



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Evaluación de la respuesta antioxidante de *Tabernaemontana alba* Mill en un modelo murino de cáncer de mama

Tesis para obtener el título de Bióloga

Presenta:

Daniela Naomi Laguna Mancilla

Directora de tesis: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Asesor interno: M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo

CDMX, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Terapia Molecular (L-7 P.1.) de la unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por ser un segundo hogar y ser parte importante en mi formación académica.

A la M. en C. Catalina Machica Rodríguez, así como al M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo por aceptarme en el laboratorio, ayudarme en la realización de mi proyecto, apoyarme académica y personalmente, así como para darme aliento para culminar mi trabajo.

A Viridiana y Frida, amigas ejemplares que me apoyaron y ayudaron en la realización de mi trabajo, así como en problemas personales, jamás olvidare todos los momentos vividos durante la carrera, sin ustedes no hubiera sido lo mismo las quiero.

A mis compañeros de laboratorio que me ayudaron en realizar mi trabajo de experimentación y con quienes compartí salidas a campo.

A cada uno de los profesores con los que tuve la dicha de tomar clases y me dejaron grandes enseñanzas.

Dedicatorias

Quiero dedicar esta tesis a mi mamá una mujer ejemplar que me ha apoyado en todo momento, con su forma de ser me ha motivado cada día a ser mejor y sobre todo a nunca rendirme, así como cumplir todas mis metas y sueños. A ti mi heroína, espero siempre ser tu orgullo, te amo.

A mi hermana y mejor amiga que me ha ayudado y acompañado en todo momento. A pesar de las adversidades y polos opuestos en ciertas cuestiones, has sido mi gran soporte, además de la causa de muchas de mis alegrías, te amo hermanita.

A mi abuela y abuelo que, aunque ya son una estrella más que brilla en el cielo, fueron como un ejemplo de sabiduría y me enseñaron muchas cosas vitales en mi vida.

A Daniel Mauricio, por darme esperanza y ánimo para no rendirme. Me ayudaste hasta donde te fue posible incluso más, sé que seremos muy exitosos los dos. Recuerda siempre que te admiro mucho. Te amo.

A mis amigos de prepa 7, que hasta el día de hoy han sido una familia para mí, cada uno con su personalidad increíble me han enseñado grandes cosas, me han apoyado en todo momento y espero nuestra amistad dure por más tiempo, los quiero mucho.

TODOS LOS TRIUNFOS NACEN CUANDO NOS
ATREVEMOS A COMENZAR.



Índice de abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
DMBA	7,12-dimetilbenzoantraceno
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MDA	Malondialdehído
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
E.A.F	Extracto acuoso de flor
E.A. Fr	Extracto acuoso de fruto
E.A.T	Extracto acuoso de tallo
E.A.H	Extracto acuoso de hoja
E.A. PC	Extracto acuoso de planta completa
E.H.F	Extracto hidroalcohólico de flor
E.H. Fr	Extracto hidroalcohólico de fruto
E.H.T	Extracto hidroalcohólico de tallo
E.H.H	Extracto hidroalcohólico de hoja
E.H. PC	Extracto hidroalcohólico de planta completa
LB	Lieberman-Bouchard
TBAR	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
EtOH	Alcohol etílico
HCl	Ácido clorhídrico
DNS	3,5-ácido dinitrosalicílico
NaOH	Hidróxido de sodio

KOH	Hidróxido de potasio
$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	Acetato de plomo (II)
AlCl_3	Tricloruro de aluminio

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Cáncer.....	2
2.2 Cáncer de mama.....	4
2.2.1 Pruebas para determinar el grado del cáncer de mama.....	5
2.2.2 Tratamientos aplicados para cáncer de mama.....	9
2.2.3 Causas del cáncer de mama.....	12
2.3 Estrés oxidativo.....	14
2.3.1 Peroxidación lipídica.....	14
2.3.2 Medición daño oxidativo.....	16
2.3.3 Mecanismos antioxidantes.....	16
2.4 Metabolitos secundarios.....	19
2.4.1 Metabolitos primarios.....	23
2.4.2 Extracción.....	25
2.5 Etnobotánica.....	27
2.5.1 Recolecta de ejemplares.....	28
2.6 Zona de estudio.....	28
2.7 Familia Apocynaceae.....	29
2.7.1 Genero <i>Tabernaemontana</i>	32
2.7.2 <i>Tabernaemontana alba Mill.</i>	33
III Justificación.....	35
IV Hipótesis.....	36
V Objetivos.....	36
General.....	36
Particulares.....	36
VI Material y método.....	37
6.1 Localidad de estudio.....	37
6.2 Registro etnobotánico.....	38
6.3 Extractos.....	39
6.4 Análisis de metabolitos primarios.....	40
6.4.1 Carbohidratos totales.....	40
6.4.2 Carbohidratos reductores.....	40
6.4.3 Lípidos.....	41
6.4.4 Proteínas.....	41
6.5 Identificación metabolitos secundarios.....	42
6.5.1 Alcaloides.....	42
6.5.2 Compuestos fenólicos.....	42
6.5.3 Cumarinas.....	43
6.5.4 Esteroides y esteroles.....	43
6.5.5 Flavonoides.....	44
6.5.6 Quinonas.....	44
6.5.7 Saponinas.....	45
6.5.8 Sesquiterpenolactonas.....	45
6.5.9 Taninos.....	46
6.6 Cuantificación de metabolitos secundarios.....	47

6.6.1 Alcaloides	47
6.6.2 Compuestos fenólicos	47
6.6.3 Cumarinas	48
6.6.4 Esteroides y esteroles	48
6.6.5 Flavonoides	49
6.6.6 Quinonas	50
6.6.7 Saponinas	50
6.6.8 Sesquiterpenlactonas	50
6.6.9 Taninos	51
6.7 Determinación de la capacidad antioxidante, método DPPH (2,2-difenil- picrilhidrazilo)	52
6.8 Modelo experimental	52
6.9 Obtención de plasma sanguíneo y homogenado de hígado murino	54
6.10 Evaluación de marcadores de estrés oxidativo	55
6.10.1 Actividad enzimática de catalasa (Método de Chance y Machley)	55
6.10.2 Lipoperoxidación (Método de TBARS)	55
6.10.3 Cuantificación de nitritos (Método modificado de Griess)	56
6.10.4 Cuantificación de proteínas (Método de Biuret)	58
VII Resultados	59
7.1 Registro de información etnobotánica	59
7.2 Rendimiento extractos hidroalcohólicos y acuosos	62
7.3 Cuantificación de metabolitos primarios en extractos acuosos e hidroalcohólicos	64
7.3.1 Cuantificación de carbohidratos totales, reductores y no reductores	64
7.3.2 Cuantificación de proteínas	66
7.3.3 Cuantificación de lípidos	67
7.4 Identificación de metabolitos secundarios	68
7.5 Cuantificación de metabolitos secundarios	72
7.6 Capacidad antioxidante método DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo)	75
7.7 Ganancia de peso en los grupos de experimentación y carcinomas	76
7.8 Marcadores de estrés oxidativo	80
7.8.1 Actividad enzimática de catalasa homogenado	80
7.8.2 Cuantificación de nitritos en plasma y homogenado	81
7.8.3 Cuantificación de malondialdehído en plasma y homogenado	83
VIII Análisis de resultados	85
8.1 Registro etnobotánico de <i>Tabernaemontana alba Mill</i>	85
8.2 Estudio fitoquímico de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de <i>Tabernaemontana alba Mill</i>	86
8.3 Capacidad antioxidante de las diferentes estructuras de la planta por medio de la reducción de radicales	88
8.4 Efecto de los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y fruto de <i>Tabernaemontana alba Mill</i> en la actividad enzimática de catalasa	89
8.5 Efecto de los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y fruto de <i>Tabernaemontana alba Mill</i> sobre la concentración de óxido nítrico	90
8.6 Efecto de los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y fruto de <i>Tabernaemontana alba Mill</i> en la concentración de malondialdehído	90
IX Conclusión	92
X Referencias	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades metabolitos secundarios.....	21
Tabla 2. Diseño experimental.....	53
Tabla 3. Datos obtenidos en las entrevistas etnobotánicas.....	59
Tabla 4. Rango de edad de las personas entrevistadas.....	60
Tabla 5. Rendimiento de extractos acuosos.....	62
Tabla 6. Rendimiento de extractos hidroalcohólicos.....	63
Tabla 7. Identificación de metabolitos primarios en campo y laboratorio de los diferentes extractos.....	68
Tabla 8. Concentración de metabolitos secundarios en los extractos acuosos.....	72
Tabla 9. Concentración de metabolitos secundarios en los extractos hidroalcohólicos.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del cáncer.....	3
Figura 2. Anatomía de la mama femenina.....	4
Figura 3. Anatomía de la mama masculina.....	5
Figura 4. Mamografía.....	6
Figura 5. Ciclo óxido reducción del Glutatioón.....	17
Figura 6. Metabolismo primario y secundario.....	23
Figura 7. Biosíntesis de metabolitos	24
Figura 8. Mapa de Limón Chiquito.....	29
Figura 9. <i>Catharanthus roseus</i>	30
Figura 10. <i>Nerium oleander</i>	31
Figura 11. <i>Gonolobus niger</i>	31
Figura 12. Mapa de la República Mexicana con localización de <i>T. alba Mill</i>	32
Figura 13. Foto del sitio donde se realizó la caminata botánica.....	37
Figura 14. <i>Tabernaemontana alba Mill</i> en uno de los lugares de colecta.....	38
Figura 15. Momento donde se realizaron parte de las entrevistas etnobotánicas.....	38
Figura 16. Procesando los extractos en el sitio de recolecta.....	39
Figura 17. Momento de inducción con DMBA a ratones de cepa CD-1.....	53
Figura 18. Reacción de Griess para la cuantificación de nitritos.....	57
Figura 19. Curva patrón de nitritos	57
Figura 20. Reacción de reconocimiento de proteínas por método de Biuret.....	58
Figura 21. Curva patrón de proteínas.....	58
Figura 22. Se observa el látex emanado de <i>T. alba Mill</i>	60
Figura 23. Prueba de Alcaloides.....	69
Figura 24. Prueba de Compuestos Fenólicos.....	69
Figura 25. Prueba de Cumarinas.....	70
Figura 26. Prueba de Esteroides y Esteroles.....	70
Figura 27. Prueba de Flavonoides.....	70
Figura 28. Prueba de Quinonas.....	71
Figura 29. Prueba de Saponinas.....	71
Figura 30. Prueba de Sesquiterpenlactonas.....	71
Figura 31. Prueba de Taninos.....	72
Figura 32. Cuantificación de alcaloides en extractos de <i>T. alba Mill</i>	73
Figura 33. Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. alba Mill</i>	73
Figura 34. Cuantificación de cumarinas en extractos de <i>T. alba Mill</i>	73
Figura 35. Cuantificación de esteroides y esteroles en extractos de <i>T. alba Mill</i>	73

Figura 36. Cuantificación de flavonoides en extractos de <i>T. alba Mill</i>	73
Figura 37. Cuantificación de quinonas en extractos de <i>T. alba Mill</i>	73
Figura 38. Cuantificación de saponinas en extractos de <i>T. alba Mill</i>	74
Figura 39. Cuantificación de sesquiterpenlactonas en extractos de <i>T. alba Mill</i>	74
Figura 40. Cuantificación de taninos en extractos de <i>T. alba Mill</i>	74
Figura 41. Ratón que muestra crecimiento anormal que dio como resultado un tumor	78
Figura 42. Ratones tratados con extracto de hoja y una dosis de DMBA que presentaron caída de pelo.....	78
Figura 43. Ratón tratado con extracto de hoja que presento caída de pelo	78
Figura 44. Ratón tratado con extracto de flor que presento caída de pelo	79
Figura 45. Ratón tratado con extracto de planta completa que presenta un hematoma.....	79
Figura 46. Ratón tratado con extracto de flor que presenta pulmones notablemente pálidos.....	79

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de mujeres y hombres que se entrevistaron.....	61
Gráfica 2. Usos de <i>T. alba Mill</i> para diferentes padecimientos	61
Gráfica 3. Concentraciones obtenidas en extractos acuosos de <i>T. alba Mill</i> de carbohidratos totales, reductores y no reductores.....	64
Gráfica 4. Concentraciones obtenidas en extractos hidroalcohólicos de <i>T. alba Mill</i> de carbohidratos totales, reductores y no reductores.....	65
Gráfica 5. Concentraciones proteínas en los extractos de <i>T. alba Mill</i>	66
Gráfica 6. Concentraciones lípidos en los extractos de <i>T. alba Mill</i>	67
Gráfica 7. Porcentaje de captación del radical DPPH en los extractos de <i>T. alba Mill</i>	75
Gráfica 8. Peso de ratones por semana. Control positivo (DMBA) y control negativo.....	76
Gráfica 9. Peso de ratones por semana. Ratones vehículo, control negativo y cuatro grupos con extracto.....	77
Gráfica 10. Peso de ratones por semana. Control positivo DMBA y cuatro grupos de ratones que se les suministro una dosis de DMBA y fueron tratados con extractos de flor, hoja y planta completa.....	77
Gráfica 11. Actividad de catalasa $\mu\text{mol}/\text{min}$ en homogenado de cada grupo de ratón.....	80
Gráfica 12. Concentraciones mM/mg de nitritos- proteína en plasma de cada grupo de ratón	81
Gráfica 13. Concentraciones mM/mg de nitritos-proteína en homogenado de cada grupo de ratón.....	82
Gráfica 14. Concentraciones $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de malondialdehído-proteína en plasma de cada grupo de ratón.....	83
Gráfica 15. Concentraciones $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de malondialdehído-proteína en homogenado de cada grupo de ratón.....	84

I. RESUMEN

Tabernaemontana alba Mill es una planta arbustiva o arbórea de la familia Apocynaceae, su distribución comprende las zonas cálidas de la república mexicana, principalmente en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Tabasco y Sinaloa. Es conocida con el nombre común de cojón de gato y en el ámbito de la medicina tradicional se utiliza en la cura y tratamiento de diversas afecciones como el dolor de muela, heridas, cáncer y dolor de cabeza.

Como es el caso de la presente investigación, cuyo objetivo central es determinar el efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *T. alba* Mill en ratones hembra de la cepa CD-1 inducidos a un proceso de carcinogénesis; así como la identificación, de los metabolitos secundarios siguiendo los métodos colorimétrico y de precipitado para los siguientes metabolitos secundarios como lo son alcaloides, compuestos fenólicos, cumarinas, esteroides y esteroides, flavonoides, quinonas, saponinas, sesquiterpenlactonas y taninos , así como su cuantificación, al igual que cuantificar su actividad antioxidante y finalmente llevar a cabo la evaluación de marcadores de estrés oxidativo como óxido nítrico, catalasa y lipoperoxidación lipídica tanto en plasma como en homogenado de hígado.

Se encontró que los extractos de *T. alba* Mill tiene efectos antioxidantes debido a la presencia de alcaloides, cumarinas, esteroides y esteroides, quinonas y sesquiterpenlactonas, presentes en las estructuras de flor, fruto, hoja y planta completa.

El extracto de fruto y el de hoja disminuyeron la actividad de catalasa. Los extractos de flor, hoja, planta completa y fruto disminuyeron la concentración de nitritos y el daño a membrana en el hígado de ratones CD-1.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer

Cáncer es el nombre que se aplica a un conjunto de enfermedades de origen multifactorial, en el que, las células normales experimentan una serie progresiva de alteraciones que conllevan a un aumento en la velocidad de proliferación de las células humanas, provocando un aumento en su número y a su vez generando nuevas células conforme el cuerpo las necesita. Los tumores cancerosos pueden ser malignos o benignos y muchos de ellos pueden constituirse como tumores sólidos. Los malignos pueden extenderse e invadir los tejidos cercanos. Mientras que, los benignos no se extienden, y aún, sí alcanzan un tamaño grande, éstos pueden extirparse y generalmente no vuelven a crecer. Las células cancerosas poseen características propias que las diferencian de las células normales, entre las que destacan, crecer sin control y ser invasivas, son menos especializadas, ya que las células normales maduran y generan distintos tipos de funciones. La consecuencia de que las células cancerosas no maduren es que siguen dividiéndose, ignorando las señales de muerte celular programada o apoptosis; además, muestran capacidad para evadir el sistema inmunitario e influir en las células normales en cuanto a la formación de vasos sanguíneos para el suministro de oxígeno y nutrientes necesarios para el crecimiento de los tumores y el retiro de los productos de desecho (Instituto Nacional del Cáncer, op.cit.).

El cáncer puede ser el resultado de una enfermedad genética, errores ocurridos al dividirse las células, o bien, por daño al ADN causado por algunas exposiciones ambientales, como compuestos químicos, radiación ultravioleta, entre otros. Para cada persona existe una combinación única del cáncer y conforme éste sigue creciendo ocurrirán cambios adicionales. La mayoría de las veces los cambios genéticos contribuyen a afectar tres tipos principales de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Los protooncogenes son aquellos dedicados al crecimiento y división celular normal; sin embargo, cuando se alteran pueden convertirse en causantes del cáncer y entonces son denominados oncogenes al permitir a las células multiplicarse cuando no deberían.

Los genes supresores de tumores controlan el crecimiento y la división celular. Los genes reparadores del ADN, como su nombre lo indica, se dedican a la reparación del ADN dañado, ya que, si presenta mutaciones, entonces llega a producir mutaciones en otros genes. Los científicos se han dado cuenta que los cambios moleculares, generan ciertas mutaciones que producen diversos tipos de cáncer. Por ello, los cánceres se caracterizan según los tipos de alteraciones genéticas que podrían ser causantes, tanto por el sitio del cuerpo donde se forman, como por la forma del cómo se encuentran las células (Instituto Nacional del Cáncer, op.cit.).

Existen más de cien tipos de cáncer, y generalmente son nombrados según los órganos o tejidos donde se desarrollan; por ejemplo, el cáncer de pulmón empieza en las células del pulmonares En el desarrollo del cáncer son consideradas etapas que avanzan hasta un grado crítico, iniciando con daño al ADN que consecuentemente provoca mutaciones y promocióna una mayor proliferación y alteración de las funciones de la célula, progresando hasta producir daño que conlleve a una metástasis (Figura 1).

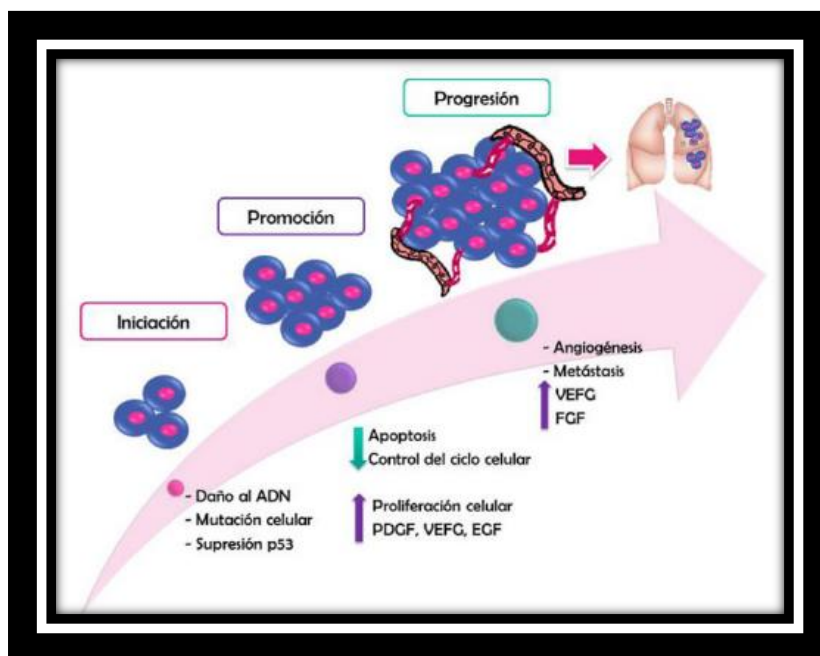


Figura 1. Etapas del cáncer. Obtenido del sitio web:<https://xdocs.pl/doc/mec-accion-carcinogenesis-pelayo-plazola-jose-luispdf-vod46mrp51o6>

El cáncer en el lugar donde se inició se denomina cáncer metastático. Mientras que, al proceso por el que las células se diseminan a otras partes del cuerpo se llama metástasis (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

2.2 Cáncer de mama

La mama es un órgano glandular ubicado en el pecho, conformado por tejido conjuntivo adiposo. Dentro de este órgano se encuentra una red de lóbulos, donde cada lóbulo está conformado por estructuras tubulares llamadas lobulillos que contienen a su vez, a las glándulas de secreción de la leche; además, presentan conductos que conectan a las glándulas, lóbulos y lobulillos, y transportan la leche desde los lóbulos hasta el pezón. El pezón está ubicado en el centro de la areola (área más oscura que rodea el pezón). Toda la mama está irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos (el sistema linfático drena los productos de desecho corporal). Los vasos linfáticos se conectan con los ganglios linfáticos, que son órganos diminutos con forma de guisante que ayudan a combatir las infecciones (Figura 2 y 3) (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

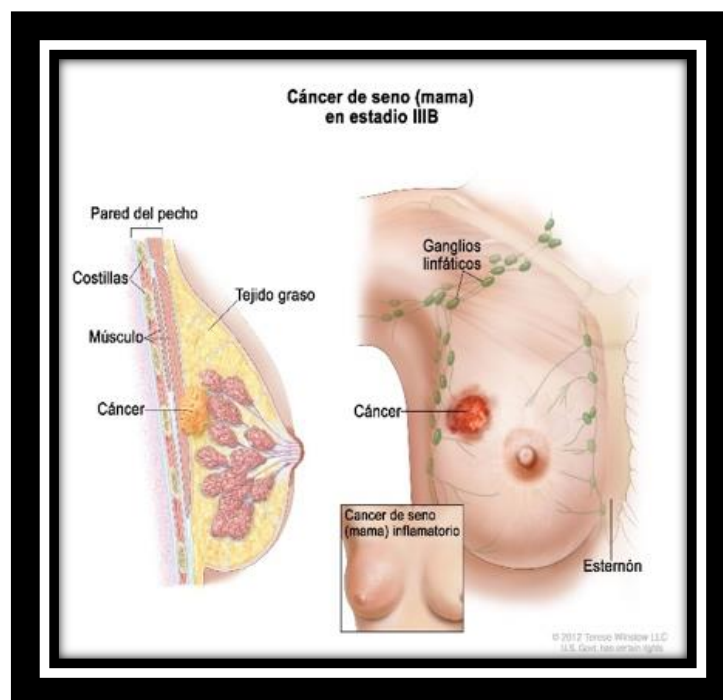


Figura 2. Anatomía de la mama femenina. Obtenido del sitio web: www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/mama

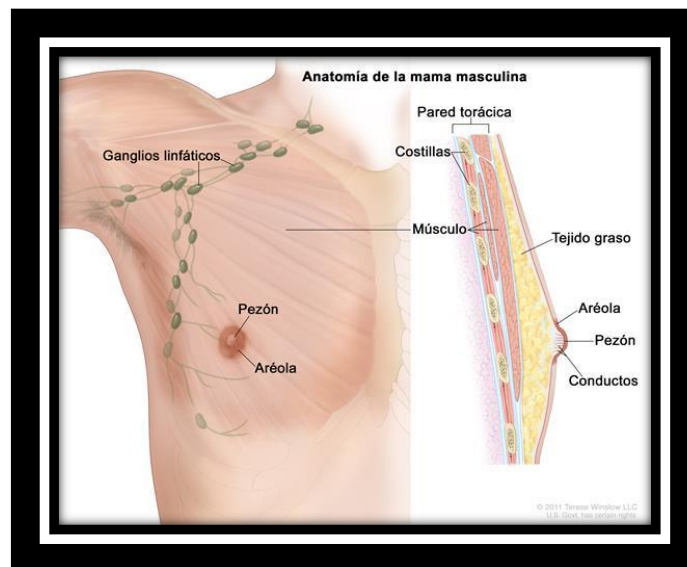


Figura 3. Anatomía de la mama masculina. Obtenido del sitio web: www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/mama

El cáncer surge cuando células saludables de la mama empiezan a proliferar sin control formando una masa celular denominada tumor, el cual, puede ser maligno o benigno. Se denomina metástasis al cáncer de mama que se disemina cuando crece en otras partes del cuerpo o cuando las células cancerosas se desplazan a otros sitios del cuerpo a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos. Este tipo de cáncer puede originarse en diferentes partes de la mama; pudiendo iniciar su desarrollo en los ductos que llevan la leche hacia el pezón (cáncer ductal), en las glándulas que producen leche (cáncer lobulillar) o en el tejido del seno (sarcoma o linfoma). La prevención del cáncer es la manera más eficaz de reducir la probabilidad de un riesgo mayor. Entre las maneras de prevenirlo se encuentra cambiar el estilo de vida o los hábitos alimenticios (Instituto Nacional del Cáncer, 2015; American Cancer Society. Inc., 2018).

2.2.1 Pruebas para determinar el grado del cáncer de mama

Para la detección de este tipo de cáncer se realizan exámenes de detección a la paciente para verificar la presencia de signos de enfermedad. El propósito es

encontrar en un estadio más temprano en el que, aún se puede tratar y muy probablemente pueda ser curado. Para ello, se debe considerar la realización de los siguientes puntos importantes:

- ❖ Pruebas para detectar diferentes tipos de cáncer, aunque no se tengan síntomas
- ❖ La mamografía es el examen más común
- ❖ Imagen por resonancia magnética (IRM)
- ❖ Existen otras pruebas de detección que se han estudiado como: examen de la mama, termografía y muestreo de tejido.

Un mamograma, también conocido como radiografía de la mama, permite localizar tumores de tamaño muy pequeño. También permite encontrar un carcinoma ductal in situ (CDIS) (Instituto Nacional del Cáncer, 2015)

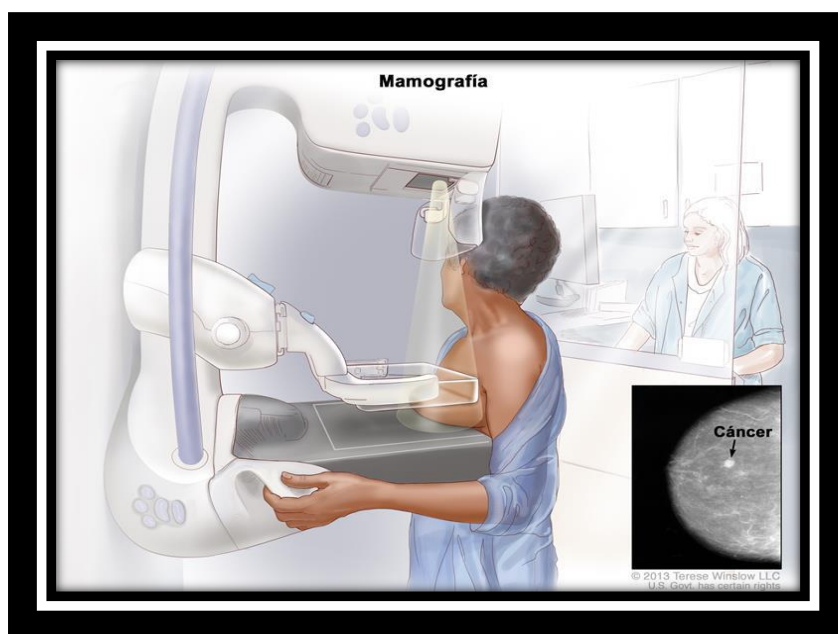


Figura 4. Mamografía. Se muestra el cómo se presiona la mama entre dos placas, se usan rayos x para tomar la imagen del tejido. Obtenido del sitio web: www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/deteccion-seno-pdq

Varios aspectos pueden afectar la capacidad de la mamografía en la detección del cáncer de mama, como son:

- Edad y peso del paciente

- Tamaño y tipo del tumor
- Sensibilidad del tejido de la mama a las hormonas
- Densidad del tejido de la mama
- Momento en que se hace la mamografía dentro del ciclo menstrual de la mujer
- Calidad de la imagen de la mamografía
- Habilidad del radiólogo para interpretar la imagen

Al realizarse el estudio debe considerarse que hay una exposición a dosis bajas de radiación que puede no llegar a ser un factor de riesgo del cáncer de mama. También es probable que se sienta dolor o incomodidad durante el examen (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

La imagen por resonancia magnética (IRM) es un procedimiento en el que se utilizan imanes, ondas de radio y computadora para crear una serie de imágenes detalladas de áreas del interior del cuerpo. Se utiliza como prueba de detección en las mujeres que presentan riesgo alto de cáncer de mama. Algunos de estos riesgos incluyen

- ✓ Cambios en los genes de BRCA1 y BRCA2.
- ✓ Antecedentes familiares de primer grado (madre, hija o hermana).
- ✓ Síndromes genéticos como el de LI-Fraumeni (LFS es una enfermedad rara autosómica dominante que consiste en una predisposición a desarrollar un amplio rango de tumores) o de Cowden (Síndrome de hamartomas múltiples, de origen genético que se caracteriza por la aparición de tumores benignos que se llaman hamartomas)

Al realizar el examen de una muestra tumoral, pueden ser establecidas las siguientes características del cáncer:

1. Receptor de hormonas positivo: Cuando se expresan receptores de estrógeno (ER) o receptores de progesterona (PR) se denominan cánceres con “receptor de hormonas positivo”. Los tumores que tienen receptores de estrógeno se denominan “receptores de estrógenos positivos”. Este tipo de cáncer puede depender de las hormonas de estrógeno y/o progesterona para su proliferación. Los cánceres con receptor de hormonas positivo pueden

aparecer a cualquier edad, pero es probable que se manifiesten más frecuentemente en mujeres que transitaron a la menopausia. Aproximadamente del 60 % al 75 % de los casos de cáncer de mama presentan receptores de estrógeno y/o progesterona. Los cánceres que no presentan estos tipos de receptores se denominan “receptores de hormonas negativos”.

2. HER2 positivo: Aproximadamente, entre el 20 % y 25 % de los cánceres de mama dependen para su proliferación de un gen llamado receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Estos cánceres se llaman cánceres “HER2 positivo” y tienen cantidades excesivas de receptores HER2 o copias del gen. Este gen produce una proteína que se encuentra en las células cancerosas y es importante para el crecimiento de las células tumorales. Los tipos de cáncer HER2 positivo pueden ser receptores de hormonas positivos o receptores de hormonas negativos. Los cánceres que no expresan HER2 se llaman “HER2 negativo”.
3. Triple negativo: Si el tumor no expresa ER, PR ni HER2, se dice que el tumor es “triple negativo”. El cáncer de mama triple negativo representa aproximadamente el 15 % de los casos de cáncer de mama invasivo. Parece ser más frecuente entre las mujeres más jóvenes y particularmente entre las mujeres de raza negra más jóvenes. También es más frecuente en mujeres con una mutación de los genes 1 y 2 de cáncer de mama, a menudo denominados genes BRCA1(gen supresor de tumores humanos) y BRCA2. Los expertos recomiendan que todas las personas con cáncer de mama triple negativo se sometan a una prueba para determinar mutaciones del gen BRCA.

En un examen clínico de la mama, el médico palpa para detectar cualquier masa que parezca extraña. También se puede realizar un autoexamen. Es posible que los tumores produzcan cambios de temperatura que se pueden detectar aplicando el procedimiento de la termografía, donde se utiliza una cámara especial que detecta el calor y registrar la temperatura. El muestreo de tejido consiste en tomar células

del tejido de la mama para ser observadas al microscopio. (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

2.2.2 Tratamientos aplicados para cáncer de mama

I. Tratamientos locales

Se trata el tumor sin afectar al resto del cuerpo. Con base en el tipo de cáncer de seno y lo avanzado en que éste se encuentre, el paciente es sometido a una cirugía para extraer el tumor. La cirugía se realiza para eliminar tanta área como sea posible en donde el cáncer se encuentre y averiguar si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos debajo del brazo. En esta cirugía puede ser restaurada la forma del seno después de extraer el cáncer (reconstrucción del seno) y aliviar los síntomas del cáncer avanzado (American Cancer Society. Inc., 2018).

La mastectomía es un tipo de cirugía, a la que se somete a la paciente, en la que se extirpa el seno en su totalidad, incluyendo todo el tejido mamario y en ocasiones otros tejidos cercanos: También pueden ser extirpados los ganglios linfáticos para examinar la posible existencia de propagación en ellos. Las pacientes que se someten a este tipo de cirugía pueden tener la opción de reconstrucción del seno. En el caso de una mastectomía, es posible que una mujer considere rehacer la forma de su seno para restaurar la apariencia de este después de la cirugía. En algunas cirugías con conservación del seno, una mujer puede considerar tener injertos de grasa en el seno afectado para corregir cualquier hoyuelo que quede de la cirugía. Las opciones dependerán de la situación específica de cada mujer, ya que aun cuando es poco probable que la cirugía cure el cáncer de seno, cuando éste ya se ha propagado a otras partes del cuerpo, puede ser útil en algunas situaciones, sea para disminuir la velocidad de propagación del cáncer y para ayudar a prevenir o aliviar los síntomas de este. La cirugía puede llevarse a cabo según las siguientes situaciones en que se encuentre la paciente:

- Cuando el tumor del seno está causando una herida abierta en el seno (o el pecho).
- Para tratar a un pequeño número de áreas de propagación del cáncer (metástasis) en cierta parte del cuerpo, como el cerebro.

- Cuando un área de la propagación del cáncer está presionando la médula espinal.

II. Tratamiento sistémico

Este tipo de tratamiento pueden alcanzar células cancerosas en casi cualquier parte del cuerpo y su administración es vía oral o por el torrente sanguíneo. Dependiendo del tipo de cáncer de seno, pueden utilizarse diferentes tipos de tratamiento con medicamentos entre los que se incluyen los siguientes:

Quimioterapia: Tratamiento contra el cáncer en el que se utilizan diversos medicamentos que son administrados a la paciente por vía intravenosa o por la vía oral. Los medicamentos viajan por el torrente sanguíneo alcanzando las células cancerosas que se encuentran en la mayor parte del cuerpo. En ocasiones, se administra la quimioterapia directamente en el líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la médula espinal. La quimioterapia se recomienda en los siguientes casos:

- Después de la cirugía (quimioterapia coadyuvante o después de la cirugía) se utiliza para tratar de eliminar las células cancerosas residuales (que puedan haberse quedado).
- Antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante o antes de la cirugía), es aplicada para reducir el tamaño del tumor de modo que se pueda extirpar mediante una cirugía menos extensa. También, es utilizada para evaluar cómo responde el cáncer.
- Para cáncer de seno avanzado, la quimioterapia se puede aplicar como tratamiento principal para las mujeres cuyo cáncer se ha propagado fuera del seno y del área axilar después de cuando se hizo el diagnóstico o después de los tratamientos iniciales (American Cancer Society. Inc., 2018).

Los medicamentos utilizados en la quimioterapia pueden causar efectos secundarios que dependen del tipo y la dosis de los medicamentos suministrados,

así como la duración del tratamiento. Algunos de los posibles efectos secundarios más comunes son:

- Caída de pelo
- Cambios en las uñas
- Úlceras en la boca
- Pérdida de apetito o cambios en el peso
- Náuseas y vómitos
- Diarrea

La quimioterapia también puede afectar las células productoras de sangre de la médula ósea, o puede causar las siguientes afecciones:

- Aumento de la probabilidad de infecciones (debido a los bajos niveles de glóbulos blancos)
- Tendencia a presentar moretones o sangrados fácilmente (a causa de bajos niveles de plaquetas)
- Cansancio (debido a bajos niveles de glóbulos rojos y otras razones)

Terapia hormonal: Las células del cáncer de seno positivas para receptores de estrógeno y positivas para receptores de progesterona (cáncer ER-positivo y PR-positivo, respectivamente), tienen receptores que se adhieren al estrógeno, apoyando así su crecimiento. Sin embargo, existen diversas alternativas para evitar que el estrógeno se adhiera a estos receptores, llegando a las células cancerosas en casi cualquier parte del cuerpo y no sólo al seno. Estos tipos de terapia hormonal pueden ser opciones si otras formas de terapia hormonal ya no surten efecto, pero a menudo causan efectos secundarios. Algunos tipos de terapia hormonal se utilizaban más frecuentemente en el pasado, pero hoy día se aplican en pocas ocasiones, entre estos se incluye:

- Acetato de megestrol (Megace), un medicamento similar a la progesterona
- Andrógenos (hormonas masculinas)

- Altas dosis de estrógeno

Terapia dirigida: está diseñada para bloquear el crecimiento y propagación de las células cancerosas, por lo que actúa de forma diferente a los medicamentos de la quimioterapia, ya que ataca a todas las células que están creciendo rápidamente, incluyendo células cancerosas. De cada una de cada cinco mujeres con cáncer de seno, las células cancerosas tienen demasiada cantidad HER2/neu (o simplemente HER2) que prolonga el crecimiento. Estos tipos de cáncer tienden a crecer y a propagarse de manera más agresiva. Los efectos secundarios de los medicamentos a menudo son leves, pero algunos pueden llegar a ser graves. Puede llegar a generarse insuficiencia cardíaca congestiva que puede llegar a durar poco y se alivia en el momento en que se corta la medicación. Por ende, el médico tiende a verificar la función cardíaca antes y se repite mientras este en tratamiento. También se pueden presentar dificultad al respirar, hinchazón de las piernas y cansancio intenso, diarrea grave, irritación, enrojecimiento tanto en manos como en pies (American Cancer Society. Inc., 2018).

2.2.3 Causas del cáncer de mama.

A partir de que se tiene mayor conocimiento del genoma humano, se considera que las mujeres con mutaciones genéticas de herencia autosómica dominante presentan un mayor riesgo de padecer cáncer de mama. Además, es probable que los factores individuales, ambientales y sociales sean responsables de acelerar los procesos de carcinogénesis. Entre los factores pueden enumerarse los siguientes:

- Herencia: Se caracteriza por la aparición temprana, antes de los 40 años; siendo el mayor número de carcinomas de tipo medular; presencia de alteraciones en el gen p53.
- Edad: aunque el cáncer de mama se diagnostica a cualquier edad, la incidencia es menor antes de los 30 años y la frecuencia aumenta entre los 45 y 55 años.
- Sexo: la probabilidad de cáncer de mama es de 99% en las mujeres, frente al 1% en los varones.

- Ciclo menstrual y reproducción: Los factores hormonales juegan un papel preponderante en el desarrollo del cáncer de mama. El riesgo aumenta al presentar una menstruación antes de los 11 años y una menopausia después de los 55 años. Reduciéndose, sí el primer embarazo ocurre en edades tempranas. Actualmente se encuentra asociada la lactancia con una pequeña reducción del riesgo.
- Factores dietéticos-obesidad: una dieta rica en grasas de origen animal parece existir una correlación entre obesidad y cáncer de mama.
- Factores medio ambientales: una gran cantidad de alimentos que se utilizan en la engorda de animales de granja presentan estrógenos y pesticidas y su ingesta por el humano a largo plazo trae consecuencias.
- Factores relacionados con el estilo de vida: una vida sedentaria, así como un estrés mayor a los niveles normales.

La presente investigación está enfocada fundamentalmente al estudio del estrés oxidativo (EO), definido como desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en el organismo a favor de los primeros. La producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (prooxidantes y oxidantes) acontece de forma fisiológica en todo organismo vivo, siendo su principal fuente endógena la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Sánchez, et. al, 2004). Las ERO son moléculas radicales y no radicales que actúan como agentes oxidantes y son convertidos fácilmente en radicales. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo que induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los que se altera la funcionalidad celular con lo que conduce al desarrollo de enfermedades neurológicas, cáncer, entre otras (Avello & Suwalsky, 2006).

Los radicales libres son átomos que poseen un electrón desapareado o libre, razón por lo que son muy reactivos, tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. En cuanto el radical libre se queda con un electrón, aquel que lo cede se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así una reacción en cadena que destruye las células. La vida media de un radical libre es de microsegundos, pero reacciona con todo aquel que esté a su alrededor provocando daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Estos radicales libres se producen de manera moderada en nuestro cuerpo y en algunos casos se enfrentan a bacterias y virus (Avello & Suwalsky, 2006).

2.3 Estrés oxidativo

El oxígeno es básicamente una molécula oxidante utilizada en el metabolismo, siendo responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). En condiciones ambientales normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno con la formación de agua, mientras que un pequeño porcentaje forma tres intermediarios altamente tóxicos; de los que, dos de ellos forman radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). Otra fuente importante de producción de ERO está constituida por el metabolismo de las células defensivas como monocitos, macrófagos y eosinófilos. En condiciones normales son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas. Los oxidantes pueden proceder del exterior, por ejemplo, de la contaminación ambiental, la luz solar, radiaciones ionizantes, los pesticidas, metales pesados, humo de tabaco, etc. (Avello & Suwalsky, 2006).

2.3.1 Peroxidación lipídica

La membrana celular contiene proteínas que juegan un papel importante en la interacción de la célula con otras células. Su estructura básica es la bicapa lipídica, la cual funciona como una barrera de permeabilidad selectiva, ésta es rica en ácidos grasos poliinsaturados y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libre que traen como consecuencia la peroxidación lipídica que implica un proceso complejo, donde los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan la abstracción de un hidrógeno,

formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente (Avello & Suwalsky, 2006). No obstante, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular, y existen varias formas de medirla entre las que destacan las siguientes:

- Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, se basa en la reacción del tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto éste del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Su análisis es usado por su buena facilidad y sencillez, pero le falta sensibilidad, por lo que se recomienda, para aumentarla, utilizar procedimientos fluorométricos o cromatográficos.
- Medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación: el 4 hidroxinonenal, susceptible de ser medido por HPLC con detección ultravioleta.
- Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación, mide la lipofuscina, producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos, pero sólo es útil para etapas tardías de la peroxidación.
- O_2^- (radical anión superóxido): la cuantificación de este radical se realiza por quimioluminiscencia
- TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, marcador de lipoperoxidación), la medición de TBARS es una medida indirecta de lipoperoxidación. Consiste en la medición plasmática de malondialdehído.
- Isoprostanos (marcador de lipoperoxidación), su formación es una medida directa de la formación de lipoperóxidos independiente de ciclooxigenasa. Se mide por técnicas de enzima inmuno análisis.
- NF Kappa B, es un factor de transcripción nuclear que está involucrado en la activación de genes que participan en la patofisiología de la pared vascular y en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. En condiciones de estrés oxidativo, este factor se encuentra activado. Su cuantificación se realiza habitualmente por técnicas de movilidad electroforética.
- Biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), la cuantificación de los niveles de NO consiste en la determinación de sus metabolitos estables: nitritos y nitratos (urinarios o plasmáticos) a través de la reacción de Griess.
- GMPc: la 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc), es un mediador secundario del NO. Su formación indica la capacidad del NO de producir vasodilatación. Los métodos más utilizados son los de radioinmunoensayo (RIA) y EIA.

2.3.2 Medición daño oxidativo

Los sistemas antioxidantes se pueden medir de diferentes formas específicas y el sistema amortiguador antioxidante global puede evaluarse con pruebas de capacidad antioxidante total. La mejora en la tecnología e interpretación de estos métodos ha permitido profundizar en el conocimiento básico de las formas de defensa de la célula, habiéndose multiplicado los estudios de capacidad antioxidante desde sustancias puras hasta organismos complejos, sirviendo incluso para métodos de diagnósticos y evaluación de la efectividad de los tratamientos (Sánchez, & Mendoza, 2003; Quintanar & Calderón, 2009). El daño oxidativo se puede medir de forma directa o indirecta como se indica a continuación:

Métodos directos:

- Medición de la concentración de agentes oxidantes. Durante los últimos años se ha tratado de medir la concentración de agentes oxidantes en el organismo, resultando difícil en muchos de los casos, debido a que el tiempo de vida media de éstos es muy corto. La espectrometría de la resonancia de la rotación (spin) de electrones es la única técnica analítica que mide directamente las ERO's, pero su aplicación en el ser humano no es factible aún. Además, se suma lo costoso del equipo necesario.

Métodos indirectos:

- Determinación de productos terminales de la acción oxidante. Se han desarrollado métodos para medir algunas de las ERO's, pero indirectamente, mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre proteínas, ADN y lípidos.

2.3.3 Mecanismos antioxidantes

La evolución de la vida ocurrió debido a que los organismos desarrollaron un sistema de defensa antioxidante para hacer frente a la atmósfera oxidativa del planeta mediante un metabolismo oxidativo. Lo que les permitió alcanzar eficientes sistemas amortiguadores antioxidantes para mantener la capacidad de reducir a los radicales libres, las especies reactivas y los oxidantes endógenos y exógenos. Un antioxidante es una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de

electrones) de otras moléculas, principalmente lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Al generarse una oxidación de estos sustratos biológicos se generan dos tipos de especies reactivas: los radicales libres y los que sin ser radicales libre son suficientemente reactivas para generar una oxidación. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular. El organismo se enfrenta a mecanismos homeostáticos que generan un daño oxidativo y causan numerosas formas de radicales libres y especies reactivas. Estos sistemas amortiguadores antioxidantes se regeneran y cargan de electrones e hidrógenos a través del sistema de glutatión-NADPH y de la reducción de NADP^+ del metabolismo. De tal forma que, las enzimas antioxidantes y los antioxidantes endógenos y exógenos generan barreras para la reducción de los oxidantes disminuyendo así su potencial oxidativo, con lo que se hacen frente a la variedad de diversas especies y formas oxidativas capaces de agredir al organismo (Avello & Suwalsky, 2006; Quintanar & Calderón, 2009).

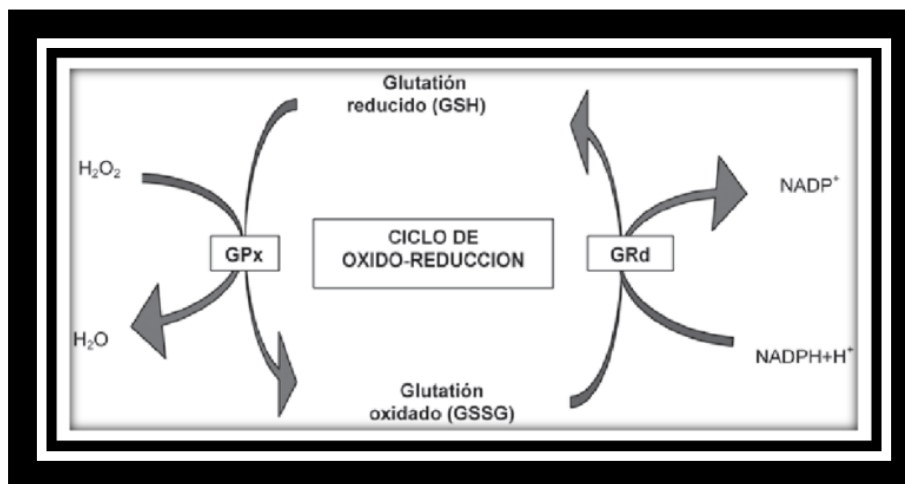


Figura 5. Ciclo oxido reducción del Glutatión. Tomada del sitio web: https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Ciclo-de-oxido-reduccion-del-glutation-GPx-Enzima-glutation-peroxidasa-GRd_fig2_250372121

Por otra parte, existen defensas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el glutatión peroxidasa (GPx) y el glutatión reducido (GSH), indispensables para la existencia de concentraciones bajas de ERO. Sin embargo, bajas concentraciones de antioxidantes hacen al cuerpo más susceptible a estos daños. Las moléculas EROs son altamente reactivas y atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX

que ocurren como parte normal del metabolismo celular por la exposición a factores ambientales y se forman de la siguiente manera, la reducción univalente del O_2 produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente, genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un RLO, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que es varios miles de veces más reactivo que el $O_2^{\cdot-}$ y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres. Las especies reactivas explicadas hasta ahora no son las únicas, existen otras como el peroxil (ROO^{\cdot}) y el alcoxil (RO^{\cdot}) que resultan de la acción del OH^{\cdot} y constituyen la fase inicial de la peroxidación lipídica. También existe el oxígeno molecular (O_2), el óxido nítrico (NO^{\cdot}), el anión peroxinitrito ($OONO$) y el ion hipoclorito (OCl) formado a partir del H_2O_2 por la enzima mieloperoxidasa (MPO) (Sánchez, et. al, 2004, Martínez et al., 2005).

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía liberan ERO's. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que en la célula existan mecanismos de defensa que los neutralicen. Estas defensas son conocidas como antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre. El antioxidante, al colisionar con un RLO le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un RLO débil no tóxico (la vitamina E). No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan substratos que a su vez reaccionan con los RLO. Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y scavengers o eliminadores de radicales (Sánchez, & Mendoza, 2003; Sánchez, et. al, 2004). A continuación, se muestran ejemplos de ambos tipos de defensas antioxidantes:

Enzimas:

- El citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.

- La enzima superóxido dismutasa está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno.

Scavengers o eliminadores:

- La vitamina E (tocoferol) neutraliza al radical OH^\cdot por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante.
- La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el O_2^\cdot y con él. OH^\cdot , también es captor del oxígeno singlete y del ion hipoclorito.
- El glutatión (GSH), además de captar el H_2O_2 como substrato de la GPx, también capta al O_2^\cdot y al OH^\cdot .
- La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO.

Este sistema defensivo, que lo mismo puede estar en el citosol que en las membranas, no es totalmente efectivo, por lo que hay involucrada una segunda línea constituida por:

- Sistemas reparadores de biomoléculas que reparan el daño producido al ADN y que pudieran propiciar trastornos genéticos o cancerígenos.
- Sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados como las macroproteinasas y las endonucleasas.

También están los denominados metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales, de los cuales se han hecho muchos estudios desde hace décadas por el potencial de sus sustancias con propiedades biológicas. Principalmente están compuestos por antioxidantes que protegen al organismo de la acción de los radicales libre (Gutiérrez, et al., 2007).

2.4 Metabolitos secundarios

Dentro de un organismo ocurren reacciones químicas que constituyen el metabolismo. Tanto la energía del carbono y nitrógeno, necesarias para el

funcionamiento del organismo, termina en moléculas de las células, como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, que se encuentran presentes en las plantas, al igual que se encuentran presentes los metabolitos secundarios. Inicialmente se había aceptado la idea de que las sustancias secundarias se producían con funciones relativas inespecíficas. Posteriormente, se encontró que muchas de éstas poseen altos rendimientos y múltiples funciones en las plantas. Los metabolitos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario, pero sí como defensa, protección, etc., y son derivados de los primarios, pero su distribución se encuentra más limitada en el reino vegetal y para determinados compuestos queda restringida a ciertas especies e incluso a algunas poblaciones dentro de una misma especie; por lo que, es improbable que desarrollen un papel fundamental en el metabolismo primario. Sin embargo, existen excepciones, entre éstas se encuentran las clorofilas y los reguladores del crecimiento (hormonas vegetales), en las que sus funciones bioquímicas y fisiológicas han sido ampliamente reconocidas. Recientemente se encontró que los flavonoides son factores que inducen la germinación del polen y la elongación del tubo polínico. Pero respecto al uso humano, éstos representan una fuente importante de principios activos de medicamentos y productos químicos. Entre los metabolitos secundarios se puede citar a: los fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, esteroides, alcaloides y otros compuestos que pueden encontrarse en una gran variedad de productos como, aspirinas, perfumes, opio, belladona y cafeína, entre otros. Entre sus propiedades se destaca, ser compuestos químicamente reactivos, aptos para ingresar a los sistemas vivos e interactuar y cambiar la estructura de un receptor o blanco molecular y penetrar en las células donde pueden afectar varios procesos fisiológicos. De allí deriva su actividad biológica o farmacológica, aunque gran parte de los medicamentos se obtienen por síntesis química, la mayoría de las estructuras principales están basadas en productos naturales. Mundialmente existe un 44% de nuevos medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Goossens et al., 2003; Haq, 2004; Shilpa et al., 2010).

Los compuestos secundarios de interés comercial según su ruta biosintética han sido agrupados en tres categorías: Terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenos se generan por la polimerización de isoprenos y esteroides, se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides. En los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas flavonoides y taninos. Mientras que los alcaloides son un grupo muy diverso, estos son fisiológicamente activos en humanos y de gran interés farmacológico como lo son los alcaloides (atropina, nicotina) (Chinou, 2008)

METABOLITOS SECUNDARIOS	CARACTERISTICAS	PROPIEDADES BIOLÓGICAS
ALCALOIDES	<p>Forman sales con ácidos orgánicos o glicósidos, se pueden encontrar principalmente en hojas, flores, frutos, semillas corteza y raíz (Arango, 2008).</p> <p>Se clasifican siguiendo un criterio biosintético de acuerdo con el aminoácido y/o compuesto precursor. Hay muchos conocidos y sus funciones son atribuidas; están los principales derivados del triptófano (conversión del triptófano en triptamina) y los del tipo bencilisoquinoleico (BIAs) (se convierte tirosina en dopamina por reacciones de descarboxilación) (Facchini, 2002).</p>	<p>Pueden ser psicoactivos por lo cual contribuyen a atenuar el dolor y el tratamiento de trastornos mentales, también genera adicción, tienen propiedades anestésicas o como la vincristina es un alcaloide de la planta <i>Catharanthus roseus</i>, se utiliza como tratamiento para la leucemia aguda, este es uno de los ejemplos (Arango, 2008).</p>
COMPUESTOS FENOLICOS	<p>El fenol es la molécula básica, se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH). El anillo aromático juega un papel importante en las propiedades antioxidantes (Clifford & Scalbert, 2000).</p>	<p>Presentan propiedades antioxidantes, tienen una actividad biológica importante como los antibióticos, antiparasitarios y citotóxicos (Clifford & Scalbert, 2000).</p>
CUMARINAS	<p>Su estructura química es 2H-1-benzopirano-2-ona, se origina biosintéticamente por hidroxilación y lactonización del ácido cumárico (2-hidroxi-2-ona) (Oliveros, et al., 2010).</p>	<p>Muestran propiedades espasmolíticas o antitusivas, tienen olores dulces por lo que son utilizados en la farmacia (Oliveros, et al., 2010).</p>
ESTEROLES Y ESTEROIDES	<p>Son lípidos que derivan del ciclopentano perhidrofenantreno, su estructura está formada por cuatro anillos de carbono, son derivados de los alcoholes. En este grupo se agrupan compuestos vitales para la vida, tales como el colesterol, los ácidos biliares y las hormonas esteroidales. Son potentes toxinas, son responsables de importantes funciones biológicas</p>	<p>Son antiinflamatorios, inmunosupresores, progestacionales, diuréticos, anabólicos y anticonceptivos. Algunos son usados para el tratamiento de cáncer de próstata y mama, insuficiencia suprarrenal, en la prevención de enfermedades del corazón, tratamiento para la obesidad, etc. (Mensah-Nyagan et al., 2009).</p>

	en la célula como en la actividad hormonal (Mensah-Nyagan et al., 2009).	
FLAVONOIDES	Son pigmentos naturales presentes en los vegetales y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Tienen una estructura química con un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, con propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, generándoles una gran capacidad antioxidante (Aherne & O'Brien, 2002).	Tienen baja toxicidad, presentando actividad en el sistema vascular, efecto antioxidante, efecto antimutagénicos y la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (Aherne & O'Brien, 2002).
QUINONAS	Compuestos orgánicos con una base aromática (benceno, fenantreno, etc.), son moléculas cíclicas conjugadas, derivan de la oxidación de los fenoles. Se encuentran en la naturaleza en forma de pigmentos en plantas y animales (Tandon, et al., 2005).	Tienen funciones de tintes y colorantes, sirven como base para la elaboración de numerosos medicamentos. Se han utilizado en una amplia gama como agentes antimaláricos, antimicrobianos, antitumorales, fungicidas, anticancerígenos, entre otros (Tandon, et al., 2005).
TANINOS	Derivados de las plantas que pueden ser esteres de ácido gálico o sus derivados de plantas que pueden ser esteres de ácido gálico o sus derivados unidos a una amplia variedad de núcleos terpenoides. Son conocidos por su capacidad para unirse a los hidratos de carbono y las proteínas, por fuerzas covalentes y no covalentes (Vázquez, et al., 2012).	Presentan una capacidad antioxidante, antimicrobiana, astringentes, antiinflamatorias, etc. (Vázquez, et al., 2012).
SAPONINAS	Son grupo de glucósidos oleosos, son glicósidos hidrosolubles, con propiedades tensoactivas y hemolíticas, ambas presentadas por su naturaleza anfifílica (Orlando & Guirado, 2005).	Tienen la habilidad de crear una espuma jabonosa, presentando un comportamiento como un agente espumante o emulsionante, también tiene propiedades diuréticas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antioxidantes, etc. (Orlando & Guirado, 2005).
SESQUITERPENLACTONAS	Compuestos activos, que están muy distribuidos en la naturaleza. Se pueden encontrar de forma libre o glicosídica. Son altamente irritantes a la nariz, ojos y aparato gastrointestinal (Chadwick, et al., 2013).	Son agentes antimicrobianos, neurotóxico, antiinflamatorios (Chadwick, et al., 2013).

Tabla 1. Propiedades y características de los metabolitos secundarios

En todos los organismos existen rutas metabólicas primarias, diferentes a las que se encuentran en los vegetales. Sin embargo, todas ellas conducen a la formación de compuestos característicos de cada grupo taxonómico y cuya función no guarda

relación con los procesos vitales de la célula que los sintetizan, pero puede tener significación para el organismo productor como un todo. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario (Figura 6). Las enzimas involucradas tendrán el carácter de metabolitos primarios o secundarios, dependiendo de su función metabólica. La biosíntesis suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a periodos de estrés (Shilpa et al., 2010).

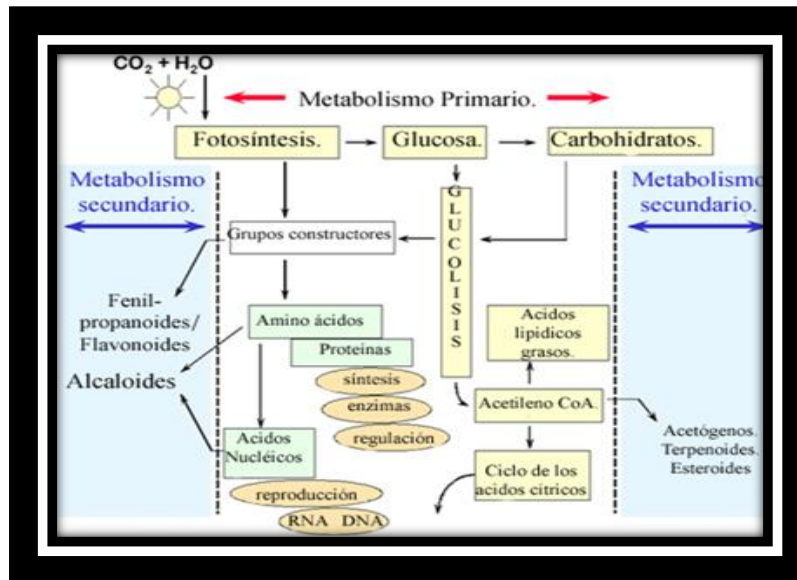


Figura 6. Metabolismo primario y secundario. Obtenido del sitio web: www.ugr.es/~quiorred/pnatu/secundario.htm

2.4.1 Metabolitos primarios

Los metabolitos primarios, son muy abundantes en la naturaleza, indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta. Se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran aminoácidos proteicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, algunos ácidos carboxílicos, etc. Son esenciales para las vías bioquímicas que controlan el crecimiento (división, alargamiento, diferenciación celular), la respiración, asimilación de nutrientes y ayudan a la planta a sobrevivir, reproducirse y llevar a cabo diversas actividades como la fotosíntesis, absorción de nutrimentos, etc. Por lo que, se caracterizan por tener una función metabólica directa; además de ser compuestos esenciales intermedios en las vías catabólica (degradación) y anabólica (biosíntesis) (Gottlieb et al., 2001).

El metabolismo primario comienza con la fotosíntesis que convierte el carbono en compuestos orgánicos y energía química, generando hidratos de carbono (a su vez generan lípidos) formando ácidos nucleicos (ADN, ARN), aminoácidos (proteínas) y nitrógeno orgánico (el cual forma nitratos del suelo). Las rutas biosintéticas que dan lugar a cada metabolito se encuentran entrelazadas por los productos del catabolismo. El metabolismo primario forma un sistema integrado que se prolonga en dos direcciones una general (síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, etc.) y otra secundaria para formar el metabolismo herbáceo como flavonoides, alcaloides terpenos, etc. La mayor parte de los metabolitos secundarios tiene un interés farmacéutico y se sintetizan de tres grandes ramas: 1) rutas del ácido shikímico y de los poliacetatos que dan lugar a la síntesis de sustancias aromáticas, 2) ruta del ácido mevalónico que da lugar a los terpenoides y 3) ruta del metabolismo del nitrógeno que da lugar a la síntesis de alcaloides principalmente por aminoácidos (Hadacek, 2002).

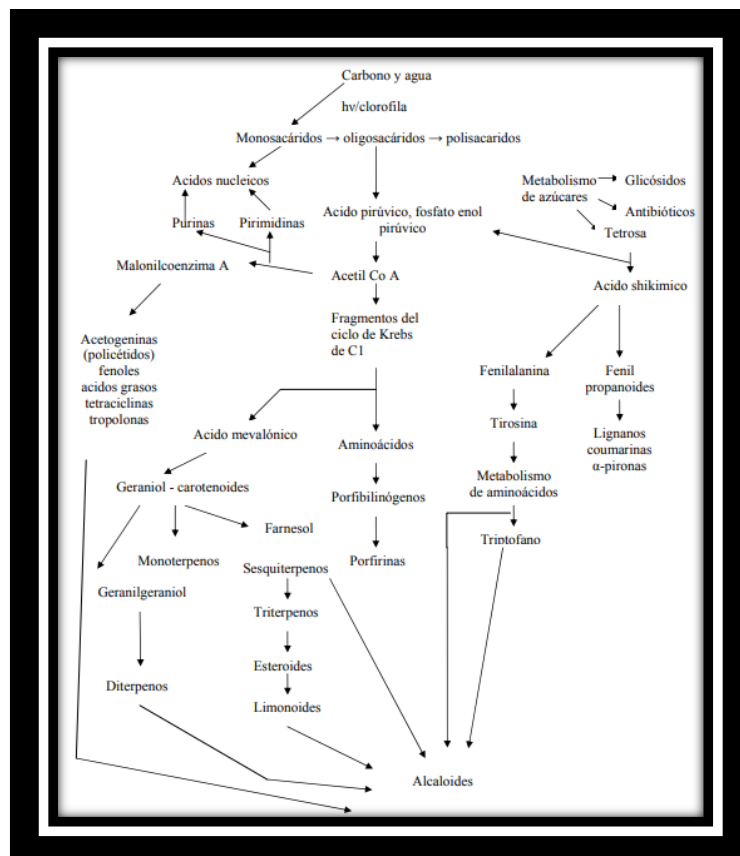


Figura 7. Biosíntesis de metabolitos (Domínguez, 1973).

2.4.2 Extracción

Los productos naturales, conocidos como productos bioactivos, se caracterizan por contener sustancias con actividad terapéutica. Según la especie de planta, dicha actividad varía en cuanto a su proporción, pureza y concentración; a su vez que, depende de factores ambientales como la temporada del año en que se recolecta y la parte de la planta utilizada. Existen diversos procedimientos para la extracción de los diversos metabolitos secundarios presente en la planta. A continuación, se citan algunos de ellos:

Cocimiento: Permite obtener los principios activos de las partes duras de las plantas (raíces, tallos, cortezas, semillas y hojas). Se puede utilizar un recipiente barro o en su defecto, vidrio. Nunca deberá utilizarse recipientes de aluminio.

Preparación: En un recipiente se coloca la parte correspondiente de la planta, agregando agua fría. Se hace hervir a fuego lento durante 5 a 10 minutos; se retira del fuego y se filtra en un colador o en una tela fina (Ecoagricultor, 2016).

Infusión: Es la forma más frecuentemente usada para obtener los principios activos de las partes suaves de la planta medicinal (flores y hojas).

Preparación: Normalmente se utiliza 1 parte de hierbas por 8 a 10 partes de agua. Colocar las partes de la hierba en un recipiente adecuado (no de aluminio). Agregar agua hirviendo, tapar y dejar reposar durante 3 a 5 minutos. Filtrar o colar, y utilizar la infusión de acuerdo con las indicaciones para cada hierba en particular (Ecoagricultor, 2016).

Maceración: Normalmente se utiliza 1 parte de hierbas por 4 a 6 partes de agua y se reposa toda la noche. Este procedimiento consiste en dejar remojando la hierba en

agua hervida fría (maceración acuosa), o bien, en alcohol diluido (maceración alcohólica).

Preparación: Poner la planta en un recipiente de vidrio oscuro; agregar agua fría o alcohol diluido, dejar en reposo durante 6 a 8 horas. No debe prolongarse por más tiempo, ya que el preparado tiende a descomponerse y puede ser peligroso para la salud. Se filtra y se utiliza de acuerdo con las indicaciones de cada hierba y afección que se está tratando.

La extracción por solución genera un gran rendimiento, se pueden obtener prácticamente todos los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. Sobre todo, es necesario utilizar disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc. El éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, se evapora fácilmente y es inflamable, el benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua. La extracción puede ser sólido – líquido o líquido – líquido en función del estado de la muestra.

- Extracción sólido – líquido: Cuando se trata de una muestra sólida, se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles. Normalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar (Bruneton, 2001).
- Extracción líquido – líquido: Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmiscible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento (Bruneton, 2001).
- Extracción en fase sólida: Se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente (Bruneton, 2001).

Para el cálculo del rendimiento de los extractos se calcula a partir del siguiente algoritmo (Tolosa & Cañizares, 2002):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P \cdot 100}{m}$$

donde

P = peso seco del extracto en gramos

m = peso del material vegetal en gramos.

2.5 Etnobotánica

Por sus propiedades curativas, las plantas medicinales representan la base de la medicina tradicional en el tratamiento de algún tipo de enfermedad. Sus efectos biológicos curativos se atribuyen a la planta completa o bien a alguna estructura como el fruto, la raíz, la hoja principalmente. Históricamente en las poblaciones humanas este conocimiento ha pasado de generación en generación, resultando en la diferenciación, selección y categorización medicinal de las plantas, así como la generándose de una ficha botánica local, sea por municipios o regiones mayores (Santillán, 2012).

La etnobotánica se define como el conocimiento de las plantas y las tradiciones agrícolas de un pueblo. En el campo de la medicina, el énfasis histórico y actual recae en la medicina tradicional con el uso medicinal de plantas y sus constituyentes. Por lo que, los ejemplares confinados en los herbarios brindan importante información para la realización de estudios florísticos, ecológicos, fitogeográficos y sistemáticos. Además, como colección de plantas secas, identificadas y ordenadas, éstas representan, en espacio y tiempo, registros permanentes de la biodiversidad. Por la gran variedad de plantas medicinales que existen actualmente en el territorio nacional y su uso como una terapia alternativa, las autoridades sanitarias se han visto en la necesidad de promover la sistematización de la información médica tradicional y complementaria a lo que recurre un gran porcentaje de la población mexicana (60%), creando la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Por lo que, actualmente, en México, la

importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global (Santillán, 2012; Salegi, 2017; Rojas, 2009; Tesauro, 2013)

2.5.1 Recolecta de ejemplares

Es condición necesaria que los especímenes a recolectar deberán incluir flor, fruto, hojas y partes vegetativas; además de ser recolectados en su hábitat típico. Si una especie crece normalmente en bosque de pino, no es conveniente recolectarla en la orilla de caminos, ya que generalmente algunas características resultan alteradas como la forma de la hoja, el color de la flor, entre otras, ya que la planta se desarrolla y crece bajo otra intensidad lumínica. Las plantas vasculares pequeñas se recolectan completas; las raíces y los tallos rastreros o subterráneos frecuentemente son útiles, para la identificación. Si el ejemplar es una herbácea de tamaño grande, se deben incluir hojas de la base, tallo suficiente como para mostrar la variación en sus hojas, así como material en floración y fructificación. En caso necesario, las partes pequeñas como las semillas se colocan en bolsas pequeñas de papel dentro del folder de periódico. Para minimizar el daño a los árboles y a los ejemplares, las ramas se cortan con un cuchillo limpio o con tijeras. Es muy importante colocar las plantas en una prensa y secarlas tan rápido como sea posible, con el fin de prevenir infecciones por hongos. Algunas especies delicadas, como *Campanula* sp., pierden rápidamente su color y estructura; en algunas plantas de la familia Asteraceae, los pétalos y cabezuelas se enrollan (Hadlow, 2004; Frank & Perkins, 2004; Bowles, 2004).

2.6 Zona de estudio

La localidad rural donde se realizó la recolecta de plantas se denomina Limón Chiquito y perteneciente al municipio de Cazonces de Herrera, Veracruz (20°40'58" N, 97°16'30" O). Las condiciones ambientales son las siguientes: clima cálido húmedo con lluvias todo el año, pero con inviernos menos lluviosos; suelos

arcillosos, duros al secarse, vegetación de selva, pastizales y matorrales o bosques (Figura 8).

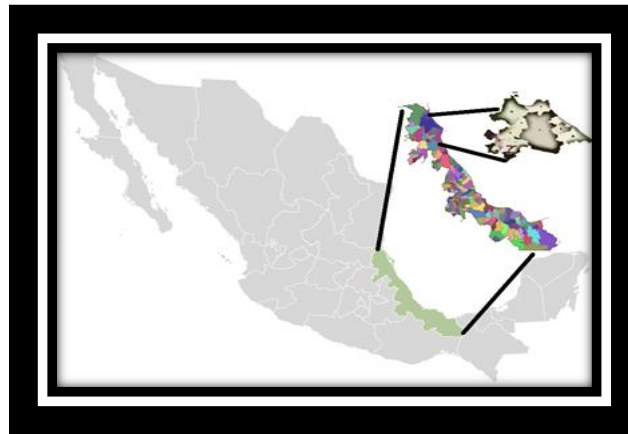


Figura 8. Mapa de Limón Chiquito. Realizada en el laboratorio 7 P1 UMIEZ

El poblado presenta un alto grado de marginación, en el 2005 el INEGI estableció que contaba con 958 habitantes aproximadamente, 444 hombres y 514 mujeres. El promedio de mujeres/hombres es de 1.158, y el índice de fecundidad es de 3.05 hijos por mujer. Del total de la población, el 4,91% proviene de fuera del Estado de Veracruz. El 10,75% de la población es analfabeta: 11% de los hombres y el 13,04% de las mujeres. El grado de escolaridad es del 5.53 (5.94 en hombres y 5.15 en mujeres) (SEDESOL, 2013).

2.7 Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae presentan una distribución pantropical, por lo que se distribuye en las zonas tropicales y subtropicales (rara vez en zonas templadas). Las apocináceas están constituidas por cinco subfamilias, 375 géneros y cerca de 5000 especies. Las características que las distinguen son: árboles, arbustos, hierbas con látex. Hojas simples, opuestas, alternas o verticales. Flores solitarias o en inflorescencias racimosas o cimosas. Perfectas, actinomorfas o zigomorfas. Fruto como folículo, cápsula, drupa, baya, sámara, carnosos, indehiscentes o secos dehiscentes. Semillas poliédricas o complanadas, aladas. Endospermo carnoso o nulo. Son polinizadas por lepidópteros y abejas de trompa larga que llegan atraídos

por el néctar que se halla ubicado en el fondo de la corola. Por su constante expansión geográfica, la familia se ha visto envuelta en diversos procesos adaptativos fitoquímicos que han otorgado a sus especies desarrollar mecanismos defensivos (alcaloides, olores, etc.). La especie *Catharanthus roseus* (Figura 9), originaria de Madagascar ha adquirido relevancia pues de ella se obtienen más de 90 alcaloides, como la vinblastina y la vincristina que son utilizados en el tratamiento de la leucemia. También son utilizadas como plantas ornamentales como la *Nerium oleander* (Figura 10). Algunas otras de las especies de la familia Apocynaceae han sido utilizadas como veneno: mientras que otras como *Plumeria* tienen importancia ceremonial. Aunque la familia está integrada por plantas tóxicas, éstas son incluidas como condimentos de platillos regionales. En la región de Ocotlán, Veracruz, el látex de *Gonolobus niger* (Figura 11) se utiliza para producir espuma en una bebida de chocolate. Finalmente, en algunas localidades de los estados de Chiapas y Morelos, el látex de algunas especies de *Aspidosperma* o *Stemmadenia* es utilizado como pegamento escolar (Endress, 2004; Alvarado-Cárdenas, 2003).



Figura 9. *Catharanthus roseus*.

Consultada del sitio web: https://es.123rf.com/photo_44015157_madagascar-ob%C3%ADgaro-o-flor-de-vinca-catharanthus-roseus-.html



Figura 10. *Nerium oleander*

Consultada del sitio web: https://es.123rf.com/photo_80820462_nerium-oleander-flor-en-el-jard%C3%ADn-de-la-naturaleza.html



Figura 11. *Gonolobus niger*.

Consultada del sitio web:
<https://www.earth.com/earthpedia/plant/en/gonolobus-niger/>

2.7.1 Genero *Tabernaemontana*

El género *Tabernaemontana* cuenta con alrededor de 110 especies de plantas que forman parte de la familia Apocynaceae, cuya distribución comprende la parte de la planicie del Golfo de México (Figura 12). Su fenología manifiesta que son arbustos y pequeños árboles que alcanzan 1 a 15 metros de altura. Las hojas son perennes opuestas. Las flores son olorosas, blancas. Cuentan con látex blanco. Los frutos de cada una de las especies conocidas de este género para México son muy distintivos y se contrastan los atributos de tamaño, forma, grosor de la pared del folículo, ornamentación, sépalos persistentes y su distribución geográfica, puede llevarse a cabo una adecuada identificación (Morales, 2009).



Figura 12. Mapa de la República Mexicana con localización de *Tabernaemontana alba* Mill.
Consultada del sitio web: <https://www.gbif.org/species/3169628>

En México existen al menos 12 especies de *Tabernaemontana*, algunas de ellas son abundantes en zonas perturbadas e incluso forman parte de componentes clave de vegetación secundaria. Tiene un amplio registro etnobotánico en el tratamiento de heridas, complicaciones dermatológicas y gastrointestinales, dolores intensos y/o crónicos, así como enfermedades infecciosas causadas por bacterias, protistas y nemátodos, incluso algunos trastornos neurológicos como la epilepsia. Otros usos etnobotánicos son de tipo afrodisiacos, abortivo, galactagogo (potenciadores de lactancia) y regulador de los desórdenes menstruales, sugiriendo la presencia de

actividad hormonal en algunas preparaciones medicinales de *Tabernaemontana*. Su actividad biológica puede ser atribuida a ciertos MIAs (alcaloides indólicos monoterpénicos, denominados así por presentar una estructura indólica originada del triptófano específicamente de la triptamina, ligada a la unidad monoterpénica derivada de la secologanina. Los MIAs conforman una familia de más de 3,000 miembros, de los cuales sólo en algunos casos se conoce su efecto fisiológico en los mamíferos. Este tipo de alcaloides se han encontrado en varias familias vegetales, principalmente en especies de las familias Apocynaceae, Loganiaceae, Nissaceae y Rubiaceae, todas ellas pertenecientes al orden Gentianales. Entre las plantas más conocidas y estudiadas que producen MIAs se tienen a *Catharanthus roseus*, *Tabernaemontana divaricata* y *Rauvolfia serpentina* (Pratchayasakul, et al., 2008), (Loyola et al., 2004).

2.7.2 *Tabernaemontana alba* Mill

La planta de estudio *Tabernaemontana alba* Mill, presenta la siguiente taxonomía (Rivas et. al, 2017)

Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Género	<i>Tabernaemontana</i> L.
Especie	<i>Tabernaemontana alba</i>
Nombre científico	<i>Tabernaemontana alba</i> Mill
Determinador	Alvarado-Cárdenas (2006)

Sinónimos (Hassler, 2018):

- *Tabernaemontana amblyblasta* S.F. Blake
- *Tabernaemontana amblyocarpa* Urb.
- *Tabernaemontana berteroi* var, *parviflora* A.D.C
- *Tabernaemontana chrysocarpa* Blake

- *Tabernaemontana cymosa* Sesse & Moc.
- *Tabernaemontana martensii* Peyr
- *Tabernaemontana paisavelensis* Loes
- *Tabernaemontana tuxtlensis* Sesse & Moc.
- *Tabernaemontana umbellata* Sesse & Moc.
- *Tabernaemontana veracruzencis* Sesse & Moc.
-

Nombre común: Cojón de gato; huevo de gato; lecherillo; palo de San Diego; t'abat (lengua huasteca); white milkwood (Hassler, 2018).

Distribución: México, Costa Rica, Nicaragua, Belice, Panamá, Guatemala, Honduras, Colombia, Cuba, USA (Hassler, 2018).

Localidades mexicanas: Campeche, Chiapas, Colima, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán.

Descripción: Arbusto o árbol de hasta 15 m de alto, perennifolio, abundantemente lactífero, tronco de hasta 60 cm de diámetro, hojas verde oscura en el haz, algo más pálida en el envés; inflorescencias laterales o pseudoterminal, compuestas de numerosas flores, corola blanca, de color crema o a veces amarilla, estambres insertos en la mitad superior del tubo corolino, anteras sésiles; ovario rodeado en la base por un nectario anular; semillas rodeadas de un arilo anaranjado o rojo, de color café o verde. Elemento frecuente del bosque tropical subcaducifolio. Se ha encontrado en flor de septiembre a abril y en fruto de enero a septiembre (Roskov, 2018).

Observaciones: Godínez y López (2002), mencionan que el único uso que le dan a *T. alba* Mill es como un recurso maderable. Mientras que Kregel (2015) utilizó algunas estructuras como hoja, tronco, callos de cultivo para la producción de alcaloides (MIAs alcaloides indólicos monoterpénos). De igual manera no se encontraron estudios etnobotánicos o de índole químicos.

III Justificación

Muchas personas con cáncer se someten a cirugía, sí el cáncer parece estar restringido a una zona, ya que entonces puede ser extirparlo junto con cualquier tejido alrededor que pudiera contener células cancerosas (mastectomía). La terapia de radiación destruye o daña las células cancerosas para impedir su crecimiento, Puede presentar efectos secundarios como cansancio, cambios en la piel en el área tratada, cierta pérdida del apetito y pérdida del cabello. Más de la mitad de todas las personas con cáncer reciben tratamiento de radiación en alguna ocasión. Otro tratamiento muy utilizado es la quimioterapia que consiste en tratar el cáncer con medicamentos de acción fuerte que por lo general se inyectan a través de una vena o se administran oralmente. Los efectos secundarios dependen del tipo de medicamentos utilizados en la quimioterapia, de la cantidad administrada y de la duración del tratamiento. Los más comunes son náusea y vómito, pérdida temporal del cabello, más probabilidades de infecciones y cansancio. Al ser en su mayoría tratamientos que con llevan a un gran desgaste emocional y físico, se busca un método etnofarmacológico alternativo que ocasione el menor daño posible y que sea de bajo costo. Muchas personas se someten a diversos tratamientos dependiendo del sitio donde se localice la tumoración y del daño en el sistema, sin embargo presentan poca especificidad y generan efectos adversos. Este estudio se enfoca en la actividad antioxidante de los extractos de *Tabernaemontana alba Mill* en la regulación del estrés oxidativo.

IV Hipótesis

Los extractos *Tabernaemontana alba Mill* modificaran la respuesta antioxidante, al presentar moléculas con capacidad antioxidante que cambiaran el potencial redox en el sistema.

V Objetivos

General

- Analizar la actividad antioxidante de los extractos de *Tabernaemontana alba Mill* en un modelo murino (cepa CD1) con inducción a cáncer de mama por medio de marcadores de estrés oxidativo

Particulares

- Elaborar un registro etnobotánico de *T. alba Mill* en Limón Chiquito, Veracruz.
- Realizar un estudio fitoquímico general de la planta en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *T. alba Mill*.
- Determinar la capacidad antioxidante de las diferentes estructuras de la planta por medio de la prueba DPPH
- Evaluar los marcadores de estrés oxidativo en el proceso carcinógeno (tales como óxido nítrico, malondialdehído y actividad de catalasa)

VI Material y método

6.1 Localidad de estudio

Con la finalidad de evaluar los puntos geográficos donde se realizará la toma de muestra de la planta *T. alba* Mill, se llevó a cabo una caminata botánica en los alrededores del ejido Limón Chiquito. La recolecta de muestras se realizó el 21 de septiembre de 2018 entre las coordenadas 20°40'46.2" N y 97° 16'45.2" W, a 21 m.s.n.m. La segunda recolecta de muestra se realizó el día 22 de septiembre de 2018 entre las coordenadas 20° 40' 34.9" N y 97° 16' 34.4" W, a 12 msnm. Una tercera recolecta se llevó a cabo en el mes de febrero 2019 entre las coordenadas 20° 40' 49.6" N y 097° 16' 44.5" W, a 4 msnm. Se prepararon ejemplares para su identificación de la muestra botánica con apoyo de taxónomos del Herbario de México (MEXU).



Figura 13. Foto del sitio donde se realizó la caminata botánica, tomada por Daniela L., Limón Chiquito, Veracruz, 2018.



Figura 14. *Tabernaemontana alba* Mill en uno de los lugares de colecta, tomada por Daniela L., Limón Chiquito, Veracruz, 2018.

6.2 Registro etnobotánico

Se realizaron encuestas etnofarmacológicas (Anexo 1), donde se entrevistaron a 55 personas, tanto a hombres como a mujeres adultos, ancianos y jóvenes, que tuvieran un conocimiento de la especie para obtener información de uso, nombres comunes, partes y dosis, posibles efectos adversos, entre otros. La información obtenida durante las entrevistas y el proyecto fue utilizada para la cuantificación de la dosis recomendada.



Figura 15. Momento donde se realizaron parte de las entrevistas etnobotánicas a los residentes de la zona de Limón Chiquito, Veracruz. Fotografía de Edit R., 2018.

6.3 Extractos

Se tomaron *in situ*, 100 gr de cada una de las partes de la planta (Flor, flor, fruto, tallo y hoja) para la preparación del extracto acuoso, así como 100g para el extracto hidroalcohólicos. Se recolectaron 3 ejemplares para su identificación taxonómica.

Para la preparación del extracto acuoso se ocuparon 1000 ml de agua destilada con 100 g de la parte correspondiente de planta, realizándose una decocción hasta la ebullición y en ese momento se agregan los 100 g de la planta, dejándola en esta solución por 5 minutos. El líquido se colocó en la botella blanca y la parte vegetal se secó y guardo.

Con respecto al extracto hidroalcohólico, se preparó con una solución al 70% de etanol.

Posteriormente en el laboratorio, después de macerar las partes vegetales del extracto acuso, junto con el líquido obtenido, se filtraron. El filtrado se sometió a evaporación a baño maría hasta obtener el sólido en polvo. Éste se almacenó en frasco ámbar y se colocó en un desecador.

A los extractos hidroalcohólicos se les aplicó el mismo procedimiento, solo que un mes después de su realización



Figura 16. Procesando los extractos en el sitio de recolecta, macerando las partes vegetativas y realizando la evaporación de los extractos en laboratorio. Fotos tomadas en campo y laboratorio, Laguna, D., 2018.

6.4 Análisis de metabolitos primarios

6.4.1 Carbohidratos totales

Fundamento

Se basa en la deshidratación de los carbohidratos por la adición del ácido sulfúrico, con esta reacción se forman derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF). La presencia del fenol y su interacción con el HMF facilita la formación de complejos que permiten la coloración de la solución y en consecuencia la cuantificación de carbohidratos por medio de la espectrofotometría (López et al., 2017).

Método

Leyendo contra una curva patrón de glucosa de 0.001mg/mL. Las muestras obtenidas se leyeron a 490 nm.

6.4.2 Carbohidratos reductores

Fundamento

La cuantificación de los carbohidratos reductores se llevará con el método de Miller (1959). Se basa en la capacidad de reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de calor, a partir de esta se desarrolla un cambio de color con variaciones de amarillo hasta café, este cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica en un espectrofotómetro (Ávila, 2012).

Método

Para la curva patrón se utilizó una solución estándar de glucosa 2 mg/ml. Las muestras obtenidas se leyeron a 540 nm.

Cuantificación de carbohidratos no reductores

La concentración de estos compuestos se obtendrá por la diferencia entre los azúcares totales y los azúcares reductores.

6.4.3 Lípidos

Fundamento

Con ácido sulfúrico concentrado y el reactivo ácido fosfórico-vainillina produce una reacción de coloración rosa que puede ser medida en el espectrofotómetro a 530 nm. La intensidad de esta coloración es directamente proporcional a la concentración de lípidos presentes en la muestra, siguiendo la ley de Beer (Gutiérrez, 2002).

Método

Para la curva patrón se utilizó una solución estándar de colesterol 10 mg/mL. Las muestras obtenidas se leyeron a 530 nm.

6.4.4 Proteínas

Fundamento

El método de Biuret se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ion Cu^{2+} y los grupos NH_4 de los enlaces pépticos en medio básico (NaOH o KOH), es de baja sensibilidad por lo cual se recomienda prepararlos muy concentrados (Valencia, 2012).

Método

Para la obtención de la curva patrón se utilizó una solución estándar de albumina 10 mg/mL. Las muestras obtenidas se leyeron a 545 nm.

6.5 Identificación metabolitos secundarios

6.5.1 Alcaloides

Compuestos nitrogenados que derivan biosintéticamente de aminoácidos y se encuentran fundamentalmente en las plantas (Ibarra, et al., 2011).

Fundamento

Para la determinación de alcaloides se usó el reactivo de Dragendorff, Wagner y Mayer. La identificación tiene como fundamento la capacidad que tiene los alcaloides en estado de sal, de combinarse con el yodo y metales pesados, dándose reacciones de precipitación. El intercambio de aniones del reactivo reemplaza los aniones de las sales de los alcaloides (Arango, 2008).

6.5.2 Compuestos fenólicos

Comprende una de las clases más importantes de metabolitos secundarios, en su mayoría son derivados de fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. Interviene como antioxidante natural en los alimentos, lo cual se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Clifford & Scalbert, 2000).

Método

Método Folin-Ciocalteu: A cada muestra se le colocó 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 2 ml de carbonato de sodio. La coloración indica la presencia de polifenoles (García, 2004(2)).

Fundamento

Se basa en la oxidación de los fenoles en medio básico, mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de complejos ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico), produciéndose por reducción del reactivo, una mezcla de complejos de wolframio y molibdeno que presenta una coloración azul característica que es detectada espectrofotométricamente (García, 2004(2)).

6.5.3 Cumarinas

Son un grupo amplio de la familia de las lactonas, identificadas aproximadamente 1,500 en diferentes especies de plantas, se caracterizan por presentar fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm (López et al., 2000).

Fundamento

Las cumarinas son lactonas que pueden disolverse en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas dando una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular (López et al., 2000).

Método

Prueba de Baljet: 1) Solución A: ácido pícrico con EtOH al 50%; Solución B: NaOH (estas soluciones se mezclan hasta que se vaya a utilizar). 2) KOH al 10%. Coloración roja o naranja inestable (López et al., 2000).

6.5.4 Esteroides y esteroides

Son metabolitos secundarios que poseen una estructura básica de cuatro anillos, denominado ciclopentanoperhidrofenantreno (Cheirif et al., 2015).

Fundamento

La prueba es para triterpenos y compuestos esteroidales. Consiste en una reacción donde el esteroide se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial de esta prueba ocurre la protonación del grupo OH del esteroide habiendo una pérdida de agua y obteniéndose el ion carbonio 3,5 colestadieno que constituye la primera parte para la formación de color (Orantes, 2008).

Método

Prueba de Liebermann-Burchard: Se mezcló 1 ml de cloroformo y 1 mL de anhídrido acético, se agregaron a la muestra en un tubo de ensayo y posteriormente se

agregaron gotas de ácido sulfúrico. Si presenta una coloración roja-naranja se indica que es positivo (Hinojosa et al., 2013).

6.5.5 Flavonoides

Son fenilbenzopiranos de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos (A, B, C), dos de ellos aromáticos, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno, constituyendo la mayoría de los colores amarillo rojo y azul de las plantas (Aherne & O'Brien, 2002).

Fundamento

Reactivo de Shinoda: Se basa en que el Mg^{2+} metálico es oxidado por el HCl, dando como productos H_2 (eliminando en forma de gas) y el $MgCl_2$, que es el que forma los complejos con los flavonoides dando coloraciones características. Anaranjado para flavonoides, rojo para dihidroflavonas, rojo-azulado para flavonoides, violeta para dihidroflavonoles y xantonas (Salamanca, Correa & Principal, 2007).

Método

Se caracteriza por compuestos de estructura benzopirona. Para la identificación se utilizó un poco de limadura de hierro y se agregó gota a gota ácido clorhídrico hasta que la coloración cambiara a rojiza, naranja o violeta lo que indica su presencia (Salamanca, Correa & Principal, 2007).

6.5.6 Quinonas

Las quinonas son compuestos carbonílicos α - β insaturados, los cuales se clasifican en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas, respectivamente. Se encuentran tanto en especies vegetales superiores, hongos y bacterias (Carvajal et al, 2009).

Fundamento

La prueba de Bornträger se fundamenta en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos produce una oxidación de las antronas y los antranoles hasta antraquinonas generando la formación de complejos de color rojo (Carvajal et al, 2009).

Método

Reacción de Bornträger: 1) Hidróxido de potasio al 5% 2) Peróxido de hidrógeno al 6% 3) Ácido acético 4) Benceno 5) Hidróxido de amonio. De rojizo a violeta (dependiendo el tipo de quinona) (Carvajal et al, 2009).

6.5.7 Saponinas

Las saponinas se caracterizan por un sabor amargo, las propiedades espumantes, su efecto hemolítico sobre los glóbulos rojos y la inhibición de la fauna microbiana (García, 2004).

Fundamento

Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos. Aprovechando esta propiedad, la prueba de formación de espuma, al ser tensoactivas las saponinas inestabilizan la membrana celular de los eritrocitos, induciendo su ruptura (García, 2004(2)).

Método

Prueba de espuma: Se añadió parte de la muestra en 1 ml de agua, se comenzó a agitar y se consideró positiva si después de un tiempo se mantiene la espuma (García, 2004 (2)).

6.5.8 Sesquiterpenolactonas

Son compuestos activos, que han sido aislados de una serie de plantas utilizadas en la medicina tradicional, que pertenecen fundamentalmente a la familia Asteraceae (Compositae), están muy distribuidos en la naturaleza, se han reportado más de

3000 sesquiterpenlactonas diferentes en la literatura científica (Cornell University, 2005).

Fundamento

La prueba de Baljet se basa en la formación de un complejo formado entre el ácido pícrico y la lactona α , β y γ insaturada, dicho complejo presenta coloración rojo claro a oscuro (Manual, 2005).

Método

La prueba de Baljet consiste en añadir 1 gota de extracto etanólico de la planta, 1 gota de solución metanólica 2N de clorhidrato de hidroxilamina y 1 gota de solución metanólica 2N de hidróxido de potasio. Calentar de 1-2 minutos. Tiene que dar una coloración rojiza (Manual, 2005).

6.5.9 Taninos

Son compuestos fenólicos de alto peso molecular que contienen hidroxilos y otros grupos como carboxilos que les permiten formar complejos fuertes con proteínas, ácidos nucleicos, esteroides y otras macromoléculas (Mora et al., 2012).

Fundamento

Estos polifenoles tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta razón, la prueba más empleada para la detección de este grupo de metabolitos secundarios emplea el reactivo de gelatina-sal, el cual produce un precipitado blanco en presencia de taninos, luego de haber extraído el extracto etanólico total con una solución acuosa de etanol (García, 2004).

Método

Prueba de gelatina sal: Se disuelven 0.50g de grenetina en 50 mL de agua, en una solución al 10% de cloruro de sodio, la prueba es positiva si presenta un precipitado blanco (García, 2004).

6.6 Cuantificación de metabolitos secundarios

6.6.1 Alcaloides

Fundamento

Se utilizó la técnica de verde de bromocresol en la cual se genera una reacción de alcaloides que tienen solamente nitrógeno en su estructura, se forma un complejo de transferencia de cargas alcaloide-verde de bromocresol a un pH de 4.7, de color amarillo susceptible a 420 nm. El complejo obtenido es muy estable y es nula o escasa la interferencia por otros compuestos (Shamsa et al., 2008).

Método

Para la curva patrón se utilizó una solución estándar de atropina 0.1 mg/ml. Las muestras obtenidas se leyeron a 420nm.

6.6.2 Compuestos fenólicos

Fundamento

Por medio de un ensayo colorimétrico se puede medir la concentración total de grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de la planta. Por medio del método de Folin-Ciocalteu en el cual los extractos reaccionan con reactivos redox para formar un complejo azul que puede ser cuantificado por espectrofotómetro (Blainski,2013).

Método

Para la curva patrón se ocupó una solución stock de ácido gálico 0.05 mg/ml. Las muestras se leyeron a 760 nm.

6.6.3 Cumarinas

Fundamento

Hay una modificación en la espectrofotometría de las cumarinas con los cambios de pH, por lo cual se ocupa un espectro que registre lecturas de longitud de onda ultravioleta. La presencia de grupos metilo modifica poco al espectro, los grupos hidroxilo poseen un fuerte efecto batocrómico. Los grupos de pirano muestran bandas de 266 nm y 348 nm y los furanos absorben a 240-342 nm. En medio alcalino hay un efecto batocrómico y un hipertónico; así el de la umbeliferona de 320 nm se desplaza a 372 nm (Muñoz & Sarmiento, 2010).

Método

Para la curva patrón se ocupó una solución stock de umbeliferona donde se pesaron 0.1g de patrón de cumarina y se disolvieron en 5 mL de etanol. Las muestras se leyeron a 320nm.

6.6.4 Esteroides y esteroides

Fundamento

Reacción de Lieberman- Burchard. Se realiza en general en un medio ácido fuerte. En la reacción, el colesterol sufre una oxidación gradual, formándose en cada etapa una molécula de colestapolieneo que posee un doble enlace adicional con respecto al compuesto del cual deriva. La etapa inicial de la reacción consiste en la protonación del grupo OH del colesterol, con la consiguiente pérdida de agua obteniéndose el ion carbonio 3.5- colestadieno que constituye el primer paso de la reacción de color. La reacción entre el colesterol con el reactivo LB que contiene los ácidos

concentrados forma el producto azul oxidado con una longitud de onda máxima a 626 nm (García, 2004).

Método

Para la curva patrón se ocupó una solución stock de colesterol 1 mg/mL, a partir de esta solución se prepararon disoluciones con concentraciones 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 626 nm.

6.6.5 Flavonoides

Fundamento

Una de las formas de cuantificación de flavonoides en extractos vegetales es por medio de AlCl_3 . El AlCl_3 forma complejos de ácidos estables con el grupo ceto en el carbono 4 y los grupos hidroxilos en los carbonos 3 y 5 de las flavonas y flavonoles al unirse el AlCl_3 forma complejos de ácidos lábiles con los grupos orto- hidroxilos de los anillos A o B de los flavonoides. Los complejos formados presentan una máxima absorción a longitud de onda de 415 nm (Venegas, 2012).

Método

Se prepara un stock de quercetina en el cual se pesan 0.04 g, se disuelven con etanol al 96% hasta completar un volumen de 5 mL. Se realizan dos diluciones del primer stock, en la dilución A se tomaron 500 μL del primer stock y se completó un volumen de 5 mL con etanol al 96%, en la dilución B se tomaron 500 μL de la dilución A y se completó un volumen de 5 mL con etanol al 96%. Se preparan 4 disoluciones (miligramos/mililitro) a partir de la dilución B de stock, las cuales fueron de 0.008, 0.006, 0.004 y 0.002. Cada una debe mezclarse por separado con etanol 96%, 1 mL de cloruro de aluminio al 10% y 1 mL acetato de potasio. Dejar incubar

en la oscuridad durante 30 minutos y posteriormente medir en espectrofotómetro a 415 nm (Venegas, 2012).

6.6.6 Quinonas

Fundamento

Las quinonas reflejan sus espectros de absorción en ultravioleta por lo cual las benzoquinonas absorben intensamente entre 240-290 nm con una absorción débil. Las naftaquinonas, antraquinonas y homólogos muestran espectros con varias absorciones, así las primeras dan señales a 240-290 nm y a 300-500 nm (Alcántara, 2005).

Método

Para la curva patrón se ocupó una solución stock de quercetina 1mg/mL, la cual se conservó en un frasco ámbar y en refrigeración. Las muestras se leyeron a 415 nm.

6.6.7 Saponinas

Fundamento

Se fundamenta en la separación por hidrólisis ácida (anhídrido acético-ácido sulfúrico al 16 %) de carbohidratos y del aglicón presentes en la estructura de la saponina. Las absorbancias se leyeron a 485 nm en un espectrofotómetro (Ramos et al., 2014).

Método

Para la curva patrón se ocupó una solución stock de sapogenina 20 mg/mL, la cual se conservó en un frasco ámbar. Las muestras se leyeron a 485 nm.

6.6.8 Sesquiterpenlactonas

Fundamento

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, son una clase de terpenoides (sesquiterpenoides C15) con un anillo lactónico, que provienen biogenéticamente del farnesil difosfato. Se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean y con la terminación olido que indica la existencia de un grupo funcional lactónico. Una de las formas de cuantificación de sesquiterpenlactonas en extractos vegetales es por medio de una solución alcalina de picrato de sodio. Se basa en la formación de un complejo formado entre el ácido pícrico y la lactona α , β y γ insaturada, dicho complejo presenta coloración rojo claro a oscuro. Los complejos formados presentan una máxima absorción a longitud de onda de 495 nm (Orantes,2008).

Método

Método colorimétrico de picrato de sodio. Para poder medir las sesquiterpenlactonas presentes en los extractos acuoso e hidroalcohólico debe prepararse una curva de calibración. Deben emplearse 0.0025 g de estafiatina, estos se disolverán con etanol hasta completar un volumen de 2250 μ L. Se preparan 3 disoluciones (miligramos/mililitro) a partir del stock de estafiatina antes elaborada. A cada una se le debe agregar 2 mL de picrato de potasio. Dejar incubar en la obscuridad durante 30 minutos y posteriormente medir en espectrofotómetro a 495 nm.

6.6.9 Taninos

Fundamento

Se utiliza la solución de yodato de potasio al 2.5% para generar un complejo colorido entre el yodo del reactivo y los taninos presentes en la muestra (Camacho, 2012).

Método

Para la curva patrón se ocupó una solución stock de ácido tánico donde se pesaron 11.36 mg y se disolvieron con 10 mL de acetona al 70%, la cual se conservó en un frasco ámbar. Las muestras se leyeron a 550 nm.

6.7 Determinación de la capacidad antioxidante, método DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo)

FUNDAMENTO

Se basa en la reducción de la absorbancia medida en 517 nm del radical 2,2-difenil-picrilhidrazilo (DPPH) el cual se reduce en presencia de antioxidantes manifestándose un cambio de color (Kuskoski, 2005).

Para las muestras se tomaron 100 µL de muestra y se colocaron 2.9 mL de DPPH.

Para calcular el porcentaje de inhibición se ocupa la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (1 - a_m/a_c) \times 100$$

Donde:

a_m es la absorbancia de la solución problema

a_c es la absorbancia de la solución DPPH control

6.8 Modelo experimental

Para el modelo experimental se ocuparon 60 ratones hembra de la cepa CD1 del bioterio FES Zaragoza, UNAM, los cuales se clasificaron en 6 grupos experimentales (de estos 60 ratones 2 murieron por causas naturales antes de la experimentación 36 y 58). Y se evaluara la actividad antioxidante de los extractos acuoso (flor, hoja, fruto y planta completa).

A los grupos que se les indujo DMBA (concentrado) fue en una única dosis diluido en aceite de oliva manteniéndolos en observación por tres meses, así como

registrando su peso semanal de cada uno (Figura 17). La inducción fue hecha de manera desfasada.

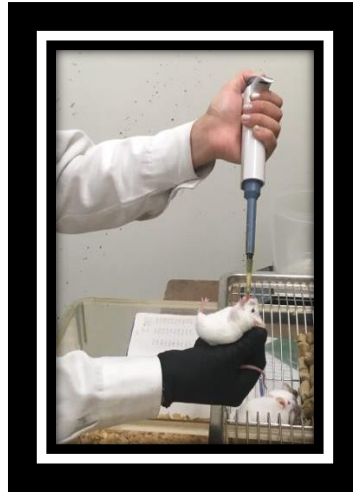


Figura 17. Momento de inducción con DMBA a ratones de cepa CD1, fotografía tomada por Puga, 2018.

Cuando terminaron los tres meses de inducción se aplicó a cada grupo su respectivo extracto acuoso de *Tabernaemontana alba* la dosis se obtuvo a partir de la dosis recomendada.

Su tratamiento fue administrado diariamente durante 15 días, después de los cuales se sacrificó a los ratones por decapitación.

Los grupos eran los siguientes:

Grupo	Características	Numero de ratón
1	DMBA. Animales que fueron inducidos a cáncer con una única dosis	(1,2,3,4,5,19)
2	Vehículo. Animales que se les administro 50 µL de aceite de oliva	(6,7,8,9,10,11)
3	Control. Animales sin inducción a cáncer, sin aceite de oliva, sin tratamiento.	(12,13,14,15,16,17)
4	DMBA + FLOR. Animales que se les indujo a cáncer con DMBA (única dosis) y se les suministró diariamente extracto acuoso de flor durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(20,28,18,22,23,24)
5	FLOR. Animales que solo se les suministro diariamente extracto acuoso de flor durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(26,27,29,30,31,32)

6	DMBA + HOJA. Animales que se les indujo a cáncer con DMBA (única dosis) y se les suministro diariamente extracto acuoso de hoja durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(21,33,34,35,55,37)
7	HOJA. Animales que solo se les suministro diariamente extracto acuoso de hoja durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(38,39,40,41,42,43)
8	DMBA + PLANTA COMPLETA. Animales que se les indujo a cáncer con DMBA (única dosis) y se les suministro diariamente extracto acuoso de planta completa durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(25,44,45,46,47,48)
9	PLANTA COMPLETA. Animales que solo se les suministro diariamente extracto acuoso de planta completa durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(49,50,51,52,53,54)
10	FRUTO. Animales que solo se les suministro diariamente extracto acuoso de fruto durante 15 días (50 µL a una concentración de 0.005 g/mL)	(56,57,59,60)

Tabla 2. Diseño experimental para llevar a cabo la carcinogénesis y tratamientos.

6.9 Obtención de plasma sanguíneo y homogenado de hígado murino

Cada uno de los grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación (26/06/2019), la sangre que se obtuvo fue colectada en tubos con heparina y centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos y preservándose en hielo.

A cada ratón se le extrajo el hígado colocándose en solución fisiológica fría. Se realizó perfusión con solución fisiológica al 0.09%. Posteriormente se obtuvo el homogenado de hígado con amortiguador (TRIS/ph 7.5)

En la disección de cada ratón se observaron todos los órganos, se extirparon los tumores presentes y se fijaron en formol al 10% y se tomaron medidas del bazo.

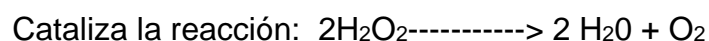
El plasma sanguíneo y el homogenado de hígado fueron utilizados para la cuantificación de proteínas y evaluación de marcadores de estrés oxidante (óxido nítrico, lipoperoxidación lipídica y catalasa).

6.10 Evaluación de marcadores de estrés oxidativo

La actividad antioxidante se evaluó en cada grupo de ratones tanto en plasma sanguíneo como en el homogenado de ratones, utilizando cuatro pruebas.

6.10.1 Actividad enzimática de catalasa (Método de Chance y Machley)

En varios tipos de células la catalasa es una enzima, su función es proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno el cual es resultado de distintas reacciones redox (Díaz, 2003):



Este método tiene como fundamento que la catalasa es capaz de reducir H_2O_2 en una molécula de agua y media molécula de oxígeno. Se mide la descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm, 37 °C en una solución de agua oxigenada al 0.009% (Díaz, 2003)

La actividad catalasa se determinó a través de la velocidad de descomposición del H_2O_2 a 240 nm en una solución tampón de fosfato de potasio (20 mM, pH 7,0), que contenía 3% (v/v) de H_2O_2 . La actividad enzimática se realizó con 0,05 mL de solución de H_2O_2 ; se utilizó como blanco agua destilada. La lectura se hizo a 240 nm en un espectrofotómetro (Ultrospect 2000); se tomaron tres réplicas por cada tratamiento.

6.10.2 Lipoperoxidación (Método de TBARS)

Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que son eliminados por receptores endógenos, pero también pueden interactuar con los lípidos séricos y tisulares provocando peroxidación. Durante esta reacción se generan agentes inestables y resulta difícil medir la magnitud de dicha peroxidación,

pero en este caso es más accesible medir la degradación metabólica, constituida por aldehídos de capacidad reactiva, siendo el más significativo el malondialdehído (MDA) (Repetto et al., 2012).

En este caso el método ocupado fue descrito por Asakawa y Matsushita, 1979, se adicionaron iones de Fe (II) el cual se utiliza para optimizar la descomposición de los lipoperóxidos del MDA. Comportándose como un catalizador. La cuantificación se llevó a cabo por el método de TBARS. Se tomaron 150 μL de muestra de sangre, se añadieron 100 μL de sulfato de hierro FeSO_4 , 100 μL de buffer TRIS-HCl y 100 μL de ácido ascórbico, se incubaron por 15 minutos a 37 °C, se añadió 1 ml de TCA y 2 ml de TBA y se colocaron en incubación a 100 °C por 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm (Repetto et al., 2012).

Mientras que para las muestras de homogenado se ocuparon 500 μL , 200 μL de agua y los demás pasos se llevaron tal cual como en las pruebas de sangre.

Se empleó el coeficiente de extinción molar de malondialdehído para obtener la concentración. Con la siguiente ecuación:

$$C = A532 / EP$$

Donde

E = Coeficiente de extinción molar del MDA a 532

P = Grosor o diámetro de la fotocelda

6.10.3 Cuantificación de nitritos (Método modificado de Griess)

El óxido nítrico (ON) es una molécula endógena de señalización intercelular y que se forma a partir del aminoácido L-arginina, a través de la enzima ON-sintasa (ONS). Los nitritos en sangre y orina son metabolitos estables y se utilizan como marcadores. El óxido nítrico es un radical libre que participa en el desarrollo de muchas enfermedades (Adarmes et. al, 2009).

La concentración de nitrito se determinó utilizando la reacción de Griess, el cual tiene como fundamento la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro. Leyéndose a 540 nm (Adarmes et. al, 2009).

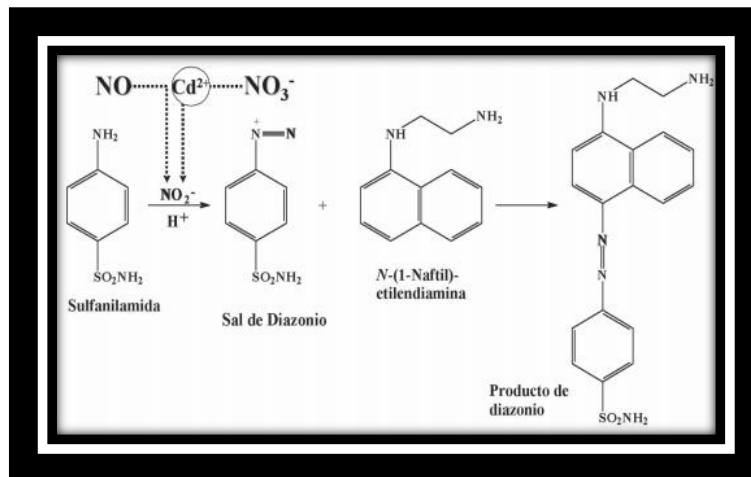


Figura 18. Reacción de Griess para la cuantificación de nitritos. Obtenido del sitio web: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57936106.pdf>

En cuanto a la lectura de la concentración en muestras para la sangre se tomaron 50 μL de muestra y para homogenado 500 μL , posteriormente se agregó 1 ml de sulfanilamida y 500 μL de agua, se dejó reposar en obscuridad durante 15 minutos, después se agregó 1 ml de NED y se dejó reposar otros 15 minutos en obscuridad. Luego se procedió a tomar lectura en el espectrofotómetro.

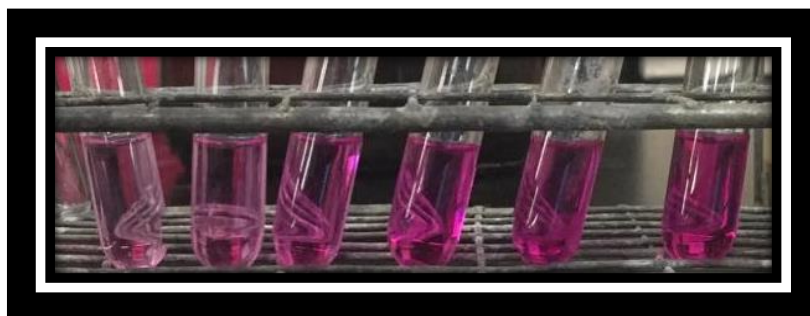


Figura 19. Curva patrón de nitritos por el Método de Griess, fotografía de Laguna, 2018

6.10.4 Cuantificación de proteínas (Método de Biuret)

Se utilizó el método de Biuret el cual permite determinar la presencia de proteínas cuando se forma un complejo estable entre la proteína y el cobre. Da un color azul-violeta que se observa a una absorbancia de 545 nm. El fundamento del método consta en la formación de un complejo coloreado entre el ion Cu^{2+} y los grupos NH_4 de los enlaces pépticos en medio básico (NaOH o KOH), es una reacción específica, ya que pocas sustancias interfieren, es de baja sensibilidad por lo cual es recomendado en preparados muy concentrados (como el suero) (Valencia, Cuellar, Aguilar, Salmerón & Rodríguez, 2012).

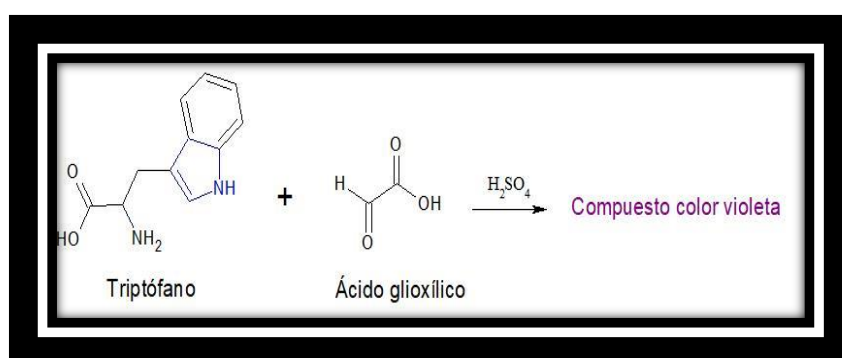


Figura 20. Reacción de reconocimiento de proteínas por método de Biuret. Obtenido del sitio web: <https://quimicafacil.net/manual-de-laboratorio/analisis-cualitativo-de-proteinas/>

Se realizó una curva de calibración con un patrón de albumina (10 mg/ml) y 2 ml de Biuret.





Figura 21. Curva patrón de proteínas por el Método de Biuret. Fotografía de Laguna, 2018

VII Resultados

7.1 Registro de información etnobotánica

Ficha etnobotánica de *Tabernaemontana alba*, realizada en el laboratorio 7 P1 UMIEZ, con los datos obtenidos con las entrevistas.

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Laboratorio de Terapia Molecular, UMIEZ
PLANTAS MEDICINALES DE VERACRUZ
REGION TONACA



Nombre científico: *Tabernaemontana alba Mill*
Nombre común: Cojon de gato
Nombre totonaco: Waltek'et
Familia: APOCYNACEAE
No. Colecta: 2 Fecha: 16/11/18
Coordenas: N 20° 40' 49.6" W 97° 16' 44.5" Altitud: 4 msnm
Localidad: Limón Chiquito Municipio: Cazones

Datos generales:
Hábitat: Subcaducifolio perturbado, orilla de camino y huerta familiar
Abundancia: Regular Forma biológica: Árbol Tamaño: 2 m
Floración: Sept- Oct Fructificación: Sept- Oct Ciclo de vida: Perenne
Propagación: Semilla
Uso (s): Dolor de muela, cáncer, erupciones o granos, heridas, diabetes, dolor de cabeza
Parte usada: Hoja, fruto y látex Preparación: Cocimiento, hervida y látex sin preparar
Administración: Vía oral y vía cutánea Frecuencia: Hasta aliviar enfermedad

Se realizaron un total de 55 entrevistas con las cuales se obtuvo la siguiente información:

<i>Nombre común</i>	<i>Cojón de gato</i>
<i>Uso</i>	Medicinal (como tratamiento para cáncer, diabetes, dolor de cabeza, heridas, granos, dolor de muela)
<i>Estructura usada</i>	Hoja, fruto y el látex
<i>Forma de preparación</i>	Cocimiento, hervido, agua de tiempo
<i>Dosis</i>	5 hojas y látex (Figura 25) (50 g aprox.)
<i>Frecuencia de uso</i>	Hasta que se tenga mejoría

Tabla 3. Resumen de los datos obtenidos en las entrevistas etnobotánicas



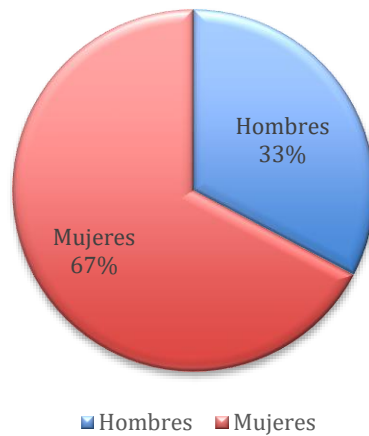
Figura 22. Se observa el látex emanado de *T. alba Mill.* Fotografía de Laguna, 2018.

Se realizaron 55 entrevistas, de las cuales en su mayoría eran mujeres que sabían por vecinos o por herencia familiar, las personas tenían un rango de edad de entre 18 a 75 siendo más de entre 31 a 45, donde mencionaron que se ocupan hojas, frutos y el látex dependiendo de la enfermedad o el padecimiento que se tenga en el momento. No se tiene una dosis exacta ya que variaba desde un puño hasta unas cuantas hojas, frutos o gotas del látex. Se mencionó que se toma como agua de tiempo que es una especie de té para hoja como para fruta, mientras que el látex se ocupa como una especie de pegamento de heridas. Durante el uso de esta planta no se generaron efectos secundarios en los tratamientos de las personas.

Edad	0-18	19-30	31-45	46-60	61-75	
N	2	10	20	13	10	55
%	3.636364	18.18182	36.36364	23.63636	18.182	

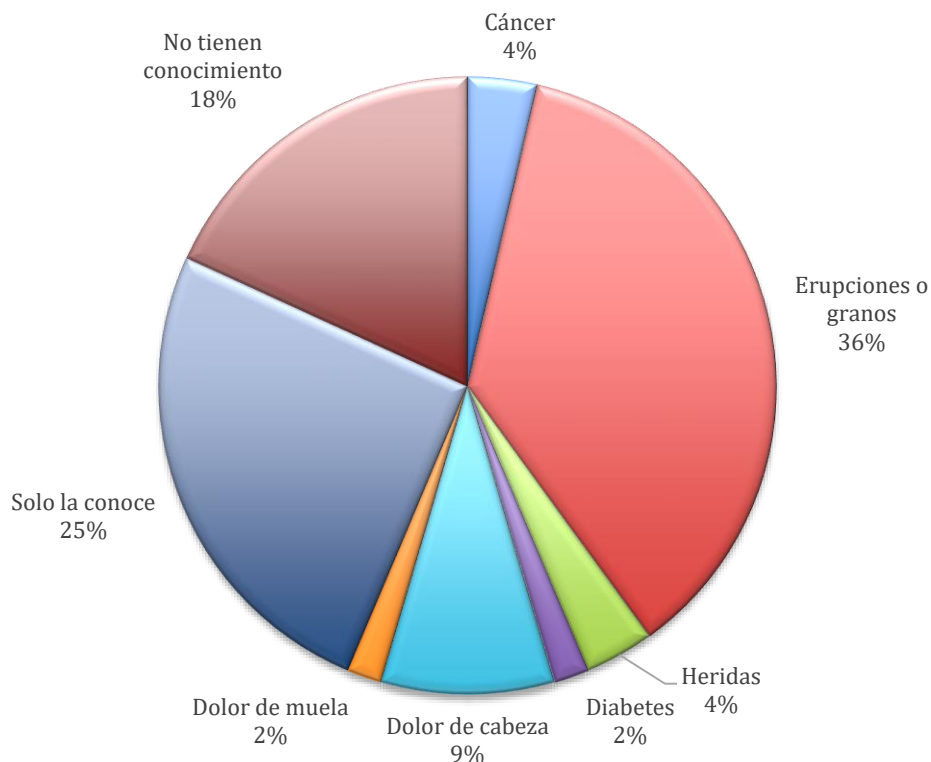
Tabla 4. Rango de edad de las personas entrevistadas

Porcentaje de mujeres y hombres entrevistados



Gráfica 1. Porcentaje de mujeres y hombres que se entrevistaron en Limón Chiquito, Veracruz

Porcentaje de padecimientos que son tratados con *Tabernaemontana alba Mill*



Gráfica 2. Usos de *Tabernaemontana alba Mill* para diferentes padecimientos

También se colectaron ejemplares que incluían flor, fruto, tallo y hoja para prensarlos y herborizarlos.

7.2 Rendimiento extractos hidroalcohólicos y acuosos

Se inició con la evaporación en baño maría a una temperatura constante de los extractos acuosos, cabe recalcar que se complicó el proceso debido a la alta concentración de látex que la planta tiene. Se obtuvieron los siguientes resultados:

EXTRACTOS ACUOSOS				
Parte	Características	Peso	Cantidad de muestra	Rendimiento
Flor	Olor a azúcar, color verde pardo paso a pardo	1.723 g	100 g	1.723%
Fruto	Color amarillo	1.471 g	100g	1.471%
Tallo	Olor a pescado; color de amarillo a pardo	1.3418 g	100g	1.3418%
Hoja	Olor a hoja de tamal, de color amarillo a pardo	1.628 g	100g	1.628%
Planta completa	Color verde a pardo	3.332 g	100g	3.332%
Dosis	Color transparente a color pardo	0.5786	5 hojas y resina	5.786%

Tabla 5. Rendimiento de extractos acuosos

Respecto al extracto hidroalcohólico se comenzó su evaporación un mes después de realizarlos, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 6):

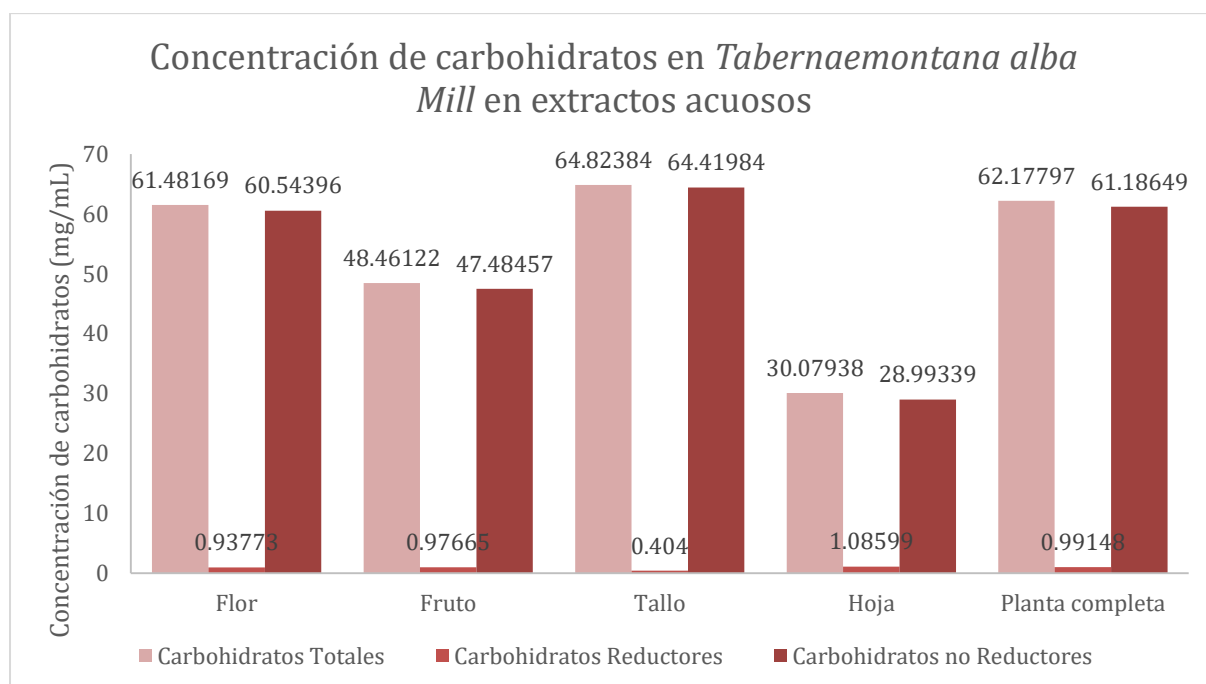
EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS				
Parte	Características	Peso	Cantidad de muestra	Rendimiento
Flor	Olor dulce, color amarillo que pasa a pardo	3.3300 g	100 g	3.300%
Fruto	Olor dulce, color amarillo que pasa a pardo	3.5687 g	100g	3.5687%
Tallo	Olor dulce, color amarillo que pasa a pardo	2.27 g	100g	2.27%
Hoja	Olor dulce, color verde que pasa a pardo	3.533 g	100g	3.533%
Planta completa	Color verde, olor a pardo	3.32 g	100 g	3.32%

Tabla 6. Rendimiento de extractos hidroalcohólicos

7.3 Cuantificación de metabolitos primarios en extractos acuosos e hidroalcohólicos

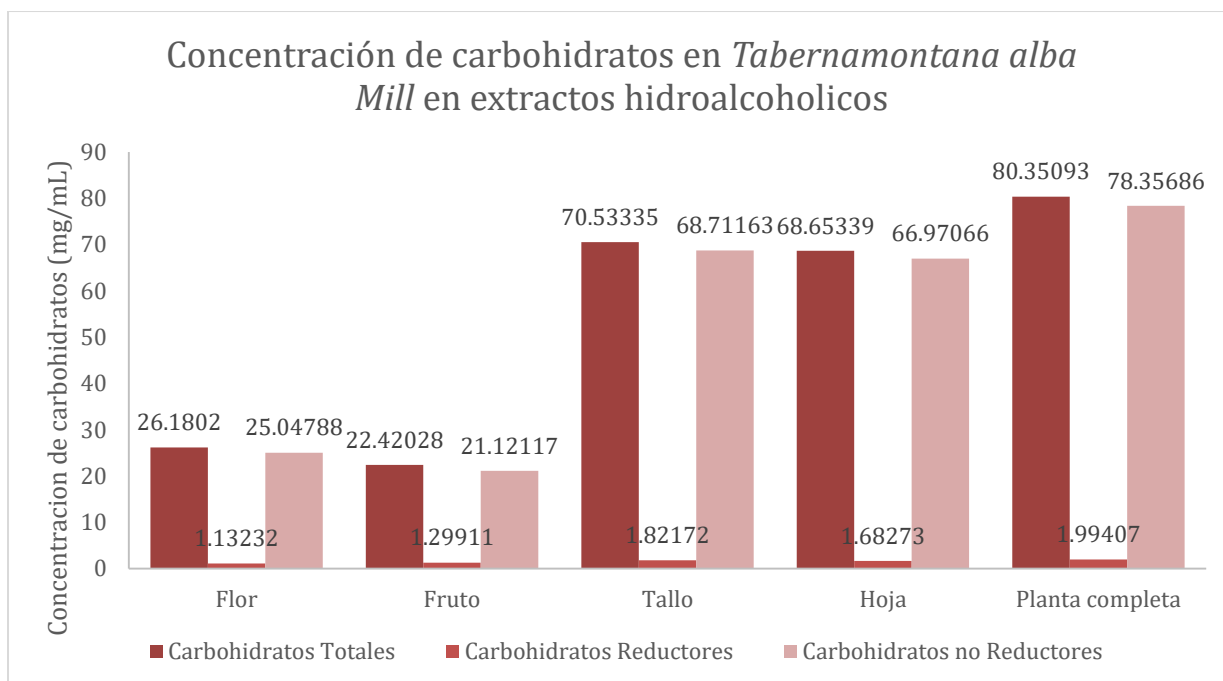
7.3.1 Cuantificación de carbohidratos totales, reductores y no reductores.

Para los carbohidratos totales en cuanto a los extractos acuosos se obtuvo una mayor concentración en tallo (64.82384 mg/mL), mientras que para los carbohidratos reductores hoja (1.08599 mg/mL) tuvo la mayor concentración y para los carbohidratos no reductores Tallo (64.41984 mg/mL).



Gráfica 3. Concentraciones obtenidas en extractos acuosos de *Tabernaemontana alba* Mill de carbohidratos totales, reductores y no reductores.

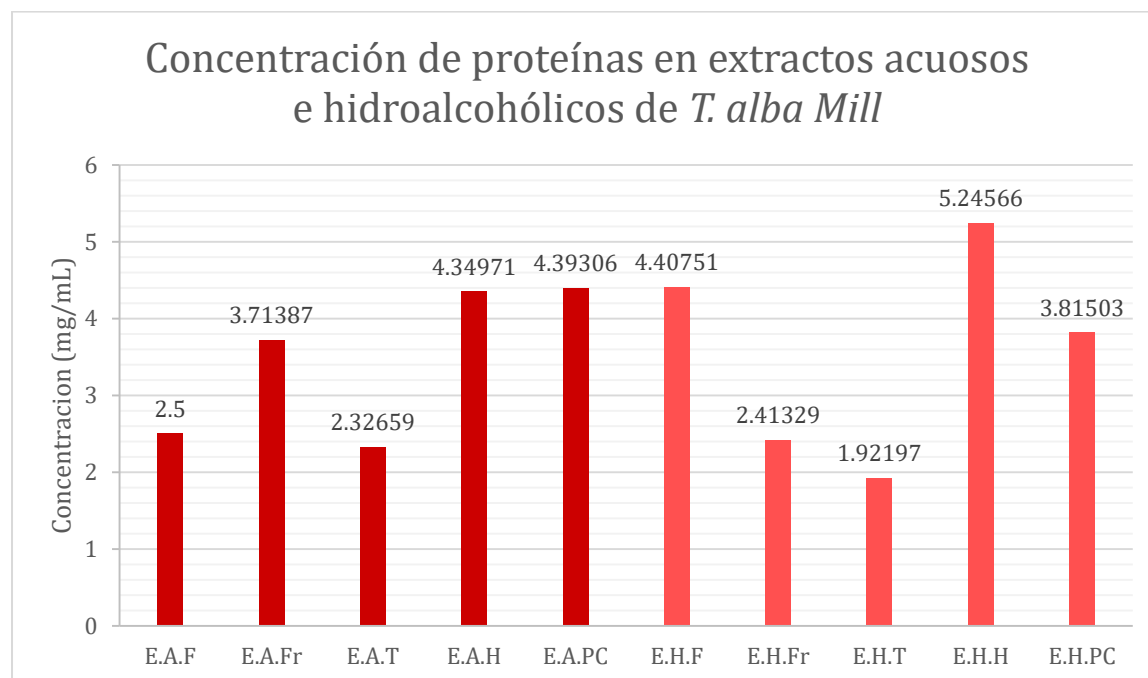
Para los carbohidratos totales en cuanto a los extractos hidroalcohólicos se obtuvo una mayor concentración en planta completa (80.35093 mg/mL), mientras que para los carbohidratos reductores planta completa (1.99407 mg/mL) tuvo la mayor concentración y para los carbohidratos no reductores planta completa (78.35686 mg/mL).



Gráfica 4. Concentraciones obtenidas en extractos hidroalcohólicos de *Tabernaemontana alba* Mill de carbohidratos totales, reductores y no reductores.

7.3.2 Cuantificación de proteínas

En la Gráfica 5 se observa que el extracto hidroalcohólico de hoja presenta una mayor concentración (5.245 mg/mL) seguido de extracto hidroalcohólico de flor (4.407 mg/mL) extracto acuoso de planta completa (4.393 mg/mL) y extracto acuoso de hoja (4.349 mg/mL).

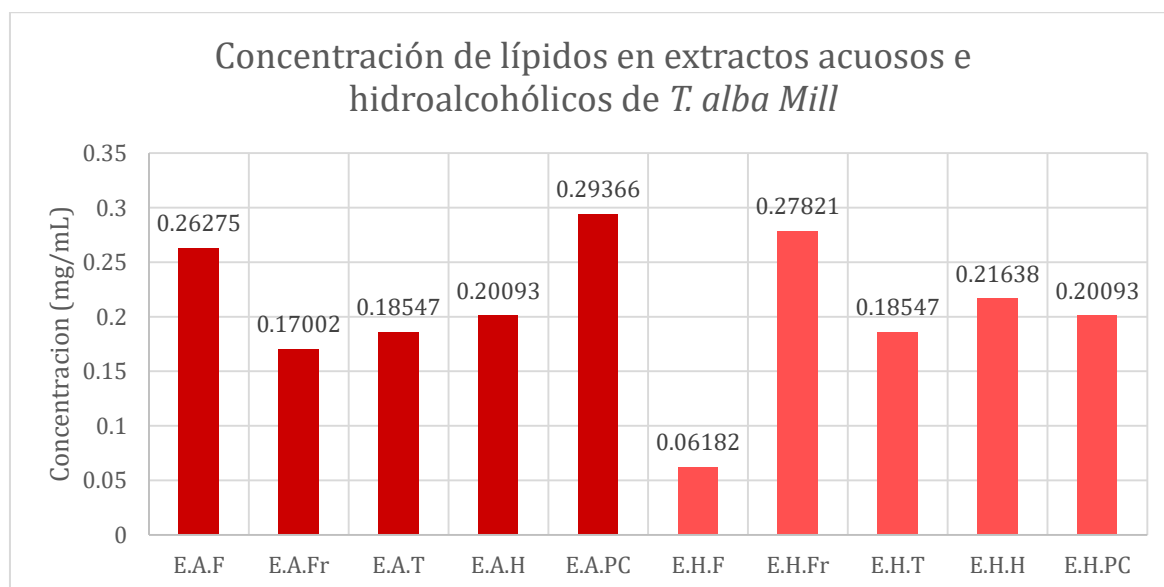


Gráfica 5. Concentraciones proteínas en los extractos de *Tabernaemontana alba Mill.*
Donde:

- E.A.F (Extracto acuoso de flor)
- E.A. Fr (Extracto acuoso de fruto)
- E.A.T (Extracto acuoso de tallo)
- E.A.H (Extracto acuoso de hoja)
- E.A. PC (Extracto acuoso de planta completa)
- E.H.F (Extracto hidroalcohólico de flor)
- E.H. Fr (Extracto hidroalcohólico de fruto)
- E.H.T (Extracto hidroalcohólico de tallo)
- E.H.H (Extracto hidroalcohólico de hoja)
- E.H. PC (Extracto hidroalcohólico de planta completa)

7.3.3 Cuantificación de lípidos

En la Gráfica 6 se observa que el extracto acuoso de planta completa presenta una mayor concentración (0.2936 mg/mL) seguido de extracto hidroalcohólico de fruto (0.2782mg/mL) y extracto acuoso de flor (0.2627 mg/mL)



Gráfica 6. Concentraciones lípidos en los extractos de *Tabernaemontana alba Mill.*

Donde:

- E.A.F (Extracto acuoso de flor)
- E.A. Fr (Extracto acuoso de fruto)
- E.A.T (Extracto acuoso de tallo)
- E.A.H (Extracto acuoso de hoja)
- E.A. PC (Extracto acuoso de planta completa)
- E.H.F (Extracto hidroalcohólico de flor)
- E.H. Fr (Extracto hidroalcohólico de fruto)
- E.H.T (Extracto hidroalcohólico de tallo)
- E.H.H (Extracto hidroalcohólico de hoja)
- E.H. PC (Extracto hidroalcohólico de planta completa)

7.4 Identificación de metabolitos secundarios

Se tomó 1g de cada estructura de la planta y la cantidad de solución que requería cada prueba. A partir de estas pruebas en fresco y en laboratorio se desarrollaron las pruebas colorimétricas, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 7):

Metabolitos secundarios	Prueba	Flor			Fruto			Tallo			Hoja		
		D.C	E. A	E.H	D.C	E. A	E.H	D.C	E. A	E.H	D.C	E. A	E.H
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+
	Wagner	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+	++	++	-
	Mayer	++	++	+	++	++	++	++	++	+	+++	+++	+
Compuestos fenólicos	Folin-Ciocalteu	-	+++	++	-	++	++	-	++	+	+	++	+
Cumarinas	Baljet	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Esteroles y esteroides	Lieberman B.	+	+	++	-	-	-	++	++	++	++	++	+
Flavonoides	Shidona	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Quinonas	Solubilidad NaOH	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+++
Saponinas	Espuma	+++	+++	+	-	-	-	+++	+++	+	-	-	-
Sesquiterpenlactonas	Baljet	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
Taninos	Grenetina	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Identificación de metabolitos secundarios en campo y laboratorio de los diferentes extractos [+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado. DC (Determinación en campo), EA (Extracto acuoso), EH (Extracto hidroalcohólico)]

La Figura 23 muestra a partir de la Prueba de Alcaloides la presencia de un precipitado blanco-crema (Prueba de Mayer), luego un precipitado color anaranjado-marrón (Prueba de Dragendorff) y por último un precipitado de color marrón (Prueba de Wagner).



Figura 23. Prueba de Alcaloides.

La Figura 24, muestra la Prueba de Compuestos Fenólicos a contraluz se observa un tono azul claro tenue. En campo no dio presencia, pero en laboratorio si, y la única constante fue de hoja.

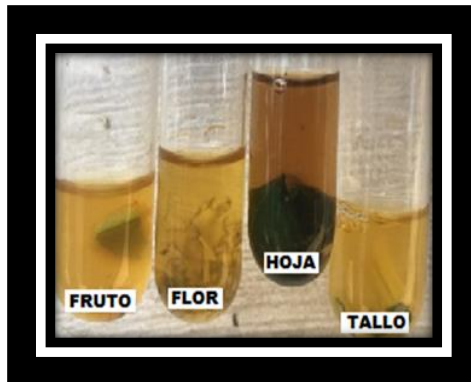


Figura 24. Prueba de Compuestos Fenólicos

En la Figura 25, resultado de la Prueba de Cumarinas, se muestra una coloración muy tenue de color anaranjado-amarillo, excepto en hoja.



Figura 25. Prueba de Cumarinas.

En la Figura 26, a partir de la Prueba de Esteroides y Esteroles, se muestra una coloración muy tenue rojo-naranja, menos en fruto.

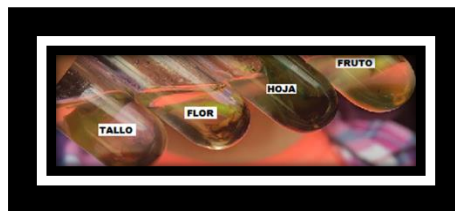


Figura 26. Prueba de Esteroides y Esteroles.

En la Figura 27, a partir de la Prueba de Flavonoides, se muestran ligeramente los colores como violeta-rojizo en fruto y un poco en flor.

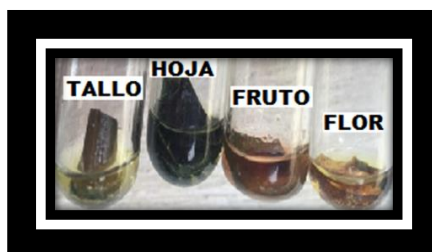


Figura 27. Prueba de Flavonoides.

En la figura 28, a partir de la Prueba de Quinonas, pero a la luz se nota ligeramente un todo violeta muy claro



Figura 28. Prueba de Quinonas

En la figura 29, a partir de la Prueba de Saponinas, se observa la presencia de poca espuma en fruto y tallo, pero una mayor cantidad en flor y hoja.



Figura 29. Prueba de Saponinas

En la Figura 30, como resultado de la Prueba de Sesquiterpenlactonas, se observan coloraciones rojizas en todas las estructuras.



Figura 30. Prueba de Sesquiterpenlactonas

En la figura 31, resultado de la Prueba de Taninos, se observa ligeramente un precipitado blanco.

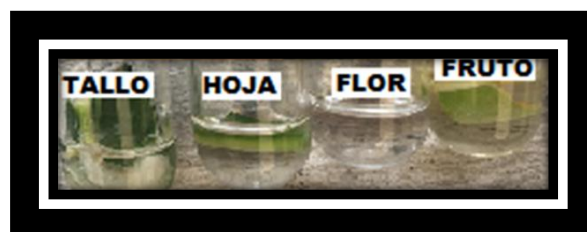


Figura 31. Prueba de Taninos

7.5 Cuantificación de metabolitos secundarios

Para los extractos acuosos se obtuvo las siguientes concentraciones (mg/mL) de metabolitos:

Metabolitos (mg/mL)	FLOR	FRUTO	TALLO	HOJA	PLANTA COMPLETA
Alcaloides	0.00146	0.00226	0.00251	0.00225	0.00080
Compuestos fenólicos	0.00462	0.00288	0.00037	0.00078	0.00332
Cumarina	0.00824	0.00777	0.00754	0.00942	0.01979
Esteroles y esteroides	0.05196	0.09810	0.01697	0.08166	0.11029
Flavonoides	0.00101	0.00107	0.00050	0.00106	0.00140
Quinonas	0.14362	0.05984	0.03402	0.12661	0.06866
Saponinas	0.00880	0.00201	0.00827	0.00244	0.00594
Sesquiterpenlactonas	0.02282	0.02647	0.01004	0.02556	0.02191
Taninos	0.00629	0.00090	0.00353	0.00145	0.00394

Tabla 8. Concentración de metabolitos secundarios en los extractos acuosos

Para los extractos hidroalcohólicos se tienen las siguientes concentraciones (mg/mL) de metabolitos:

Metabolitos (mg/mL)	FLOR	FRUTO	TALLO	HOJA	PLANTACOMPLETA
Alcaloides	0.00373	0.00378	0.00253	0.00283	0.00357
Compuestos fenólicos	0.00226	0.00549	0.00515	0.00353	0.00602
Cumarina	0.01013	0.01060	0.00707	0.01790	0.01979
Esteroles y esteroides	0.18718	0.04931	0.12461	0.68296	0.16491
Flavonoides	0.00117	0.00089	0.00060	0.00205	0.00154
Quinonas	0.20850	0.12598	0.18268	0.70929	0.37606
Saponinas	0.00679	0.00201	0.00424	0.00233	0.00255
Sesquiterpenlactonas	0.01369	0.02008	0.03469	0.02282	0.02739
Taninos	0.00283	0.00107	0.00270	0.00159	0.00097

Tabla 9. Concentración de metabolitos secundarios en los extractos hidroalcohólicos

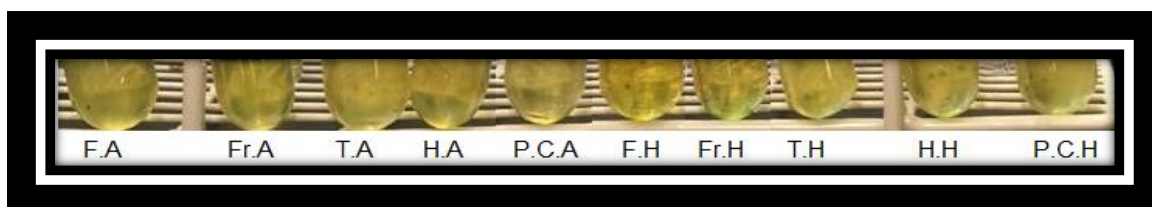


Figura 32. Cuantificación de alcaloides en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

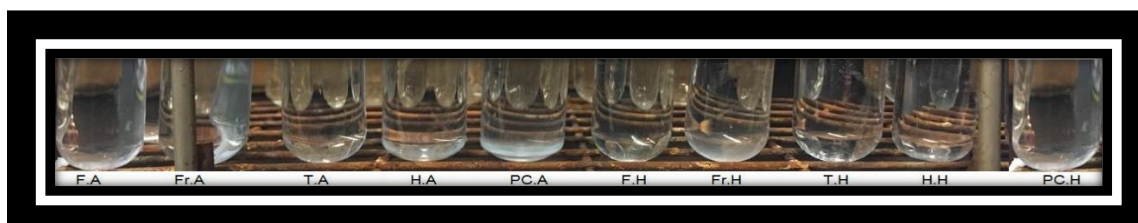


Figura 33. Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

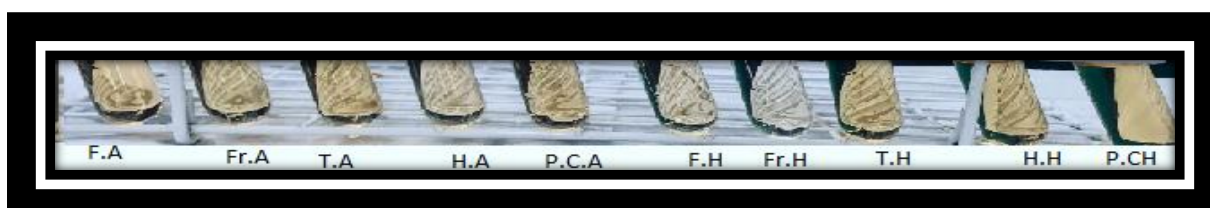


Figura 34. Cuantificación de cumarinas en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

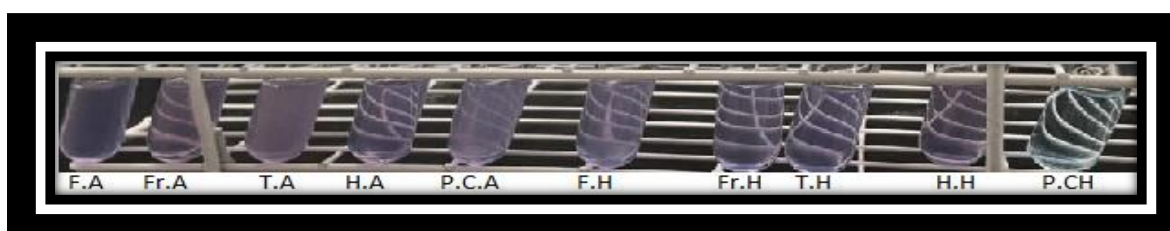


Figura 35. Cuantificación de esteroides y esteroides en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).



Figura 36. Cuantificación de flavonoides en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

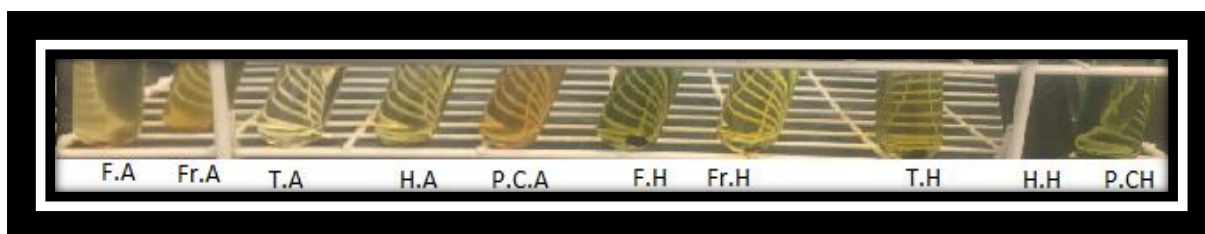


Figura 37. Cuantificación de quinonas en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

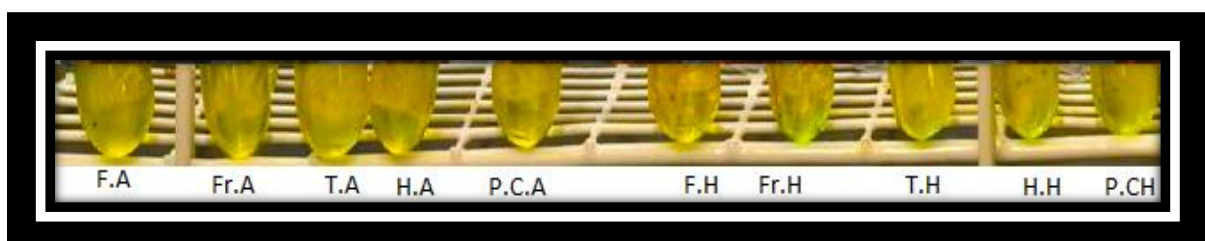


Figura 38. Cuantificación de saponinas en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

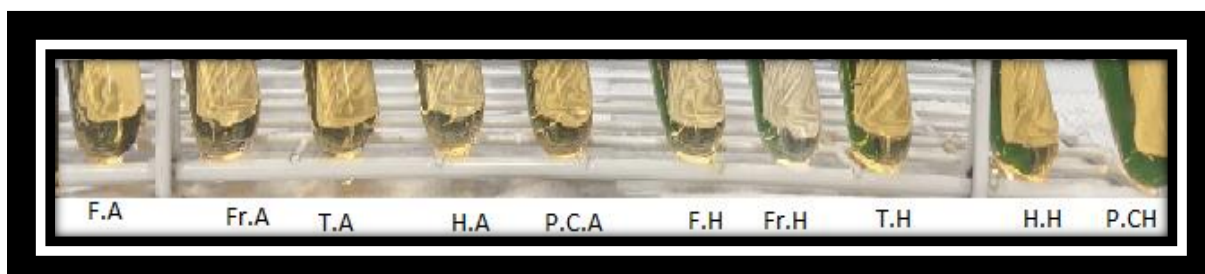


Figura 39. Cuantificación de sesquiterpenolactonas en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

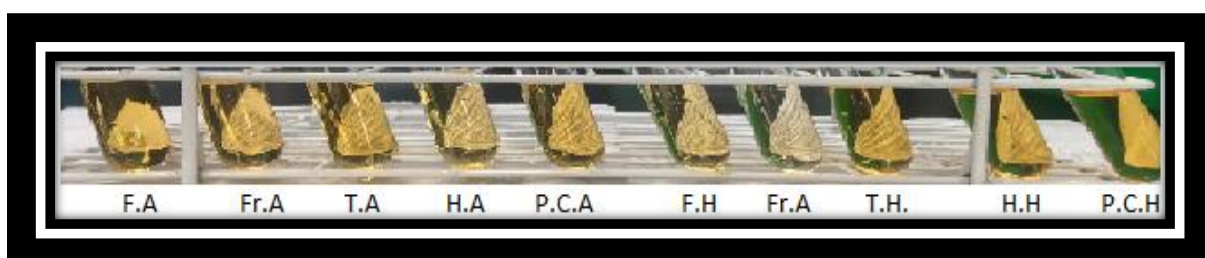
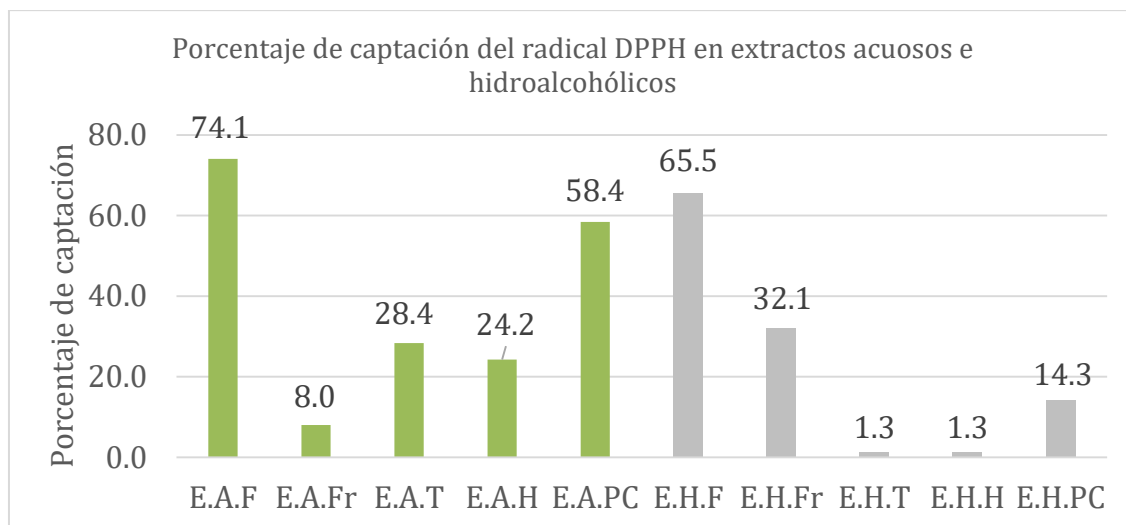


Figura 40. Cuantificación de taninos en extractos de *Tabernaemontana alba* Mill. (Acuoso de flor, fruto, tallo, hoja y planta completa. Hidroalcohólico flor, fruto, tallo, hoja y planta completa).

7.6 Capacidad antioxidante método DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo)



Gráfica 7. Porcentaje de captación del radical DPPH en los extractos de *Tabernaemontana alba Mill*

Donde:

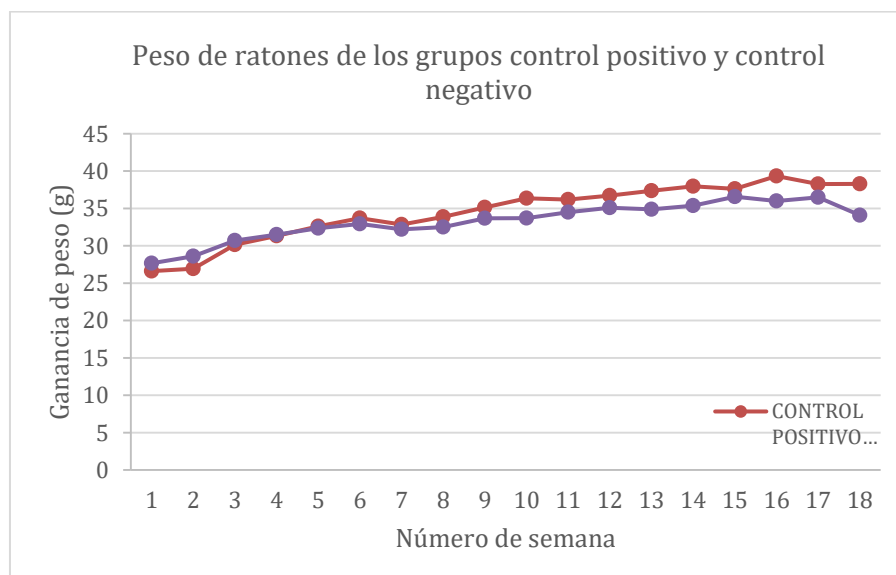
- E.A.F (Extracto acuoso de flor)
- E.A. Fr (Extracto acuoso de fruto)
- E.A.T (Extracto acuoso de tallo)
- E.A.H (Extracto acuoso de hoja)
- E.A. PC (Extracto acuoso de planta completa)
- E.H.F (Extracto hidroalcohólico de flor)
- E.H. Fr (Extracto hidroalcohólico de fruto)
- E.H.T (Extracto hidroalcohólico de tallo)
- E.H.H (Extracto hidroalcohólico de hoja)
- E.H. PC (Extracto hidroalcohólico de planta completa)

7.7 Ganancia de peso en los grupos de experimentación y carcinomas

Durante la experimentación se evaluó el aumento o disminución del peso corporal, se pesaron diariamente durante cuatro meses. Los datos se obtuvieron del peso promedio desde el momento que se obtuvieron los animales hasta que se sacrificaron (4 de marzo de 2019- 30 de junio de 2019).

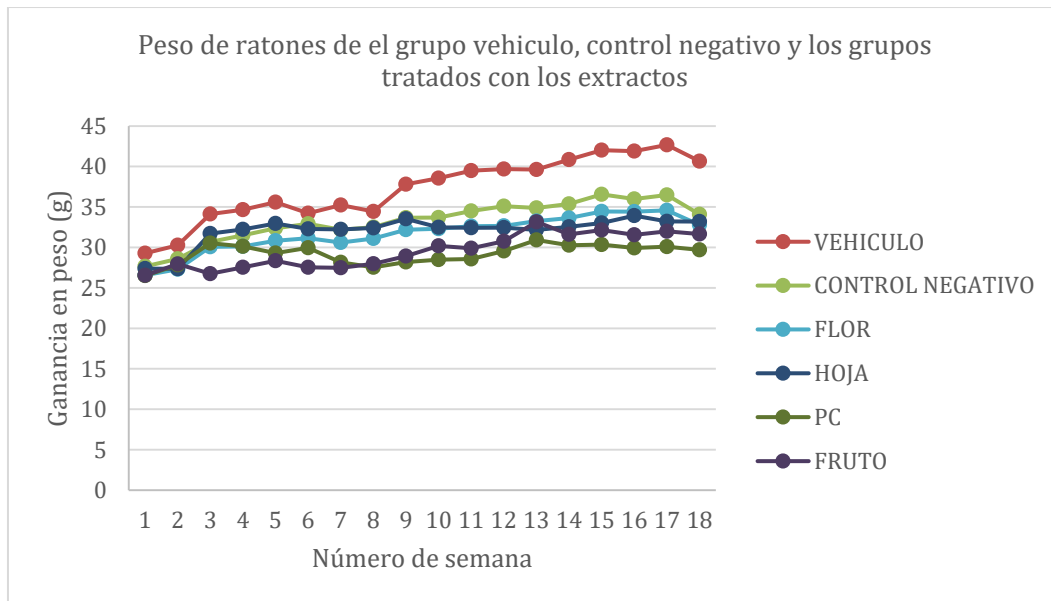
En la semana 14 se realizó la inducción con DMBA y de la semana 15-17 se aplicó el tratamiento con los extractos de *Tabernaemontana alba Mill.*

En la Gráfica 8 se observa la diferencia de peso de gramos del control positivo con respecto al control negativo. Podemos ver que son muy parecidos y en ambos grupos se mantuvo el aumento de peso.



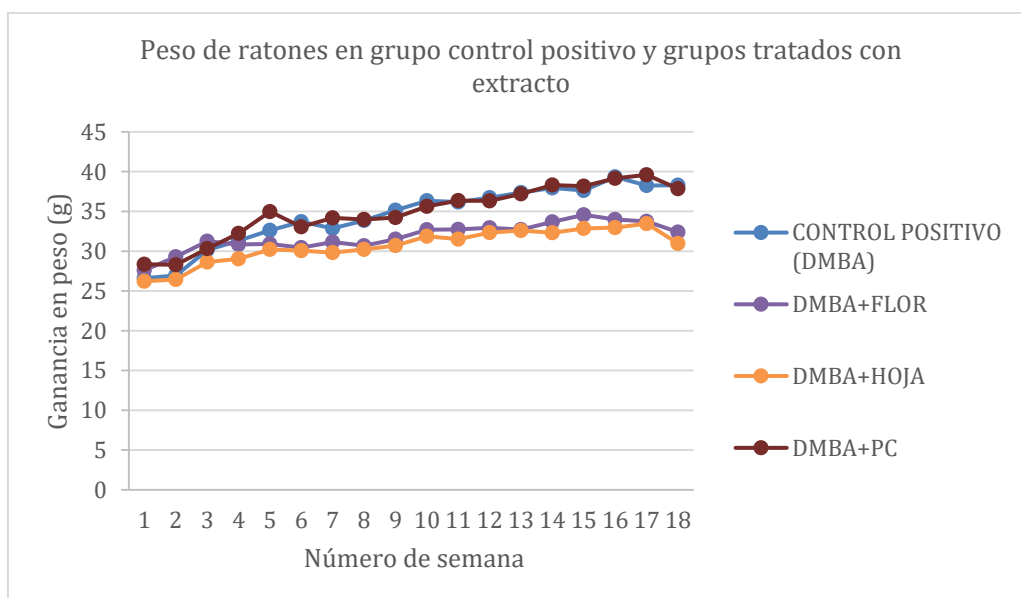
Gráfica 8. Peso de ratones por semana. Control positivo (DMBA) y control negativo promedio por semanas

En la Gráfica 9 se observa que el grupo vehículo fue de los que más aumentaron de peso, mientras que comparándolo con los otros grupos estos tuvieron un aumento constante de peso, el grupo tratado con el extracto de planta completa fue el que tuvo menos aumento en el peso.



Grafica 9. Peso de ratones por semana. Ratones vehículo (se les suministro aceite de oliva), control negativo (sin nada) y cuatro grupos de ratones que se les suministro únicamente extractos de flor, hoja, planta completa y fruto.

En la Gráfica 10 se observa que tanto el grupo control positivo como el DMBA+ PC fueron los que más tuvieron aumento de peso durante el experimento, el que menos tuvo un aumento fue el grupo DMBA+HOJA y el grupo DMBA+FLOR mantuvo un aumento constante del peso.



Gráfica 10. Peso de ratones por semana. Control positivo DMBA y cuatro grupos de ratones que se les suministro una dosis de DMBA y fueron tratados con extractos de flor, hoja y planta completa.

Uno de los ratones sometido a carcinogénesis y tratado con extracto de flor presentó una tumoración que peso 5 g y tamaño de 2 cm, este creció cerca de su intestino grueso en la parte baja y de su pata trasera derecha.

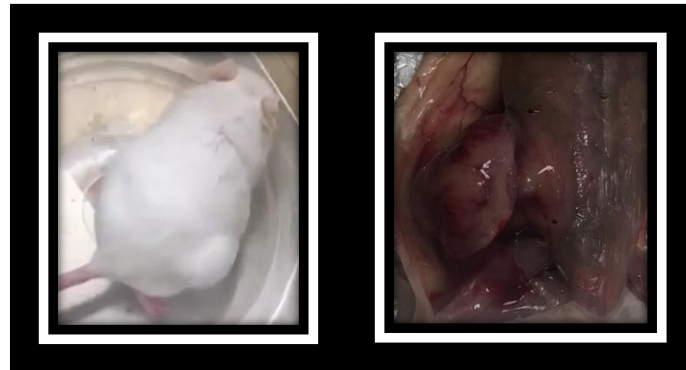


Figura 41. Ratón que muestra crecimiento anormal que dio como resultado un tumor, fue tratado con DMBA y extracto de flor. Fotografía de Laguna, 2018.

Dos de los ratones a los que se le suministro DMBA y tratados con extracto de hoja, un ratón tratado con extracto de hoja y otro con flor presentaron una caída de pelo en la cabeza y esto después de empezar con su tratamiento.



Figura 42. Ratones tratados con extracto de hoja y una dosis de DMBA que presentaron caída de pelo. Fotografía de Laguna, 2018.



Figura 43. Ratón tratado con extracto de hoja que presento caída de pelo Fotografía de Laguna, 2018.



Figura 44. Ratón tratado con extracto de flor que presento caída de pelo Fotografía de Laguna, 2018.

Uno de los ratones tratados con extracto de planta completa y una dosis de DMBA presento una acumulación de sangre en su riñón derecho



Figura 45. Ratón tratado con extracto de planta completa que presenta un hematoma Fotografía de Laguna, 2018.

Mientras que un ratón con tratamiento de flor presento pulmones con tono rosa pálido en comparación a los de los otros ratones

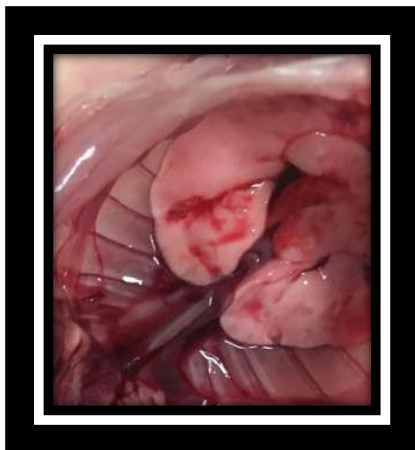
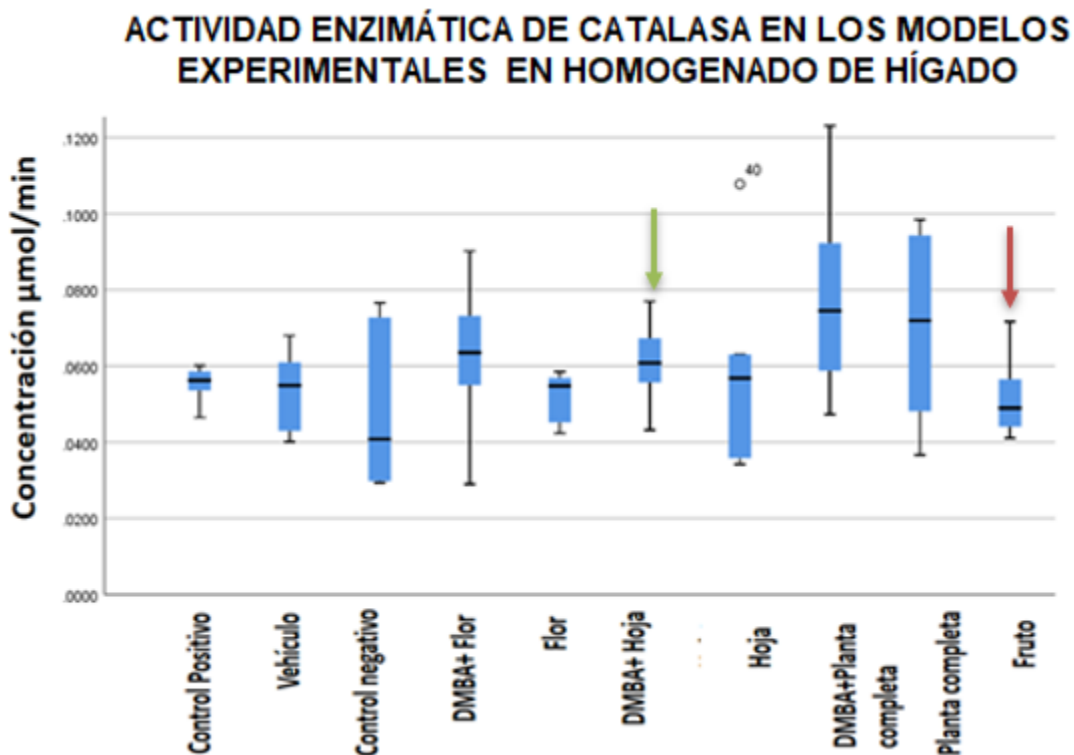


Figura 46. Ratón tratado con extracto de flor que presenta pulmones notablemente pálidos. Fotografía de Laguna, 2018.

7.8 Marcadores de estrés oxidativo

7.8.1 Actividad enzimática de catalasa homogenado

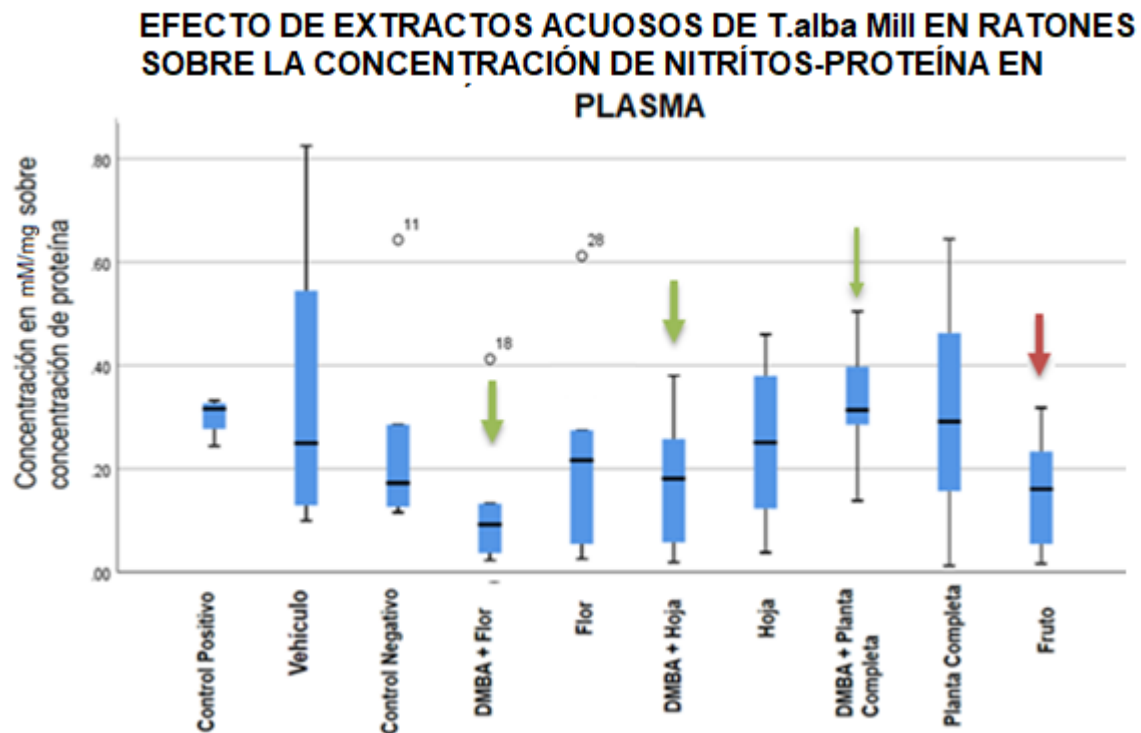
En la Gráfica 11, de catalasa en homogenado de ratón CD-1 se observa que para los grupos con inducción a carcinogénesis y tratados con los extractos acuosos (flor y planta completa) aumentaron su actividad, mientras que el grupo con hoja lo estabilizo. Para los grupos únicamente con tratamiento de extractos acuosos el de fruto estabilizo la actividad de catalasa, al contrario de los otros que aumentaron su actividad.



Grafica 11. Actividad enzimática de catalasa en concentraciones $\mu\text{mol}/\text{min}$ de catalasa en homogenado de cada grupo de ratón.

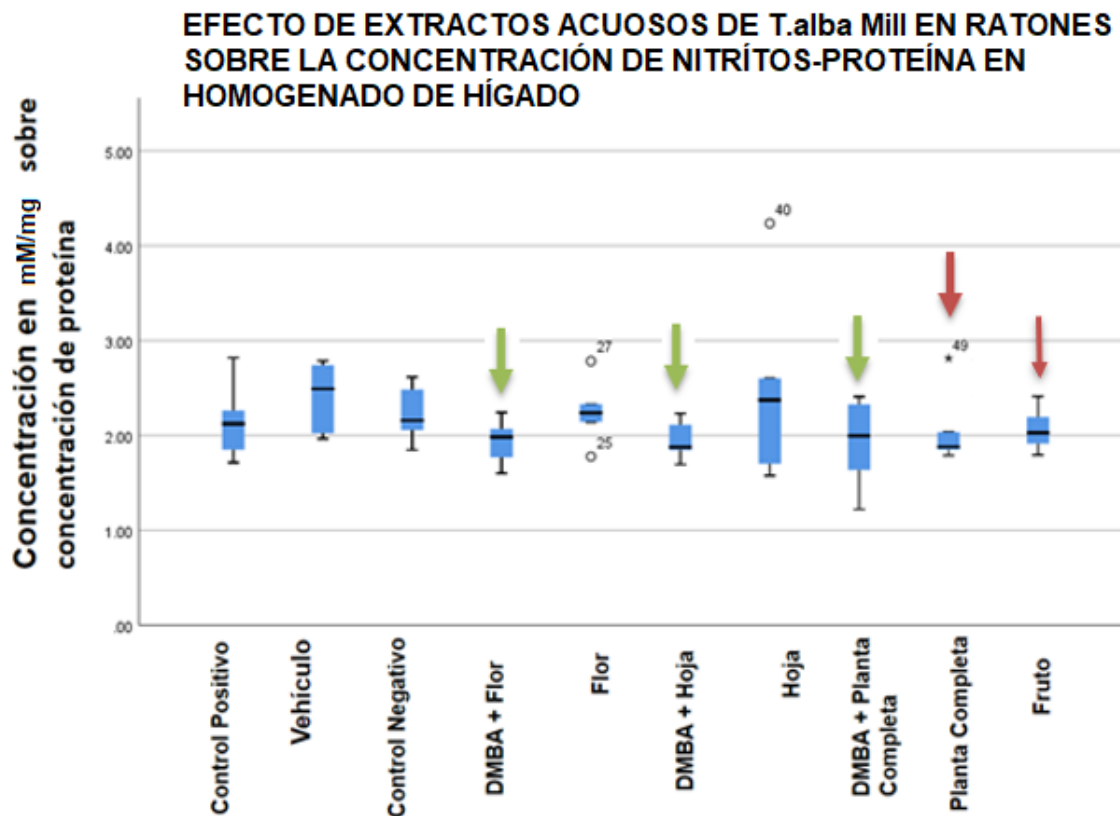
7.8.2 Cuantificación de nitritos en plasma y homogenado

Los tres grupos inducidos a carcinogénesis y tratados con extractos de flor, hoja y planta completa disminuyeron la concentración de nitritos en plasma, al igual que el grupo tratado con extracto de fruto.



Gráfica 12. Concentraciones mM/mg de nitritos- proteína en plasma de cada grupo de ratón.

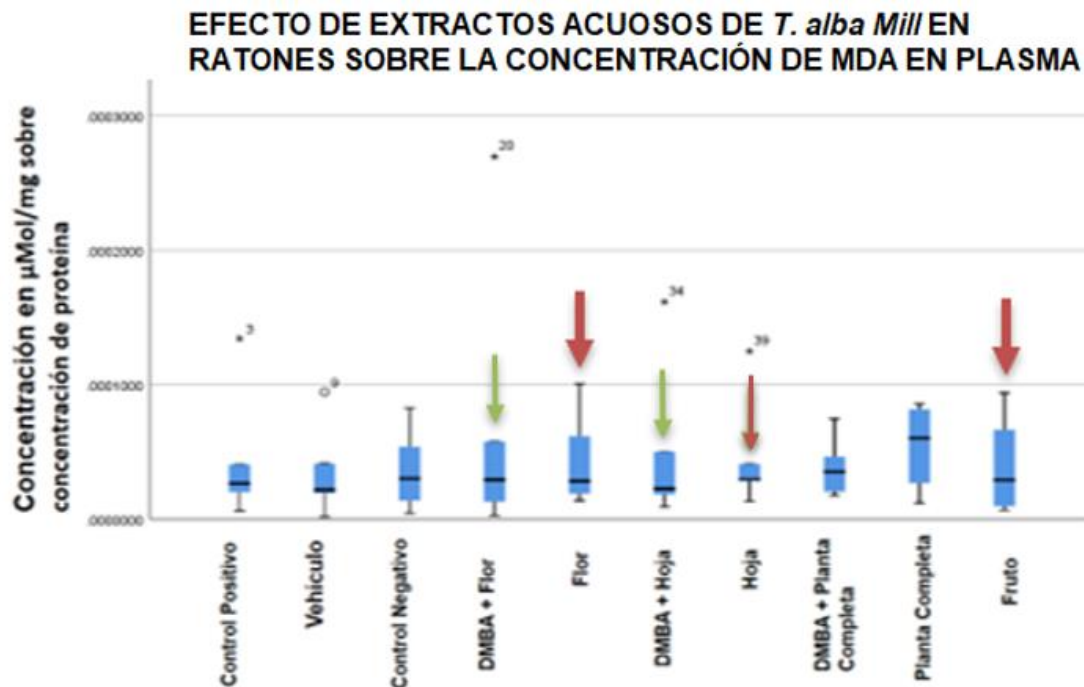
En la gráfica de nitritos en homogenado los tres grupos inducidos a carcinogénesis y tratados con extracto de flor, hoja y planta completa al igual que los tratados únicamente con planta completa y fruto, disminuyeron la concentración.



Gráfica 13. Concentraciones mM/mg de nitritos-proteína en homogenado de cada grupo de ratón.

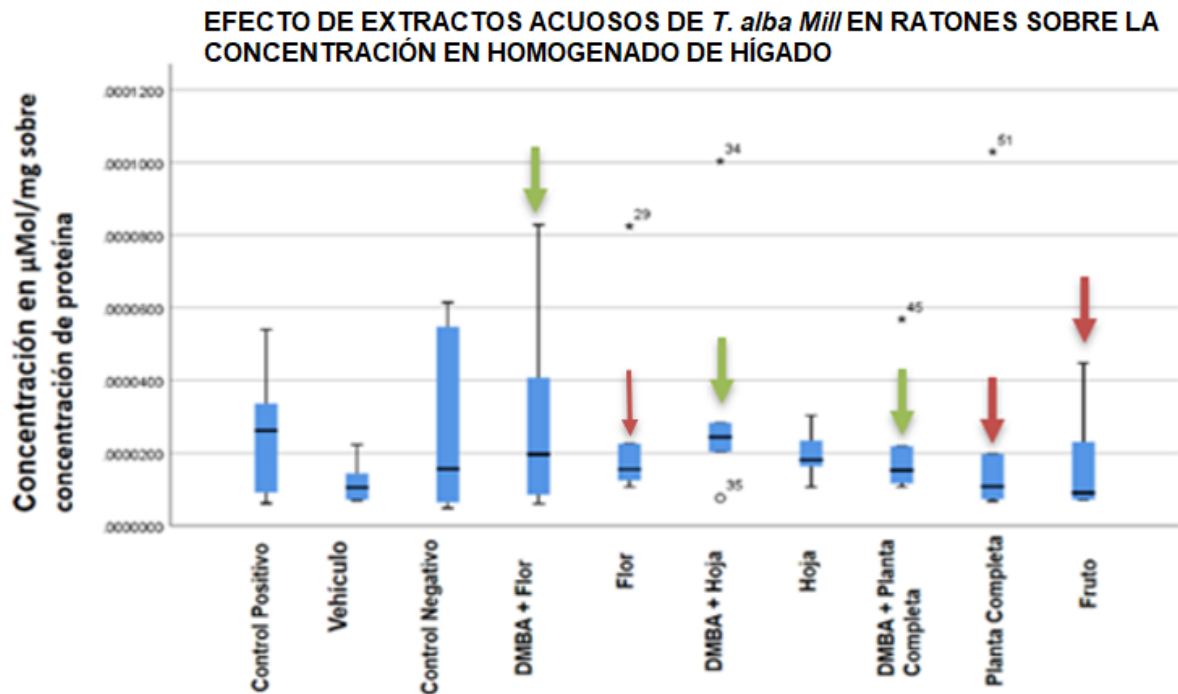
7.8.3 Cuantificación de malondialdehído en plasma y homogenado

En resultados obtenidos en la cuantificación de malondialdehído en plasma los grupos con inducción a carcinogénesis y tratados con extracto acuoso de flor y hoja disminuyeron la concentración de malondialdehído. Lo grupos únicamente tratados con extracto de flor, hoja y fruto disminuyeron de igual forma la concentración MDA.



Gráfica 14. Concentraciones $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de malondialdehído-proteína en plasma de cada grupo de ratón.

Los datos en la Gráfica 13, que corresponde al malondialdeído en homogenado de ratón no son estadísticamente significativos pero los grupos con DMBA y tratados con extracto de flor, hoja y planta completa muestran medianas menores al grupo control positivo. Mientras que los grupos que se trataron con extracto de planta completa y fruto tienen una mediana menor al grupo control negativo.



Gráfica 15. Concentraciones μmol/mg de malondialdeído-proteína en homogenado de cada grupo de ratón.

VIII Análisis de resultados

8.1 Registro etnobotánico de *Tabernaemontana alba Mill*

Encontramos que *Tabernaemontana alba Mill* en Limón Chiquito, Veracruz, es utilizado en el tratamiento del cáncer, diabetes, dolor de cabeza, en heridas, granos y dolor de muela. Con las entrevistas que se llevaron a cabo, se obtuvo que la hoja es la estructura de la planta que más frecuentemente se utiliza en la medicina tradicional de la región. Su modo de administración es por medio de aplicación cutánea o en agua de tiempo (hervir y dejar reposar), aplicada hasta que disminuya la enfermedad. Se obtuvo la dosis de administración la cual es 50g por cada litro de agua; datos que fueron sumamente importantes para conocer la cantidad de tratamiento y el tiempo que se les daría a los ratones en el estudio. Actualmente no se encuentra documentados muchos estudios sobre *Tabernaemontana alba Mill*, pero adentrándonos en al género se cuenta con un registro etnobotánico realizado por Ingkaninan et al., (2006) *T. Divaricata*; donde documenta el uso en tratamiento de heridas, problemas dermatológicos y gastrointestinales, etc. así como para usos de índole afrodisiacos, abortivos y desordenes menstruales. Estas actividades se asocian principalmente a que se encontraron MIAs (Alcaloides indólicos monoterpenos), las cuales presentan actividad citotóxica y antineoplásica en diferentes modelos como la línea celular de leucemia linfocítica P-388.

8.2 Estudio fitoquímico de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Tabernaemontana alba* Mill

No hay estudios donde realicen la cuantificación de metabolitos primarios a *T. alba* Mill, pero si para otra especie *T. pachysiphon* en la que Duru *et al.* (2010) demostró la presencia de carbohidratos. De carbohidratos totales y no reductores en extractos acuoso de *T. alba* Mill tiene una mayor concentración el tallo (64.8238 mg/mL) (64.41 98 mg/mL), respectivamente, para los carbohidratos reductores el extracto de hoja tiene una mayor concentración (1.0859 mg/mL). Por otro lado, en cuanto a los extractos hidroalcohólicos vemos que planta completa tiene una mayor concentración de carbohidratos totales, reductores y no reductores (80.3509 mg/mL), (1.9940 mg/mL), (78.3568mg/mL), respectivamente.

Para proteínas de ambos tipos de extractos, la mayor concentración se presentó en el extracto hidroalcohólico de hoja (5.2456 mg/mL), seguido del extracto de flor (4.4075 mg/mL), para los acuosos el de planta completa (4.3930 mg/mL) y el de hoja (4.3497 mg/mL).

Con los lípidos el extracto acuoso de planta completa (0.29366 mg/mL) y el de flor (0.2627 mg/mL) tiene las mayores concentraciones; mientras que para el extracto hidroalcohólico de fruto (0.2782 mg/mL) y el de hoja (0.2163 mg/mL) tiene las concentraciones más altas.

La ruta del ácido shikímico, la ruta del acetato polimalonato y la ruta del ácido mevalónico, surgen a partir de los carbohidratos por ende durante la cuantificación fueron los que en mayor concentración se encontraron en comparación a proteínas y lípidos, cada una se va derivando en más moléculas como eritrosa-4-fosfato para el ácido shikímico, Acetil-CoA para acetato de polimalonato y mevalónico, a su vez de cada una de estas rutas surgen los metabolitos secundarios los cuales Anaya y Espinoza, (2006) han documentado que son químicamente reactivos y pueden afectar diversos procesos fisiológicos.

El análisis de las pruebas en campo arrojó la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos (solo en hoja), cumarinas (excepto en hoja), esteroides y esteroides, flavonoides (solo en fruto), quinonas, saponinas (solo en flor y tallo), sesquiterpenlactonas, taninos (solo en fruto). En cuanto a las pruebas realizadas en laboratorio los extractos acuosos hay presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, cumarinas (excepto en hoja), esteroides y esteroides, flavonoides (solo en fruto), quinonas, saponinas (solo en flor y tallo), sesquiterpenlactonas, taninos (solo en fruto). Sin embargo, en los extractos hidroalcohólicos se arrojó presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, cumarinas (excepto en hoja), esteroides y esteroides (excepto en fruto), flavonoides (solo en fruto), quinonas, saponinas, sesquiterpenlactonas, taninos (solo en fruto). Los extractos acuosos como hidroalcohólicos presentaron una mayor presencia de metabolitos secundarios que en las pruebas realizadas en campo. Tanto en los extractos acuosos como hidroalcohólicos no hubo presencia de taninos, poca presencia de compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, saponinas y una mayor presencia de alcaloides, esteroides y esteroides, quinonas, y sesquiterpenlactonas. Diaz, et. al, (2012) identificaron que *T. cymosa* tiene la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, triterpenos, esteroides y compuestos fenólicos. Se descartó la presencia de taninos, dentro de los compuestos fenólicos. En el caso de *T. alba Mill* se complemento con otros metabolitos identificados el estudio.

En cuanto a los metabolitos secundarios con respecto a los extractos acuosos presentan una mayor concentración el de flor saponinas (0.0088 mg/mL) y taninos (0.0062 mg/mL); el extracto de planta completa cumarinas (0.0197 mg/mL). Mientras que para los extractos hidroalcohólicos presentaron una mayor concentración el de flor (0.0037 mg/mL) y el fruto (0.0037 mg/mL) en alcaloides, el de planta completa con compuestos fenólicos (0.0060 mg/mL) y cumarinas (0.0197 mg/mL); el de hoja con esteroides y esteroides (0.6829 mg/mL), flavonoides (0.0020 mg/mL) y quinonas (0.7092 mg/mL) y el extracto de tallo con sesquiterpenlactonas (0.0346 mg/mL). Como se escribe anteriormente Ingkaninan et al. (2006), documentan que se encontró una gran cantidad de alcaloides indólicos monoterpenos en la especie *T. divaricata*, pero de la especie que se analiza no hay estudios referentes a que

metabolitos secundarios lo componen, por lo cual podría decirse que es el primer screening fitoquímico completo realizado a *T. alba Mill.*

8.3 Capacidad antioxidante de las diferentes estructuras de la planta por medio de la reducción de radicales

El que tuvo una mayor reducción del radical DPPH fue el extracto acuoso de flor (74.1%) el cual viendo los resultados obtenidos en los metabolitos secundarios tiene una mayor concentración de saponinas (0.0088 mg/mL), también presenta una mayor concentración de taninos (0.0062 mg/mL). Durante la identificación de este metabolito, la flor tuvo la mayor presencia de espuma, pero no se identificaron taninos. Cheok, et al. (2014), mencionan que hay una gran cantidad de propiedades biológicas reportadas y asociadas a saponinas, entre las que resaltan su capacidad antitumoral, fungicida, actividad hemolítica y antiinflamatoria, así como proteger a la célula contra los radicales libres, ayudando a prevenir alteraciones en el ADN, que pueden conducir a enfermedades como el cáncer. Mientras que los taninos, Arapitsas (2012), comenta que estos han mostrado una fuerte capacidad biológica como antimutágena, antidiabética, antibiótica, así como antioxidante, reducción del estrés oxidativo y previenen del envejecimiento celular, así como la capacidad de cesar la multiplicación de células cancerígenas. Y viendo en la ruta metabólica las saponinas vienen de la ruta mevalónica que se origina de la glucosa y esto refleja por qué hay una mayor concentración de carbohidratos totales.

El segundo extracto con capacidad antioxidante alto fue el de flor hidroalcohólico (65.5%), el cual presenta la mayor concentración de alcaloides (0.0037 mg/mL). Ibarra et. al, (2011) documenta que *E. americana* tienen potencial antioxidante con diversos niveles de poder inhibitorio sobre el DPPH, donde destaca la fracción de alcaloides liberados con la mayor actividad antioxidante.

El tercer extracto que estabilizo el radical DPPH fue el de planta completa acuoso (58.4%) que presenta una mayor concentración de cumarinas (0.0197 mg/mL). Marin et. al, (2018) en su estudio el extracto etanólico de corteza de *P. alvaradoi*

presentó una gran capacidad captadora de radicales libres como DPPH lo que indica que están presentes metabolitos secundarios con capacidad antioxidante como: flavonoides, cumarinas y alcaloides que son sustancias características en especies de este género.

8.4 Efecto de los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y fruto de *Tabernaemontana alba* Mill en la actividad enzimática de catalasa

Para homogenado de hígado con la actividad enzimática de catalasa se mantuvo constante con los grupos tratados únicamente con extracto de fruto y el grupo con inducción a carcinogénesis y se le suministro hoja. El efecto de la actividad catalítica de la enzima en ambos extractos se debe a que presentan una gran concentración de sesquiterpenlactonas (0.0264 mg/mL y 0.0255 mg/mL respectivamente) las cuales Chaturvedi, (2011) en estudios que realizo encontró que inhiben el crecimiento de tumores, controlan la división celular y, por ende, inhiben una variedad de funciones celulares que dirigen a la célula a la apoptosis, efectos antiinflamatorios. De igual manera tienen una gran concentración de alcaloides ambos 0.0022 mg/mL los cuales se ha reportado en *Catharantus roseus* por Lounasmaa y Hanhinen, (2001) que son inhibidores de la mitosis celular, utilizados en medicina como agentes antitumorales siendo eficaces para el tratamiento de determinados tipos de cáncer.

Con respecto a los grupos de extracto acuoso de flor y planta completa inducidos a carcinogénesis con DMBA, así como los tratados únicamente con extracto hubo un aumento de la actividad enzimática de catalasa. Esto puede deberse a que los dos presentan una gran concentración de quinonas ((0.1436 mg/mL), (0.0686 mg/mL), respectivamente), Da silva, Ferreira y De Souza, (2003) documentan que poseen una actividad anticancerígena, pero a su vez se genera un estrés oxidativo que produce especies de oxígeno muy reactivas ($O_2 \bullet-$, $HO\bullet$, $H_2 O_2$) capaces de inhibir

al complejo de topoisomerasa, lo que induce el desencadenamiento de la apoptosis celular.

8.5 Efecto de los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y fruto de *Tabernaemontana alba Mill* sobre la concentración de óxido nítrico

La concentración de nitritos en plasma sanguíneo, así como en homogenado en los grupos con inducción a carcinogénesis (E.A. F+ DMBA, E. A. H. +DMBA Y E.A. PC+DMBA), los grupos tratados con extracto acuoso de planta completa (solo homogenado) y fruto disminuyeron la concentración. El extracto de planta completa presenta una gran concentración de cumarinas (0.0197 mg/mL) en comparación a los demás extractos, Venegupola, Rashmi y Odhav, (2013) demostraron que son compuestos bioactivos con interesantes propiedades farmacológicas que podrían ayudar en el tratamiento de muchas enfermedades como algunos tipos de cáncer. El extracto de fruto presenta una concentración alta de esteroides y esteroides (0.0981 mg/mL) y se ha demostrado que son capaces de inhibir el óxido nítrico (Diaz, et al.,2007). Con respecto a los extractos de flor y hoja presentan una gran concentración de quinonas ((0.1436 mg/mL), (0.0686 mg/mL)). Xia, et al. (2001) documenta que este compuesto ha sido utilizado en la medicina tradicional como antibacteriano, antifúngico, antimalárico y anticancerígeno. Sus propiedades de oxidación-reducción, así como su capacidad ácido-base son las características responsables de dicha actividad biológica.

8.6 Efecto de los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y fruto de *Tabernaemontana alba Mill* en la concentración de malondialdehído

Los grupos tratados con extracto de planta completa (E.A.PC Y E.A.PC + DMBA solo en homogenado) y fruto (en plasma como homogenado), ambos extractos tienen una gran concentración esteroides y esteroides (0.1102 mg/mL s y 0.0981 mg/mL respectivamente). Avalos y Pérez, (2009) en su estudio mencionan que

estos metabolitos dentro de sus propiedades tienen actividad antioxidante generando radicales libres más estables y así deteniendo la autooxidación de los lípidos, así que al aplicarlos como tratamiento disminuyeron las concentraciones de MDA. Mientras que los grupos E.A.F, E.A.F + DMBA, E.A.H (solamente en plasma sanguíneo) y .E. A. H + DMBA en plasma sanguíneo y homogenado de hígado también disminuyeron la concentración de MDA. Ambos presentan una gran concentración de quinonas (0.1436 mg/mL y 0.1266 mg/mL). Los compuestos quinoides aceptan electrones, los cuales modulan las propiedades redox responsables del estrés oxidativo, mecanismo implicado en la inhibición del crecimiento bacteriano, viral y de células cancerígenas (Canales et. al, 2007).

Por otro lado, el grupo tratado con hoja en homogenado de hígado y el grupo tratado con planta completa en plasma sanguíneo no disminuyeron el proceso de lipoperoxidación. Cabe recalcar que Murray-Núñez, y Orozco-Benítez, (2017) documenta que el hígado es uno de los órganos más importantes para la actividad metabólica y regula los niveles de sustancias químicas en la sangre, por lo cual es más eficaz un estudio de sangre para la detección de una gran cantidad de enfermedades, mientras que en hígado los resultados obtenidos son la serie de procesos que se llevaron a cabo por determinado tiempo.

IX Conclusión

- ✚ De acuerdo con el estudio etnobotánico se encontró que las estructuras más usadas son hoja y fruto, así como el látex. Dentro del uso de *Tabernaemontana alba Mill* se encuentra para diabetes, dolor de cabeza y de muelas, granos y cáncer.
- ✚ Se encontraron la presencia de compuestos fenólicos, cumarinas, esteroides y esteroides, flavonoides, quinonas, saponinas, sesquiterpenlactonas y taninos antes no analizados.
- ✚ Conforme a la concentración de metabolitos primarios y secundarios las principales rutas que están encendidas son la Ruta del ácido mevalónico, Ruta del acetato polimalonato y la Ruta del ácido shikímico.
- ✚ Los metabolitos primarios el que tuvo mayor concentración fue carbohidratos en el extracto hidroalcohólico de planta completa (80.35 mg/mL), proteínas con extracto hidroalcohólico de hoja (5.25 mg/mL) y para lípidos el extracto acuoso de planta completa (0.294 mg/mL).
- ✚ Los metabolitos secundarios con mayor concentración fueron quinonas en extracto hidroalcohólico de hoja (0.7092mg/mL), seguido de esteroides y esteroides (0.6829 mg/mL) y por último quinonas en extracto hidroalcohólico planta completa (0.3760 mg/mL).
- ✚ La capacidad antioxidante que presentan las diferentes estructuras de la planta para el extracto de flor acuoso 74.1 %, el extracto hidroalcohólico de flor 65.5 % y por último el extracto acuoso de planta completa 58.4 %.
- ✚ La actividad enzimática de catalasa de *Tabernaemontana alba Mill* se mantuvo estable con el extracto de fruto y hoja debido a la presencia de alcaloides y sesquiterpenlactonas
- ✚ En plasma sanguíneo, así como en homogenado de hígado en los grupos tratados con extracto de flor, hoja, planta completa y con inducción a carcinogénesis, así como los tratados únicamente con extracto de planta completa (solo homogenado) y fruto disminuyeron la concentración de nitritos.
- ✚ El malondialdehído disminuyo su concentración en plasma sanguíneo y homogenado de hígado con el extracto de flor, fruto, hoja (plasma sanguíneo) y planta completa (homogenado de hígado)
- ✚ Los grupos inducidos a carcinogénesis tratados con extracto de flor en homogenado de hígado y plasma sanguíneo, hoja en plasma sanguíneo y planta completa en homogenado de hígado, disminuyeron la concentración de malondialdehído.

- ✚ *Tabernaemontana alba Mill* es un árbol perennifolio que tiene propiedades antioxidantes por la presencia alcaloides, cumarinas, esteroides y esteroides, quinonas y sesquiterpenlactonas en flor, hoja y planta completa, por lo cual disminuyen el daño ocasionado en el proceso de carcinogénesis al modificar los marcadores de estrés.

X Referencias

1. Adarmes, H., Solís, P., Müller, A. & Galleguillos, M. (2009). Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Médica Veterinaria*. (41).255-259.
2. Aherne, S. & O'Brien, N. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*.18:75-81.
3. Alcántara, C. (2005). Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbívora con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato.
4. Alvarado-Cárdenas, L. (2003). La familia Apocynaceae en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla-Oaxaca). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
5. American Cancer Society. Inc. (2018). Tratamiento cáncer de mama. Recuperado del sitio web: www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-dirigida-para-el-cancer-de-seno.html.
6. American Society of Clinical Oncology. (ASCO). (2018). Cáncer de mama. Recuperado del sitio web: www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/sintomas-y-signos.
7. Anaya A. & Espinosa F. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*.83:4-13.

8. Arango, A. (2008). Alcaloides y compuestos nitrógenos. Universidad de Antioquía Medellín.
9. Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*; 135 (3): 1708–1717.
10. Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libre, antioxidante naturales y mecanismos de protección. *Atenea* No. 494. 161-172.
11. Ávila R, Rivas B, Hernández R. & Chirinos M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease, *Multiciencias*, 12(2): 129-135.
12. Blainski, A., López, G. & Palazzo, C. (2013). Application and analysis of the Folin-Ciocalteau method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules: Brazil*. 18, 6852-6865.
13. Bowles, J. (2004). Guide to plant collection and identification. Herbarium workshop in plant collection and identification. University of Western Ontario. Disponible en: www.uwo.ca/biology/facilities/herbarium/collectingguide.pdf
14. Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª edición. Acribia, Zaragoza.
15. Camacho, C. (2012). innovación de un método analítico para la cuantificación de taninos en una formulación magistral para un enjuague bucal de extracto de encino. (Tesis para obtener el título de Químico farmacéutico Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM
16. Canales M, Hernández T, Serrano R, Hernández LB, Durán A & Ríos V. (2007). Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *J Ethnopharmacol*.110(2):343-7.

17. Carvajal, L., Hata Y., Sierra, N. & Rueda D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). Colombia forestal, 12(1), 161-170.
18. Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F. & Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids Lactones: benefits to plants and people. Int. J. Mol. Sci. 14: 12780-12805.
19. Chaturvedi, D. 2011. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities, In: Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, Research Signpost, Kerala, India, Cap 10, 313-334pp.
20. Cheirif, W., Sáez, O. & Lammoglia, O. (2015). Esteroides tópicos: revisión actualizada de sus indicaciones y efectos adversos en dermatología. Dermatología cosmética, médica y quirúrgica, 13 (4), 305-312.
21. Cheok, C., Salman, H., Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review, Food Research International, 59, 16.
22. Chinou, I. (2008) Primary and secondary metabolites and their biological activity. In: Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) Thin layer chromatography in phytochemistry, pp. 59-76. CRS Press, Boca Raton
23. Clifford, M. & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 1118-1125.
24. Cornell University, (2005). Department of Animal Science, Plantas Poisonous to livestock.

25. Da Silva, M., Ferreira, V., De Souza, M., (2003). Un panorama actual da química y da farmacología de naftoquinonas, con enfase na β -lapachona e derivados. *Quim. Nova.* 26, 407-416.
26. Diaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. Vol. 22 (2). 77
27. Díaz, F. C., Morelos, S. M., Carrascal, M., Pajaro, Y. & Gómez, H. C. (2012). Actividad larvicida de extractos etanólico de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 17(3):256-267.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2012/cpm123f.pdf>
28. Díaz., Rodríguez, F., González, A., Ramírez, R., Bilbao, C., León, A., Jaime, A., Chirino, R. & Navarro, D. (2007). Androgens and androgen receptores in breast cáncer. *J Steroids Biochem Mol Biol.*; 105: 1-15.
29. Domínguez, J. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. México: LIMUSA
30. Duru C. & M. bata T. 2010. The antimicrobial activities and phytochemical screening of ethanolic leaf extracts of *Hedranthera barteri* Hook and *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf. *Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering* Vol. 2(1), pp. 1-4
31. Ecoagricultor. (2016). Preparación y aplicación de plantas curativas. Consultado el 8 de abril de 2020. Sitio web: <https://www.ecoagricultor.com/preparacion-y-aplicacion-de-plantas-curativas/>. Sitio web: www.ecoagricultor.com/preparacion-y-aplicaion-de-plantas-curativas/
32. Endress, M. E. (2004). Apocynaceae: Brown and now. *Telopea* 10: 525-541.

33. Facchini, P., Hagel, J. & Zulak, K. (2002). Hydroxycinnamic acid amine metabolism: Physiology and Biochemistry. *Can J. Bot.* 80:577-589.
34. Fernández, M., Hernández, I. & Regueira, S. (2015). Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Rev. Electrónica* Vol. 40(7). 3-18.
35. Frank, S. & Perkins, D. (2004). Preparation of plant specimens for deposit as herbarium vouchers. University of Florida Herbarium. Florida Museum of Natural History, Florida. Disponible en: www.flmnh.ufl.edu/herbarium/voucher.htm
36. García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 7 (1) 1-12.1
37. García, D. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y forrajes*, 27 (2). 101-116.2
38. Godínez, O. & López, L. (2002). Estructura, composición, riqueza y diversidad de árboles en tres muestras de selva mediana subperennifolia. *Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Botánica* 73 (2): 283-314
39. Goossens, A., Häkkinen S., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A., Söderlund, H., Zabeau, M., Inze, D. & Oksman-Caldentey, K. (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8595-8600
40. Gottlieb, G., Kaplan, M. & Borin, M. (2001) Biodiversidad. Un enfoque integrado entre la química y la biología. Traducido al español por Alicia B. Pomillo. Buenos Aires, Argentina. 239 p.

41. Gutiérrez A. (2002) Guía de Prácticas de Bioquímica. Univ. Nal. Federico Villarreal. Recuperado de: <http://www.bioquimica.ucv.cl/paginas/central/Bioquimica%20experimental%201/Guia%20laboratorio%20bioquimica.pdf>
42. Gutiérrez, A., Ledesma, L., García, I. & Grajales, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. Revista Cubana de Salud Pública, 33(1). Versión Online ISSN 0864-3466
43. Hadacek, F. (2002), "Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives", Critical Reviews in Plant Science 21, 273-322.
44. Hadlow, B. (2004). Guidelines for the Handling of Cutting Material, Live Plants and Seeds, Centre for Plant Biodiversity Research, Canberra. Disponible en: [www. Anbg.gov.au/cpbr/herbarium/collecting/live-material.html](http://www.Anbg.gov.au/cpbr/herbarium/collecting/live-material.html)
45. Haq, N (2004). In vitro production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants [en línea] In: <[http://www. telmedpak.com](http://www.telmedpak.com)> [consulta: 05 de abril de 2020]
46. Hassler M. (2018). World Plants: World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Nov 2018). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2020-02-24
47. Hinojosa, D., Gutiérrez, L., Siller, L., Rodríguez, S., Morales, D., Guerrero, M. & Del Toro, S. (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Revista de Ciencia Biológicas y de la Salud, 15 (2), 53-60

48. Ibarra, E., Pacheco, M., García, R., San Miguel, R., Ramírez, G. & Soto, M. (2011). Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. Rev. Fitotec. Mex vol. 34 Chapingo
49. Ingkaninan, K., Changwijit, K. & Suwanboriux, K. (2006). Vobasinyl-iboyabi sindole alkaloids potent acetyl cholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. Journal of pharmacy and pharmacology, 58 (6): 847-842
50. Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. NIH. (9 de febrero de 2015). ¿Qué es el cáncer? Sito web: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
51. Krengel, F. (2015). Producción de alcaloides indólicos monoterpénos en cultivos de caldo y células en suspensión de *Tabernaemontana alba* Mill. México: Facultad de ciencias. Biología experimental.
52. Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., MMancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc. Tecnol. Aliment. 25(4):726-732.
53. López, G., Prado, G., Aguilar, C., Molina, G., Mandoki, J. & Medina, M. (2000). Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxycumarina. Rev Inst Nal Resp Mex, 13 (4), 192-197.
54. Lounasmaa, M. & Hanhinen, P. (2001). "The ajmaline group of indole alkaloids". Alkaloids. Chem Biol., 55, 1-87
55. Loyola, V., Sánchez, P., Canto, B., Pacheco, L., Galaz, R. & Moreno, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. Rev. Soc. Quim. Mex. Vol. 48 no.1 México ene./mar.

56. Martínez, G., Popoy, I., Pérez, G., Al-Dalaen, S., Horwat, R., & Giuliani, A. (2005). Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients with macroangiopathic complications. *Acta Farm Bonaerense*; 24(2):197-203.
57. Mensah-Nyagan, A., Meyer, L., Schaeffer, V., Kibaly, C. & Patte-Mensah, C. (2009). Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. *Psychoneuroendocrinology*.34: 169-177.
58. Mora, A., Galeano, J. & Osorio, D. (2012). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia I. Universidad de Antioquia Medellín
59. Morales, J. (2009). *Stemmadenia-Tabernaemontana*. In Flora Mesoamericana, vol. 4, parte 1, G. Davidse, M. Sousa S., S. Knapp y F. Chiang (eds.). Instituto de Biología, UNAM/ Missouri Botanical Garden/ The Natural History Museum (London). México, D. F. p. 695-700.
60. Muñoz, J & Sarmiento, D. (2010). Valoración comparativa de dos métodos de secado de plantas medicinales a través de la cuantificación de flavonoides y cumarinas. Universidad de Cuenca.
61. Murray-Núñez, R. & Orozco -Benítez, M. (2017). Manual Básico de prácticas para análisis clínico. Universidad Autónoma de Nayarit. 1er edición <https://www.ecorfan.org/textbooks/L-Manuals/LM%20TIII/LM%20TIII.pdf>
62. Oliveros, A., Cordero, I., Paredes, D., Buendía, D. & Macías, F. (2010). Extracción y cuantificación de cumarinas mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólicos de semillas de *Dipteryx odorata*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 39/1-2.
63. Orantes, E. (2008). Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca *Guararibea yunckeri standley* subsp. *izabalensis* w.s. *alverson* ex véliz

(Bombacaceae). Universidad de san Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala


64. Orlando, A. & Guirado, A. (2005). Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. Rev. Cubana Plant Med. 10(3-4).
65. Pratchayasakul, W., Pongchaidecha. A., Chattipakorn, N. & Chattipakorn S. (2008). Ethnobotany and ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. Indian J Med Res. 127:317–35.
66. Quintanar, M. & Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Base y aplicaciones. UNAM: D.F. Revista de Educación Bioquímica, vol. 28, núm. 3.
67. Ramos, B. E., Paz, V. J. & Ortiz, S. G. (2014). Determinación del contenido de hierro, saponinas y porfirinas en *Cassia grandis* L, procedente de Masaya, Chinandega y Jalapa durante el periodo de mayo 2013, abril del 2014. (Tesis que para obtener el título de Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-LEON. Nicaragua, León.
68. Repetto, M., Semprine, J. & Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In Tech. 3-24.
69. Rivas, M., Muñoz, D., Ruiz, M., Fernández, F., Muñoz, F. & Pérez, N. (2017). Colección Mastozoológica del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Universidad del Cauca. Juego de datos de registros: <https://doi.org/10.15472/ciasei> accessed via GBIF.org el 24-04-2020.
70. Rojas, A. (2009). Tratado de medicina tradicional mexicana. Bases históricas y práctica dinámico-terapéutica. 3ra edición electrónica: Cuernavaca, Morelos México.


71. Roskoy, Y., Ower, G., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., Dewalt, R., Decock, W., Nieukerken, E. & Peney, L. (2018). World Plants: Synonymic Checklists of the vascular Plants of the World. In: Species 2000 & ITIS Catalogue of life. Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col.Species](http://www.catalogueoflife.org/col/Species)
72. Salamanca, G., Correa, I. & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. Colombia. Vol 25 no.2
73. Salegi, A. (2017). Caminata botánica para conocer los árboles de Deba. Recuperado del sitio web: www.diariovasco.com/baj-deba/201706/01/caminata-botanica-para-conocer-20170601000919-v.html.
74. Sánchez, M. & Mendoza, V. (2003). Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. p. 15-19.
75. Sánchez, M., Santiago, E., Vargas, L. & Mendoza, V. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. Bioquímica; 29 (3): 81-90.
76. SEDESOL. (2013). Consultado el día 24 de abril de 2020. Sitio web: www.microrregiones.gob.mx/catloc/contenido.aspx?refnac=300330012
77. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 17-20.

78. Shilpa, K, Varun K & Lakshmi S. (2010) An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. J Plant Sci 5:222-247
79. Tandon, V., Yadav, D., Singh, R., Chaturvedic, A. & Shuklac, P. (2005). Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents. Bioorg. Med. Chem. Lett.15, 5324- 5328.
80. Tesauro. (2013). Biblioteca Agrícola Nacional de los Estados Unidos
81. Tolosa, L. & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars. Pharmaceutica 43, 37-55
82. Valencia, L., Cuellar, R., Aguilar, R., Salmeron, A. & Rodríguez, C. (2012). Implementación del método de Biuret para la determinación de proteína residual en lactosuero. Revista sistemas ambientales, 5(1), 21-24.
83. Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall, A. & de la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de consumo. Tecnociencia.6(2): 84-93 9. Khanbabaee, K. y van Ree, T. Tannins: Class.
84. Venegas E. (2012) Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. Universidad Nacional de Trujillo. Recuperado de: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/9687/Tesis%20DoctoradoX%20-%20Edmundo%20Venegas%20Casanova.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

85. Venegupola, K., Rashmi, V. & Odhav, B. (2013). Review on Natural Coumarin lead Compounds for their Farmacological Activity. Biomed Research International, 963248
86. Xia, Y.; Yang, Z.Y.; Xia, P.; Hackl, T.; Hamel, E.; Mauger, A.; Wu, J.H.; Lee, K.H. (2001) Synthesis and preclinical evaluations of 2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxy J. Med. Chem. 44, 3932- 3936.

Anexo 1.
Preguntas realizadas a la comunidad de Limón Chiquito

 **Universidad Nacional Autónoma de México**
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Unidad Multidisciplinaria de Investigación, L.7. P.A. Terapia Molecular

 **FES ZARAGOZA**

ENTREVISTA ETNOBOTÁNICA

No. de entrevista: _____
Fecha: _____
Sexo: _____

Nombre del entrevistado: _____ Edad: _____

1.- ¿Qué enfermedades ha padecido y cuales han presentado sus familiares más cercanos?

2.- ¿Qué alimentos consume regularmente?

3.- ¿Con que nombre (s) conoce a la planta?

4.- ¿Cuál es el uso que usted le ha dado a la planta?

5.- ¿Conoce algún otro uso de la planta?

6.- ¿Cómo supo usted del uso medicinal de la planta? ¿Quién le recomendó su uso?

7.- ¿Qué parte de la planta uso? ¿Tuvo una preparación? ¿Se usa sola o combinada?

8.- ¿Le advirtieron sobre algún efecto adverso sobre el uso de la planta?

9.- ¿Cómo fue su aplicación?

10.- ¿Cómo inicio y progresó su padecimiento?

11.- ¿Cuánto tiempo transcurrió desde la detección del problema hasta el inicio del tratamiento?

12.- ¿Cuánto duró el tratamiento y con qué frecuencia?

13.- ¿Cuáles fueron sus observaciones más importantes durante el tratamiento?

14.- ¿Además de utilizar la planta, tenía otro tratamiento? ¿Cuál era?

15.- ¿Presento algunas molestias durante el uso?

16.- ¿Al término del tratamiento usted ha observado nuevas lesiones?

Nota: _____