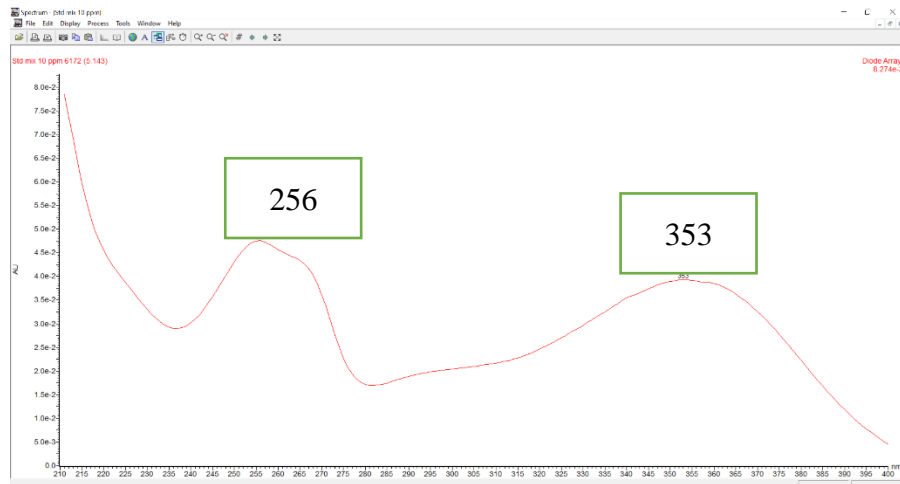


Figura 4. 15 Estándar de rutina con tiempo de retención de 5.14 min.

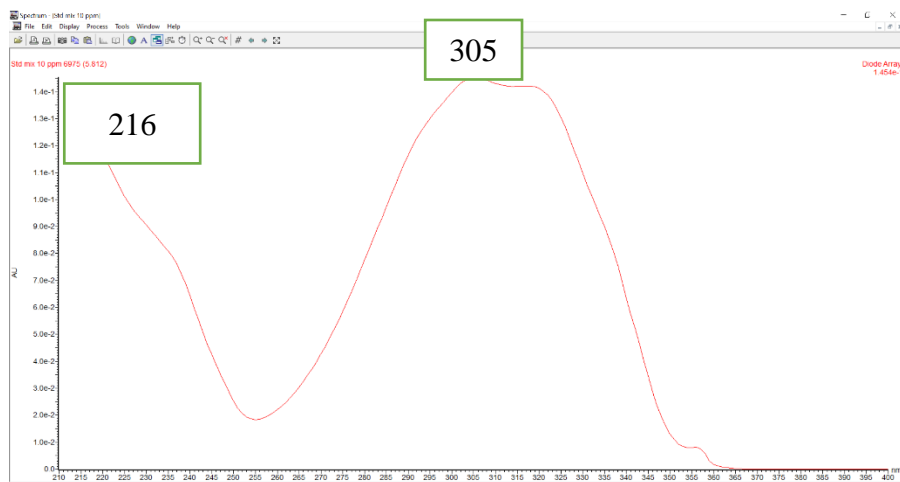


Figura 4. 16 Estándar de resveratrol con tiempo de retención de 5.81 min.

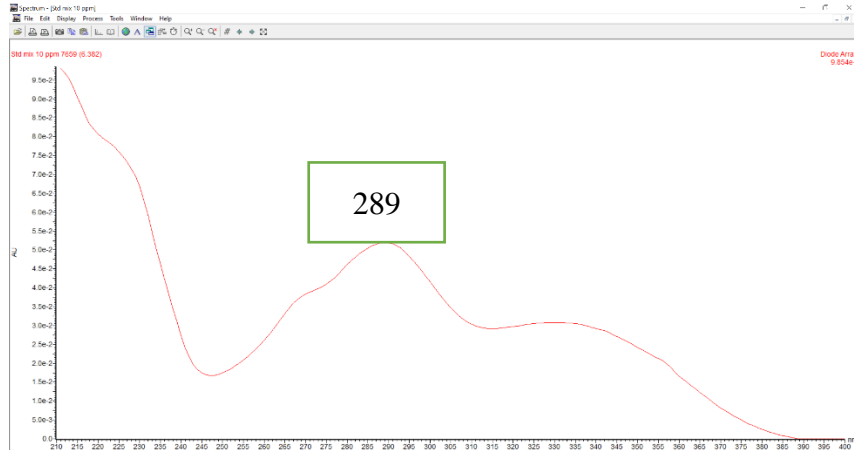


Figura 4. 17 Estándar de naringenina con tiempo de retención de 6.37 min.

Cuantificación de compuestos fenólicos

Las muestras se encontraban disueltas en la solución PBS (debido al último ensayo que correspondía a CAM) a una concentración de 200ppm, por lo que se utilizó un filtro de 0.22 μm de porosidad la filtración de 3 réplicas por muestra de fracción bioactiva. El análisis por UHPLC permitió la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en ambas fracciones bioactivas (1.3 M:C y 3.3 M:C).

En la fracción 1.3 M:C, se detectó la presencia de ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido sirínico, epicatequina, rutina, resveratrol y naringenina en el triplicado analizado, mostrando valores cercanos entre sí. De manera similar, en la fracción 3.3 M:C se identificaron los mismos compuestos fenólicos principales. La naringenina se identificó en concentraciones superiores comparado con la fracción 1.3 M:C. Los valores por triplicado de las fracciones fueron agrupados según el tratamiento y el compuesto fenólico, y expresados como media \pm desviación estándar. La prueba t de student permitió evaluar las diferencias en el contenido individual de compuestos fenólicos.

El ácido gálico presentó concentraciones mayores en la fracción 1.3 M:C en comparación con la fracción 3.3 M:C, evidenciando una disminución de su concentración en la biomasa liofilizada y una diferencia estadísticamente

significativa entre ambos tratamientos. Mientras que, compuestos como catequina, ácido clorogénico, ácido siríngico, epicatequina, rutina y resveratrol mostraron concentraciones similares entre ambas fracciones. La naringenina presentó concentraciones ligeramente superiores en la fracción 3.3 M:C en comparación con la fracción 1.3 M:C sin diferencias estadísticamente significativas.

El análisis por UHPLC evidencian que ambas fracciones bioactivas presentan un perfil fenólico similar, con diferencias puntual en el ácido gálico. Estos resultados confirman la presencia de compuestos fenólicos previamente detectados mediante la caracterización fitoquímica cualitativa y actividad antioxidante por DPPH.

Tabla 4. 7 Contenido de compuestos fenólicos individuales en las fracciones 1.3 M:C y 3.3 M:C de *I. fuscus*.

Compuesto fenólico	1.3 M:C	3.3 M:C
Ácido gálico	0.186 ± 0.001	0.161 ± 0.014
Catequina	0.142 ± 0.001	0.163 ± 0.012
Ácido clorogénico	0.115 ± 0.000	0.117 ± 0.002
Ácido siríngico	0.195 ± 0.002	0.194 ± 0.004
Epicatequina	0.128 ± 0.001	0.132 ± 0.003
Rutina	0.129 ± 0.001	0.143 ± 0.008
Resveratrol	0.148 ± 0.001	0.150 ± 0.002
Naringenina	0.087 ± 0.001	0.099 ± 0.007

Modelos biológicos e identificación de compuestos fenólicos: análisis y contraste con estudios publicados.

El modelo *Allium cepa* es una herramienta empleada para la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad debido a los cambios cuantificables que se puede obtener del mismo. Una disminución del crecimiento radicular se asocia a citotoxicidad, mientras que la genotoxicidad se confirma por alteraciones cromosómicas (Nicuță et al., 2025). En el presente estudio, ninguna de las fracciones evaluadas produjo inhibición del crecimiento

radicular ni reducciones en la tasa de elongación, lo que indica la ausencia de efectos citotóxicos a 50ppm.

Las fracciones de *I. fuscus* promovieron de manera significativa el crecimiento radicular, especialmente las fracciones obtenidas de sistemas de solventes de polaridad intermedia a baja como M:C 5:5 y M:C 3:7. El análisis estadístico, mediante ANOVA y Tukey, confirmó que las fracciones 1.3 M:C, 1.4 M:C, 3.3 M:C y 3.4 M:C se agruparon en la categoría “a”, (estadísticamente superior), presentando tasas de crecimiento de hasta 6 veces mayor el control negativo. Este comportamiento sugiere un efecto estimulante sobre el crecimiento celular vegetal a la concentración de 50ppm. Raymund et al. (2021) evidenciaron que los extractos del pepino de mar *Pearsonothuria graeffei* con solventes como metanol, etil acetato y n-hexano tuvieron propiedades genotóxicas e inhibieron el crecimiento de forma significativa ($p < 0.05$) en los modelos de *Allium cepa* en concentraciones de 1000 y 1500 ppm. De forma adicional, Jayathilake & Jayewardena (2021) evaluaron concentraciones desde 62.5 hasta 500ppm del extracto acuoso de *Bohadschia vitiensis*, y los resultados demostraron que el índice mitótico fue negativamente correlacionado de acuerdo con la concentración del extracto, de modo que, a mayor concentración, menor índice mitótico. De acuerdo con estos estudios, las mayores concentraciones de extracto de pepino de mar inhiben de manera significativa el crecimiento radicular, siendo más evidente en concentraciones mayores a 500ppm, es decir 10 veces mayor que la empleada en este proyecto.

El ensayo *in vitro* de las cuatro líneas cancerígenas buscaba evaluar el efecto citotóxico proveniente de estas fracciones, sin embargo, hubo un efecto contrario en donde se evidenció un ligero incremento de la viabilidad celular hasta un 10% aproximadamente. Inicialmente se empleó una concentración de 50ppm de las fracciones, pero se terminó empleando 200ppm (máxima concentración para observar un efecto citotóxico) ante la ausencia del efecto esperado.

Cabe indicar que las fracciones que evidenciaron el mayor incremento de porcentaje de viabilidad *in vitro* correspondieron a las fracciones 1.3 M:C y 3.3 M:C. Sin embargo, aunque se observó un aumento en la viabilidad celular de las líneas cancerígenas evaluadas, este incremento fue relativamente bajo y no alcanza los niveles reportados para promotores tumorales conocidos como es el caso de la nicotina. Shi et al. (2012) demostraron que este alcaloide en concentraciones de 0.1-10 μ M durante 72h, incrementó entre 20% hasta el 200% la proliferación celular en líneas de carcinoma nasofaríngeo, evidenciando un efecto proliferativo significativamente mayor al observado en el presente estudio.

Es importante señalar que los ensayos de viabilidad celular, como el MTT, reflejan el metabolismo de células viables y no específicamente de la proliferación celular directa. En base a esta premisa, los incrementos leves en la señal se pueden asociar con cambios metabólicos y no necesariamente con un incremento significativo del número de células. Los ensayos de reducción de tetrazolio suelen describirse erróneamente como métodos para medir proliferación celular cuando no se emplean controles adecuados que permitan confirmar si los efectos observados están relacionados con cambios en el metabolismo celular (Riss et al., 2004).

Rasekh et al. (2023) realizaron ensayos sobre células estromales/mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano, las cuales sometieron a un extracto acuoso de *Holothuria parva* a 5,10, 20, 40 y 80 ppm. El ensayo MTT demostró que las menores concentraciones de extracto de pepino de mar aumentaron hasta un 200% el porcentaje de viabilidad celular en líneas celulares sanas comparado a un control positivo de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (aproximadamente 250%), lo que sugirió un posible efecto citoprotector o de estimulación metabólica en células sanas.

En el presente estudio, aunque se observó un ligero aumento en la viabilidad de las líneas celulares cancerígenas, las pequeñas variaciones en la señal metabólica pueden estar asociadas con cambios en la actividad mitocondrial

más que un aumento real en el número de células. Sin embargo, estos resultados también abren una posible línea de interpretación hipotética, basándose en los resultados previamente obtenidos en DPPH y *Allium cepa*. En la fracción 1.3 M:C, previamente se había sugerido un efecto sinérgico entre metabolitos, evidenciado en el ensayo de DPPH, mientras que en la fracción 3.3 M:C una posible concentración más alta de diferentes tipos de metabolitos semipolares, lo que podría haber contribuido tanto a la actividad antioxidante observada como a una leve estimulación metabólica celular. Se sugiere que la presencia de metabolitos con capacidad antioxidante podría explicar el ligero aumento del porcentaje de viabilidad celular, asimismo como los terpenoides que son considerados geroprotectores (Proshkina et al., 2020) y también como protectores celulares (Aboutalebi & Monfared, 2016).

Ante el resultado negativo sobre citotoxicidad en las líneas cancerígenas y reportes prometedores en líneas celulares sanas, se evaluó la posibilidad de cambiar el tipo de experimento a un modelo de herida abierta, donde se podría evaluar la capacidad proliferativa de las fracciones. Mazumder et al. (2024) evaluaron extractos de bajo peso molecular de *Apostichopus japonicus* en migración celular y cierre de herida bajo condiciones de estrés oxidativo en células epiteliales. Los resultados de esa especie de pepino de mar a 1 mg/mL por 24 h demostraron que era capaz de promover la migración celular, proliferación celular y prevenir el estrés. En un caso más cercano, Olivera-Castillo et al. (2025), demostró que péptidos de bajo peso molecular (1-3 kDa) derivados de la digestión del cuerpo de *Isostichopus badionotus* fueron capaces de promover el cierre de herida, pero que su potencia puede variar entre especie, el ambiente, edad y temporada.

Ante los resultados obtenidos a partir del modelo *Allium cepa* y de las líneas celulares cancerígenas, se procedió a hacer la evaluación de las fracciones más bioactivas (1.3 M:C y 3.3 M:C) en el modelo de membrana corioalantoidea. A pesar de las muertes debido a la sensibilidad del modelo, se pudo dar seguimiento a al menos un duplicado por tratamiento.

El control negativo, constituido por PBS, evidenció pérdida de luminosidad y cambios en la superficie de la membrana corioalantoidea, sin embargo, los tratamientos mostraron contrarrestar dicho efecto en un gran porcentaje. En el estudio de Olivera-Castillo et al. (2018) donde se evaluó la capacidad de *I. badionotus* a una concentración de 500 ppm para inhibir la irritación inducida por sulfato dodecil de sodio (SDS) en un modelo de membrana corioalantoidea, demostraron que esta especie inhibió más de un 60% de la irritación inducida y atribuían a la presencia de factores bioactivos como fucoidanos, fucosilatos de condroitin sulfatado y lectinas que son capaces de contrarrestar la inflamación. Este estudio sugiere que la especie tiene un efecto anti-inflamatorio, similar a lo observado en los resultados del ensayo de *I. fuscus* donde se observó una mejor apariencia de la membrana en comparación al control.

La cantidad en gramos de las fracciones empleadas por disco en el ensayo correspondió 0.25 µg y con la cual se pudo observar tanto el aumento de densidad vascular como cambio de orientación de la vascularización en dirección al disco. Los resultados cualitativos se deben a la presencia una gran variedad de metabolitos en los pepinos de mar, donde destacan los polisacáridos sulfatados (Bordbar et al., 2011), que corresponden a los metabolitos principales más estudiados en el género *Isostichopus* (Hossain et al., 2023; S. Li et al., 2017; Myron et al., 2014; Xu et al., 2022). En el estudio de Souza Lins Borba et al. (2017), se demostró que 2.0 mg de sulfato de condroitina y de sulfato de glucosamina incrementaron significativamente ($p < 0.05$) la densidad vascular comparado a un control negativo de PBS, revelando un efecto proangiogénico.

De forma más específica hay mayor cantidad de reportes que evidencian efectos antiangiogénicos asociados a pepinos de mar. Tong et al. (2005) evaluaron a philinopside A, una saponina sulfatada, aislada de *Pentacta quadrangulari*. Los resultados demostraron que 2-10 nmol de este metabolito inhibió significativamente la angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. En otro estudio, Zhao et al. (2011) aislaron a Ds-echonoside A, un glucósido triterpeno no sulfatado, de *Pearsonothuria*

graeffei, el cual, a una dosis de 0, 0.23 y 0.46 nmol por modelo atenúo la neovascularización en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. Asimismo, Tian et al. (2005) examinaron la actividad de Philinopside E, un compuesto marino, aislado de *Pentacta quadrangularis*, donde una dosis de 5 nmol por ensayo suprimió la angiogénesis. Estos reportes se basan en metabolitos aislados, sin embargo, las fracciones con las que se trabajó en el presente proyecto poseen más de un metabolito involucrado.

Finalmente, el análisis por UHPLC de las fracciones bioactivas 1.3 M:C y 3.3 M:C permitió identificar y cuantificar compuestos fenólicos específicos, lo que confirmó tanto los resultados obtenidos en la caracterización fitoquímica como en el ensayo de DPPH. La comparación entre las fracciones bioactivas mostró variaciones en los valores promedios del ácido gálico, catequina y rutina, sin embargo, estadísticamente solo se evidenció diferencias significativas en la concentración de ácido gálico entre las dos fracciones bioactivas. Los resultados resaltan la importancia de considerar no solo el rendimiento y la presencia de compuestos, sino también las interacciones al evaluar la bioactividad.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se cumplió con la obtención de fracciones por gradiente de polaridad a partir de biomasa húmeda y seca de *Isostichopus fuscus*. El sistema de solventes fue el factor que más determinó el rendimiento, donde las fracciones metanólicas alcanzaron los valores máximos (27.58 – 31.45%) en los tres diseños experimentales. Las mezclas metanol:cloroformo mostraron rendimientos variables, destacándose la fracción M:C 7:3 de biomasa seca con tratamiento de maceración + ultrasonido, que alcanzó un rendimiento de 20.32%, señalando el aporte de la liofilización y el ultrasonido para liberar compuestos de polaridad intermedia.
- La caracterización fitoquímica permitió establecer los grupos presentes en las fracciones y confirmó que los fenoles son el grupo predominante en todas las fracciones, independientemente del tipo de biomasa o del tratamiento de extracción; los terpenoides se concentraron en fracciones de polaridad intermedia (M:C 5:5), y las saponinas fueron detectadas únicamente en fracciones de biomasa seca, lo que sugiere que la liofilización favorece la disponibilidad de metabolitos anfipáticos. La actividad antioxidante DPPH fue mayor en fracciones de polaridad intermedia (M:C 5:5) provenientes de biomasa húmeda (hasta 21% de inhibición), mientras que las fracciones de biomasa liofilizada mostraron menor actividad antioxidante (5-8%), lo que indica que un mayor rendimiento de extracción no implica un mayor potencial antioxidante. El análisis de perfil polifenólico del UHPLC identificó y cuantificó ácido gálico, catequina y rutina en las fracciones bioactivas; la prueba t de Student mostró diferencias significativas únicamente en ácido gálico, mientras que las variaciones de los otros fenoles quedaron dentro de la variabilidad experimental.

- Las fracciones evaluadas a 50 ppm en el modelo *in vivo Allium cepa* no presentaron efectos citotóxicos. Ninguna fracción inhibió el crecimiento y varias lo potenciaron, con efecto significativo de las fracciones intermedias y bajas (M:C 5:5 y M:C 3:7); en el tercer diseño (biomasa seca) se observaron las mayores tasas de crecimiento radicular (hasta ~6x el control) y pendientes superiores, lo que evidencia un efecto estimulante. Los ensayos de viabilidad celular en las líneas cancerígenas (HeLa, PC-3, RKO, T47-D; 200ppm) no se observó citotoxicidad (viabilidad ~ o >100%, especialmente en fracciones intermedias), por lo que se recomienda un ensayo de herida abierta para explorar el potencial regenerativo/protector. En CAM, las fracciones 1.3 M:C y 3.3 M:C produjeron engrosamiento vascular, aumento de densidad y orientación de la red hacia el sitio de aplicación, sugiriendo modulación pro-angiogénica. En conjunto, los datos describen un perfil bioactivo estimulante y no citotóxico (50-200 ppm), coherente con una matriz rica en fenoles y terpenoides, que posiciona a *I. fuscus* como candidata de interés para aplicaciones biomédicas orientadas a la modulación celular y angiogénica.

Recomendaciones

- Considerar la evaluación de un rango amplio de concentración, por encima de 50ppm, para las fracciones de *I. fuscus* en los tres modelos con la finalidad de establecer curvas de dosis respuestas que permita identificar umbrales entre la estimulación y la citotoxicidad como se ha realizado en otras especies.
- Realizar una caracterización química más profunda, en base a los compuestos terpenoides, mediante UHPLC que permita conocer su contribución y efecto (sinérgico o antagónico) en la bioactividad.

- Optimizar los procesos de extracción y fraccionamiento para polaridad intermedia y baja para evaluar su bioactividad con la mayor disposición de recursos.
- Evaluar las fracciones bioactivas en modelos de células humanas de cordón umbilical o en el modelo de cicatrización de herida, teniendo en cuenta sus resultados antioxidantes, citoprotectores y estimulantes.

6. Referencias

- Abdel-Rahman, T., Hussein, A.-S., Beshir, S., Hamed, A. R., Ali, E. & El-Tanany, S. S. (2019a). Antimicrobial Activity of Terpenoids Extracted from *Annona muricata* Seeds and its Endophytic *Aspergillus niger* Strain SH3 Either Singly or in Combination. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(19), 3127–3131. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.793>
- Abdel-Rahman, T., Hussein, A.-S., Beshir, S., Hamed, A. R., Ali, E. & El-Tanany, S. S. (2019b). Antimicrobial Activity of Terpenoids Extracted from *Annona muricata* Seeds and its Endophytic *Aspergillus niger* Strain SH3 Either Singly or in Combination. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(19), 3127–3131. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.793>
- Aboutalebi, R. & Monfared, A. (2016). Saponin Terpenoids; A Brief Review of Mechanisms of Actions and Anti-cancerous Effects. *American Chemical Science Journal*, 12(2), 1–8. <https://doi.org/10.9734/ACSJ/2016/20638>
- Adrian, T. E. & Collin, P. (2018). The Anti-Cancer Effects of Frondoside A. *Marine Drugs*, 16(2), 64. <https://doi.org/10.3390/md16020064>
- Ahmad, A. & Nawaz, M. I. (2022). Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 123(12), 1938–1965. <https://doi.org/10.1002/jcb.30344>
- Ahmad, M., Tahir, M., Hong, Z., Zia, M. A., Rafeeq, H., Ahmad, M. S., Rehman, S. ur & Sun, J. (2025). Plant and marine-derived natural products: sustainable pathways for future drug discovery and therapeutic development. *Frontiers in Pharmacology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1497668>
- Akl, F. M. A., El-Sheekh, M. M., Makhlof, M. E. M. & Ahmed, S. I. (2025). Antimicrobial, antidiabetic, antiviral, and antioxidant activities of fucoidan extracted from the brown seaweed *Padina pavonica*. *BMC Biotechnology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-025-01004-1>
- Allen, D. D., Caviedes, R., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J. & Caviedes, P. A. (2005). Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(8), 757–768. <https://doi.org/10.1080/03639040500216246>
- Alqahtani F., Aleanizy F., El-Tahir E. & Alkahtani H. (2019). Paclitaxel. In *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology* (Vol. 22, pp. 205–238). <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.11.001>
- Althunibat Osama, Hashim Ridzwan, Taher Muhammad, Daud Jamaludin & Ikeda Masa-Aki. (2009). *In Vitro* Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research*, 37, 376–387.
- Alves, C. & Diederich, M. (2023). Marine Natural Products as Anticancer Agents 2.0. *Marine Drugs*, 21(4), 247. <https://doi.org/10.3390/md21040247>
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V. & Cerdà, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 80, pp. 641–654). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
- Arnone, M. I., Byrne, M. & Martinez, P. (2015). Echinodermata. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates* 6 (pp. 1–58). Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1856-6_1
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M.,

- Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M. & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Avila-Gonzalez N., Urias-Alvarez J., Arce-Hernandez A., Esquivel-Muñoz G. & Cepeda-Nieto A. (2024). Factor de crecimiento vascular endotelial en las enfermedades crónico-degenerativas: Revisión de literatura. *Revista de Ciencias Médicas Torreón*, 16. <https://revistas.uadec.mx/index.php/cienciasmedicastorreon/article/view/171>
- Ayubi, N., Padmasari, D. F., Komaini, A., Syafawi, A., Ardha, M. A. Al, Dafun, P. B., Ming, J. W., Lesmana, H. S. & Putri, D. R. S. (2024). Phytochemical Compounds in Sea Cucumber Have the Potential to Reduce Oxidative Stress and Inflammation Due to Exercise: Systematic Review. *Physical Education Theory and Methodology*, 24(1), 158–168. <https://doi.org/10.17309/tmfv.2024.1.19>
- Banday, M. Z., Sameer, A. S. & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna Journal of Medicine*, 10(04), 174–188. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20
- Barriga, E. H. & Mayor, R. (2019). Adjustable viscoelasticity allows for efficient collective cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 93, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.05.027>
- Bergers, G. & Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 592–603. <https://doi.org/10.1038/nrc2442>
- Bhuyan, P. P., Nayak, R., Patra, S., Abdulabbas, H. S., Jena, M. & Pradhan, B. (2023). Seaweed-Derived Sulfated Polysaccharides; The New Age Chemopreventives: A Comprehensive Review. *Cancers*, 15(3), 715. <https://doi.org/10.3390/cancers15030715>
- Blanco, R. & Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), a006569–a006569. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006569>
- Bordbar, S., Anwar, F. & Saari, N. (2011). High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - A review. In *Marine Drugs* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1761–1805). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md9101761>
- Bouchet, P., Decock, W., Lonneville, B., Vanhoorne, B. & Vandepitte, L. (2023). Marine biodiversity discovery: the metrics of new species descriptions. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.929989>
- Boujhoud, Z., Eleroui, M., Feki, A., Saad, H. Ben, Kraiem, M., Youlyouz Marfak, I., Essayagh, S., Hilali, S., Badraoui, R., Kallel, H., Pujo, J. M., Ben Amara, I. & Hilali, A. (2025). Pro-Angiogenic and Wound-Healing Potential of Bioactive Polysaccharides Extracted from Moroccan Algae *Osmundea pinnatifida*. *Life (Basel, Switzerland)*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/life15101564>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brasseur, L., Hennebert, E., Fievez, L., Caulier, G., Bureau, F., Tafforeau, L., Flammang, P., Gerbaux, P. & Eeckhaut, I. (2017). The Roles of Spinochromes in Four Shallow Water Tropical Sea Urchins and Their Potential as Bioactive Pharmacological Agents. *Marine Drugs*, 15(6), 179. <https://doi.org/10.3390/md15060179>

- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A. & Prinsep, M. R. (2022). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 39(6), 1122–1171. <https://doi.org/10.1039/D1NP00076D>
- Carson, M. A. & Clarke, S. A. (2018). Bioactive compounds from marine organisms: Potential for bone growth and healing. In *Marine Drugs* (Vol. 16, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md16090340>
- Castillo, L. A., Arango, A. & De Vries, E. (2022). End of life of the cancer patient: patient, family and physician perceptions. *Colombian Journal of Anesthesiology*, 50(3). <https://doi.org/10.5554/22562087.e1024>
- Castillo Marina. (2015). *Alteraciones de la calidad de vida en mujeres con cáncer de mama al recibir quimioterapia*. Escuela de enfermería de Palencia Dr. Dacio Crespo.
- Chahed, L., Balti, R., Elhiss, S., Bouchemal, N., Ajzenberg, N., Ollivier, V., Chaubet, F., Maaroufi, R. M. & Mansour, M. Ben. (2020). Anticoagulant activity of fucosylated chondroitin sulfate isolated from *Cucumaria syracusana*. *Process Biochemistry*, 91, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.006>
- Chen, S., Hu, Y., Ye, X., Li, G., Yu, G., Xue, C. & Chai, W. (2012). Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(7), 989–1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.002>
- Chen, S., Xue, C., Yin, L., Tang, Q., Yu, G. & Chai, W. (2011). Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.040>
- Chen, Z. & Tzima, E. (2009). PECAM-1 Is Necessary for Flow-Induced Vascular Remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(7), 1067–1073. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186692>
- Cheng, R. & Ma, J. xing. (2015). Angiogenesis in diabetes and obesity. In *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Vol. 16, Issue 1, pp. 67–75). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11154-015-9310-7>
- Coşkun, N., Saritaş, S., Jaouhari, Y., Bordiga, M. & Karav, S. (2024). The Impact of Freeze Drying on Bioactivity and Physical Properties of Food Products. *Applied Sciences*, 14(20), 9183. <https://doi.org/10.3390/app14209183>
- Costello, M. J., Houlding, B. & Joppa, L. N. (2014). Further evidence of more taxonomists discovering new species, and that most species have been named: response to Bebbler *et al.* (2014). *New Phytologist*, 202(3), 739–740. <https://doi.org/10.1111/nph.12689>
- Costello, M. J., Wilson, S. & Houlding, B. (2012). Predicting Total Global Species Richness Using Rates of Species Description and Estimates of Taxonomic Effort. *Systematic Biology*, 61(5), 871. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr080>
- Dai, Y. L., Kim, E. A., Luo, H. M., Jiang, Y. F., Oh, J. Y., Heo, S. J. & Jeon, Y. J. (2020). Characterization and anti-tumor activity of saponin-rich fractions of South Korean sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2283–2292. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04266-z>
- Damiani, E., Solorio, J. A., Doyle, A. P. & Wallace, H. M. (2019). How reliable are in vitro IC50 values? Values vary with cytotoxicity assays in human glioblastoma cells. *Toxicology Letters*, 302, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.004>

- Deichmann Elisabeth. (1954). The Holothurioidea collected by the velero III during the years 1932 to 1954. *Allan Hancock Pacific Expeditions.*, 11, 253–349.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P. & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- DiMarco Giovana, Alam Antoine, Dol Frederic, Corvol Pierre, Gasc Jean-Marie & Larger Etienne. (2008). Angiogenesis and Diabetes: Different Responses to Pro-Angiogenic Factors in the Chorioallantoic Membrane Assay. *Mol Med*, 14, 705–714. <https://doi.org/10.2119/2008-00054.DiMarco>
- Dohle, D. S., Pasa, S. D., Gustmann, S., Laub, M., Wissler, J. H., Jennissen, H. P. & Dünker, N. (2010). Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: How it really works. *Journal of Visualized Experiments*, 33. <https://doi.org/10.3791/1620>
- Dudley, A. C. & Griffioen, A. W. (2023). Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. In *Angiogenesis* (Vol. 26, Issue 3, pp. 313–347). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s10456-023-09876-7>
- Ebrahim, H. & El Sayed, K. (2016). Discovery of Novel Antiangiogenic Marine Natural Product Scaffolds. *Marine Drugs*, 14(3), 57. <https://doi.org/10.3390/md14030057>
- Ebrahim, H. Y. & El Sayed, K. A. (2016). Discovery of novel antiangiogenic marine natural product scaffolds. *Marine Drugs*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/md14030057>
- Espinosa-Yépez, K. R. (2025). Years of life lost due to cancer in Ecuador. *Cancer Epidemiology*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2024.102717>
- Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.-P., Nguyen, T.-N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K. J. & Schwall, R. H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine*, 4(3), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nm0398-336>
- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. & Hanahan, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 339(6219), 58–61. <https://doi.org/10.1038/339058a0>
- Fox Ramos, A. E., Evanno, L., Poupon, E., Champy, P. & Beniddir, M. A. (2019). Natural products targeting strategies involving molecular networking: Different manners, one goal. In *Natural Product Reports* (Vol. 36, Issue 7, pp. 960–980). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9np00006b>
- Gao, G., Wang, Y., Hua, H., Li, D. & Tang, C. (2021). Marine Antitumor Peptide Dolastatin 10: Biological Activity, Structural Modification and Synthetic Chemistry. *Marine Drugs*, 19(7), 363. <https://doi.org/10.3390/md19070363>
- García-Caballero, M., Cañedo, L., Fernández-Medarde, A., Medina, M. Á. & Quesada, A. R. (2014). The marine fungal metabolite, AD0157 inhibits angiogenesis by targeting the Akt signaling pathway. *Marine Drugs*, 12(1), 279–299. <https://doi.org/10.3390/md12010279>
- Gebala, V., Collins, R., Geudens, I., Phng, L.-K. & Gerhardt, H. (2016). Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nature Cell Biology*, 18(4), 443–450. <https://doi.org/10.1038/ncb3320>
- Gerhardt H. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D. & Betsholtz, C. (2003). VEGF

- guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
- Ghaffar, N. & Perveen, A. (2025). Solvent polarity effects on extraction yield, phenolic content, and antioxidant properties of Malvaceae family seeds: a comparative study. *New Zealand Journal of Botany*, 63(4), 627–637. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2024.2392705>
- Ghaffari, S., Leask, R. L. & Jones, E. A. V. (2015). Flow dynamics control the location of sprouting and direct elongation during developmental angiogenesis. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.128058>
- Gianasi, B. L., Hamel, J.-F., Montgomery, E. M., Sun, J. & Mercier, A. (2021). Current Knowledge on the Biology, Ecology, and Commercial Exploitation of the Sea Cucumber *Cucumaria frondosa*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(4), 582–653. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1839015>
- Gomes, A. R., Freitas, A. C., Duarte, A. C. & Rocha-Santos, T. A. P. (2016). Echinoderms: A Review of Bioactive Compounds With Potential Health Effects. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 49, pp. 1–54). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63601-0.00001-6>
- Gómez-Archila, L. G., Rugeles, M. T. & Zapata, W. (2014). Actividad antiviral de compuestos aislados de esponjas marinas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3), 401–412. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000300001>
- Gong, P. X., Li, Q. Y., Wu, Y. C., Lu, W. Y., Zeng, J. & Li, H. J. (2021). Structural elucidation and antidiabetic activity of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Carbohydrate Polymers*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117969>
- Guillarme, D. & Veuthey, J. L. (2017). Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS. In *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques* (pp. 1–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811732-3.00001-7>
- Gunathilaka, T. L., Samarakoon, K., Ranasinghe, P. & Peiris, L. D. C. (2020). Antidiabetic Potential of Marine Brown Algae - A Mini Review. *Journal of Diabetes Research*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1230218>
- Guo, X., Ye, X., Sun, Y., Wu, D., Wu, N., Hu, Y. & Chen, S. (2014). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(5), 1088–1095. <https://doi.org/10.1021/jf404717y>
- Gutiérrez-del-Río, I., López-Ibáñez, S., Magadán-Corpas, P., Fernández-Calleja, L., Pérez-Valero, Á., Tuñón-Granda, M., Miguélez, E. M., Villar, C. J. & Lombó, F. (2021). Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. *Antioxidants*, 10(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>
- Hamburger, V. & Hamilton, H. L. (1951). *A series of normal stages in the development of the chick embryo*.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)
- Haque, N., Parveen, S., Tang, T., Wei, J. & Huang, Z. (2022). Marine Natural Products in Clinical Use. *Marine Drugs*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/md20080528>

- He, M., Wang, J., Hu, S., Wang, Y., Xue, C. & Li, H. (2014). The effects of fucosylated chondroitin sulfate isolated from *Isostichopus badionotus* on antimetastatic activity via down-regulation of Hif-1 α and Hpa. *Food Science and Biotechnology*, 23(5), 1643–1651. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0224-z>
- Hernández A., Guzman-García X., García-Barrientos R., Ascencio-Valle F., Sierra-Beltrán A., Vallejo-C+ordoba B., Gonzalez-Córdova A., Torres-Llanez M. & Guerrero-Legarreta I. (2015). Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *ISOSTICHOPUS FUSCUS* recolectado en el golfo de california, mexico. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14.
- Hernández-Sámano, A. C. & Hernández-Ledesma, B. (2015). Release of Antioxidant Peptides from the Body Wall Proteins of the Sea Cucumber *Isostichopus fuscus*. *Natural Product Communications*, 10, 1427–1430. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1934578X1501000829>
- Herrero-Pérezrul, M. D., Reyes Bonilla, H., García-Domínguez, F. & Cintra-Buenrostro, C. E. (1999). Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biology*, 135(3), 521–532. <https://doi.org/10.1007/s002270050653>
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C. & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.097>
- Hossain, A., Dave, D. & Shahidi, F. (2022). Antioxidant Potential of Sea Cucumbers and Their Beneficial Effects on Human Health. *Marine Drugs*, 20(8), 521. <https://doi.org/10.3390/md20080521>
- Hossain, A., Dave, D. & Shahidi, F. (2023). Sulfated polysaccharides in sea cucumbers and their biological properties: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 253). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127329>
- Hossain, A., Yeo, J., Dave, D. & Shahidi, F. (2022). Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*) Processing Discards as Affected by High-Pressure Processing (HPP). *Antioxidants*, 11(2), 337. <https://doi.org/10.3390/antiox11020337>
- Hostettmann, K., Marston, A. & Hostettmann, M. (1998). *Preparative Chromatography Techniques*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03631-0>
- Hu, D., Yang, G., Liu, X., Qin, Y., Zhang, F., Sun, Z. & Wang, X. (2024). Comparison of different drying technologies for coffee pulp tea: Changes in color, taste, bioactive and aroma components. *LWT*, 200, 116193. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116193>
- Hu, S., Chen, S., Zhu, H., Du, M., Jiang, W., Liu, Y., Gao, X., Su, L. & Xu, Y. (2022). Low molecular weight, 4-o-sulfation, and sulfation at meta-fucose positively promote the activities of sea cucumber fucoidans on improving insulin resistance in hfd-fed mice. *Marine Drugs*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/md20010037>
- Huang, Y. J. & Nan, G. X. (2019). Oxidative stress-induced angiogenesis. In *Journal of Clinical Neuroscience* (Vol. 63, pp. 13–16). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.02.019>
- Huang, Z. (2004). Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 10(4), 463. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i4.463>

- Huck, C. W. & Bonn, G. K. (2000). Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885(1–2), 51–72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00333-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00333-2)
- Hunter, D. J. & Reddy, K. S. (2013). Noncommunicable Diseases. *New England Journal of Medicine*, 369(14), 1336–1343. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1109345>
- Huveneers, S. & Phng, L. K. (2024). Endothelial cell mechanics and dynamics in angiogenesis. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 91). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102441>
- Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Komatsu, R., Doi, K., Ogawa, Y., Tamura, N., Takaya, K., Igaki, T., Yamashita, J., Chun, T.-H., Masatsugu, K., Becker, A. E. & Nakao, K. (1998). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions. *Circulation*, 98(20), 2108–2116. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.20.2108>
- Ionescu, C., Oprea, B., Ciobanu, G., Georgescu, M., Bică, R., Mateescu, G.-O., Huseynova, F. & Barragan-Montero, V. (2022). The Angiogenic Balance and Its Implications in Cancer and Cardiovascular Diseases: An Overview. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(7). <https://doi.org/10.3390/medicina58070903>
- Islas, J. F., Acosta, E., G-Buentello, Z., Delgado-Gallegos, J. L., Moreno-Treviño, M. G., Escalante, B. & Moreno-Cuevas, J. E. (2020). An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. *Journal of Functional Foods*, 74, 104171. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104171>
- Iyer, R. K., Chiu, L. L. Y., Vunjak-Novakovic, G. & Radisic, M. (2012). Biofabrication enables efficient interrogation and optimization of sequential culture of endothelial cells, fibroblasts and cardiomyocytes for formation of vascular cords in cardiac tissue engineering. *Biofabrication*, 4(3), 035002. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/4/3/035002>
- Jayathilake, N. J. & Jayewardena, U. A. (2021). Genotoxic potential of *Bohadschia vitiensis* aqueous extract: A sea cucumber species, using *Allium cepa* genotoxicity model. *Advance Pharmaceutical Journal*, 6(1), 9–14. <https://doi.org/10.31024/apj.2021.6.1.2>
- Jimenez, P. C., Sahm, B. D. B., Rezende-Teixeira, P., Ferreira, E. G., Guimarães, L. A. & Costa-Lotufo, L. V. (2023). *Pharmacology of marine drugs: Pattern-, purpose- and prudence-driven innovations* (pp. 101–131). <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2023.10.004>
- Jin, F., Zheng, X., Yang, Y., Yao, G., Ye, L., Doeppner, T. R., Hermann, D. M., Wang, H. & Dai, Y. (2019). Impairment of hypoxia-induced angiogenesis by LDL involves a HIF-centered signaling network linking inflammatory TNF α and angiogenic VEGF. *Aging*, 11(2), 328–349. <https://doi.org/10.18632/aging.101726>
- Jovanovic Aleksandar & Krajnovic Dusanka. (2022). Historical overview of quinine isolation and its importance. *VIII Congress of Pharmacists of Serbia with International Participation*, 72. <https://aseestant.ceon.rs/index.php/arhfarm/article/view/38462>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J. & O'Donnell, C. P. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007>
- Kalinin, V. I. (2021). Echinoderms Metabolites: Structure, Functions, and Biomedical Perspectives. *Marine Drugs*, 19(3), 125. <https://doi.org/10.3390/md19030125>

- Karamysheva, A. F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 73, Issue 7, pp. 751–762). Maik Nauka-Interperiodica Publishing. <https://doi.org/10.1134/S0006297908070031>
- Khamis, A. A., Elkeiy, M. M., El-Gamal, M. M., Saad-Allah, K. M. & Salem, M. M. (2025). Biological and Molecular Efficiency of *Paracentrotus lividus* Shell in vitro Study: Antioxidant and Angiogenesis Effects Against T47D Breast Cancer Cell Line Via Nrf2/HMOX-1/ and HIF-1 α /VEGF Signaling Pathways. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 83(3), 2937–2959. <https://doi.org/10.1007/s12013-025-01678-6>
- Khaw, Y. S., Yusoff, F. M., Tan, H. T., Noor Mazli, N. A. I., Nazarudin, M. F., Shaharuddin, N. A., Omar, A. R. & Takahashi, K. (2022). Fucoxanthin Production of Microalgae under Different Culture Factors: A Systematic Review. *Marine Drugs*, 20(10), 592. <https://doi.org/10.3390/md20100592>
- Klangmanee, K. & Athipornchai, A. (2019). A rapid phytochemical screening of the effective phenolic antioxidant agents using FeCl₃ reagent. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 11, 3475–3480. www.jpsr.pharmainfo.in
- Kondrychyn, I., He, L., Wint, H., Betsholtz, C. & Phng, L.-K. (2025). Combined forces of hydrostatic pressure and actin polymerization drive endothelial tip cell migration and sprouting angiogenesis. *ELife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.98612.3>
- Koning, M., Dumas, S. J., Avramut, M. C., Koning, R. I., Meta, E., Lievers, E., Wiersma, L. E., Borri, M., Liang, X., Xie, L., Liu, P., Chen, F., Lin, L., Luo, Y., Mulder, J., Spijker, H. S., Jaffredo, T., van den Berg, B. M., Carmeliet, P., ... Rabelink, T. J. (2022). Vasculogenesis in kidney organoids upon transplantation. *Npj Regenerative Medicine*, 7(1), 40. <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00237-4>
- Kotini, M. P., van der Stoel, M. M., Yin, J., Han, M. K., Kirchmaier, B., de Rooij, J., Affolter, M., Huveneers, S. & Belting, H.-G. (2022). Vinculin controls endothelial cell junction dynamics during vascular lumen formation. *Cell Reports*, 39(2), 110658. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110658>
- Krishnamurti, C. & Rao, S. C. (2016). The isolation of morphine by Serturmer. *Indian Journal of Anaesthesia*, 60(11), 861–862. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.193696>
- Kumar, M., Kumar, D., Garg, Y., Mahmood, S., Chopra, S. & Bhatia, A. (2023). Marine-derived polysaccharides and their therapeutic potential in wound healing application - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127331. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127331>
- Kupinski, A. Marie. (2022). *The vascular system* (3rd ed.). Wolters Kluwer Health. <https://shop.lww.com/The-Vascular-System/p/9781975175269?srsIid=AfmBOoqnRz7Sgt7bz5xpDxyfnfWxBevqmpmCoGR-6FnCqoOJ6bFJSxk-N>
- Lee, D. J. H., Ling, Y. S., Voo, C. L. Y., Lum, M. S. & Gansau, J. A. (2025). Characterization of metabolic features derived from the non-polar metabolite UHPLC-QTOF dataset of *Jaspis* sp. Collected from the waters off Pulau Banggi, Sabah, Malaysia. *Data in Brief*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2025.111474>
- Lee, J. S., Yu, Q., Shin, J. T., Sebzda, E., Bertozzi, C., Chen, M., Mericko, P., Stadtfeld, M., Zhou, D., Cheng, L., Graf, T., MacRae, C. A., Lepore, J. J., Lo, C. W. & Kahn, M. L. (2006). Klf2 Is an Essential Regulator of Vascular

- Hemodynamic Forces In Vivo. *Developmental Cell*, 11(6), 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.006>
- Lee, J.-E., Jayakody, J., Kim, J.-I., Jeong, J.-W., Choi, K.-M., Kim, T.-S., Seo, C., Azimi, I., Hyun, J. & Ryu, B. (2024). The Influence of Solvent Choice on the Extraction of Bioactive Compounds from *Asteraceae*: A Comparative Review. *Foods*, 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>
- Leong, A. & Kim, M. (2020). The Angiopoietin-2 and TIE Pathway as a Therapeutic Target for Enhancing Antiangiogenic Therapy and Immunotherapy in Patients with Advanced Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8689. <https://doi.org/10.3390/ijms21228689>
- Li, J.-H., Li, S., Zhi, Z.-J., Yan, L.-F., Ye, X.-Q., Ding, T., Yan, L., Linhardt, R.-J. & Chen, S.-G. (2016). Depolymerization of Fucosylated chondroitin sulfate with a modified fenton-system and anticoagulant activity of the resulting fragments. *Marine Drugs*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/md14090170>
- Li, S., Li, J., Zhi, Z., Wei, C., Wang, W., Ding, T., Ye, X., Hu, Y., Linhardt, R. J. & Chen, S. (2017). Macromolecular properties and hypolipidemic effects of four sulfated polysaccharides from sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, 173, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.063>
- Li, Y., Yu, C., Wang, X., Zhang, M., Zhang, J. & Wang, H. (2025). Structural characterization and biological functions of echinoderm polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 327, 146200. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146200>
- Liekens, S., De Clercq, E. & Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 61, 253–270. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00529-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00529-3)
- Lima, R. A., Hurtado, F. B., Meneguetti, D. U., Facundo, J. B., Militão, J. S. & Facundo, V. A. (2016). Approach phytochemistry of secondary metabolites of *Maytenus Guianensis* Klotzsch ex reissek (Celastraceae). *Ciência e Natura*, 38(3), 1479. <https://doi.org/10.5902/2179460x22021>
- Liu, J. X., Luo, M. Q., Xia, M., Wu, Q., Long, S. M., Hu, Y., Gao, G. C., Yao, X. L., He, M., Su, H., Luo, X. M. & Yao, S. Z. (2014). Marine compound catunaregin inhibits angiogenesis through the modulation of phosphorylation of Akt and eNOS *in vivo* and *in vitro*. *Marine Drugs*, 12(5), 2790–2801. <https://doi.org/10.3390/md12052790>
- Liu, Z.-L., Chen, H.-H., Zheng, L.-L., Sun, L.-P. & Shi, L. (2023). Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A. & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>
- Lu, Z., Sun, N., Dong, L., Gao, Y. & Lin, S. (2022). Production of Bioactive Peptides from Sea Cucumber and Its Potential Health Benefits: A Comprehensive Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(25), 7607–7625. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02696>
- M. Rusnati & M. Presta. (2007). Fibroblast Growth Factors/Fibroblast Growth Factor Receptors as Targets for the Development of Anti-Angiogenesis Strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 13(20), 2025–2044. <https://doi.org/10.2174/138161207781039689>

- Mack, J. J. & Iruela-Arispe, M. L. (2018). NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype. *Current Opinion in Hematology*, 25(3), 212–218. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000425>
- Macura, R., Michalczyk, M., Fiutak, G. & Maciejaszek, I. (2019). Effect of freeze-drying and air-drying on the content of carotenoids and anthocyanins in stored purple carrot [pdf]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 18(2), 135–142. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0637>
- Madrigal Redondo, G. L., Loría Gutiérrez, A., Blanco Barrantes, J., Porrás Navarro, M., Ortega Monge, M. C. & Cerdas Vargas, M. J. (2021). Aspectos generales del *Allium sativum* - una revisión. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 62(4), 471–481. <https://doi.org/10.30827/ars.v62i4.20843>
- Majeed, H. & Gupta, V. (2025). *Adverse Effects of Radiation Therapy*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563259/>
- Maluf, L. (1988). *Composition and Distribution of the Central Eastern Pacific Echinoderms* (Vol. 2). Natural History Museum of Los Angeles County. <https://www.scielo.sa.cr/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0034-7744200800030001800023&lng=es&pid=S0034-77442008000300018>
- Markakis, K., Bowling, F. L. & Boulton, A. J. M. (2016). The diabetic foot in 2015: An overview. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32, 169–178. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2740>
- Marques, J., Vilanova, E., Mourão, P. A. S. & Fernández-Busquets, X. (2016). Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by *Plasmodium*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep24368>
- Marshall, P. G. (1964). Steroids. In *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (pp. 360–421). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044453345-6.50573-3>
- Martínez José & Herrera, L. (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología*, 83–96. https://www.academia.edu/39796895/ANGIOG%C3%89NESIS_VEGF_VEGFRs_como_Blancos_Terap%C3%A9uticos_en_el_Tratamiento_Contra_el_C%C3%A1ncer
- Martínez-Outschoorn, U. E., Balliet, R. M., Rivadeneira, D., Chiavarina, B., Pavlides, S., Wang, C., Whitaker-Menezes, D., Daumer, K., Lin, Z., Witkiewicz, A., Flomenberg, N., Howell, A., Pestell, R., Knudsen, E., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. (2010). Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution. *Cell Cycle*, 9(16), 3276–3296. <https://doi.org/10.4161/cc.9.16.12553>
- Matthew James. (2013). *Galápagos Marine Invertebrates: Taxonomy, Biogeography, and Evolution in Darwin's Islands*. Springer Science Business Media New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0646-5>
- Maurya, A. (2018). Vacuum Liquid Chromatography: Simple, Efficient and Versatile Separation Technique for Natural Products. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 7(2). <https://doi.org/10.19080/omcij.2018.07.555710>
- Mazumder, B., Lu, M., Rahmoune, H., Fernandez-Villegas, A., Ward, E., Wang, M., Ren, J., Yu, Y., Zhang, T., Liang, M., Li, W., Läubli, N. F., Kaminski, C. F. & Kaminski Schierle, G. S. (2024). Sea cucumber-derived extract can protect skin cells from oxidative DNA damage and mitochondrial degradation and promote wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 180, 117466. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117466>

- Melo, W. F., Linhares, P. C. F., Nascimento, J. W. B. do, Lima, A. G. B. de, Formiga, J. A., Abrantes, S. Y. S. M., Rolim, F. D., Ferreira, A. C. & Maracajá, P. B. (2024). Composição química e principais aplicações do óleo essencial da *Mentha piperita*: uma revisão de literatura. *Caderno Pedagógico*, 21(7), e5794. <https://doi.org/10.54033/cadpedv21n7-148>
- Mendoza José. (2016). *Análisis Fitoquímico y actividad farmacológica de Sargassum lapazeanum Setchell & N.L. Gardner (Ochrophyta: Fucales, Phaeophyceae)* [Universidad Autónoma de Baja California Sur]. <https://biblio.uabcs.mx/tesis/te3636.pdf>
- Mino, A., Cabezas, M., Lara, D. & Castillo, D. (2024). EE313 Economic Impact of Cancer Related to Human Papilloma Virus in Ecuador. *Value in Health*, 27(6), S115. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2024.03.612>
- Misgiati, Winarni, I., Murniasih, T., Novriyanti, E., Tarman, K., Safithri, M., Setyaningsih, I., Cahyati, D., Pratama, B. P. & Wirawati, I. (2024). The anticancer and antioxidant potential of local sea cucumber *Holothuria edulis*, an ecology balancer of Labuan Bajo marine ecosystem. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100625>
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B. & Worm, B. (2011). How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, 9(8), e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Mukaigasa, K., Nguyen, L. T. P., Li, L., Nakajima, H., Yamamoto, M. & Kobayashi, M. (2012). Genetic Evidence of an Evolutionarily Conserved Role for Nrf2 in the Protection against Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 32(21), 4455–4461. <https://doi.org/10.1128/MCB.00481-12>
- Myron, P., Siddiquee, S. & Al Azad, S. (2014). Fucosylated chondroitin sulfate diversity in sea cucumbers: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 112, pp. 173–178). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.091>
- Navarro, E. T., Marcos, T., Marcos, F. M., Romero De Avila, J. M., Juan, P. & López, T. (2022). Prevención de amputaciones relacionadas con el pie diabético. *Journal of Negative and No Positive Results*, 2, 235–265. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.4450>
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Nguyen, D. Q., Nguyen, N. L., Nguyen, V. T., Nguyen, T. H. G., Do, T. T. T., Nguyen, T. H., Dung, D. H., Nguyen, T. K. L., Nguyen, Q. H., Le, T. T. & Nguyen, H. H. (2023). Isolation and Identification of Vincristine and Vinblastine Producing Endophytic Fungi from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(8), 188. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601507>
- Nicuță, D., Grosu, L., Patriciu, O.-I., Voicu, R.-E. & Alexa, I.-C. (2025). The *Allium cepa* Model: A Review of Its Application as a Cytogenetic Tool for Evaluating the Biosafety Potential of Plant Extracts. *Methods and Protocols*, 8(4), 88. <https://doi.org/10.3390/mps8040088>
- Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Volin, M. V, Gamelli, R. L. & DiPietro, L. A. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American Journal of Pathology*, 152(6), 1445–1452.
- Niu, Q., Zhou, H., Ma, X., Jiang, Y., Liu, C., Wang, W., Yu, G. & Li, G. (2024). Anti-enterovirus 71 activity of native fucosylated chondroitin sulfates and their

- Nowak, D. & Jakubczyk, E. (2020). The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods*, 9(10), 1488. <https://doi.org/10.3390/foods9101488>
- N.S Mariana, M.A. Norfarrah, F.M Yusoff & A. Arshad. (2009). Evaluating the Antibacterial Activity and in vivo assay of Methanolic Extract of *Stichopus badionotus*. *International Journal of Pharmacology*, 228–231. <https://doi.org/https://doi.org/10.3923/ijp.2009.228.231>
- Nurrachma, M. Y., Sakaraga, D., Nugraha, A. Y., Rahmawati, S. I., Bayu, A., Sukmarini, L., Atikana, A., Prasetyoputri, A., Izzati, F., Warsito, M. F. & Putra, M. Y. (2021). Cembranoids of Soft Corals: Recent Updates and Their Biological Activities. *Natural Products and Bioprospecting*, 11(3), 243–306. <https://doi.org/10.1007/s13659-021-00303-2>
- Nussinov, R., Yavuz, B. R. & Jang, H. (2025). Molecular principles underlying aggressive cancers. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 10, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02129-7>
- Och, A., Podgórski, R. & Nowak, R. (2020). Biological Activity of Berberine—A Summary Update. *Toxins*, 12(11), 713. <https://doi.org/10.3390/toxins12110713>
- Olivera-Castillo, L., García Barrientos, R., Guerrero Legarreta, I., HernándezHern, A. & Chim Chi, Y. (2014). Sea Cucumber as a Source of Bioactive Compounds: Current Research on *Isostichopus badionotus* and *Isostichopus fuscus* from Mexico. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plants and Animal Sources*, 1. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118412893.ch15DigitalObjectIdentifier\(DOI\)](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118412893.ch15DigitalObjectIdentifier(DOI))
- Olivera-Castillo, L., Grant, G., Kantún-Moreno, N., Acevedo-Fernández, J. J., Puc-Sosa, M., Montero, J., Olvera-Novoa, M. A., Negrete-León, E., Santa-Olalla, J., Ceballos-Zapata, J., Bercansil, M. C. M., Merca, F. E., Lindsay-Edwards, J., Puerto-Castillo, C., Gil-Zamorano, J., Fernández-Herrera, M. A., Pérez-Tapia, M., Dávalos, A. & Rodríguez-Canul, R. (2018). Sea cucumber (*Isostichopus badionotus*) body-wall preparations exert anti-inflammatory activity *in vivo*. *PharmaNutrition*, 6(2), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.03.002>
- Olivera-Castillo, L., Grant, G., Kantún-Moreno, N., Barrera-Pérez, H. A., Montero, J., Olvera-Novoa, M. A., Carrillo-Cocom, L. M., Acevedo, J. J., Puerto-Castillo, C., Solís, V. M., Pérez-Vega, J. A., Gil-Zamorano, J., Hernández-Garibay, E., Fernández-Herrera, M. A., Pérez-Tapia, M., Medina-Contreras, O., Villanueva-Toledo, J. R., Rodríguez-Canul, R. & Dávalos, A. (2020). A glycosaminoglycan-rich fraction from sea cucumber *isostichopus badionotus* has potent anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. *Nutrients*, 12(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12061698>
- Olivera-Castillo, L., Grant, G., Medina-Contreras, O., Cruz-López, H., Carrillo-Cocom, L., Cruz-Córdova, A., Segura-Cadiz, F., Fernández-Velasco, D. A., Rodríguez-Morales, S., Cauich-Rodríguez, J. V., Moo-Puc, R. E., Puerto-Castillo, C., Moo-Pech, G. de J., Uuh-Narvaez, J. J., Olvera-Novoa, M. A. & Rodríguez-Canul, R. (2025). Sea Cucumber (*Isostichopus badionotus*): Bioactivity and Wound Healing Capacity In Vitro of Small Peptide Isolates from Digests of Whole-Body Wall or Purified Collagen. *Marine Drugs*, 23(11), 411. <https://doi.org/10.3390/md23110411>

- Panuwet, P., Hunter, R. E., D'Souza, P. E., Chen, X., Radford, S. A., Cohen, J. R., Marder, M. E., Kartavenka, K., Ryan, P. B. & Barr, D. B. (2016). Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(2), 93–105. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.980775>
- Parrales Alay, A. W. & Villamar Pibaque, J. A. (2022). Estudio de los alcaloides presentes en el bejuco de la saragoza (*Aristolochia elegans*). *Revista Universidad de Guayaquil*, 134(1), 67–81. <https://doi.org/10.53591/rug.v134i1.1418>
- Pastrana, O. J., Santafé, G. G. & Torres, O. L. (2016). Perfil de Ácidos Grasos y Evaluación de las Actividades Antioxidante y Antifúngica del Holotureo *Isostichopus badionotus*. *Informacion Tecnologica*, 27(3), 3–10. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000300002>
- Pawson, D. L. (1970). *The Marine Fauna of New Zealand: Sea Cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea)*. New Zealand Oceanographic Institute.
- Pawson David L. (2007). Phylum Echinodermata. In *Zootaxa*.
- Payne, S., Neal, A. & De Val, S. (2024). Transcription factors regulating vasculogenesis and angiogenesis. *Developmental Dynamics*, 253(1), 28–58. <https://doi.org/10.1002/dvdy.575>
- Pereira, R. B., Evdokimov, N. M., Lefranc, F., Valentão, P., Kornienko, A., Pereira, D. M., Andrade, P. B. & Gomes, N. G. M. (2019). Marine-Derived Anticancer Agents: Clinical Benefits, Innovative Mechanisms, and New Targets. *Marine Drugs*, 17(6), 329. <https://doi.org/10.3390/md17060329>
- Pérez Aida. (2014). *Evaluación de la actividad citotóxica y componentes del pepino de mar Isostichopus badionotus (SELENKA, 1867) del litoral de la península de Yucatán México* [Universidad autónoma de Nuevo León]. <https://cd.dgb.uanl.mx/handle/201504211/16672>
- Pérez-Espadas, A. R., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Morales-Rubio, M. E., León-Deniz, L. V., Canul-Canché, J. & Quijano, L. (2014). In vitro cytotoxic activity of *Isostichopus badionotus*, A sea cucumber from Yucatan Peninsula coast. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 4(3), 183–186. <https://doi.org/10.6000/1927-5951.2014.04.03.3>
- Pérez-Vega, J. A., Olivera-Castillo, L., Gómez-Ruiz, J. ángel & Hernández-Ledesma, B. (2013). Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). *Journal of Functional Foods*, 5(2), 869–877. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.036>
- Pichersky, E. & Lewinsohn, E. (2011). Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 549–566. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103814>
- Popov, R. S., Ivanchina, N. V. & Dmitrenok, P. S. (2022). Application of MS-Based Metabolomic Approaches in Analysis of Starfish and Sea Cucumber Bioactive Compounds. In *Marine Drugs* (Vol. 20, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md20050320>
- Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
- Priego-Capote, F. (2021). Solid–liquid extraction techniques. In *Analytical Sample Preparation With Nano- and Other High-Performance Materials* (pp. 111–130). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822139-6.00002-X>
- Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary

- Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Proshkina, E., Plyusnin, S., Babak, T., Lashmanova, E., Maganova, F., Koval, L., Platonova, E., Shaposhnikov, M. & Moskalev, A. (2020). Terpenoids as Potential Geroprotectors. *Antioxidants*, 9(6), 529. <https://doi.org/10.3390/antiox9060529>
- Quijano-Hernández Israel, De-la-cruz Susana, Del-Angel-Caraza Javier, Martínez-Castañeda José & Victoria-Mora José. (2015). Revista de investigaciones veterinarias del Perú: RIVEP. *RIVEP*, 587–595. <https://portal.issn.org/resource/ISSN/1682-3419>
- Rasekh, P., Kameli, A., Khoradmehr, A., Baghban, N., Mohebbi, G., Barmak, A., Nabipour, I., Azari, H., Heidari, Y., Daneshi, A., Bargahi, A., Khodabandeh, Z., Zare, S., Afshar, A., Shirazi, R., Almasi-Turk, S. & Tamadon, A. (2023). Proliferative Effect of Aqueous Extract of Sea Cucumber (*Holothuria parva*) Body Wall on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Marine Drugs*, 21(5), 267. <https://doi.org/10.3390/md21050267>
- Raymund, J., Torres, D. & Malaya, V. N. (2021). Mitodepressive and Genotoxic Potential of Crude Body Wall and Cuvierian Tubule Extracts of Mani-mani (*Pearsonothuria graeffei Semper*) on Root Meristems of Onion (*Allium cepa L.*). *Malaya / Mindanao Journal of Science and Technology*, 19(2), 59–90. <https://mjst.ustp.edu.ph/index.php/mjst/article/view/1001/192>
- Reed, K. A., Manam, R. R., Mitchell, S. S., Xu, J., Teisan, S., Chao, T.-H., Deyanat-Yazdi, G., Neuteboom, S. T. C., Lam, K. S. & Potts, B. C. M. (2007). Salinosporamides D–J from the Marine Actinomycete *Salinispora tropica*, Bromosalinosporamide, and Thioester Derivatives Are Potent Inhibitors of the 20S Proteasome. *Journal of Natural Products*, 70(2), 269–276. <https://doi.org/10.1021/np0603471>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. & Minor, L. (2004). *Cell Viability Assays*.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Salleh, N. H., Zulklipli, I. N., Mohd Yasin, H., Ja'afar, F., Ahmad, N., Wan Ahmad, W. A. N. & Ahmad, S. R. (2021). Systematic Review of Medicinal Plants Used for Treatment of Diabetes in Human Clinical Trials: An ASEAN Perspective. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/5570939>
- Santucci, C., Carioli, G., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Pastorino, U., Boffetta, P., Negri, E., Bosetti, C. & La Vecchia, C. (2020). Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview. *European Journal of Cancer Prevention*, 29(5), 367–381. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000594>
- Saxena, C., Author, C. & History, A. (2023). A Review on Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants. *Journal of Advanced Zoology*, 44, 647–652. <https://jazindia.com/index.php/jaz/article/view/3103>
- Schierwater, B. & DeSalle, R. (2021). *Invertebrate Zoology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429159053>
- Schwartz Adriana, Rivera Hilda & Talbott Blanche. (2019). Ozonoterapia en el tratamiento del pie diabético neuroinfeccioso. Reporte de caso. *Official Journal of Aepromo*, 9(Ozone Therapy Global Journal), 125–133. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7306848.pdf>

- Shi, D., Guo, W., Chen, W., Fu, L., Wang, J., Tian, Y., Xiao, X., Kang, T., Huang, W. & Deng, W. (2012). Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating α 7AChR, ERK, HIF-1 α and VEGF/PEDF signaling. *PloS One*, 7(8), e43898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043898>
- Shi, S., Feng, W., Hu, S., Liang, S., An, N. & Mao, Y. (2016). Bioactive compounds of sea cucumbers and their therapeutic effects. In *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 549–558). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-4334-8>
- Sinha, N. & Dabla, P. (2015). Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension—A Current Review. *Current Hypertension Reviews*, 11(2), 132–142. <https://doi.org/10.2174/1573402111666150529130922>
- Solis-Pazmino, P., Salazar-Vega, J., Lincango-Naranjo, E., Garcia, C., Koupermann, G. J., Ortiz-Prado, E., Ledesma, T., Rojas, T., Alvarado-Mafla, B., Carcamo, C., Ponce, O. J. & Brito, J. P. (2021). Thyroid cancer overdiagnosis and overtreatment: a cross-sectional study at a thyroid cancer referral center in Ecuador. *BMC Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07735-y>
- Souza Lins Borba, F. K. de, Ventura Lola Costa, E., Balvedi Polli, V. A., Sousa Coelho, D., Maraschin, M., Fernando Dias, P. & Nogueira, R. A. (2017). Pro-angiogenic Activity Assay of Chondroitin Sulfate and Glucosamine Sulfate on Vascular Network of Mouse and of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *Journal of Glycobiology*, 06(03). <https://doi.org/10.4172/2168-958X.1000129>
- Spigno, G., Tramelli, L. & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Stable García, Y. (2023). Cicatrización de Heridas en la Diabetes Mellitus. *Archivos de Medicina*, 19. <https://doi.org/10.36648/1698-9465.23.19.1581>
- Stonik, V. A., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V. & Ivanchina, N. V. (2020). Asterosaponins: Structures, Taxonomic Distribution, Biogenesis and Biological Activities. *Marine Drugs*, 18(12), 584. <https://doi.org/10.3390/md18120584>
- Suryaprabha, V., Likitha, K., Kaviarasu, D., Uma, A. & Saravanan, S. (2021). *Bioactive Compounds Derived from Marine Organisms for Human Health Applications*. www.bioticainternational.com
- Swami, U., Shah, U. & Goel, S. (2015). Eribulin in Cancer Treatment. *Marine Drugs*, 13(8), 5016–5058. <https://doi.org/10.3390/md13085016>
- Szerlauth, A., Varga, S. & Szilagyi, I. (2023). Molecular Antioxidants Maintain Synergistic Radical Scavenging Activity upon Co-Immobilization on Clay Nanoplatelets. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(10), 5622–5631. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00909>
- Tabuenca Nuria. (2024). *Programa de educación para la salud: Prevención, control y tratamiento de la formación de úlceras en pacientes con diabetes mellitus*. Universidad Europea.
- Theis, N. & Lerda, M. (2003). The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93–S102. <https://doi.org/10.1086/374190>
- Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., Sun, P., Lin, L. & Ding, J. (2005). PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, Exhibits anti-

- angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biology & Therapy*, 4(8), 874–882. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.8.1917>
- Tong, Y., Zhang, X., Tian, F., Yi, Y., Xu, Q., Li, L., Tong, L., Lin, L. & Ding, J. (2005). Philinopside a, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. *International Journal of Cancer*, 114(6), 843–853. <https://doi.org/10.1002/ijc.20804>
- Tufan, A. C. & Lale Satiroglu-Tufan, N. (2005). The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model System for the Study of Tumor Angiogenesis, Invasion and Development of Anti-Angiogenic Agents. In *Current Cancer Drug Targets* (Vol. 5).
- Vabret, N., Britton, G. J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., Levantovsky, R., Malle, L., Moreira, A., Park, M. D., Pia, L., Risson, E., Saffern, M., Salomé, B., Esai Selvan, M., Spindler, M. P., Tan, J., van der Heide, V., Gregory, J. K., ... Laserson, U. (2020). Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*, 52(6), 910–941. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
- Vaishnav, P. & Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 2, pp. 223–229). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>
- Vargas Mamani, J. J. (2024). El reactivo de Dragendorff: *Revista Médica Basadrina*, 18(1), 52–57. <https://doi.org/10.33326/26176068.2024.1.2104>
- Vartanian, R. K. & Weidner, N. (1994). Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 144(6), 1188–1194.
- Verheul, Henk. M. W. & Pinedo, H. M. (2007). Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 475–485. <https://doi.org/10.1038/nrc2152>
- Vimalraj, S. (2022). A concise review of VEGF, PDGF, FGF, Notch, angiopoietin, and HGF signalling in tumor angiogenesis with a focus on alternative approaches and future directions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 1428–1438. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.129>
- Wagenmakers, A. J. M., Strauss, J. A., Shepherd, S. O., Keske, M. A. & Cocks, M. (2016). Increased muscle blood supply and transendothelial nutrient and insulin transport induced by food intake and exercise: effect of obesity and ageing. *The Journal of Physiology*, 594(8), 2207–2222. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284513>
- Wang, J., Hu, S., Jiang, W., Song, W., Cai, L. & Wang, J. (2016). Fucoidan from sea cucumber may improve hepatic inflammatory response and insulin resistance in mice. *International Immunopharmacology*, 31, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.009>
- Wang, X., Zhang, A., Yan, G., Han, Y. & Sun, H. (2014). UHPLC-MS for the analytical characterization of traditional Chinese medicines. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 63, pp. 180–187). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.013>
- Wang, Y., Xue, W., Pustovalova, M., Kuzmin, D. V. & Leonov, S. (2025). Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Model for Cancer Studies and Drug Evaluation. In *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* (Vol. 30, Issue 5, p. 37456). <https://doi.org/10.31083/FBL37456>

- Wargasetia, T. L., Ratnawati, H. & Widodo, N. (2020). *Anticancer potential of holothurin A, holothurin B, and holothurin B3 from the sea cucumber Holothuria scabra*. 040084. <https://doi.org/10.1063/5.0002552>
- Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. & Folkman, J. (1991). Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 324(1), 1–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199101033240101>
- Xu, H., Zhou, Q., Liu, B., Chen, F. & Wang, M. (2022). Holothurian fucosylated chondroitin sulfates and their potential benefits for human health: Structures and biological activities. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 275). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118691>
- Yang, X.-W., Chen, X.-Q., Dong, G., Zhou, X.-F., Chai, X.-Y., Li, Y.-Q., Yang, B., Zhang, W.-D. & Liu, Y. (2011). Isolation and structural characterisation of five new and 14 known metabolites from the commercial starfish *Archaster typicus*. *Food Chemistry*, 124(4), 1634–1638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.033>
- Ye, J., Wang, C., Chen, X., Guo, S. & Sun, M. (2008). Marine lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumor growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(6), 1261–1267. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1269-1>
- Yetkin-Arik, B., Vogels, I. M. C., Neyazi, N., van Duinen, V., Houtkooper, R. H., van Noorden, C. J. F., Klaassen, I. & Schlingemann, R. O. (2019). Endothelial tip cells in vitro are less glycolytic and have a more flexible response to metabolic stress than non-tip cells. *Scientific Reports*, 9(1), 10414. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46503-2>
- Yin, Q., Xiang, L., Han, X., Zhang, Y., Lyu, R., Yuan, L. & Chen, S. (2025). The evolutionary advantage of artemisinin production by *Artemisia annua*. *Trends in Plant Science*, 30(2), 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.09.006>
- Yun, J., Rocic, P., Pung, Y. F., Belmadani, S., Carrao, A. C. R., Ohanyan, V. & Chilian, W. M. (2009). Redox-Dependent Mechanisms in Coronary Collateral Growth: The “Redox Window” Hypothesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(8), 1961–1974. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2476>
- Yun, Y.-R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J.-H., Shin, U. S. & Kim, H.-W. (2010). Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *Journal of Tissue Engineering*, 1(1). <https://doi.org/10.4061/2010/218142>
- Zakaria, B., Eleroui, M., Hajer, B. S., Amal, F., Kraiem, M., Youlyouz Marfak, I., Essayagh, S., Hilali, S., Badraoui, R., Kallel, H., Pujo, J. M., Ben Amara, I. & Hilali, A. (2024). *Evaluation of the Pro-Angiogenic Effect in Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Model and the In Vivo Wound Healing Potential of the Moroccan Polysaccharide-Rich Algae <i>Osmundea pinnatifida</i>*. <https://doi.org/10.20944/preprints202410.1838.v1>
- Zakirov, B., Charalambous, G., Thuret, R., Aspalter, I. M., Van-Vuuren, K., Mead, T., Harrington, K., Regan, E. R., Herbert, S. P. & Bentley, K. (2021). Active perception during angiogenesis: filopodia speed up Notch selection of tip cells *in silico* and *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1821). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0753>
- Zarychta, E. & Ruzkowska-Ciastek, B. (2022). Cooperation between Angiogenesis, Vasculogenesis, Chemotaxis, and Coagulation in Breast Cancer

- Metastases Development: Pathophysiological Point of View. *Biomedicines*, 10(2), 300. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020300>
- Zhang, L.-X., Fan, X. & Shi, J.-G. (2006). A novel pyrrole oligoglycoside from the starfish *Asterina pectinifera*. *Natural Product Research*, 20(3), 229–233. <https://doi.org/10.1080/14786410500045663>
- Zhao, L., Liu, Q., Yang, X. & Cao, R. (2018). Comparative Study on Antineoplastic Activity of Polysaccharide from Four Kinds of Sea Cucumber. *Journal of Ocean University of China*, 17(6), 1473–1478. <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3559-x>
- Zhao, Q., Liu, Z., Xue, Y., Wang, J., Li, H., Tang, Q., Wang, Y., Dong, P. & Xue, C. (2011). Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(7), 534–544. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000217>
- Zhao, Y.-C., Xue, C.-H., Zhang, T.-T. & Wang, Y.-M. (2018). Saponins from Sea Cucumber and Their Biological Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), 7222–7237. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01770>
- Zhu, Q., Lin, L. & Zhao, M. (2020). Sulfated fucan/fucosylated chondroitin sulfate-dominated polysaccharide fraction from low-edible-value sea cucumber ameliorates type 2 diabetes in rats: New prospects for sea cucumber polysaccharide based-hypoglycemic functional food. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.043>
- Zimna, A. & Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed Research International*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/549412>
- Zoepfl, M., Dwivedi, R., Taylor, M. C., Pomin, V. H. & McVoy, M. A. (2021). Antiviral activities of four marine sulfated glycans against adenovirus and human cytomegalovirus. *Antiviral Research*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105077>
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S. & Paz-Ares, L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1551–1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>

7. Apéndices y anexos

Apéndice A

Datos obtenidos a partir del modelo *Allium cepa*

Tabla A1 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el control (agua destilada).

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Control R1	0.4	0.6	0.8	1.0
Control R2	0.4	1.0	1.1	1.1
Control R3	0.0	0.2	0.2	0.2

Tabla A2 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para los controles (agua destilada).

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
Control R1	0.2	0.4	0.6
Control R2	0.6	0.7	0.7
Control R3	0.2	0.2	0.2
Promedio	0.3	0.4	0.5
Desviación estándar	0.2	0.3	0.3

Tabla A3 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 1.1 M.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
1.1 M R1	2.0	3.3	3.8	3.8
1.1 M R2	1.6	3.1	4.0	4.4
1.1 M R3	0.6	1.7	1.9	1.9

Tabla A4 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 1.1 M.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
1.1 M R1	1.3	1.8	1.8
1.1 M R2	1.5	2.4	2.8
1.1 M R3	1.1	1.3	1.3
Promedio	1.3	1.8	2.0
Desviación estándar	0.2	0.6	0.8

Tabla A5 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 1.2 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
1.2 M:C R1	1.2	1.6	1.9	2.1
1.2 M:C R2	1.8	2.3	2.6	2.8
1.2 M:C R3	1.3	1.9	2.1	2.3

Tabla A6 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 1.2 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
1.2 M:C R1	0.4	0.7	0.9
1.2 M:C R2	0.5	0.8	1.0
1.2 M:C R3	0.6	0.8	1.0
Promedio	0.5	0.8	1.0
Desviación estándar	0.1	0.1	0.1

Tabla A7 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 1.3 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
1.3 M:C R1	1.9	2.8	3.5	3.8
1.3 M:C R2	2.5	3.5	4.1	4.7
1.3 M:C R3	2.5	3.4	4.2	4.8

Tabla A8 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 1.3 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
1.3 M:C R1	0.9	1.6	1.9
1.3 M:C R2	1.0	1.6	2.2
1.3 M:C R3	0.9	1.7	2.3
Promedio	0.9	1.6	2.1
Desviación estándar	0.1	0.1	0.2

Tabla A9 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 1.4 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
1.4 M:C R1	1.5	2.7	3.4	4.2
1.4 M:C R2	1.6	2.7	3.4	4.4
1.4 M:C R3	1.7	2.9	3.6	4.5

Tabla A10 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 1.4 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
1.4 M:C R1	1.2	1.9	2.7
1.4 M:C R2	1.1	1.8	2.8
1.4 M:C R3	1.2	1.9	2.8
Promedio	1.2	1.9	2.8
Desviación estándar	0.1	0.1	0.1

Tabla A11 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 2.1 M.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
2.1 M R1	2.1	3.4	4.0	4.1
2.1 M R2	1.9	3.3	4.2	4.5
2.1 M R3	0.8	1.9	2.1	2.2

Tabla A12 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 2.1 M.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
2.1 M R1	1.3	1.9	2.0
2.1 M R2	1.4	2.3	2.6
2.1 M R3	1.1	1.3	1.4
Promedio	1.3	1.8	2.0
Desviación estándar	0.2	0.5	0.6

Tabla A13 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 2.2 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
2.2 M:C R1	1.5	1.9	2.2	2.4
2.2 M:C R2	2.1	2.6	2.9	3.0
2.2 M:C R3	1.6	2.2	2.4	2.6

Tabla A14 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 2.2 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
2.2 M:C R1	0.4	0.7	0.9
2.2 M:C R2	0.5	0.8	0.9
2.2 M:C R3	0.6	0.8	1.0
Promedio	0.5	0.8	0.9
Desviación estándar	0.1	0.1	0.1

Tabla A15 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 2.3 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
2.3 M:C R1	2.3	3.2	3.9	4.2
2.3 M:C R2	2.9	4.0	4.6	5.0
2.3 M:C R3	2.8	3.9	4.5	5.1

Tabla A16 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 2.3 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
2.3 M:C R1	0.9	1.6	1.9
2.3 M:C R2	1.1	1.7	2.1
2.3 M:C R3	1.1	1.7	2.3
Promedio	1.0	1.7	2.1
Desviación estándar	0.1	0.1	0.2

Tabla A17 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 2.4 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
2.4 M:C R1	2.4	3.3	4.1	4.8
2.4 M:C R2	2.5	3.4	4.2	4.9
2.4 M:C R3	2.6	3.5	4.3	5.0

Tabla A18 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 2.4 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
2.4 M:C R1	0.9	1.7	2.4
2.4 M:C R2	0.9	1.7	2.4
2.4 M:C R3	0.9	1.7	2.4
Promedio	0.9	1.7	2.4
Desviación estándar	0.0	0.0	0.0

Tabla A19 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 3.1 M.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
3.1 M R1	0.8	1.3	1.5	1.5
3.1 M R2	0.7	1.2	1.4	1.4
3.1 M R3	0.9	1.2	1.4	1.4

Tabla A20 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 3.1 M.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
3.1 M R1	0.5	0.7	0.7
3.1 M R2	0.5	0.7	0.7
3.1 M R3	0.3	0.5	0.5
Promedio	0.4	0.6	0.6
Desviación estándar	0.1	0.1	0.1

Tabla A21 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 3.2 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
3.2 M:C R1	2.0	3.1	3.8	4.6
3.2 M:C R2	0.8	1.9	2.6	3.3
3.2 M:C R3	1.7	2.6	3.2	3.9

Tabla A22 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 3.2 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
3.2 M:C R1	1.1	1.8	2.6
3.2 M:C R2	1.1	1.8	2.5
3.2 M:C R3	0.9	1.5	2.2
Promedio	1.0	1.7	2.4
Desviación estándar	0.1	0.2	0.2

Tabla A23 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 3.3 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
3.3 M:C R1	2.5	4.0	4.4	4.5
3.3 M:C R2	1.7	3.5	4.1	4.2
3.3 M:C R3	2.6	4.5	5.4	5.4

Tabla A24 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 3.3 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
3.3 M:C R1	1.5	1.9	2.0
3.3 M:C R2	1.8	2.4	2.5
3.3 M:C R3	1.9	2.8	2.8
Promedio	1.7	2.4	2.4
Desviación estándar	0.2	0.5	0.4

Tabla A25 Registro de longitudes de raicillas por triplicado para el tratamiento 3.4 M:C.

Tratamientos	Longitud de raicillas (cm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
3.4 M:C R1	2.0	2.7	3.8	4.8
3.4 M:C R2	1.9	2.5	3.3	4.6
3.4 M:C R3	1.7	2.9	4.1	5.1

Tabla A26 Tasa de crecimiento radicular en comparación al día 0 para el tratamiento 3.4 M:C.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)		
	Día 1	Día 2	Día 3
3.4 M:C R1	0.7	1.8	2.8
3.4 M:C R2	0.6	1.4	2.7
3.4 M:C R3	1.2	2.4	3.4
Promedio	0.8	1.9	3.0
Desviación estándar	0.3	0.5	0.4

