



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
Carrera de Biología

Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante de  
*Bidens odorata cav.* (Familia: *Compositae*) en un modelo murino de  
cáncer de mama.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

VIRIDIANA VARGAS PEÑA

DIRECTORA: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez  
ASESOR: M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo  
ASESOR: M. en C. Genaro Montaña Arias  
SINODAL: M. en C. Guadalupe Bribiesca Escutia  
SINODAL: M. en C. Carlos Alberto Santana Martínez



Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 (Lab. 7, primer piso) de la Unidad  
Multidisciplinaria de Investigación Experimental  
Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios  
Superiores Zaragoza, UNAM. Bajo la dirección de la M.  
en C. Catalina Machuca Rodríguez.**

# Agradecimientos

Principalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme concluir mi formación académica en un lugar que se convirtió en mi segunda casa.

También quiero agradecer a la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez por todas las enseñanzas y el apoyo incondicional, así como el aliento constante para culminar este trabajo; por todos los grandes consejos y la paciencia infinita que me ha brindado. Por igual quiero agradecer al M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo por toda la ayuda y los buenos consejos durante todo este proyecto.

Agradezco mis compañeros de laboratorio por toda la ayuda brindada en el proceso de experimentación y por los grandes momentos vividos durante la realización de este proyecto. En especial quiero agradecer a Frida Puga y Naomi Mancilla por ser las mejores amigas que me pude haber encontrado en este proceso, por toda la ayuda, los consejos, el apoyo incondicional y todos los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de la Fes Zaragoza.

Por último, agradezco a todos los maestros con los que tuve la fortuna de tomar clases, de los cuales logre obtener grandes conocimientos.

# Dedicatorias

Principalmente dedico este trabajo a mis padres que día con día han trabajado y se han esforzado para darme una mejor vida y educación de la que ellos pudieron tener, por siempre apoyarme y ayudarme en todo momento sin cuestionamientos; y gracias por ser la mejor versión de ustedes como padres. Dedico esto a mi mamá que me ha enseñado a valorar mi esfuerzo, que nunca debo rendirme sin importar las adversidades; gracias por todo el esfuerzo que haces para que yo logre mis metas y mis sueños, gracias por aguantar todos esos años de sacrificios para darme lo mejor, eres la mejor mamá y mi ejemplo que seguir. Dedico esto a mi papá que todos los días me demuestra que las cosas solo se logran trabajando duro, que siempre me ha alentado a superarme; gracias por todo el arduo trabajo y los sacrificios que haces por mi, por apoyarme siempre sin importar nada, gracias por siempre estar a mi lado y acompañarme en todo momento, gracias por ser un gran padre, siempre eres digno de admirar.

Dedico esto a mis abuelos quienes a pesar de ya no estar conmigo siguen siendo y serán las personas más importantes en mi vida. Gracias por hacer de mí la persona que soy ahora, gracias por la crianza, las enseñanzas y los valores que me dieron siempre, gracias por todo el tiempo que me alentaron a ser la mejor versión de mí y a siempre dar lo mejor en todos los aspectos, gracias por enseñarme a buscar siempre la felicidad sin importar las adversidades; pero sobre todo gracias por el amor y el cariño infinito que me dieron y me demostraron siempre.

También dedico esto a Rafael por ser ese pilar que necesitaba en los peores momentos, por nunca dejar que me rindiera y por nunca abandonarme sin importar nada, sé que siempre

vas a estar a mi lado. También a Antonia por ser la mejor amiga, hermana y persona con la que pude coincidir en la vida, gracias por apoyarme siempre hasta en las ideas más retorcidas, gracias por estar presente sin importar la distancia, gracias por el cariño y la ayuda incondicional, mucho de esto no sería realidad sin ti. A Frida por ser mi persona, por estar siempre ahí y apoyarme en todo, por acompañarme a vivir nuevas aventuras, gracias por enseñarme a que se puede salir adelante sin importar nada. A Verónica por siempre ayudarme sin medida, por traer la alegría a mi vida, por enseñarme a no tener miedo y por siempre estar a mi lado, gracias por ser mi soulmate. Y a Jovani por ser el mejor amigo, compañero y confidente que me pude encontrar en la vida.

A Nería, David, Berlín, Naima y Naomi por ser mi segunda familia, por siempre apoyarme y estar cerca de mí. Gracias por hacer mi vida más divertida y darme las mejores vivencias de mi vida; gracias por las enseñanzas, el cariño y la amistad que me han dado todos estos años.

“No consideremos el futuro simplemente como una oscuridad sombría, todavía tenemos muchas páginas en nuestra historia y no deberíamos hablar como si el final ya estuviera escrito.”

-Kim Namjoon

# Índice de Abreviaturas

<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxígeno</b>
<b>OH</b>	<b>Radical hidroxilo</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrogeno</b>
<b>HOCl</b>	<b>Acido hipocloroso</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>ERO</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive oxygen species</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutasa</b>
<b>GPX</b>	<b>Glutación peroxidasa</b>
<b>TRX</b>	<b>Tioredoxinas</b>
<b>Prx</b>	<b>Peroxirredoxinas</b>
<b>CAT</b>	<b>Catalasa</b>
<b>Glx</b>	<b>Glutarredoxina</b>
<b>GSSG</b>	<b>Disulfuro de glutación</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutación reducido</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamida adenina nucleótido</b>
<b>PDI</b>	<b>Proteínas disulfuro isomerasa</b>
<b>TGR</b>	<b>Tiorredoxina-glutación reductasa</b>
<b>CoO</b>	<b>Oxido de cobalto</b>
<b>SET</b>	<b>Single electron transfer</b>
<b>HAT</b>	<b>Hidrogen atom transfer</b>
<b>GST</b>	<b>Glutación-5-transferasa</b>
<b>Nrf2</b>	<b>Factor de transcripción nuclear fritoide-2</b>

<b>XO</b>	<b>Xantina-oxidasa</b>
<b>MPO</b>	<b>Mieloperoxidasa</b>
<b>NOS</b>	<b>Óxido nítrico sintasa</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloruro de magnesio</b>
<b>H<sub>2</sub></b>	<b>Dihidrógeno</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de sodio</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hidróxido de sodio</b>
<b>KOH</b>	<b>Hidróxido de potasio</b>
<b>EtOH</b>	<b>Alcohol etílico</b>
<b>HMT-5</b>	<b>5-hidroxi metilfurfural</b>
<b>Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>Acetato de plomo</b>
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	<b>Cloruro de aluminio</b>
<b>DPPH</b>	<b>2,2-Difenil-1-Picrilhidracido</b>
<b>DMBA</b>	<b>7,12-Dimetilbenz(a)antroceno</b>
<b>TBARS</b>	<b>Ácido tiobarbitúrico</b>
<b>MDA</b>	<b>Malondialdehido</b>
<b>TRIS</b>	<b>Tris (hidroximetil) aminometano</b>
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	<b>Sulfato de Hierro</b>
<b>TBA</b>	<b>Toxina botulínica</b>
<b>N-1</b>	<b>Nafil (Etilenodamina diclorhidrato)</b>

# INDICE

1. Resumen.....	14
2. Marco teórico.....	15
2.1 Cáncer .....	15
2.2 Cáncer mamario.....	15
2.3 Epidemiología del cáncer mamario en México.....	16
2.4 Radicales libres de oxígeno y nitrógeno.....	17
2.5 estrés oxidativo en el proceso de carcinogénesis.....	18
2.6 Los antioxidantes.....	20
2.6.1 Superoxido dismutasa.....	21
2.6.2 Glutación peroxidasa.....	21
2.6.3 Tiorredoxina.....	21
2.6.4 Peroxirredoxina.....	21
2.6.5 Catalasa.....	21
2.6.6 Glutación reductasa.....	22
2.6.7 Glutarredoxina.....	22
2.6.8 Tiorredoxina reductasa.....	22
2.7 Sistema antioxidante endógeno.....	22
2.8 Sistema antioxidante exógeno.....	24
2.9 Mecanismos de acción antioxidante.....	26
2.9.1 Atrapamiento directo de radicales libres.....	26
2.9.2 Inducción de enzimas que remueven radicales libres.....	28
2.9.3 Inhibición o represión de enzimas formadores de radicales libres.....	30
2.9.4 Inhibición de la formación de radicales libres dependiendo de metales.....	31
2.10 Metabolitos primarios y secundarios.....	31
2.11 Metabolismo primario.....	32
2.11.1 Lípidos.....	32
2.11.2 Proteínas.....	33
2.11.3 Carbohidratos.....	34
2.12 Metabolitos secundarios.....	35
2.12.1 Alcaloides.....	35
2.12.2 Saponinas.....	35
2.12.3 Cumarinas .....	36
2.12.4 Taninos.....	36
2.12.5 Compuestos fenólicos .....	37
2.12.6 Esteroles/Esteroides.....	37
2.12.7 Quinonas.....	38
2.12.8 Sesquiterpenolactonas.....	38
2.12.9 Flavonoides.....	38

2.13 Etnobotánica.....	39
2.14 <i>Bidens odorata cav.</i> .....	40
3. Justificación.....	41
4. Hipótesis.....	42
5. Objetivos.....	42
5.1 General.....	42
5.2 particulares.....	42
6. Zona de estudio.....	42
7. Método.....	43
7.1 Caminata botánica.....	43
7.2 Registro etnobotánico .....	44
7.3 Preparación de extractos.....	44
7.4 Obtención de extractos secos.....	44
7.5 Pruebas de identificación de metabolitos secundarios.....	45
7.5.1 Alcaloides.....	45
7.5.2 Flavonoides.....	46
7.5.3 Esteroles/Esteroides.....	46
7.5.4 Compuestos fenólicos.....	47
7.5.5 Taninos .....	47
7.5.6 Saponinas.....	48
7.5.7 Cumarinas.....	48
7.5.8 Sesquiterpenolactonas.....	49
7.5.9 Quinonas.....	49
7.6 Identificación de metabolitos secundarios en diferentes concentraciones.....	49
7.7 Cuantificación de metabolitos primarios.....	50
7.7.1 Carbohidratos totales.....	50
7.7.2 Carbohidratos reductores.....	50
7.7.3 Carbohidratos no reductores.....	51
7.7.4 Lípidos.....	51
7.7.5 Proteínas.....	52
7.8 Cuantificación de metabolitos secundarios.....	53
7.8.1 Alcaloides.....	53
7.8.2 Compuestos fenólicos.....	54
7.8.3 Cumarinas.....	54
7.8.4 Esteroides/ Esteroles.....	55
7.8.5 Flavonoides.....	56
7.8.6 Quinonas.....	57
7.8.7 Saponinas.....	58
7.8.8 Sesquiterpenolactonas.....	59
7.8.9 Taninos.....	60
7.9 Determinación de la capacidad antioxidante, método DPPH.....	60
7.10 Modelo experimental.....	61

7.11	Diseño experimental formación de grupos de ratones.....	62
7.12	Inducción del cáncer de mama.....	63
7.13	Tratamiento con extractos.....	63
7.14	Obtención de plasma sanguíneo y homogenado de hígado.....	64
7.15	Evaluación de actividad antioxidante.....	64
7.15.1	lipoperoxidación (Método de TBARS).....	65
7.15.2	Cuantificación de nitritos (Método modificado de Griess).....	66
7.15.3	Cuantificación de proteínas (Método de Biuret).....	67
8.	Resultados.....	68
9.	Análisis de resultados.....	86
9.1	Registro etnobotánico.....	86
9.2	Estudio fitoquímico de <i>Bidens odorata cav.</i> .....	86
9.2	Cuantificación de metabolitos secundarios.....	89
9.3	Determinación de la capacidad antioxidante.....	90
9.4	Evaluación de la capacidad antioxidante mediante marcadores de estrés oxidativo.....	90
10.	Conclusiones.....	91
11.	Referencias.....	92

# Índice de Tablas

1. Curva patrón de carbohidratos totales.....	49
2. Curva patrón de carbohidratos reductores.....	50
3. Curva patrón de lípidos.....	51
4. Curva patrón de proteínas .....	51
5. Curva patrón de alcaloides.....	52
6. Curva patrón de compuestos fenólicos.....	53
7. Curva patrón de cumarinas.....	54
8. Curva patrón de esterol/esteroides.....	55
9. Curva patrón de flavonoides.....	56
10. Curva patrón de quinonas.....	56
11. Curva patrón de saponinas.....	57
12. Curva patrón de sesquiterpenolactonas.....	58
13. Curva patrón de taninos.....	59
14. Curva patrón de DPPH.....	60
15. Diseño experimental de grupos de ratones.....	61
16. Curva patrón de nitritos.....	65
17. Curva patrón de proteínas.....	66
18. Estudio preliminar de metabolitos secundarios.....	69
19. Características de los extractos hidroalcohólicos secos.....	71
20. Características de los extractos acuosos secos .....	71
21. Resultados de las pruebas de identificación en los extractos antes del proceso de secado.....	72
22. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios a diferentes concentraciones en extractos acuosos.....	73
23. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios a diferentes concentraciones en extractos hidroalcohólicos.....	74
24. Concentraciones de metabolitos primarios en extractos hidroalcohólicos.....	75
25. Concentraciones de metabolitos primarios en extractos acuosos.....	76
26. Concentraciones de metabolitos secundarios en extractos acuosos.....	77
27. Concentraciones de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos.....	78

# Índice de Gráficas

1. Diferentes usos que las personas le dan a la planta <i>Bidens odorata cav</i> .....	67
2. en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.....	68
3. Se muestra el rango de edades de las personas entrevistadas.....	68
4. Genero de las personas entrevistadas.....	75
5. Resultado de las cuantificaciones de metabolitos primarios en extractos hidroalcohólicos.....	76
6. Resultados de las cuantificaciones de metabolitos primarios en extractos acuosos.....	77
7. Resultados de las cuantificaciones de metabolitos secundarios en extractos acuosos.....	78
8. Resultados de las cuantificaciones de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos.....	79
9. Prueba de DPPH.....	82
10. Pruebas de nitritos en homogenado de hígado de los ratones.....	83
11. Prueba de lipoperoxidación en homogenado de hígado de los ratones.....	84
12. Prueba de nitritos en plasma en sangre de los ratones.....	85
13. Prueba de lipoperoxidación en plasma en sangre de los ratones.....	86

# Índice de imágenes

1. Principales especies reactivas.....	17
2. Mecanismos de acción antioxidante.....	25
3. Mecanismos de atrapamiento de radicales libres.....	27
4. Enzimas involucradas en la remoción de radicales libres.....	28
5. Metabolitos secundarios y sus rutas metabólicas.....	31
6. Planta mozote ( <i>Bidens odorata</i> cav.).....	40
7. Mapas de la ubicación de la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.....	42
8. Ratones que mostraron falta de pelo.....	80
9. Ratones que mostraron pérdida de los bigotes.....	80
10. Ratones que mostraron crecimiento de tumores.....	80

# Resumen

*Bidens odorata cav.* de la familia *Compositae* es una planta que crece principalmente en los sembradíos, la podemos encontrar en diferentes estados del país ya que es una planta que se adapta a cualquier ambiente. Es conocida coloquialmente como Mozote y es una planta a la cual se le atribuyen diversas propiedades medicinales. A partir de estos conocimientos en medicina tradicional es que se considera que la planta *Bidens odorata* contiene sustancias activas las cuales son las que le otorgan sus propiedades curativas.

No se ha realizado muchos estudios científicos acerca de la planta, los pocos que se conocen hablan sobre sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas.

El cáncer de mama es una de las enfermedades con más incidencia en México y una de las principales causas de muerte entre la población. Esto se debe a la detección tardía, a que no se tiene la información suficiente, pero sobre todo a que es una enfermedad con un tratamiento muy costoso y muy pocas personas tienen acceso a uno, por eso se han buscado diferentes alternativas que puedan ayudar a los pacientes.

Es por eso por lo que en este proyecto se busca determinar el efecto que tienen los extractos de *Bidens odorata cav.* en modelos murinos con cáncer de mama. Se realizaron pruebas de identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en los extractos de cada una de las estructuras de la planta para conocer los metabolitos que contenía, obteniendo como resultado que las sesquiterpenolactonas son las que se encontraban en mayor cantidad seguidas de los compuestos fenólicos, cumarinas, quinonas y esteroides/esteroides. Posteriormente se le suministraron los extractos a los ratones que fueron infectados con DMBA para después realizar pruebas de marcadores de estrés oxidativo como óxido nítrico y lipoperoxidación en

homogenado de hígado y en plasma sanguíneo, a partir de las cuales se pudo conocer el efecto de la planta. Obteniendo que los extractos de la planta ayudaron a la modulación del estrés oxidativo.

En conclusión, la planta *Bidens odorata* contiene metabolitos secundarios los cuales le otorgan sus propiedades curativas, las cuales demostraron ayudar a modular el proceso de carcinogénesis, por lo cual en un futuro los extractos de *Bidens odorata* pueden ser un tratamiento alternativo para el cáncer de mama mas accesible y económico.

## **MARCO TEÓRICO**

### **Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que se produce por la transformación de células sanas en células incapaces de controlar su crecimiento, provocada por complejos cambios en el material genético llamados mutaciones. La forma de almacenar la información de las células es a través de las cadenas de ADN, siendo este un sitio de la génesis tumoral. La complejidad para que múltiples mutaciones o cambios en el ADN acumulados conduzcan al desarrollo de cáncer es tan marcada como asimismo el proceso para que un tumor genere metástasis. (Chacón, 2009)

Incidencias en la Región de las Américas:

- Los tipos de cáncer que padecen con mayor frecuencia los hombres son: de próstata (8,6%), pulmón (11,7%), colorrectal (10,2%) y vejiga (5,9%).
- Los tipos de cáncer que padecen con mayor frecuencia las mujeres son: de mama (30,7%), pulmón (10,3%), colorrectal (9,6%) y cuerpo uterino (6,4 %). (OPS, 2022)

El proceso de carcinogénesis inicia cuando en una célula normal se ve afectado crecimiento o la apoptosis. Cuando se alcanza cierto volumen el tumor requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos, y comienza el proceso de angiogénesis para el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos. Una característica importante de las células cancerosas es su inestabilidad genética, que puede producirse a nivel de las estructuras cromosómicas o en las secuencias de ADN, esta inestabilidad se atribuye a fallos en los sistemas de reparación, provocando que se dé una acumulación de mutaciones puntuales.

### **Cáncer Mamario**

El cáncer de mama es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula

mamaria forman un tumor que invade los tejidos del órgano mamario, podemos encontrar diferentes tipos de cáncer de mama como: carcinoma lobular, carcinoma ductal, enfermedad de Paget, carcinoma inflamatorio. El cáncer de mama se considera que es consecuencia de alteraciones en la estructura y función de los genes. Los carcinomas de mama suponen más de 90% de los tumores malignos. (SSP, 2007)

### **Epidemiología del cáncer mamario en México**

México a nivel mundial se ubica en un nivel intermedio con tasas de incidencia menores a las que se han presentado en otros países, el cáncer de mama en México es un problema de salud cada vez más importante por la tendencia ascendente en su incidencia y mortalidad, determinadas por diferentes factores como: por el envejecimiento de la población, el aumento de los factores de riesgo, la falta de programas o campañas nacionales de detección oportuna y la falta de apoyos económicos para las personas diagnosticadas. (Sánchez, et. al., 2013)

Los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama son los siguientes:

#### A) Biológicos:

- Sexo femenino.
- Antecedente personal o familiar de cáncer de mama.
- Vida menstrual mayor a 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años).
- Densidad mamaria.
- Ser portador conocido de los genes BRCA1 o BRCA2.

#### B) Ambientales:

- Exposición a radiaciones ionizantes, principalmente durante el desarrollo o crecimiento (en útero, en la adolescencia).

#### C) Antecedentes reproductivos:

- Primer embarazo a término después de los 30 años de edad.
- Terapia hormonal en la perimenopausia o posmenopausia por más de cinco años.

#### D) estilo de vida:

- Mala alimentación.
- Obesidad.
- Sedentarismo.
- Consumo de alcohol.
- Tabaquismo. (Sánchez, *et. al.*, 2013)

### **Radicales Libres de Oxígeno y Nitrógeno**

Los radicales libres son átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita, la molécula estable que lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Los radicales libres ayudan en nuestro cuerpo, producidos en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. (Avello & Suwalsky, 2006)

Para evitar la proliferación masiva de radicales libres en las células, estos procesos deben ser controlados con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres en las células, mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. (Finkel & Holbrook, 2000)

La mayor fuente de radicales libres en los sistemas biológicos es el oxígeno. La denominación “especies reactivas del oxígeno” designa colectivamente al  $O_2^{\cdot-}$  y al  $\cdot OH$ . que son radicales libres, y al  $H_2O_2$  que no lo es. También, por ser un oxidante energético, es incluido en este grupo, sin ser un radical libre. el ácido hipocloroso (HOCl) producido por las células fagocíticas en una reacción entre el ion cloruro y el peróxido de hidrógeno catalizada por la mieloperoxidasa. De acuerdo con lo que antecede se da el nombre de oxidantes, al  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,

·OH y HOCl, aunque estrictamente esta denominación es válida solamente para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH y HOCl, dado que en algunas circunstancias el O<sub>2</sub>· puede ser reductor. También se considera como una especie reactiva del oxígeno al radical libre óxido nítrico. NO·. Este es sintetizado a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa en las células endoteliales, los neutrófilos, las neuronas y las microglías. El óxido nítrico es muy tóxico, dado que puede aumentar la toxicidad del superóxido al reaccionar con él para dar peroxinitrito que es tóxico, y que, además en ciertas condiciones, se descompone dando lugar a la formación de radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno. (Korc, *et. al.*, 1995)

RADICALES LIBRES		ESPECIES REACTIVAS NO-RADICALES	
SUPERÓXIDO	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PERÓXIDO HIDRÓGENO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
HIDROXILO	HO·	HIDROPERÓXIDOS	ROOH
ALCOXI	RO·	HIPOCLORITO	ClO <sup>-</sup>
PEROXI	ROO·	OXÍGENO SINGLETE	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
CARBONATO	CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OZONO	O <sub>3</sub>
OXIDO NÍTRICO	NO·	PEROXINITRITO	ONOO <sup>-</sup>
DIOXIDO NÍTRICO	NO <sub>2</sub>		<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">           NO· O<sub>2</sub><sup>-</sup> </div>

Imagen 1. Principales especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno.

### Estrés oxidativo en el proceso de carcinogénesis

El daño al ADN se considera el suceso crucial en la carcinogénesis. Se han reportado al menos 100 diferentes tipos de lesiones oxidativas al ADN. El ataque oxidante a esta molécula puede ocurrir a nivel de las bases nitrogenadas o el azúcar fundamentalmente. El daño a las bases nitrogenadas origina modificaciones de bases, tales como la 8-hidroxi,2'-desoxiguanosina (modificación altamente mutagénica). Por otra parte, el daño oxidativo al

azúcar produce la pérdida de la base nitrogenada, lo cual genera sitios apurínicos o apirimidínicos (sitios AP) que promueve la ruptura de una cadena o de las dos cadenas del ADN, esto a su vez provoca inestabilidad genética. También pueden generarse entrecruzamientos de las cadenas de ADN. De esta forma, el estrés oxidativo es una causa significativa de daño al ADN que provoca mutaciones e inestabilidad genética, ambos implicados en la carcinogénesis. (García, et. al., 2012)

En relación con las mutaciones, estas pueden producirse en el próximo ciclo de replicación del ADN, por fallos en los procesos de reparación del daño oxidativo, encargados del mantenimiento de la integridad de esta molécula. Si las mutaciones ocurren en genes críticos en el desarrollo del cáncer en células germinales, pueden dar lugar a la presencia de cáncer en la descendencia. Por otra parte, si las mutaciones afectan estos genes críticos en células somáticas pueden originar el cáncer. Los genes críticos para el cáncer son aquellos que regulan la expresión o codifican a proto-oncogenes y genes supresores del tumor. Los proto-oncogenes están presentes en el ADN de las células normales, pero las mutaciones pueden originar su activación en oncogenes, los cuales estimulan la proliferación celular. El carácter dominante de estos genes provoca que la mutación en solo uno de los alelos puede conducir al cáncer. Por otra parte, las mutaciones que inhiben la expresión o afectan la estructura y función de genes supresores del tumor, también pueden conducir a la proliferación celular incontrolada. El carácter recesivo de estos genes hace que se requieran mutaciones graduales en ambos alelos, para que se altere la proliferación celular. (García, et. al., 2012)

Los estudios que se han realizado brindan evidencias de la relación entre estrés oxidativo con la carcinogénesis como:

- El mecanismo de acción de muchos carcinógenos involucra al daño oxidativo. Este es el caso de los carcinógenos químicos como los hidrocarburos aromáticos

policíclicos, el benceno, etcétera, y de carcinógenos físicos como las radiaciones.

(Garcia, et. al., 2012)

- Los oxidantes han sido implicados en cada una de las tres primeras etapas del proceso de carcinogénesis (inducción, promoción y progresión).
- Los antioxidantes pueden bloquear estas etapas. El antioxidante N-acetil cisteína puede bloquear el efecto de incremento de estrés oxidativo y cáncer inducido por deficiencia del gen p53, quien codifica a un supresor tumoral implicado también en la modulación de ERO in vivo.
- La poca existencia de genes que codifican enzimas antioxidantes incrementa el riesgo de cáncer. Ratones deficientes de peroxiredoxina sufren incremento del daño oxidativo y la incidencia de cáncer. (García, et. al., 2012)

### **Los antioxidantes**

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran el traspaso de electrones que producen radicales libres. A estos procesos de defensa se les denomina antioxidantes, se considera antioxidante a cualquier sustancia que posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre. El antioxidante al encontrarse con un radical libre, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan así, los enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos para actuar con los radicales libres. Esto nos dice que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta). (Mayor, 2010)

### **Sistema antioxidante endógeno enzimático.**

Los componentes de este sistema comprenden las enzimas siguientes:

**Superóxido dismutasa (SOD).** Esta enzima tiene la propiedad de convertir el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Existen tres isoformas: la SOD1 (Cu/Zn) es la principal isoforma que reacciona con el  $O_2^{\bullet-}$  en el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial; SOD2 (Mn), encargada de reaccionar en la matriz mitocondrial con el  $O_2^{\bullet-}$ , y la SOD 3 (Cu/Zn), que se encuentra localizada en el líquido extracelular. (Mayor, 2010)

**Glutación peroxidasa (GPX).** Tiene la propiedad de reaccionar con el  $H_2O_2$  y eliminar hidroperóxidos, compuestos que se forman mediante las reacciones de oxidación de los lípidos; esta enzima requiere glutación (GSH) y selenio para su actividad. Se han descrito varias isoformas, y la GPX1 es la más abundante. (Mayor, 2010)

**Tiorredoxina (TRX).** Es una tiol-disulfuro oxidorreductasa que tiene la propiedad de reducir otras proteínas como el ribonucleótido reductasa y diversas peroxidasas; la TRX1 es de localización citosólica y extracelular, mientras la TRX2 se localiza en la mitocondria. (Mayor, 2010)

**Peroxirredoxina (Prx).** Es otra enzima antioxidante que tiene la propiedad de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos, formando agua y alcohol, respectivamente, asimismo, regula la concentración de peróxido de hidrógeno, propiedad que le permite modular las vías de señalización celular en las que participan el TNF- $\alpha$  y factores de crecimiento. (Mayor, 2010)

**Catalasa (CAT).** Esta enzima, caracterizada por ser de amplia distribución en el ser humano, encontrándose preferencialmente en el hígado y riñones, tiene una actividad catalítica muy elevada al descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, aunque a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno la catalasa puede oxidar a compuestos fenólicos, constituyendo este tipo de catálisis su actividad peroxidásica. (Mayor, 2010)

**Glutación reductasa.** Tiene la propiedad de reducir el glutatión oxidado (GSSG) y formar dos moléculas de glutatión reducido (GSH) con la activa participación del cofactor NADPH. Esta enzima es muy importante por su propiedad de reconstituir el GSH, ya que cuando se eleva la relación GSSG/GSH se torna tóxica para la célula. Los niveles de GSH son muy importantes para que la glutatión peroxidasa pueda eliminar eficientemente el peróxido de hidrógeno. (Mayor, 2010)

**Glutarredoxina (GlrX).** Es una enzima cuya propiedad es separar el glutatión de la proteína a la que está unido, permitiendo que las proteínas dispongan de sus grupos sulfhidrilo libres. Esta enzima y el glutatión S-transferasa son claves en el mantenimiento del ciclo de señalización redox celular, superponiéndose su acción con la actividad de las tiorredoxinas. Tiene la propiedad de participar en el control de la apoptosis, para cuya finalidad inhibe Fas y activa Akt y NF-kB. (Mayor, 2010)

**Tiorredoxina reductasa (TrxR).** Es una de las enzimas antioxidantes que tienen la propiedad de reducir la tiorredoxina (TRX) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) utilizando como coenzima a la NADPH; en su sitio activo también tiene los cofactores Se y FAD. Existen varias isoformas de tiorredoxina reductasa, la TrxR1, que tiene localización citosólica; la TrxR3, que se localiza en la mitocondria, y la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), que se localiza en el testículo de manera específica. (Mayor, 2010)

#### **Antioxidante endógeno no enzimático.**

Este sistema está constituido por una diversidad de antioxidantes como el glutatión (GSH), sustancia que se encuentra en concentraciones elevadas en el hígado 5 a 10 mM, mientras que en el plasma es aproximadamente de 20  $\mu$ M; es utilizado por el glutatión peroxidasa para eliminar hidroperóxidos, reacción en la que es convertido en glutatión oxidado (GSSG), compuesto que, necesariamente, debe reducirse para regenerar GSH, para cuyo propósito se

requiere del glutatión reductasa y la NADPH. La mioglobina es una proteína cuya función es almacenar oxígeno en el tejido muscular, habiéndose descrito que tiene la propiedad de neutralizar la acción del radical libre óxido nítrico. Una de las más importantes funciones de la ferritina es mantener el balance intracelular del hierro, de esta manera impide que este metal genere radicales libres. Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular caracterizadas por tener varios grupos sulfhidrilo que les permiten reaccionar con el anión superóxido y radicales hidroxilos. La CoQ participa en el transporte mitocondrial de electrones y tiene la propiedad de reaccionar con el oxígeno molecular y diversos radicales libres. Las poliaminas comprenden a compuestos como la espermina, espermidina y putrescina, los que tienen la propiedad de proteger las membranas celulares del radical peroxilo, peróxido de hidrógeno, radical superóxido, etc. La melatonina tiene la propiedad de bloquear la acción nociva del radical hidroxilo, el óxido nítrico y el peroxinitrito. (Mayor, 2010)

La transferrina es una glicoproteína con la propiedad de ligarse al hierro trivalente, de esta manera impide que el hierro pueda intervenir en formar un radical hidroxilo; así mismo, la ceruloplasmina, otras proteínas que circulan en el plasma, tiene como función transportar cobre, un metal que genera radical hidroxilo cuando se encuentra con el peróxido de hidrógeno. El ácido úrico es el producto del metabolismo de las purinas, tiene la propiedad de comportarse como un eficiente antioxidante, lo que le permite bloquear el radical hidroxilo, peroxinitrito y peróxidos lipídicos. La albúmina es un componente de las proteínas plasmáticas que cumple múltiples funciones, una de estas propiedades está asociada con la actividad antioxidante gracias a sus grupos sulfhidrilo; así mismo, se ha descrito que la bilirrubina posee una elevada acción antioxidante, de manera análoga la lactoferrina. (Mayor, 2010)

Este grupo incluye a los polifenoles, carotenoides, algunas vitaminas, elementos traza, etc. Los polifenoles son compuestos orgánicos caracterizados por poseer anillos aromáticos con uno o varios grupos fenólicos que se encuentran de manera natural en los vegetales; su efecto está relacionado con la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles como cáncer, psoriasis, aterosclerosis, diabetes mellitus, hipertensión arterial, obesidad, etc. Se han identificado más de cuatro mil clases de polifenoles, y se ha podido distinguir químicamente en este grupo a moléculas tales como los ácidos fenólicos, grupo constituido por los derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico; así mismo, se ha conseguido diferenciar polifenoles con estructuras ligeramente diferentes como los estilbenos, lignanos y flavonoides. (Mayor, 2010)

Las frutas y verduras son fuente de polifenoles, particularmente los derivados del ácido hidroxibenzoico, como el ácido gálico y el ácido protocauquético. Los derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido cumárico, el ácido clorogénico, el ácido sinápico y el ácido ferúlico. (Mayor, 2010)

### **Antioxidantes exógenos**

El ser humano puede incrementar su defensa antioxidante ingiriendo frutas y verduras, alimentos ricos en sustancias antioxidantes. Estos compuestos son numerosos y sus propiedades antioxidantes aún no han sido estudiadas en su totalidad, pero han mostrado tener efectos muy beneficiosos para la salud. (Mayor, 2010)

Los estilbenos son un grupo de polifenoles cuyo principal representante es el resveratrol, un antioxidante muy eficiente. Otro grupo importante de polifenoles son los lignanos, de los cuales uno de los compuestos más conocidos es el secoisolarisirecinol, que se encuentra en cereales, frutas y verduras, pero en cantidades muy bajas. Los flavonoides constituyen un grupo muy importante de compuestos naturales con propiedades antioxidantes, cuyo estudio

ha recibido preferencial atención. Estos compuestos químicos pueden dividirse en seis grandes subgrupos: flavonoles, flavanonas, flavonas, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas. Los flavonoles como la rutina, isorhamnetina, miricetina, quercetina, etc. (Mayor, 2010)

Los carotenoides son compuestos químicos caracterizados por ser liposolubles debido a que tienen una estructura constituida por una larga cadena hidrocarbonada eminentemente hidrofóbica, salvo las xantófilas, que tienen uno o más átomos de oxígeno. Estos compuestos están constituidos por dos subgrupos, los carotenos y las xantófilas. (Mayor, 2010)

La vitamina C es un compuesto hidrosoluble que se absorbe a nivel intestinal con la participación del cotransportador de sodio y vitamina C, participa en los procesos de absorción de hierro, facilita el transporte de glucosa a través de membrana, interviene en la captación de hierro ligado a la transferrina, en la homeostasis del hierro, hidroxilación del colágeno, biosíntesis de carnitina, norepinefrina, metabolismo de la tirosina, reciclaje de la vitamina E, reciclaje de la tetrahidrobiopterina, metabolismo del colesterol, etc. Es un potente agente antioxidante que tiene la propiedad de reducir el proceso de lipoperoxidación, disminuir la oxidación de las proteínas y ADN por acción de los radicales libres. (Mayor, 2010)

La vitamina E también es un antioxidante liposoluble natural que se representa químicamente como los compuestos denominados tocoferoles, siendo el  $\alpha$ -tocoferol es el que presenta mayor capacidad antioxidante. Esta vitamina tiene la propiedad de interrumpir la propagación de la reacción en cadena, ocasionada por radicales libres, que ocurre en la membrana mitocondrial y en el retículo endoplásmico; reacciona preferencialmente con las lecitinas, y las protege del daño oxidativo producido por radicales libres. Los procesos mecanísticos de las reacciones en que participa la vitamina E son muy complejos, en estas

reacciones la vitamina E se convierte en radical  $\alpha$ -tocoferoxilo, el cual ulteriormente puede transformarse nuevamente en vitamina E con participación de la vitamina C. (Guija & Guija, 2023)

### Mecanismos de acción antioxidante

Los antioxidantes tienen la capacidad prevenir o retardar la oxidación, esto gracias a la remoción de radicales libres, inhibiendo la formación de dichas especies, y/o revirtiendo un daño oxidativo ya generado. (Arteel, 2016)

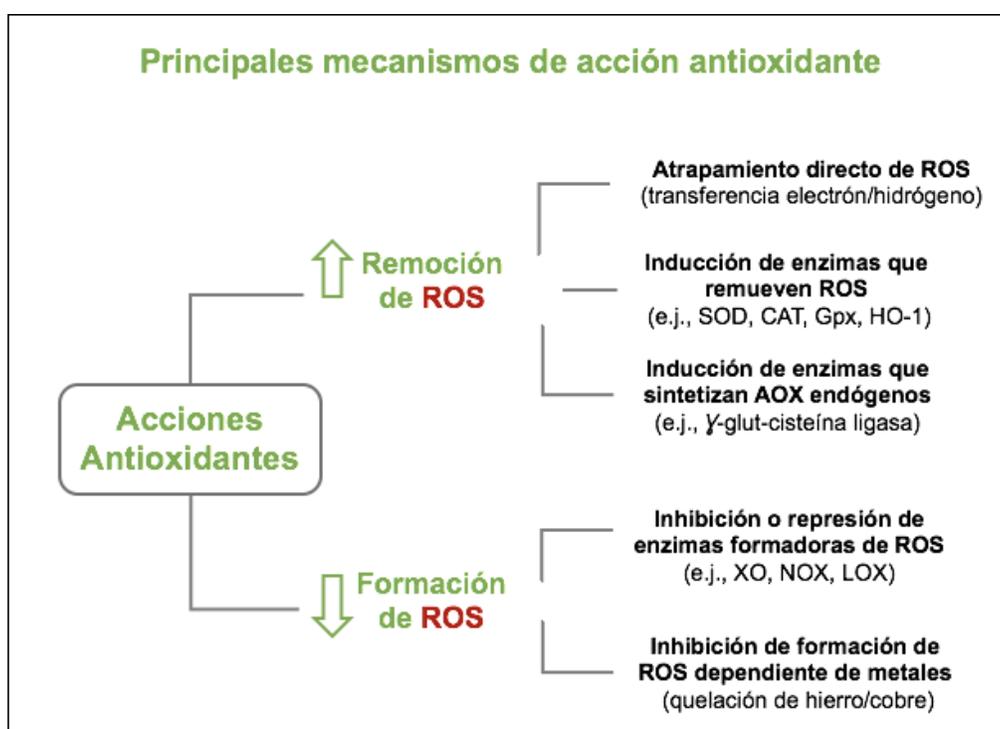


Imagen 2. Mecanismos de acción antioxidante.

Entre los mecanismos de Remoción de ROS, destacan:

**Atrapamiento directo de radicales libres:** El mecanismo más conocido, aunque no necesariamente el más relevante a la acción, se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como “estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas”.

En el caso de los radicales libres, esta acción tiene como resultado su estabilización a través de dar un electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como “SET” (single electron transfer), permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado. Uno de los resultados para el antioxidante es que, al ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja reactividad. Junto al mecanismo SET, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón). Tal mecanismo es definido como “HAT” (hydrogen atom transfer). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente. (Arteel, 2016)

Los antioxidantes que trabajan a través de mecanismos SET y/o HAT son mayoritariamente los antioxidantes no-enzimáticos, sean estos normalmente bio-sintetizados por el organismo humano, o bien que ingresen al organismo a través de la dieta. La mayoría de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su estructura química, como grupos funcionales, hidroxilos fenólicos (ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles). No obstante, otros antioxidantes, no fenólicos, como el glutatión, la melatonina, y los ácidos, ascórbico, dihidrolipoico y úrico, son también ejemplos de moléculas cuya acción es promovida por mecanismos SET y/o HAT. (Arteel, *op cit.*)

Junto a los mecanismos SET y HAT, ciertos antioxidantes actúan estabilizando especies reactivas mediante un mecanismo que implica “la adición directa del radical a su estructura”. Como resultado de tal reacción, el radical libre (ej. peroxilo) pierde su condición, y el caroteno es modificado covalentemente, convirtiéndose en un radical libre que a través de reacciones sucesivas es oxidado y convertido en derivados epóxido y carbonilos de notablemente menor reactividad. (Arteel, *op cit.*)

Como es de esperar, la interacción directa entre un antioxidante y una especie reactiva prevendrá ya sea el inicio y/o la propagación de procesos oxidativos que afectan a los sustratos biológicos. (Arteel, *op cit.*)

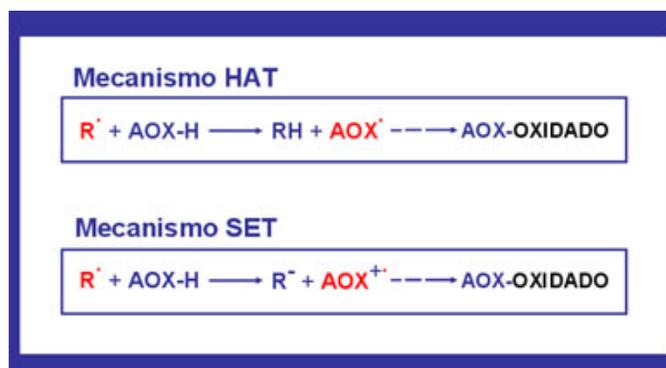


Imagen 3. Mecanismos de atrapamiento de radicales libres.

**Inducción de enzimas que remueven radicales libres:** Este mecanismo es actualmente considerado el más eficiente para la remoción de ROS. Se fundamenta en la capacidad que tienen algunos compuestos (no todos los antioxidantes) para inducir la síntesis de enzimas antioxidantes. Entre estas destacan las siguientes: superóxido dismutasa (SOD, en sus isoformas Cu/Zn y Mn-dependientes) que reduce radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, catalasa (CAT, hierro-dependiente) que reduce peróxido de hidrógeno a agua, glutatión peroxidasa (GSpx; Se-dependiente) que reduce lipo-hidroperóxidos a sus alcoholes correspondientes, glutatión-S-transferasa (GST) en su tipo peroxidasa que actúa reduciendo peróxidos orgánicos, glutatión reductasa que reduce glutatión oxidado (GSSG) a reducido (GSH), y sulfoxi-metionina-reductasa que regenera metionina a partir de su metabolito sulfoxi-oxidado (ver tabla). La acción antioxidante de dichas enzimas se traduce en una disminución del estado redox celular. Entre las enzimas mencionadas, dos ameritan un comentario adicional. El primero, la SOD se distingue pues si bien su acción remueve un radical libre (superóxido), como producto de su acción se forma una especie que también es

reactiva, peróxido de hidrógeno. Esto último pone importancia en que existen otras enzimas capaces de remover peróxido de hidrógeno, como son la CAT y la GSpx. La segunda enzima que destaca es el glutatión reductasa pues su acción antioxidante es doble porque esta enzima cataliza no sólo la eliminación de un ROS, como es el glutatión oxidado (GSSG), sino que, además, como resultado de ello, da simultáneamente lugar a la formación de un importante antioxidante celular, el glutatión reducido (GSH). (Arteel, 2016)

<b>Superoxido-dismutasa</b>	$O_2^{\cdot -}$	→	$H_2O_2$
<b>Catalasa</b>	$H_2O_2$	→	$H_2O$
<b>Glutatión peroxidasa</b>	LOOH	→	LOH
<b>Glutatión S-transferasa</b>	ROOH	→	ROH
<b>Glutatión reductasa</b>	GSSG	→	GSH
<b>Metionin-SO<sub>2</sub> reductasa</b>	Met-SO <sub>2</sub>	→	Met

Imagen 4. Enzimas involucradas en la remoción de radicales libres.

Por tanto, el mecanismo descrito solo aplica a células o tejidos expuestos a ROS. La lista de compuestos capaces de inducir la síntesis de tales enzimas incluye a muchos polifenoles presentes en frutas y hortalizas, a diversos isotiocianatos (como sulforafano) presentes en crucíferas y a algunos curcuminoides. Estos compuestos son también conocidos como inductores de enzimas bio-transformantes del tipo fase II, es decir aquellas que conjugan xenobióticos electrófilos. Su acción antioxidante es ejercida a través de un mecanismo que requeriría de concentraciones significativamente menores a aquellas implicadas en el atrapamiento directo de ROS. El mecanismo involucrado, definido como indirecto, muestra

una reacción del compuesto antioxidante sobre la vía del “Factor de Transcripción Nuclear Eritroide-2” (Nrf2), cuya activación citosólica conduce a su translocación al núcleo, permitiendo la regulación positiva (“upregulation”) de

la expresión de genes que codifican para la síntesis de enzimas involucradas en la eliminación de ROS y/o en la síntesis de antioxidantes endógenos. La mayor eficiencia de este mecanismo reside en que la acción antioxidante no está limitada por el consumo estequiométrico que deviene del atrapamiento directo de ROS, sino que se extiende a la amplificación de la acción antioxidante dada por la acción catalítica de las enzimas inducidas. A su vez, en función de la vida media de tales enzimas, su acción antioxidante se extiende comparativamente más que lo logrado por la estricta presencia y tiempo de consumo oxidativo de aquellas moléculas cuya acción es vía atrapamiento directo. (Arteel, 2016)

Entre los mecanismos de inhibición de la formación de ROS, destacan:

**Inhibición o represión de enzimas formadoras de radicales libres:** Algunos antioxidantes pueden actuar para la prevención de la formación de ROS. Lo llevan a cabo inhibiendo ya sea la actividad catalítica de enzimas prooxidantes involucradas en la realización de especies reactivas, como son la NADPH-oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa (XO), la mieloperoxidasa (MPO) y el óxido nítrico sintasa (NOS), o la síntesis de algunas de estas enzimas (como NOX y NOS) a través de la vía Nrf2. En el primer caso, su acción antioxidante no demanda que su molécula exhiba en su estructura características que típicamente se asocian a los mecanismos de acción SET o HAT. Se trata en cambio, de estructuras que pueden interactuar con los sitios reguladores de tales enzimas. Ejemplos de inhibidores de la actividad son un gran número de polifenoles provenientes de la dieta. Además, se incluyen ciertos agentes farmacológicos, como es el caso de alopurinol, que empleado en la terapia de la gota, capaz

de inhibir la xantina oxidasa. En forma adicional, ciertas moléculas pueden reprimir la síntesis endógena de enzimas formadoras de ROS. (Arteel, *op cit.*)

**Inhibición de la formación de radicales libres dependiente de metales:** Este es un mecanismo que implica la inhibición de la formación de especies reactivas, este se relaciona con contraponer la capacidad que tienen algunos metales de transición, como hierro y cobre (ambos en su estado reducido), para catalizar (actividad redox) la formación de radicales superóxidos y de radicales hidroxilos (esta última conocida como Reacción de Fenton). Aquellas moléculas que tienen la habilidad de unir tales metales, formando complejos o quelatos, logran inhibir la actividad redox de éstos, previniendo la formación de las especies reactivas anteriormente mencionadas. Se incluyen en este grupo de antioxidantes: *i)* ciertos péptidos y proteínas normalmente biosintetizadas por el organismo y cuya función fisiológica les implica transportar, almacenar y/o excretar hierro (como ferritina) o cobre (como metalotioneína y ceruloplasmina), *ii)* ciertos polifenoles que acceden al organismo a través de la dieta y cuya característica distintiva es presentar en su estructura flavonoídea un grupo catecol en el anillo B, y *iii)* algunos agentes que son empleados en la terapia de remoción de metales como desferroxamina que atrapa hierro, y penicilamina o tetratiomolibdato que atrapan cobre. (Arteel, 2016)

### **Metabolitos primarios y secundarios**

A todas las reacciones químicas en conjunto que tienen lugar en un organismo se le conoce como el metabolismo. Existen moléculas específicas que son necesarias para las células principalmente para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, que también están presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones, a estas sustancias se les denomina metabolitos primarios. Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la

energía a la síntesis de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, a los cuales se les denomina metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales). (Avalos, *et. al.*, 2009)

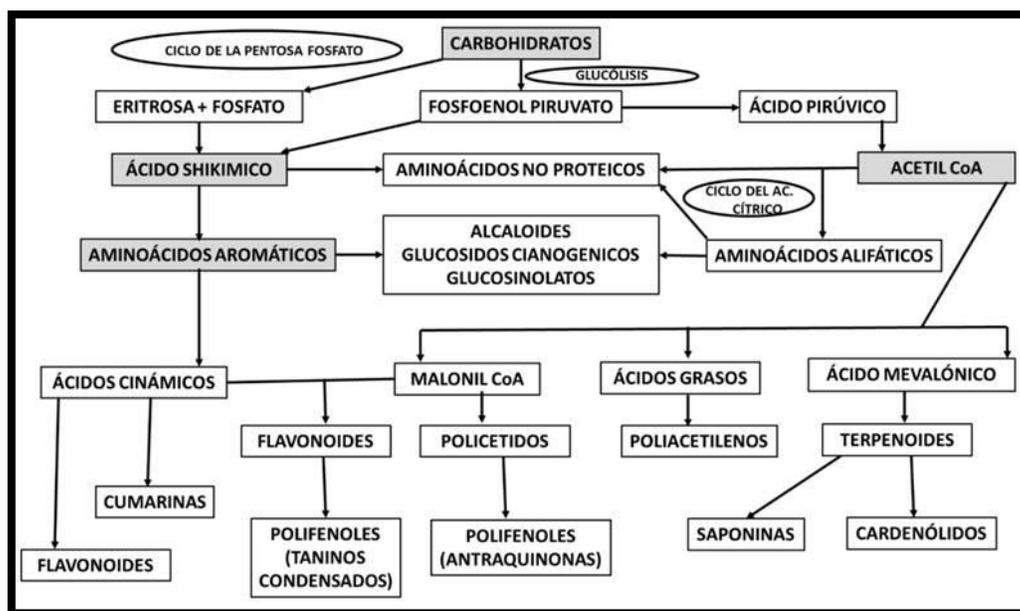


Imagen 5. Metabolitos secundarios y sus rutas metabólicas.

### Metabolitos primarios

**Lípidos:** Los lípidos son un grupo muy heterogéneo de moléculas orgánicas; e incluyen grasas, aceites, esteroides, ceras, etc. Están relacionados más por sus propiedades físicas que por sus propiedades químicas. El término lípido se aplica a compuestos con la propiedad de ser insoluble en el agua y soluble en solventes no polares. Los lípidos consisten en grupos no polares (en general con un alto contenido de carbono e hidrógeno). Hay algunos lípidos que son más complejos, los cuales contienen grupos no lipídicos, como sulfatos, fosforilos o amino. Químicamente, los lípidos son biomoléculas que al ser sometidas a hidrólisis producen ácidos grasos y alcoholes complejos, formando ésteres. (Carvajal, 2019)

Los lípidos se pueden clasificar en dos grupos, un grupo que consta de compuestos de cadena abierta con cabezas y largas colas hidrocarbonadas no polares, en los cuales se encuentran los ácidos grasos, los triglicéridos, los esfingolípidos, los fosfoacilgliceroles y los glucolípidos; y otro grupo que consta de compuestos con anillos fusionados, conocidos como esteroides. (Carvajal, 2019)

Otra clasificación divide a los lípidos en:

1. Lípidos simples: ésteres de ácidos grasos con diversos alcoholes (grasas y ceras).
2. Lípidos complejos: ésteres de ácidos grasos que tienen otros grupos más un alcohol y un ácido graso (fosfolípidos, glucolípidos y otros lípidos complejos).
3. Lípidos precursores y derivados: comprenden ácidos grasos, glicerol, esteroides, cuerpos cetónicos, hidrocarburos, vitaminas y hormonas liposolubles. (Carvajal.2019)

**Proteínas:** Las proteínas son sustancias complejas (macromoléculas) formadas por los elementos: C, H, O, N, S y en algunos casos fósforo. Las proteínas tienen alto peso molecular, forman dispersiones coloidales y están compuestas por alfa-aminoácidos en enlace peptídico. (Micocci, 2018)

Una de las funciones importantes de las proteínas es constituir la parte fundamental de las enzimas. Las proteínas participan también como agentes activos en todas las funciones de la célula y del organismo. (Micocci, *op cit.*)

Las proteínas funcionan también como hormonas –mensajeros químicos entre las células– como ejemplo de hormonas proteicas se destacan: la insulina, el glucagón, la hormona adrenocorticotrófica y demás hormonas tróficas de la hipófisis: tirotrópina, luteinizante, prolactina, hormona del crecimiento; así como los factores liberadores del hipotálamo. A nivel del organismo las proteínas tienen también una importante función nutricional,

formando el principal ingreso nitrogenado del organismo. Las proteínas de membrana se ocupan de realizar los principales tipos de transporte activo y pasivo de la célula: difusión facilitada, contratransporte, etc. (Micocci, 2018)

**Carbohidratos:** Los carbohidratos, son conocidos como glúcidos, azúcares, hidratos de carbono o sacáridos; son moléculas formadas por carbono, hidrógeno y oxígeno, en proporción aproximada de 1:2:1. Si un carbohidrato se compone de una molécula de azúcar, se describe como monosacárido, si se enlazan dos monosacáridos se forma un disacárido y si enlazamos muchas unidades de monosacáridos se forma un polisacárido. (Audesirk, *et. al.*, 2008)

1. **Los monosacáridos:** son azúcares sencillos. En un monosacárido, casi todos los átomos de carbono tienen unido un grupo hidroxilo (-OH) y un hidrógeno (-H), de manera que los carbohidratos en general responden a la fórmula empírica  $(CH_2O)_n$  (donde n es el número de carbonos del esqueleto). Un carbono del monosacárido forma un doble enlace con un átomo de oxígeno, formándose un grupo carbonilo (-CO). En relación con la posición del grupo carbonilo, los monosacáridos se clasifican en aldosas o cetosas. Al poseer muchos grupos hidroxilos, los monosacáridos se pueden clasificar en polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas. (Audesirk, *et. al.*, 2008)
2. **Los disacáridos:** se forman por el enlace entre dos monosacáridos por una reacción de condensación (o síntesis por deshidratación). En esta reacción, se forma una molécula de agua luego de que un monosacárido pierde un átomo de hidrógeno y el otro monosacárido pierde un grupo hidroxilo. Es así como luego quedan unidos ambos monosacáridos por un enlace glucosídico, el cual consiste en un oxígeno

central unido covalentemente a dos carbonos, uno en cada anillo. (Audesirk, *et. al.*, 2008)

3. **Los polisacáridos:** son una macromolécula con unidades repetitivas de azúcares simples, por lo general glucosa; estos pueden ser de cadena larga y sencilla o ramificada. Son polisacáridos el almidón, el glucógeno y la celulosa. (Audesirk, *op cit.*, 2008)

### **Metabolitos secundarios**

**Alcaloides:** Los alcaloides han sido aislados de las plantas, de las cuales alrededor del 20% los contienen. Una gran cantidad de alcaloides han sido empleados en la medicina, y muchos de ellos aún son prominentes fármacos. En el grupo de sustancias químicas conocidas como alcaloides, alrededor d 12,000, se agrupan a una variedad de constituyentes químicos, por lo que se han estructurado de acuerdo con su origen biogénético. (Loyola, *et. al.*, 2004)

Con base en esta clasificación se tienen cuatro grupos:

- 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico.
- 2) alcaloides purínicos.
- 3) terpenos aminados.
- 4) alcaloides policétidos.

**Saponinas:** Los saponósidos o saponinas son heterósidos muy extendidos en el reino vegetal. Las saponinas tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad de las paredes celulares y destruir los hematíes por hemólisis.

Las saponinas, son heterósidos que constan de una parte glucídica (con uno o más azúcares) y de una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina. Los azúcares más frecuentes constituyentes de los dos tipos de saponósidos son la glucosa, galactosa, etc. Y en los saponósidos triterpénicos también es frecuente el ácido glucurónico. (López, 2001)

Los saponósidos se caracterizan por su capacidad, cuando se agita cualquier solución acuosa que los contenga, para producir espuma. La espuma se forma debido a que los saponósidos disminuyen la tensión superficial del agua, es decir, son tensioactivos naturales. (López, 2001)

**Cumarinas:** Las cumarinas son una gran clase de lactonas, de origen natural o sintético, constituidas por un anillo de benceno condensado a un anillo  $\alpha$ -pirona, y esencialmente poseen un sistema  $\pi$ - $\pi$  conjugado rico en electrones, que posee propiedades de transporte de carga. (Pinto, 2013)

En la naturaleza las cumarinas pueden encontrarse en diferentes familias de las Angiospermas. Las cumarinas son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos. Son lactonas y como tales en un medio alcalino sufren hidrólisis con formación de sales y solubilización de esta misma. (Pinto, 2013)

La diversidad estructural de los compuestos derivados de las cumarinas permite su clasificación en cumarinas simples, o bien en cumarinas más complejas en general condensadas con otros heterociclos: furocumarinas, piranocumarinas, biscumarinas, cumarinolignanos y triscumarinas. (Pinto, 2013)

**Taninos:** Son sustancias con solubilidad en agua y en alcohol. Por destilación seca aparecen dos tipos de fenoles polivalentes distintos: la pirocatequina, que con sales férricas da lacas verde negruzcas, y el pirogalol. Los taninos se encuentran en los espacios intermicelares de las paredes de las células del tejido parenquimatoso de toda la planta. Los ácidos tánicos formados en las hojas emigran a los órganos acilares perennes de la planta, el tronco y la raíz; pasando de la corriente que se mueve en el liber a los depósitos principales. (Martín, 1997)

Los taninos, ácidos tánicos o azúcares, son un conjunto de compuestos amorfos, generalmente de naturaleza glucósida, que presentan propiedades fisicoquímicas comunes.

Son colorantes, materias extractivas de secreción de la planta, que se encuentran universalmente, en mayor o menor cantidad, en el tejido vegetal. (Martin, 1997)

**Compuestos fenólicos:** Los compuestos fenólicos se considera un grupo muy diverso que se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH), de reacción ácida, unidos a un anillo aromático (grupo fenol). (Bowsher et. al., 2008)

Algunos compuestos fenólicos forman complejos con las proteínas e inhiben por lo tanto la actividad de ciertas enzimas. Los protocolos para el aislamiento de proteínas en el laboratorio incluyen pasos específicos necesarios para minimizar la interferencia de las sustancias fenólicas (Croteau *et al.*, 2000)

Las funciones biológicas de los compuestos fenólicos vegetales son un comprendiendo desde sustancias odoríferas y pigmentos que atraen a los agentes polinizadores, compuestos alelopáticos, componentes estructurales y agentes antifúngicos y antimicrobianos. Varios fenólicos cumplen funciones específicas para la planta, como componentes de germinación, protectores de radiación ultravioleta (UV), entre otros roles. Algunos compuestos fenólicos revisten gran importancia como materiales que contribuyen al soporte de las células. Forman parte integral de la estructura de las paredes celulares, principalmente los materiales poliméricos tales como ligninas, cutinas y suberinas, que actúan como soporte mecánico y barreras contra la invasión microbiana (Strack, 1997)

**Esteroles/Esteroides:** Los esteroles son compuestos que se encuentran distribuidos en los reinos: animal y vegetal. Los fitoesteroles y fitoestanoles son esteroles vegetales (compuestos con 28 o 29 átomos de carbono). Derivan del ciclopentano perhidrofenantreno. Los fitoestanoles están en menor proporción en el reino vegetal, pero se preparan por reducción química de los fitoesteroles. (Muñoz, et. al., 2011)

Los esteroides son más abundantes en las plantas que los esteroides. Están presentes en la membrana celular y proporcionan resistencia de la membrana al estrés, realizan funciones de protección, estructurales, transporte y señalización. (Sánchez y Garcia, 2022)

**Quinonas:** Las quinonas son muy comunes entre las plantas, en vegetales superiores o inferiores, en hongos, bacterias y en el reino animal como artrópodos y equinodermos. Funcionan como componentes de las cadenas de transporte de electrones que están involucrados en la fotosíntesis y la respiración celular. La exposición de los humanos a las quinonas es por la dieta o por los contaminantes del aire. Se clasifican en benzoquinonas, naftaquinonas o antraquinonas dependiendo de los anillos aromáticos que contengan. (Sánchez y García, 2022)

Se utilizan como antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, antimicrobianos, antitumorales y en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En la industria se aplican para la fabricación de colorantes, cosméticos, gelatinas, peróxido de hidrógeno, síntesis de compuestos orgánicos. (Sánchez y García, *op cit.*)

**Sesquiterpenolactonas:** Son metabolitos secundarios terpenoides que contienen 15 átomos de carbono con estructura isoprenoide y un grupo funcional lactona. Existen varios subtipos según el arreglo de sus esqueletos, los más representativos son los germacranólidos, eudesmanólidos y los guayanólidos. Subtipos menos representativos son los helenanólidos y pseudoguayanólidos. La mayoría de las lactonas sesquiterpénicas contienen un metileno anexo al ciclo conjugado con un grupo carbonilo, sus actividades biológicas se atribuyen a este grupo de átomos. (Sánchez y García, *op cit.*)

**Flavonoides:** Es la clase más numerosa de los compuestos fenólicos. Se biosintetizan a partir de la fenilalanina y de 3-malonil-CoA. Su producto es la estructura base y se cicla gracias a una enzima isomerasa. Se localizan principalmente en las partes aéreas de las plantas. Su

distribución está en diferentes órganos y en diferentes poblaciones de una misma especie. Los flavonoides comparten una estructura general de difenilpirano C6-C3-C6, formada por dos anillos de benceno (A y B) unidos a través de un anillo (C) de pirano y pueden tener un grupo carbonilo en la posición 4 formando así el anillo de pirona. (Sánchez y García, *op cit.*) Sus principales efectos son a nivel de venas o capilares: disminuyen la permeabilidad y aumentan la resistencia. Algunos son diuréticos, antiespasmódicos, antiulcerosos. Antinflamatorios, antialérgicos, antihepatotóxicos, antitromboticos, su acción antiviral y antialérgico, así como sus propiedades antitrombótca y antinflamatoria. Los flavonoides tienen efectos terapéuticos en la cardiopatía isquémica, la úlcera estomacal, la aterosclerosis, la diabetes y el cáncer. Se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Se utilizan como colorantes. (Sánchez y García, *op cit.*)

### **Etnobotánica**

La etnobotánica busca principalmente adquirir el conocimiento y rescatar el saber botánico tradicional, en algunas comunidades aun emplean plantas para afrontar las necesidades primarias de asistencia médica. Las plantas medicinales tienen una contribución importante en el sistema de salud de comunidades locales, ya que son usadas de manera frecuente por la mayoría de las poblaciones rurales. (Zambrano *et. al.*, 2015)

La medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de plantas medicinales. (OMS, 2002)

El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países. En México, los conocimientos sobre herbolaria se han transmitido en la población, principalmente de generación en generación, para el 45% de la población nacional es el único recurso con el que cuentan. (Zapparoli, 2012)

Las plantas tienen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza. Estos compuestos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones. Reciben también la denominación de productos naturales. (Avalos, 2009)

Los métodos de prospección siguen teniendo preferencia en la búsqueda de compuestos activos gracias a esto se ha prestado especial atención a la utilización de la etnobotánica en la búsqueda de compuestos con actividad biológica. (García, 2007)

Desde el punto de vista de la importancia taxonómica: México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas. De todas las plantas que tenemos en México sólo se han estudiado poco más de 500. (Muñeton. 2009)

La planta *Bidens Odorata cav.* conocida como Mozote se utiliza como planta medicinal en el estado de Veracruz más específicamente en la localidad de Limón chiquito el principal uso que se le da a esta planta es en el tratamiento de diversos desórdenes del aparato digestivo, tales como diarrea, vómito, dolor e infección estomacal. Se utilizan también contra la ictericia, como tranquilizante y antipiréticas. Y en otras alteraciones orgánicas como dolor de huesos, de cabeza y dolor de riñón. También para heridas, diabetes, mal de orín, anemia, irritación de la piel, contra la caída del cabello. Principalmente se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitusiva, catártica y hemostática. (BDMTM, 2009)

***Bidens Odorata cav.:***

Reino: Plantae, Subreino: Traqueobionta, Superdivisión: Spermatophyta, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Subclase: Compositae, Orden: Compuestas

Se registra en gran parte del país, como: Chiapas, Colima, Ciudad de México, Durango, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, entre otros. (BDMTM, 2009)

Es una especie muy variable, pero se puede identificar con la combinación de las siguientes características: hierba anual con cabezuelas, con 5 flores liguladas blancas y rosadas; tallo cuadrangular: hojas con 3-5 foliolos en la mayoría de los individuos de una población: frutos largos (los interiores por lo menos 10mm); raíz delgada. (BDMTM, 2009)



Imagen 6. Planta Mozote (*Bidens Odorata cav.*), foto tomada en Limón Chiquito, Veracruz.

## JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la organización mundial de la salud, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la población mundial. En México, en 2020, el cáncer de mama fue una de las enfermedades más frecuentes y la primera causa de muerte en mujeres. (SEGOB, 2022)

Los pacientes que padecen cáncer de mama tienen que llevar a cabo a tratamientos muy agresivos como lo son quimioterapias, radioterapias, entre otros. Estos tratamientos tienen efectos secundarios muy variados como lo son náuseas constantes, vómito frecuente, pérdida de peso, pérdida de cabello, cansancio, alta probabilidad de adquirir infecciones, entre otras; estos efectos conllevan desgaste físico y emocional bastante grande. Por otro lado, a nivel económico estos tratamientos son excesivamente costosos y de difícil acceso debido al desabasto que se puede encontrar actualmente en los hospitales. Por estas razones se busca proponer un tratamiento mediante la utilización de plantas medicinales que sea de bajo costo y fácil acceso para todo el público; y que tenga la posibilidad de reducir o interrumpir el

proceso del cáncer de mama. En esta investigación se estudian las propiedades antioxidantes de la planta *Bidens odorata cav.* para contrarrestar el estrés oxidativo que desarrolla el cáncer.

## **HIPÓTESIS**

*Bidens odorata cav.* posee propiedades de actividad antioxidante, que modulan el estrés oxidativo que conlleva el desarrollo del cáncer de mama.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la planta *Bidens odorata cav.* en modelos murinos de cáncer de mama, mediante marcadores de estrés oxidativo.

### **Objetivos particulares**

- Realizar un estudio etnobotánico de la planta *Bidens Odorata cav.* en la comunidad de Limón Chiquito, Veracruz.
- Realizar un análisis fitoquímico en la planta Mozote (*Bidens Odorata cav.*).
- Analizar los marcadores de estrés oxidativo (lipoperoxidación, óxido nítrico) en sangre e hígado de ratón.

## **ZONA DE ESTUDIO 6**

Limón Chiquito, es una localidad en el Municipio Cazonas del Estado de Veracruz y se encuentra en las coordenadas GPS: Longitud (dec): -97.281389 Latitud (dec): 20.678889. La

localidad se encuentra a una mediana altura de 10 metros sobre el nivel del mar. (INEGI, 2015)

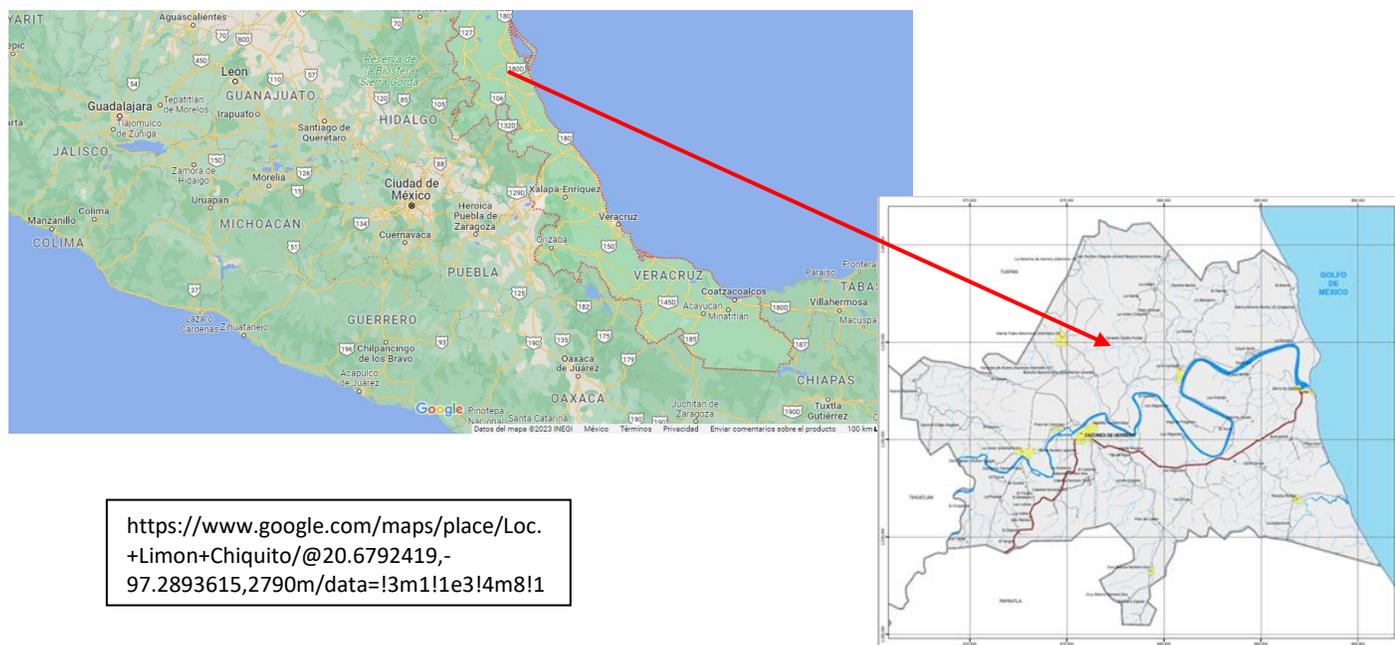


Imagen 7. Mapas de la ubicación de la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.

## MÉTODO

- **Caminata botánica**

Con la finalidad conocer los lugares donde se recolectaron los ejemplares de la planta *Bidens odorata cav.*, se realizó un registro fotográfico de *B. Odorata* en el ejido de Limón Chiquito. Posteriormente las recolectas de muestras se llevaron a cabo los días 21 y 22 de septiembre del 2018 en las coordenadas 20° 68' 06.85'' N y 97° 28' 42.16'' W, la tercera recolecta se realizó en el mes de febrero del 2019 en las coordenadas 20° 68' 00.18'' N y 97° 27' 90.37'' W. El material recolectado se utilizó en la elaboración de los extractos y en el análisis fitoquímico, también se preparó un ejemplar para su identificación con apoyo de taxónomos del Herbario de México (MEXU).

- **Registro etnobotánico**

Se realizó por medio de entrevistas etnobotánicas. Se entrevistaron a 50 personas; de la comunidad donde se encuentran hombres, mujeres, ancianos y jóvenes, se les preguntó acerca de algún tipo de conocimiento o información sobre las plantas medicinales que hay en su comunidad y más específico sobre la planta *Bidens odorata cav.*, esto con la finalidad de conocer los usos que se le dan a planta o a sus diferentes estructuras, nombres comunes con los que las conocen, las dosis y las formas de administrarse, efectos que puede tener en las personas, etc.

- **Preparación de extractos**

Se tomaron *in situ* 100g de hoja y tallo y de la planta completa, y 50g de flor y raíz debido a que había menos material de estas últimas dos estructuras, esto se empleó para la preparación de extractos acuosos e hidroalcohólicos.

Para los extractos acuosos se ocuparon 1000mL de agua para las estructuras de las que se tenían 100g y 500mL para las estructuras que se tenían 50g, con cada una de las estructuras se realizó un cocimiento durante 5 minutos, se dejó enfriar para después guardarlo en botellas de plástico. El material vegetal se separó para secarlo y guardarlo a parte, esto se realizó con cada una de las partes de planta por separado.

Para los extractos hidroalcohólicos se ocupó una solución hidroalcohólica al 70%, en una proporción de 1:10 de material vegetal/solución hidroalcohólica, cada una de las estructuras de la planta se pusieron cortadas en pequeños trozos dentro del envase de plástico con la solución realizada y se dejaron reposar por 1 mes en refrigeración.

- **Obtención de extractos secos.**

Todos los extractos se mantuvieron en refrigeración para su conservación una vez que se regresó de campo. Posteriormente en los extractos acuosos se maceró el material vegetal que

se guardó, después se filtró junto con el líquido y se sometió a baño maría para obtener el extracto seco.

Para los extractos hidroalcohólicos se almacenaron en refrigeración durante un mes desde su elaboración, después se maceraron la solución y el material vegetal, se filtraron para después evaporar el solvente, utilizando cristalizadores con el extracto en una campana de extracción y así obtener el extracto seco.

- **Pruebas de identificación rápida de metabolitos secundarios.**

Con el material vegetal, se realizaron *in situ* pruebas de colorimetría para identificar diferentes metabolitos secundarios.

- **Alcaloides**

Prueba de reactivo de Dragendorff, Mayer y Wagner.

Fundamento: Para la determinación de alcaloides se usó el reactivo de Dragendorff, Wagner y Mayer. Este experimento 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).

Método

- El reactivo de Dragendorff se preparó disolviendo 4g de nitrato de bismuto pentahidratado en 10 mL de ácido nítrico al 30% con una solución de 13.6g de yoduro de potasio en 50 mL de agua. La prueba es positiva si presenta un precipitado naranja o rojo.
- El reactivo de Wagner se disuelve 0.31g de yodo sublimado en 50 mL de agua y 0.5g de yoduro de potasio La prueba es positiva para alcaloides al dar precipitado marrón.

- El reactivo de Mayer se preparó disolviendo 0.65g de bicloruro de mercurio en 50 mL de agua y 2.5g de yoduro de potasio. La prueba es positiva si se presenta un precipitado blanco o crema.

- **Flavonoides**

#### Prueba de Shinoda

Fundamento: Reactivo de Shinoda: Se basa en que el Mg metálico es oxidado por el HCl, dando como productos H<sub>2</sub> (eliminando en forma de gas) y el MgCl<sub>2</sub>, 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).

- **Esteroles/Esteroides**

#### Prueba de Lieberman y Salkowski

Fundamento: La prueba es para triterpenos y compuestos esteroidales. Consiste en una reacción donde el esteroles 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 esteroles 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 Lieberman-Burchard: Se mezcló 1 ml de cloroformo y 1 mL de anhídrido acético, se agregaron a la muestra en un tubo de ensaye y posteriormente se agregaron gotas de ácido sulfúrico. Si presenta una coloración roja-naranja se indica que es positivo (Hinojosa et al., 2013).

- **Compuestos fenólicos**

Prueba de Folin-Ciocalteu

Fundamento: Se basa en la oxidación de los fenoles en medio básico, mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de complejos ácidos fosfowolframico 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).

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

- **Taninos**

Prueba de grenetina-NaCl, Prueba de cloruro férrico.

Fundamento: Reacción con Cloruro férrico. Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles, por lo que al igual que con los compuestos fenólicos se puede usar esta técnica para su identificación, al formarse el complejo con la unión del grupo fenóxido al hierro, pueden surgir distintas coloraciones lo que ayudara a diferenciar entre fenoles y taninos, una coloración rojo-vino indica compuestos fenólicos en general, una coloración verde intensa indicara taninos del tipo pirocatecólicos, mientras que una coloración azul señala la presencia de taninos del tipo pirogalol (Barrera, 2014).

Reacciona con grenetina- NaCl. Esta técnica se basa en la habilidad de los taninos para precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas (Isaza, 2007).

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 (Isaza, 2007).

Prueba de Cloruro Férrico: a 0.5 mL de cada extracto se le agregó 0.5 mL de cloruro férrico y 0.2 mL de agua, se observó el color producido. (Barrera, 2014).

- **Saponinas**

Prueba de espuma

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).

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).

- **Cumarinas**

Prueba de reactivo de Baljet

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: 1g de ácido pícrico se afora con 100mL de etanol (EtOH) al 50%; Solución B: 10g de NaOH disuelto en 100mL de agua destilada. (estas soluciones se mezclan hasta que se vaya a utilizar). 2) KOH al 10% en EtOH (50 mL de EtOH 96% y 5g de KOH). Coloración roja o naranja inestable (López et al., 2000).

- **Sesquiterpenolactonas**

Prueba de reactivo de Baljet.

Fundamento: La prueba de Baljet se basa en la formación de un complejo formado entre el ácido pícrico y la lactona  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  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).

- **Quinonas**

Prueba de solubilidad del Hidróxido de sodio al 5%

Fundamento: Las quinonas  $\alpha$ - y  $\beta$ - hidroxiladas con la solución de hidróxido de sodio al 5% dan coloraciones que van del amarillo pasando por el rojo al violeta, esta reacción sirve para saber si un determinado vegetal contiene pigmentos quinónicos (Simatupang, et. al. 1970)

Método: En tubo de ensayo se coloca la muestra y se agregan 0.2mL de etanol y 0.4mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5%, se observa si hay un cambio de coloración a violeta. (Simatupang, et. al. 1970)

- **Identificación de los metabolitos secundarios.**

- La identificación de los metabolitos en los extractos secos se realizó por medio de una solución de 0.1g de extracto seco en 1 mL de agua, a partir de esta se hicieron 3 diluciones: 0.01, 0.001 y 0.0001 g/mL. Las pruebas de identificación que se realizaron en cada una de las diluciones fueron las mismas pruebas de colorimetría antes mencionadas que se llevaron a cabo en campo.

- **Cuantificación de metabolitos primarios.**
- **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: Para la curva patrón se utilizó el método de DuBois, con una solución estándar de glucosa (0.1 mg/mL). Las muestras obtenidas se leyeron a 490 nm. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en (mg/mL). Se realizó lo que muestra la tabla siguiente:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (µL)	Agua (µL)	Fenol 5% (mL)	Ácido sulfúrico (mL)
Blanco	0	0	1000	0.5	2.5
1	0.01	100	900	0.5	2.5
2	0.02	200	800	0.5	2.5
3	0.04	400	600	0.5	2.5
4	0.06	600	400	0.5	2.5
5	0.08	800	200	0.5	2.5
6	0.1	1000	0	0.5	2.5

Tabla 1. Curva patrón de carbohidratos totales.

Los tubos se dejaron reposar por 10 minutos, seguido de una agitación durante 30 minutos y luego se colocaron en baño maría a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para los extractos se tomaron 1 mL.

- **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. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en (mg/mL). Se realizó lo que muestra la tabla siguiente:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (μL)	Agua (μL)	DNS (mL)
<b>Blanco</b>	0	0	500	0.5
<b>1</b>	0.4	100	400	0.5
<b>2</b>	0.8	200	300	0.5
<b>3</b>	1.2	300	200	0.5
<b>4</b>	1.6	400	100	0.5
<b>5</b>	2	500	0	0.5

Tabla 2. Curva patrón de carbohidratos reductores.

Los tubos se colocaron en baño maría a 100 °C por 5 minutos. Se enfrían a temperatura ambiente. Se agita y se realiza la lectura en espectrofotómetro. Para leer las muestras se colocan 0.5 mL de la muestra y se le añaden 5 mL de agua destilada.

- **Carbohidratos no reductores**

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

- **Lípidos**

Fundamento: Se fundamenta en que las muestras se calientan, al contar con ácido sulfúrico concentrado y el reactivo ácido fosfórico-vainillina donde se 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. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en (mg/mL). Se realizó lo que muestra la tabla siguiente:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (μL)	Cloroformo Metanol (μL)	Alícuota (μL)	Ac. Sulfúrico (mL)	Alícuota (μL)	Vainillina (mL)
Blanco	0	0	1000	100	1	100	2.9
1	0.5	50	950	100	1	100	2.9
2	1	100	900	100	1	100	2.9
3	2	200	800	100	1	100	2.9
4	4	400	600	100	1	100	2.9
5	6	600	400	100	1	100	2.9
6	8	800	200	100	1	100	2.9
7	10	1000	0	100	1	100	2.9

Tabla 3. Curva patrón de lípidos.

Los tubos se colocaron en baño maría a 100 °C por 5 minutos. Se enfrían a temperatura ambiente por 10 minutos. Se agita y se realiza la lectura en espectrofotómetro. Para leer las muestras se colocan 100 μL de la muestra.

- **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. Se realizó lo que muestra la tabla siguiente:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (μL)	Agua (μL)	Biuret mL
Blanco	0	0	1000	2
1	0.5	50	950	2
2	1	100	900	2
3	2	200	800	2

4	4	400	600	2
5	6	600	400	2
6	8	800	200	2
7	10	1000	0	2

Tabla 4. Curva patrón de proteínas.

Los tubos se dejaron reposar por 20 minutos. Se agita y se realiza la lectura en espectrofotómetro. Para leer las muestras se colocan 200  $\mu$ L de la muestra.

- **Cuantificación de metabolitos secundarios.**

Se preparó una solución de 0.5g de extracto seco en 5mL de agua destilada y a partir de esta se tomaron las cantidades solicitadas para cada una de las pruebas de cuantificación.

Las pruebas que se utilizaran fueron las siguientes:

- **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. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en mg/mL (Shamsa et al., 2008). Se realizó lo que muestra la tabla siguiente:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Buffer de fosfato (mL)	BCG (mL)	CHCL3 (mL)	Solución patrón ( $\mu$ L)	Cloroformo( $\mu$ L)
Blanco	0	2	2	5	0	1000
1	0.01	2	2	5	1000	0
2	0.008	2	2	5	800	200
3	0.006	2	2	5	600	400
4	0.004	2	2	5	400	600
5	0.002	2	2	5	200	800
6	0.001	2	2	5	100	900

Tabla 6. Curva patrón de alcaloides.

Después de colocar todos los reactivos se procede a hacer dos o tres lavados con cloroformo.

- **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 un patrón de ácido gálico 0.05 mg/ml. Las muestras se leyeron a 760 nm. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en la siguiente concentración (mg/mL). Se realizaron los pasos de la siguiente tabla:

Tubo	Concentración (mg/ml)	Agua (µL)	Patrón (µL)	Folin-Ciocalteu (µL)	Carbonato de sodio (µL)
Blanco	0	1000	0	500	1500
1	0.01	800	200	500	1500
2	0.02	600	400	500	1500
3	0.03	400	600	500	1500
4	0.04	200	800	500	1500
5	0.05	0	1000	500	1500

Tabla 6. Curva patrón de compuestos fenólicos.

Después de colocar el reactivo de Folin-Ciocalteu se agitan y se dejan reposar por 5 minutos.

Se agrega el carbonato de sodio, se agitan y se dejan reposar por 30 minutos en oscuridad.

- **Cumarinas**

Fundamento: Hay una modificación en la fluorescencia 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 patrón 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. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en la siguiente concentración (mg/ml). Se realizaron los pasos de la siguiente tabla:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (µL)	Agua (mL)	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (µL)	Sobrenadante (mL)	HCL 0.1M (mL)
Blanco	0	0	2	500	1	4
1	0.01	10	2	500	1	4
2	0.02	20	2	500	1	4
3	0.03	30	2	500	1	4
4	0.04	40	2	500	1	4
5	0.05	50	2	500	1	4
6	0.1	100	2	500	1	4

Tabla 7. Curva patrón de cumarinas.

Después de colocar Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> se centrifuga por 10 minutos a 3500 rpm

- **Esteroides/esteroles**

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 patrón 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. A 1 mL de cada una de esta solución se les agregará 1 mL del reactivo de Lieberman Bouchard, 1 mL de cloroformo se dejarán incubar por 10 minutos y se leerá la absorbancia a 626 nm. Para cada muestra: Se prepararán soluciones clorofórmicas de cada extracto, de cada una de ellas se tomará 1 mL al cual se le agregará 1 mL del reactivo de Lieberman-Bouchard, 1 mL de cloroformo se dejará reposar por 10 minutos, finalmente la absorbancia se leerá a 626 nm.

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (µL)	Cloroformo (mL)	Lieberman-Burchard (µL)
Blanco	0	0	1000	1000
1	0.2	200	800	1000
2	0.3	300	700	1000
3	0.4	400	600	1000
4	0.5	500	500	1000
5	0.6	600	400	1000

Tabla 8. Curva patrón de esteroides/esteroides.

- **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 patrón 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 patrón, en la dilución A se tomaron 500 µL del primer patrón 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 patrón, 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 obscuridad durante 30 minutos y posteriormente medir en espectrofotómetro a 415 nm (Venegas, 2012).

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (µL)	R-0H 96% (µL)	AlCl3 10 % (mL)	CH3CO2K (mL)
<b>Blanco</b>	0	0	1000	1	1
<b>1</b>	0.002	250	250	1	1
<b>2</b>	0.004	500	500	1	1
<b>3</b>	0.006	750	250	1	1
<b>4</b>	0.008	1000	0	1	1

Tabla 9. Curva patrón de flavonoides.

- **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 patrón de quercetina (1mg/mL), la cual se conservó en un frasco ámbar y en refrigeración. Las muestras se leyeron a 415 nm. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en la concentración que se muestra en la tabla.

Tubo	Concentración (mg/mL)	Patrón (µL)	Metanol (µL)	Metanol (mL)	AlCl3 (mL)
<b>Blanco</b>	0	0	1000	1	1
<b>1</b>	0.02	20	980	1	1
<b>2</b>	0.04	40	960	1	1
<b>3</b>	0.06	60	940	1	1

4	0.08	80	920	1	1
5	0.1	100	900	1	1
6	0.2	200	800	1	1
7	0.3	300	700	1	1
8	0.4	400	600	1	1

Tabla 10. Curva patrón de quinonas.

Después de agregar todos los reactivos se dejó reaccionar por 10 minutos, para registrar las lecturas correspondientes.

- **Saponinas**

Fundamento: Se fundamenta en la separación por hidrólisis ácida (anhídrido acético-ácido sulfúrico al 16 %) de carbohidratos y del aglicon 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 patrón de sapogenina (20 mg/mL), la cual se conservó en un frasco ámbar. Las muestras se leyeron a 485 nm. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en la siguiente concentración (mg/ml). Se realizaron los pasos de la siguiente tabla:

Tubo	Concentración (mg/mL)	Sapogenina (µL)	Agua (µL)	Anhídrido acético (mL)	Ácido sulfúrico 16 % (mL)
Blanco	0	0	1000	1000	1000
1	0.01	1000	0	1000	1000
2	0.008	800	200	1000	1000
3	0.006	600	400	1000	1000
4	0.004	400	600	1000	1000
5	0.002	200	800	1000	1000

Tabla 11. Curva patrón de saponinas.

Se dejaron reposar por 15 minutos a temperatura ambiente, después se procedió a realizar las lecturas en espectrofotómetro.

- **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 biogénicamente 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  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  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  $\mu$ L. Se preparan 3 disoluciones (miligramos/mililitro) a partir del patrón 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. Tabla para la preparación de la curva patrón:

Tubo	Patrón ( $\mu$ L)	R-0H 96% ( $\mu$ L)	Picrato de sodio (mL)	Concentración (mg/mL)
Blanco	0	1000	2	0
1	500	500	2	0.5
2	750	250	2	0.75
3	1000	0	2	1000

Tabla 12. Curva patrón de sesquiterpenolactonas.

- **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 patrón 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. Las concentraciones obtenidas fueron expresadas en la siguiente concentración (mg/ml). Se siguieron los pasos de la tabla siguiente y después se agito en un vortex por 1 minuto. Posteriormente se calentó en un baño de agua a 25 grados durante 7 minutos y luego se leyó a 550 nm en espectrofotómetro.

Tubo	Concentración (mg/mL)	Acido tánico (µL)	Acetona (µL)	Yodato de potasio (µL)
Blanco	0	0	1000	1000
1	0.01	1000	0	1000
2	0.006	600	400	1000
3	0.004	400	600	1000
4	0.002	200	800	1000
5	0.001	100	900	1000

Tabla 13. Curva patrón de taninos.

- **Determinación de la capacidad antioxidante, método DPPH (2,2-difenil-picrihidrácido)**

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

Preparación de reactivos

- **Ácido gálico (2 mg/mL):** Se pesaron 2 mg de ácido gálico en 10 mL de etanol al 96%. Solución stock. La concentración del ácido gálico es 1175.64  $\mu$ M.
- **DPPH:** Se pesaron 3.9 mg del radical y se disolvió en 100 mL de etanol al 96%. La solución se agito por 20 minutos en completa oscuridad.
- Etanol al 96%

Se dejaron reposar por 1 hora a temperatura ambiente, en completa oscuridad. Como blanco se utilizó etanol.

Para las muestras se tomaron 100  $\mu$ L de muestra y se colocaron 2.9 mL de DPPH.

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

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (1 - am/ac) + 100$$

Donde:

- Am es la absorbancia de la solución problema
- Ac es la absorbancia de la solución DPPH control

TUBO	Concentración (mg/mL)	Ácido gálico ( $\mu$ L)	Concentración ácido gálico ( $\mu$ L)	Etanol al 96% ( $\mu$ L)	DPPH (mL)
1	.05	375	146.95	2625	2.9
2	.1	1500	587.80	1500	2.9
3	.15	2250	881.73	750	2.9
4	.175	2625	1028.68	375	2.9

Tabla 14. Curva patrón de DPPH.

- **Modelo experimental.**

Para el modelo experimental se ocuparon 62 ratones hembra de la cepa CD1 del bioterio FES Zaragoza, UNAM, los cuales se clasificaron en 11 grupos experimentales. Los ratones fueron

marcados con una numeración en las orejas mediante pequeñas perforaciones en lugares específicos de acuerdo con número que le correspondía, se marcaron del 1 al 62 para su fácil identificación.

- **Diseño experimental formación de grupos de ratones**

La organización para formar los grupos experimentales fue la siguiente:

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Números de ratones que conforman el grupo</b>
<b>1</b>	Grupo control (ratones sin inducción de cáncer, sin tratamiento y sin aceite de oliva)	1,2,3,4,5,6
<b>2</b>	Grupo DMBA (ratones inducidos a cáncer con una única dosis)	7,8,9,10,11,12
<b>3</b>	Grupo Flor (ratones que solo se les administrara diariamente el extracto acuoso de flor durante 30 días)	13,14,15,16,17,18
<b>4</b>	Grupo Hoja (ratones que solo se les administrara diariamente el extracto acuoso de hoja durante 30 días)	19,20,21,22,23,24
<b>5</b>	Grupo planta completa (ratones que solo se les administrara diariamente el extracto acuoso de planta completa durante 30 días)	25,26,27,28,29,30
<b>6</b>	Grupo Raíz (ratones que solo se les administrara diariamente el extracto acuoso de raíz durante 30 días)	31,32,33,34,35,36
<b>7</b>	Grupo flor + DMBA (ratones inducidos a cáncer con DMBA con una única dosis, y se les administrara diariamente el extracto de flor durante 30 días)	37,38,39,40,41,42
<b>8</b>	Grupo hoja + DMBA (ratones inducidos a cáncer con DMBA con una única dosis, y se les administrara diariamente el extracto de hoja durante 30 días)	43,44,45,46,47,48

<b>9</b>	Grupo planta completa + DMBA (ratones inducidos a cáncer con DMBA con una única dosis, y se les administrara diariamente el extracto de planta completa durante 30 días)	49,50,51,52,53,54
<b>10</b>	Grupo raíz + DMBA (ratones inducidos a cáncer con DMBA con una única dosis, y se les administrara diariamente el extracto de raíz durante 30 días)	55,56,57,58,59,60
<b>11</b>	Vehículo (ratones que se les administro aceite de oliva)	61,62

Tabla 15. Diseño experimental de grupos de ratones.

- **Inducción de cáncer de mama**

A los grupos de ratones que se les administro DMBA (concentrado), se les dio una dosis de 2 mg/g diluido en aceite de oliva, esto fue de acuerdo con su peso al momento, después se mantuvieron en observación por tres meses registrando su peso semanal y cada uno los cambios que fueron presentando.

- **Tratamiento con extractos**

El tratamiento con los extractos se comenzó a suministrar después de los tres meses transcurridos de inducción con DMBA, el tratamiento que se les dio a los ratones fue de acuerdo con la dosis recomendada indicada en las entrevistas etnobotánicas.

La dosis de los extractos administrada a los ratones fue de acuerdo con la proporción entre el peso y la dosis recomendada para un adulto de alrededor de 65 kg, el tiempo de duración del tratamiento fue de 30 días indicado en las entrevistas etnobotánicas por los pobladores de la comunidad.

- **Obtención de plasma sanguíneo y de homogenado de hígado**

Posterior al término del tratamiento se comenzaron a sacrificar diariamente a los ratones de acuerdo con cómo se les fue induciendo a cáncer con DMBA y como se les fue administrando el tratamiento.

Se sacrificaron por decapitación en grupos de 10 o 11 ratones uno de cada grupo, la sangre obtenida fue depositada en tubos Vacutainer con heparina para después ser centrifugados a 3500 rpm durante 10 min., esto para obtener el plasma y posteriormente ser conservados en frío.

Posteriormente se disecciono el cuerpo de cada ratón para extraer el hígado, el bazo y se revisó si no tiene algún tumor o presentaban alguna anomalía; el hígado se pesó y se colocó en solución fisiológica fría, después se realizó una perfusión de cada hígado con solución fisiológica al 0.9% y se macero con un amortiguador PBS (Buffer TRIS/pH 7.5) manteniéndolo a una temperatura de 4 °C, el macerado se depositó en tubos Ependorff y fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 min. para obtener el homogenado.

- **Evaluación de actividad antioxidante por medio de marcadores de estrés oxidativo.**

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

Las pruebas utilizadas fueron las siguientes:

- Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Método de TBARS)
- Cuantificación de óxido nítrico (Método modificado de Griess)

- Cuantificación de proteínas totales (Método de Biuret)
- **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, 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  $\mu$ L de muestra de sangre, se añadieron 100  $\mu$ L de sulfato de hierro  $\text{FeSO}_4$ , 100  $\mu$ L de buffer TRIS-HCl pH 3.5 y 100  $\mu$ L de ácido ascórbico, se incubaron por 15 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ , se añadió 1 mL de TCA concentrado y 2 mL de TBA concentrado y se colocaron en incubación a 100  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ L, 200  $\mu$ L 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:

$$C = A_{532} / EP$$

Donde

E = Coeficiente de extinción molar del MDA a 532

P = Grosor o diámetro de la fotocelda

- **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 determinará 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. Al ser un método colorimétrico se lee la absorbancia en espectrofotómetro dando tonos magenta y leyéndose a 540 nm (Adarmes et. al, 2009).

En cuanto a la lectura de la concentración en muestras para la sangre se tomaron 50  $\mu$ L de muestra y para homogenado 500  $\mu$ L, posteriormente se agregó 1 mL de sulfanilamida 2% y 500  $\mu$ L de agua, se dejó reposar en obscuridad durante 15 minutos, después se anexo 1 mL de NED 0.1% y se dejó reposar otros 15 minutos en obscuridad. Luego se procedió a tomar lectura en el espectrofotómetro a 540 nm.

Tubo	Solución stock ( $\mu$ L)	Agua ( $\mu$ L)	Sulfanilamida (mL)	NED (mL)
Blanco	0	1000	1	1
1	200	800	1	1
2	400	600	1	1
3	600	400	1	1
4	700	300	1	1

5	800	200	1	1
6	900	100	1	1

Tabla 16. Curva patrón de nitritos.

- **Cuantificación de proteínas (Método de Biuret)**

Se utilizó el método de Biuret (método colorimétrico) 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  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos  $\text{NH}_4$  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, et. al., 2012).

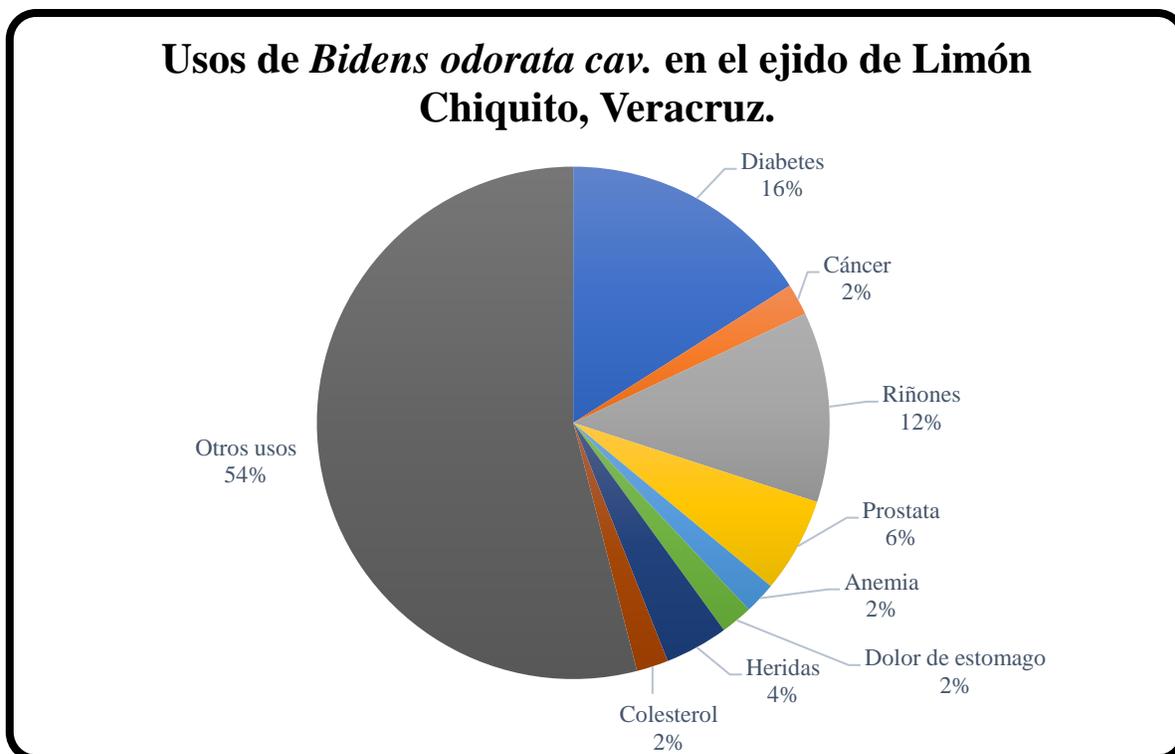
Se realizó una curva de calibración con un patrón de albumina (10 mg/mL) y 2 mL de Biuret. Para la cuantificación de proteínas en sangre se ocuparon 50  $\mu\text{L}$  de muestra mientras que para el homogenado se ocuparon 500  $\mu\text{L}$ , en ambas se completó con agua y 2 mL de Biuret mientras se dejó reposar por 20 minutos.

Tubo	Solución stock ( $\mu\text{L}$ )	Biuret (mL)	Agua ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	2	1000
1	200	2	800
2	400	2	600
3	600	2	400
4	800	2	200

Tabla 17. Curva patrón de proteínas.

## RESULTADOS

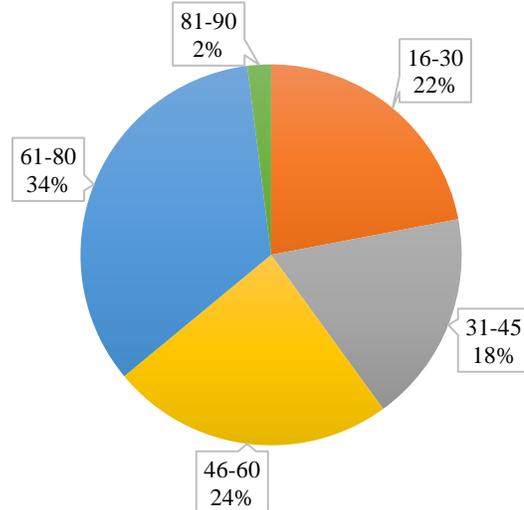
En la Gráfica 1 se observan los diferentes usos que se dan a mozote en la comunidad, destaca la diabetes con 16%, seguido de las enfermedades en el riñón. Es importante resaltar que su uso en la disminución de colesterol, y en la anemia no ha sido reportado.



Gráfica 1. Diferentes usos medicinales que las personas le dan a la planta *Bidens odorata cav.* en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.

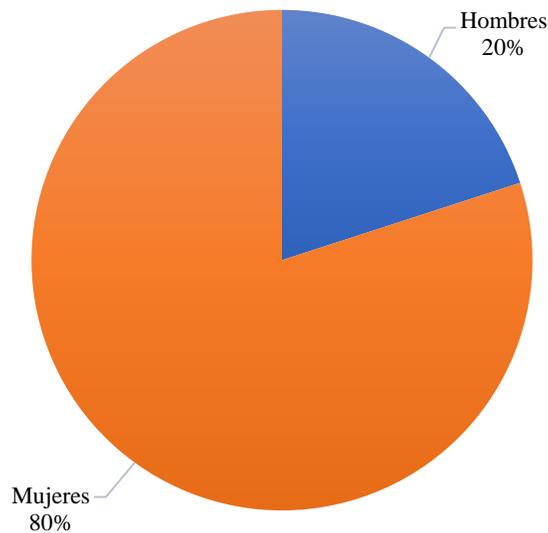
Las personas de la tercera edad y las mujeres son las personas que mayores conocimientos tenían acerca de la planta, y también las que mayor uso medicinal le dan.

### Rango de edades de las personas entrevistadas.



Gráfica 2. Se muestra el rango de edades de las personas entrevistadas.

### Personas entrevistadas en la comunidad.



Gráfica 3. Género de las personas entrevistadas.

Resumen sobre cómo es la forma de uso y preparación de las infusiones que toman como tratamiento de la planta:

Usos: Medicinal y alimento para animales de crianza
Forma de preparación: Hervida
Partes de las plantas que utilizan: hojas, raíz, flor y planta completa sin raíz
Frecuencia de uso: <ul style="list-style-type: none"><li>• Diaria, durante un mes (agua de tiempo)</li><li>• 15 días de toma y 15 días de reposo (agua de tiempo)</li><li>• 3 días por semana (agua de tiempo)</li></ul>

De acuerdo con la tabla de identificación preliminar hecha en campo, podemos observar que el material vegetal *in vivo* presenta una mayor presencia de los metabolitos secundarios como los alcaloides, sesquiterpenlactonas y cumarinas.

Tabla 18. Estudio preliminar de metabolitos secundarios.

Metabolitos secundarios	Prueba	Observaciones	Hoja	Tallo	Raíz	Flor
<b>Alcaloides</b>	Prueba de reactivo de Dragendorff	En todas las estructuras se mostró una coloración marrón	+++	+++	+++	+++
	Prueba del reactivo de Wagner	Se mostró una coloración anaranjada, siendo más intenso en hoja y flor	+++	++	++	+++
	Prueba de reactivo de Mayer	Solo se mostró un pequeño precipitado en raíz y flor	-	-	+	+
<b>Flavonoides</b>	Prueba de Shinoda	Se mostró un cambio de coloración a casi negro en hoja, flor, y un poco en raíz	+++	-	++	+++
<b>Esteroles/Esteroides</b>	Prueba de Lieberman	Se notó un cambio de coloración a amarillenta en la flor y un poco en la hoja	+	-	-	+++
	Prueba de Salkowski	Solo se mostró un cambio de coloración a amarillenta en hoja y flor	++	-	-	+++
<b>Compuestos fenólicos</b>	Prueba de cloruro férrico	Solo se mostró un cambio de coloración a más oscuro en hoja y flor	++	-	-	++
<b>Taninos</b>	Prueba de Gelatina-sal	Solo se pudo mostrar un precipitado en raíz y uno más pequeño en hoja y flor	+	-	+++	+
	Prueba de Cloruro férrico	Solo se mostró un precipitado en la raíz	-	-	++	-
<b>Saponinas</b>	Prueba de Espuma	Solo se notó una pequeña cantidad de espuma en la raíz	-	-	+	-
<b>Cumarinas</b>	Prueba de reactivo de baljet	Se notó un cambio mayor a negro en hoja, y un cambio a marrón en raíz y flor	+++	-	++	++
<b>Sesquiterpen-lactonas</b>	Prueba de Reactivo de baljet	Se mostró una coloración marrón a anaranjado más intensa en flor, tallo y hoja	+++	+++	++	+++
<b>Quinonas</b>	Prueba de Hidróxido de sodio al 5%	Solo se mostró cambio de coloración a amarillenta en flor y raíz	-	-	++	+++

+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado

Tabla 19. Características de los extractos hidroalcohólicos secos.

<b>Rendimiento de Extractos Hidroalcohólicos</b>			
<b>Estructura</b>	<b>Características de los extractos</b>	<b>Cantidad de muestra obtenida</b>	<b>Cantidad de muestra recolectada</b>
<b>Tallo</b>	Coloración verde muy claro.	2.51g	100g
<b>Flor</b>	Coloración amarillenta.	2.06g	50g
<b>Hoja</b>	Coloración verde intenso.	4.60g	100g
<b>Raíz</b>	Coloración marrón claro.	1.04g	50g
<b>Planta Completa</b>	Coloración verde intenso.	3.39g	100g

Tabla 20. Características de los extractos acuosos secos.

<b>Rendimiento de extractos acuosos</b>			
<b>Estructura</b>	<b>Características de los extractos</b>	<b>Cantidad de muestra obtenida</b>	<b>Cantidad de muestra recolectada</b>
<b>Tallo</b>	Coloración verde claro.	3.44g	100g
<b>Flor</b>	Coloración amarillenta.	2.10g	50g
<b>Hoja</b>	Coloración verde intenso.	4.41g	100g
<b>Raíz</b>	Coloración marrón claro.	1.45g	50g
<b>Planta Completa</b>	Coloración marrón.	2.83g	100g

Tabla 21. Resultados de las pruebas de identificación en los extractos antes del proceso de secado.

Metabolitos secundarios	Pruebas	Extractos Acuosaos				Extractos Hidroalcohólicos			
		Hoja	Tallo	Raíz	Flor	Hoja	Tallo	Raíz	Flor
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Wagner	+++	++	++	+++	+++	++	++	+++
	Mayer	-	-	+	+	+++	+++	+	+++
Flavonoides	Shinoda	+++	-	++	+++	+++	-	+	+++
Esteroles/Esteroides	Lieberman	+	-	-	+++	+	-	-	++
	Salkowski	++	-	-	+++	+	-	-	++
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Taninos	Gelatina-sal	+	-	+++	+	+++	-	+++	+++
	FeCl <sub>3</sub>	-	-	++	-	+++	-	++	+++
	Formaldehido	++	++	+++	++	+++	++	++	+++
Saponinas	Espuma	-	-	+	-	-	-	+	-
Cumarinas	Baljet	+++	-	++	++	+++	-	++	++
Sesquiterpenolactonas	Baljet	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
Quinonas	NaOH 5%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado

Tabla 22. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios a diferentes concentraciones (0.01, 0.001, 0.0001) en extractos acuosos.

Metabolitos secundarios	Pruebas	mg/ml	Extractos Acuosos											
			Hoja			Tallo			Raíz			Flor		
			0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001
Alcaloides	Dragendorff		+++	++	++	+++	++	+	+++	++	+	+++	+++	++
	Wagner		+++	++	++	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	++
	Mayer		+	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-
Flavonoides	Shinoda		+++	+++	++	++	+	-	++	++	+	+++	++	++
Esteroles/Esteroides	Lieberman		++	+	-	+	-	-	+	-	-	+++	++	++
	Salkowski		++	++	+	+	-	-	+	-	-	+++	++	++
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico		+++	++	++	+++	+	-	++	+	-	+++	++	+
Taninos	Gelatina-Sal		+++	++	+	++	+	-	+++	++	+	++	+	+
	FeCl <sub>3</sub>		+++	+	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	+	-
Saponinas	Espuma		+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Cumarinas	Baljet		+++	++	+	++	+	-	++	+	+	+++	++	+
Sesquiterpenolactonas	Baljet		+++	++	+	++	+	-	++	+	+	+++	++	+
Quinonas	NaOH al 5%		+++	++	++	+++	++	++	+++	++	+	+++	++	++

+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado

Tabla 23. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios a diferentes concentraciones (0.01, 0.001, 0.0001) en extractos hidroalcohólicos.

		Extractos Hidroalcohólicos												
		Hoja			Tallo			Raíz			Flor			
Metabolitos secundarios	Pruebas	mg/ml	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001
Alcaloides	Dragendorff		+++	++	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+
	Wagner		+++	++	+	+++	++	+	+	-	-	+++	++	+
	Mayer		+++	+	-	++	+	-	++	+	-	+++	+	-
Flavonoides	Shinoda		+++	++	+	++	+	-	++	++	+	+++	++	+
Esteroles/Esteroides	Lieberman		+++	++	+	++	+	-	+++	++	-	+++	++	+
	Salkowski		++	+	+	++	+	-	++	+	-	+++	++	++
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico		+++	-	-	+++	++	+	+++	++	-	+++	-	-
Taninos	Gelatina-Sal		+++	++	++	++	+	-	+++	++	+	+++	++	+
	FeCl <sub>3</sub>		+++	++	-	++	+	-	+++	+	-	+++	++	-
Saponinas	Espuma		+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Cumarinas	Baljet		+++	++	++	++	+	-	+++	++	+	+++	++	++
Sesquiterpenlactonas	Baljet		+++	++	+	++	+	-	+++	++	+	+++	++	+
Quinonas	NaOH al 5%		+++	++	++	+++	++	+	+++	++	+	+++	+++	++

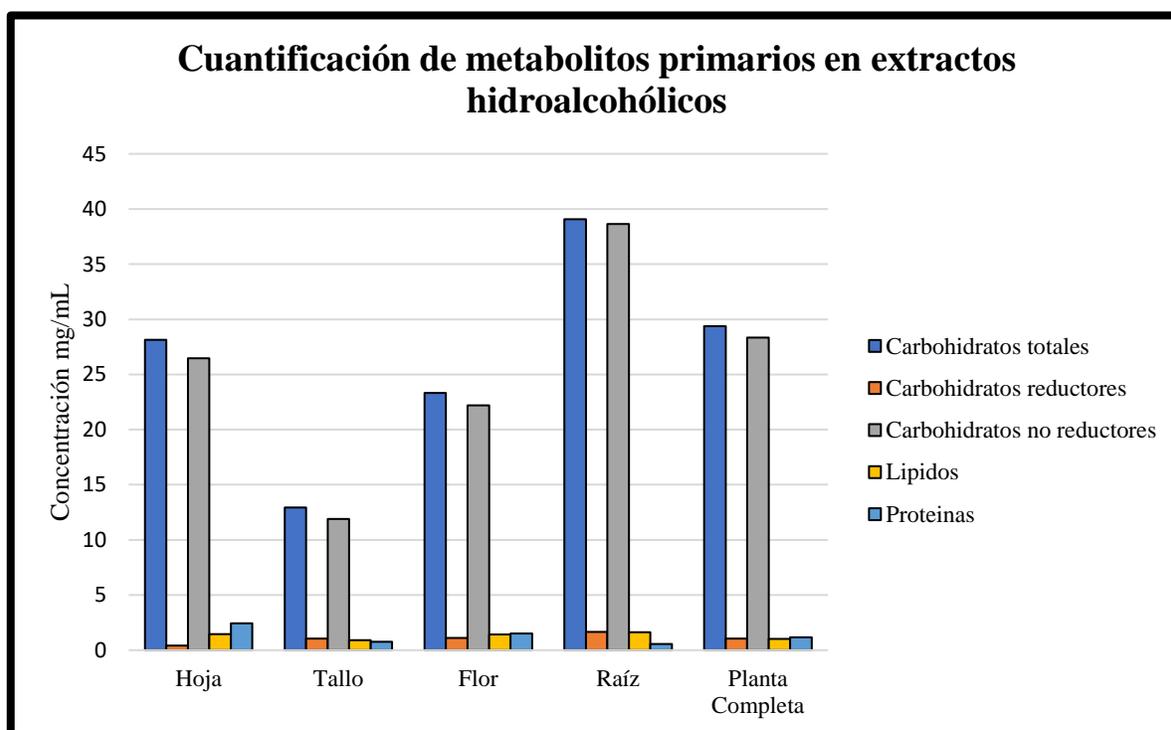
+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado

- **Cuantificación de metabolitos primarios y secundarios.**

En los resultados de las cuantificaciones realizadas de los metabolitos secundarios, podemos observar que las sesquiterpenolactonas son las que se encuentran en mayor cantidad, seguidas de los esteroides/esteroles, después las quinonas y cumarinas, y en una cantidad baja los compuestos fenólicos.

Tabla 24. Concentraciones de metabolitos primarios en extractos hidroalcohólicos (mg/mL).

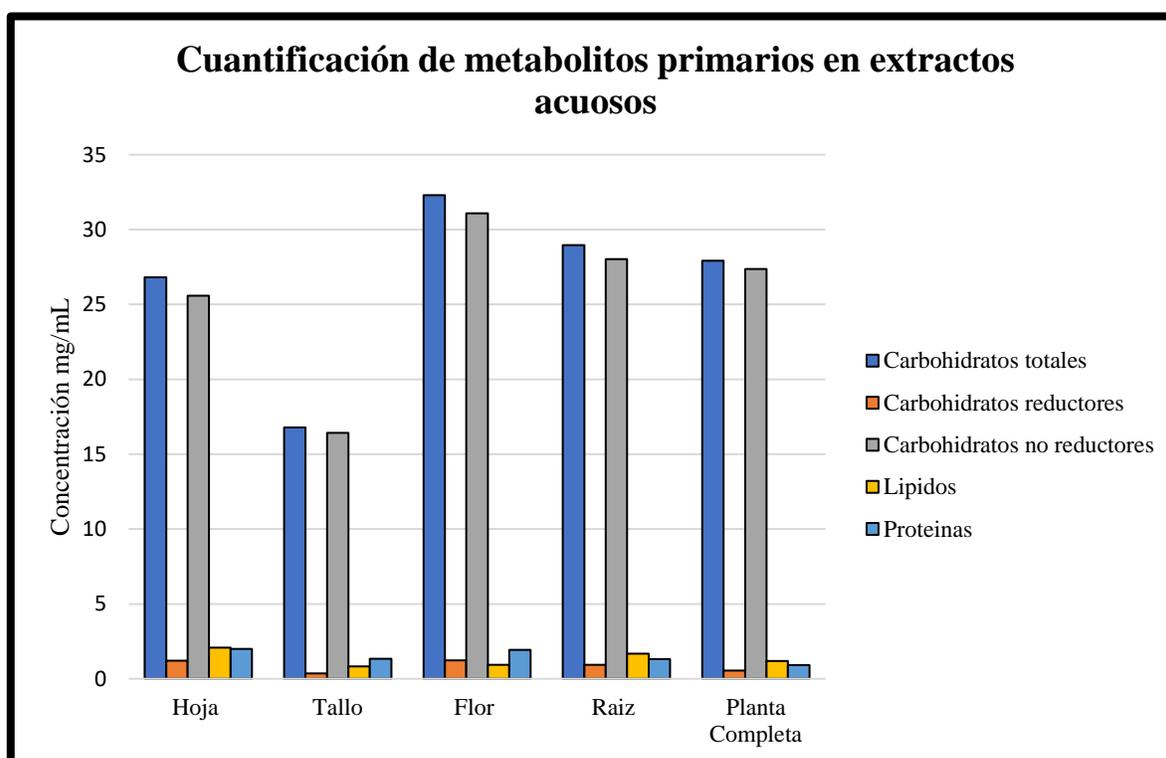
	Extractos Hidroalcohólicos				
	Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Planta Completa
<b>Carbohidratos totales</b>	28.1297869	12.9508425	23.3254421	39.0614121	29.38309428
<b>Carbohidratos reductores</b>	0.40770941	1.03965901	1.11749444	1.6641957	1.037805782
<b>Carbohidratos no reductores</b>	26.4655912	11.9111835	22.2079477	38.6537026	28.34528849
<b>Lípidos</b>	1.45285935	0.89644513	1.42194745	1.62287481	1.035548686
<b>Proteínas</b>	2.43243243	0.75391181	1.50782361	0.56899004	1.166429587



Gráfica 4. Resultado de las cuantificaciones en metabolitos primarios en extractos hidroalcohólicos.

Tabla 25. Concentraciones de metabolitos primarios en extractos acuoso (mg/mL)

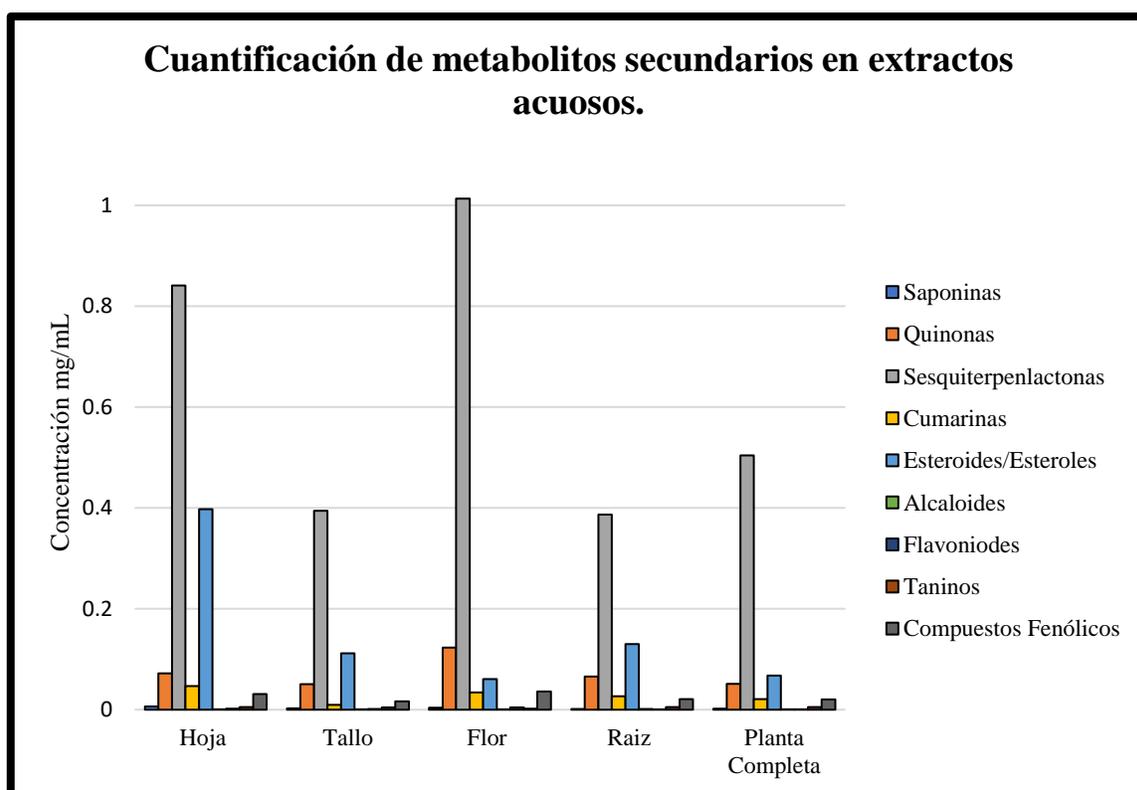
	Extractos Acuoso				
	Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Planta Completa
<b>Carbohidratos totales</b>	26.8068514	16.7803927	32.3074781	28.9653252	27.92090238
<b>Carbohidratos reductores</b>	1.21386212	0.35767235	1.22683469	0.9414381	0.550407709
<b>Carbohidratos no reductores</b>	25.5929893	16.4227204	31.0806434	28.0238871	27.37049467
<b>Lípidos</b>	2.08655332	0.81916538	0.92735703	1.68469861	1.190108192
<b>Proteínas</b>	1.99146515	1.3371266	1.93456615	1.32290185	0.910384068



Gráfica 5. Resultados de las cuantificaciones de metabolitos primarios en extractos acuoso.

Tabla 26. Concentraciones de metabolitos secundarios en extractos acuosos (mg/mL).

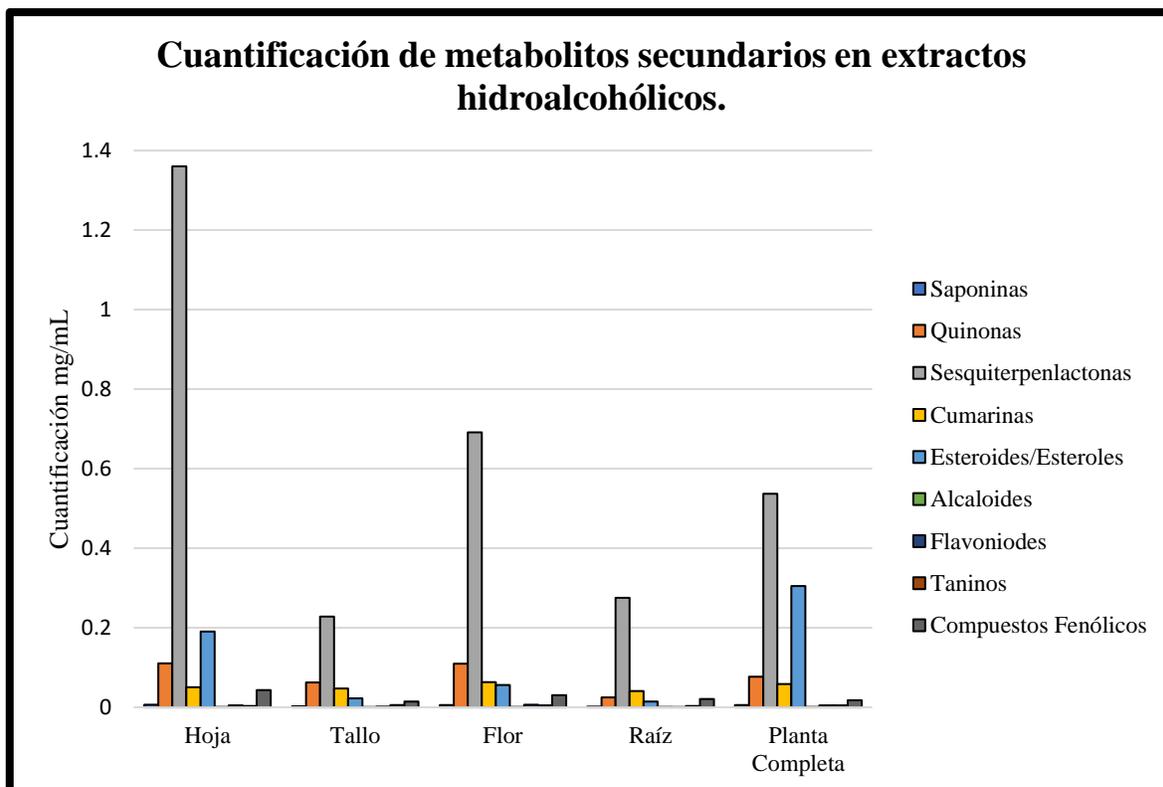
	Extractos Acuoso				
	Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Planta Completa
<b>Saponinas</b>	0.00636254	0.00265106	0.00371148	0.00127251	0.002014804
<b>Quinonas</b>	0.07181102	0.0503937	0.12283465	0.06551181	0.051023622
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	0.84078875	0.39437648	1.01332846	0.38707322	0.503925507
<b>Cumarinas</b>	0.04663652	0.00942152	0.03391747	0.02661579	0.021198417
<b>Esteroides/Esteroles</b>	0.39768811	0.11188292	0.06097884	0.12991145	0.067341853
<b>Alcaloides</b>	0.00101386	0.0007019	0.00079103	0.00124783	0.000991577
<b>Flavonoides</b>	0.00187287	0.00163746	0.0048339	0.00031912	0.000957363
<b>Taninos</b>	0.00539289	0.00439036	0.00176306	0.00518547	0.005220037
<b>Compuestos Fenólicos</b>	0.03101638	0.01649261	0.03612395	0.0207727	0.020572961



Gráfica 6. Resultados de las cuantificaciones de metabolitos secundarios en extractos acuosos.

Tabla 27. Concentraciones de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos (mg/mL).

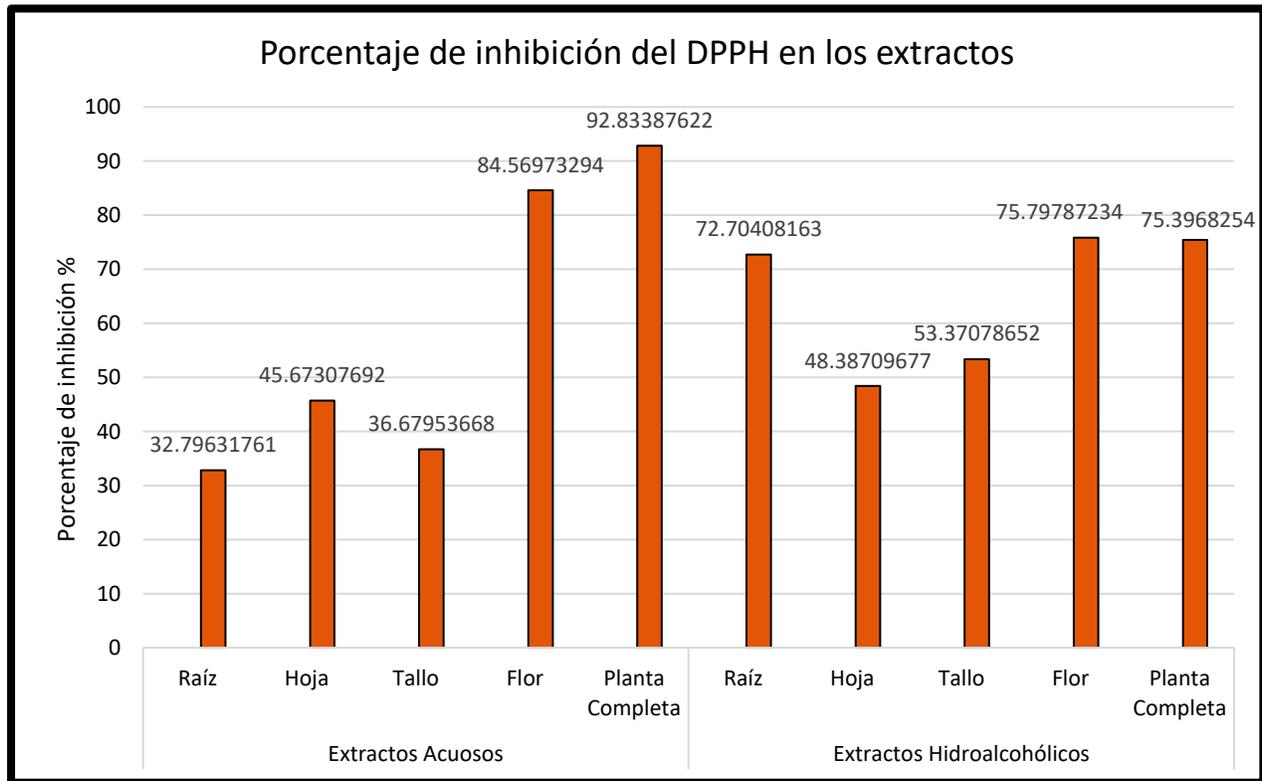
	Extractos Hidroalcohólicos				
	Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Planta Completa
<b>Saponinas</b>	0.00668066	0.0027571	0.00562024	0.00180272	0.005726284
<b>Quinonas</b>	0.11086614	0.06299213	0.1096063	0.02519685	0.076850394
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	1.3602337	0.22822713	0.69107175	0.27569838	0.536790214
<b>Cumarinas</b>	0.05040513	0.04781421	0.06359525	0.04074807	0.058413416
<b>Esteroides/Esteroles</b>	0.19036004	0.02227053	0.05620659	0.01431677	0.305424466
<b>Alcaloides</b>	0.00084674	0.00053478	0.00103614	0.00111413	0.000924729
<b>Flavonoides</b>	0.00486529	0.00185718	0.00659691	0.00064871	0.004755428
<b>Taninos</b>	0.00376811	0.00615342	0.00497805	0.00342241	0.004839769
<b>Compuestos Fenólicos</b>	0.04371398	0.01443817	0.0304457	0.02117217	0.017748102



Gráfica 7. Resultados de las cuantificaciones de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos.

El porcentaje de inhibición en los extractos acuosos nos muestra que las estructuras de planta completa y flor son las que tienen mayor efecto antioxidante sobre la oxidación del DPPH. Mientras que en los extractos hidroalcohólicos se muestra que todas las estructuras tienen una buena capacidad antioxidante siendo la raíz, flor y planta completa las que tienen un mayor porcentaje de inhibición.

Pero en general todos los extractos demostraron tener una buena capacidad antioxidante al tener más del 20% de porcentaje de inhibición del DPPH.



Gráfica 8. Porcentaje de inhibición de DPPH



Imagen 8. Algunos ratones mostraron pérdida de pelaje durante la administración del tratamiento.

Imagen 9. Algunos ratones mostraron pérdida de los bigotes durante el tratamiento.

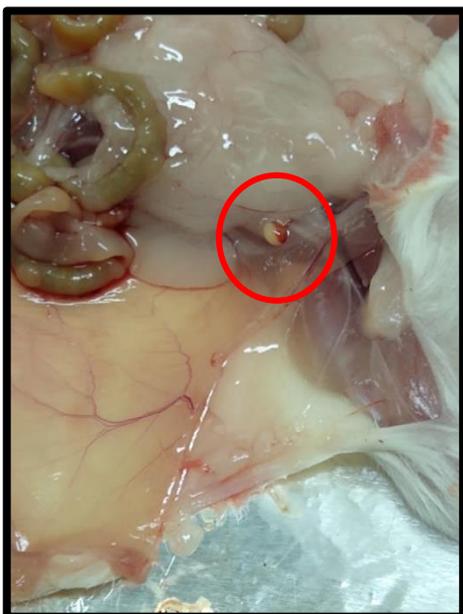
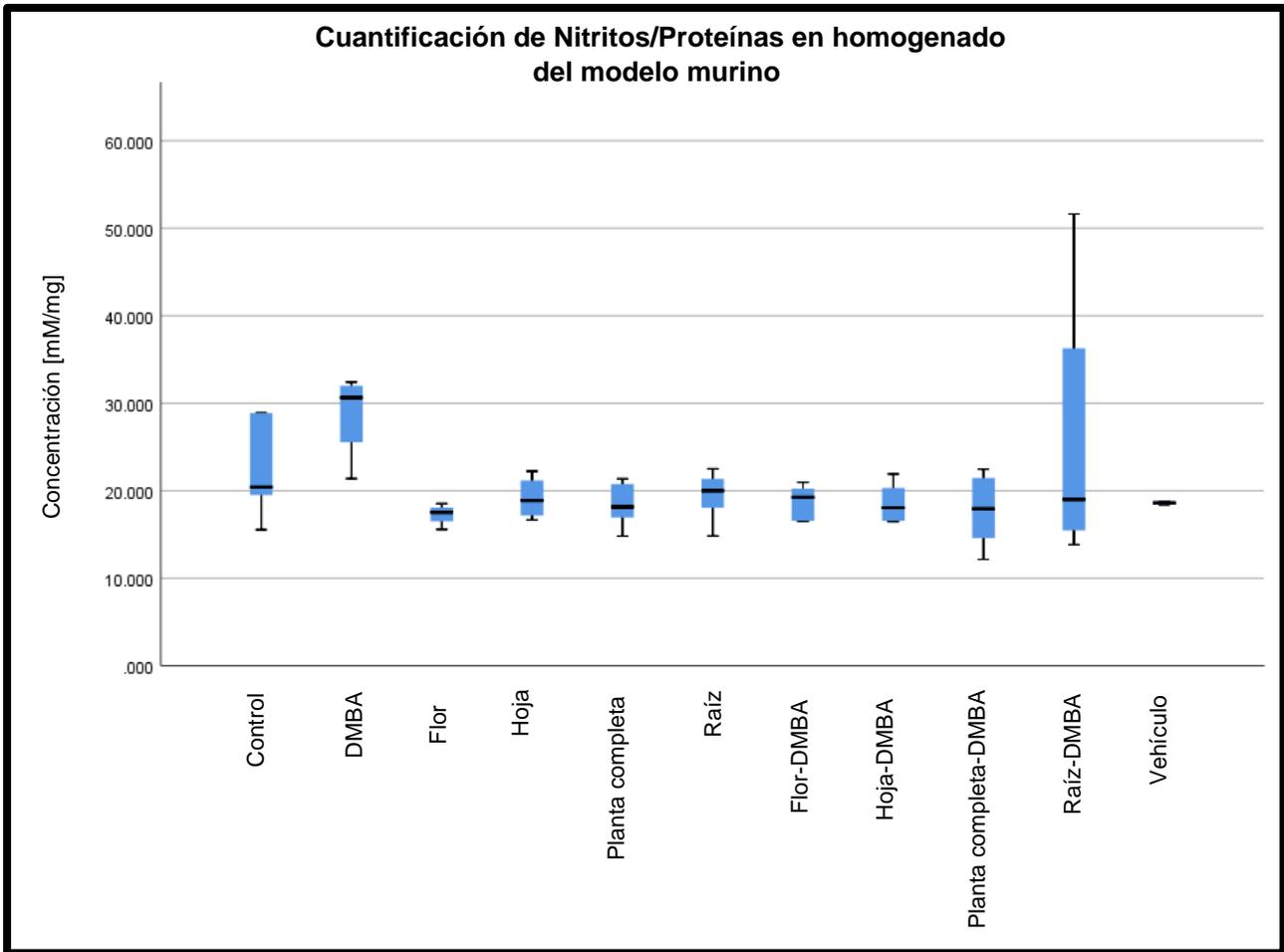
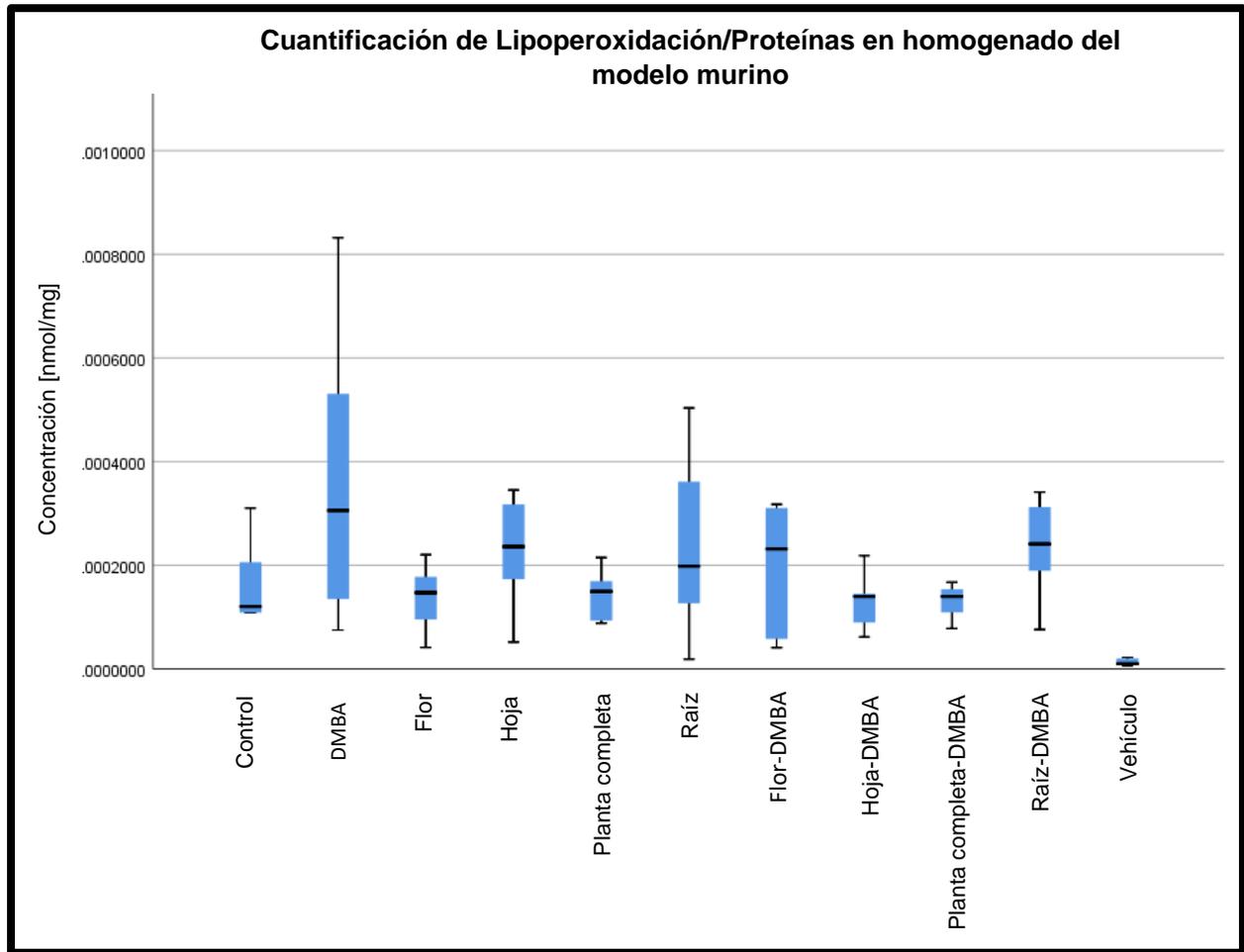


Imagen 10. Tumores que mostraron algunos ratones.

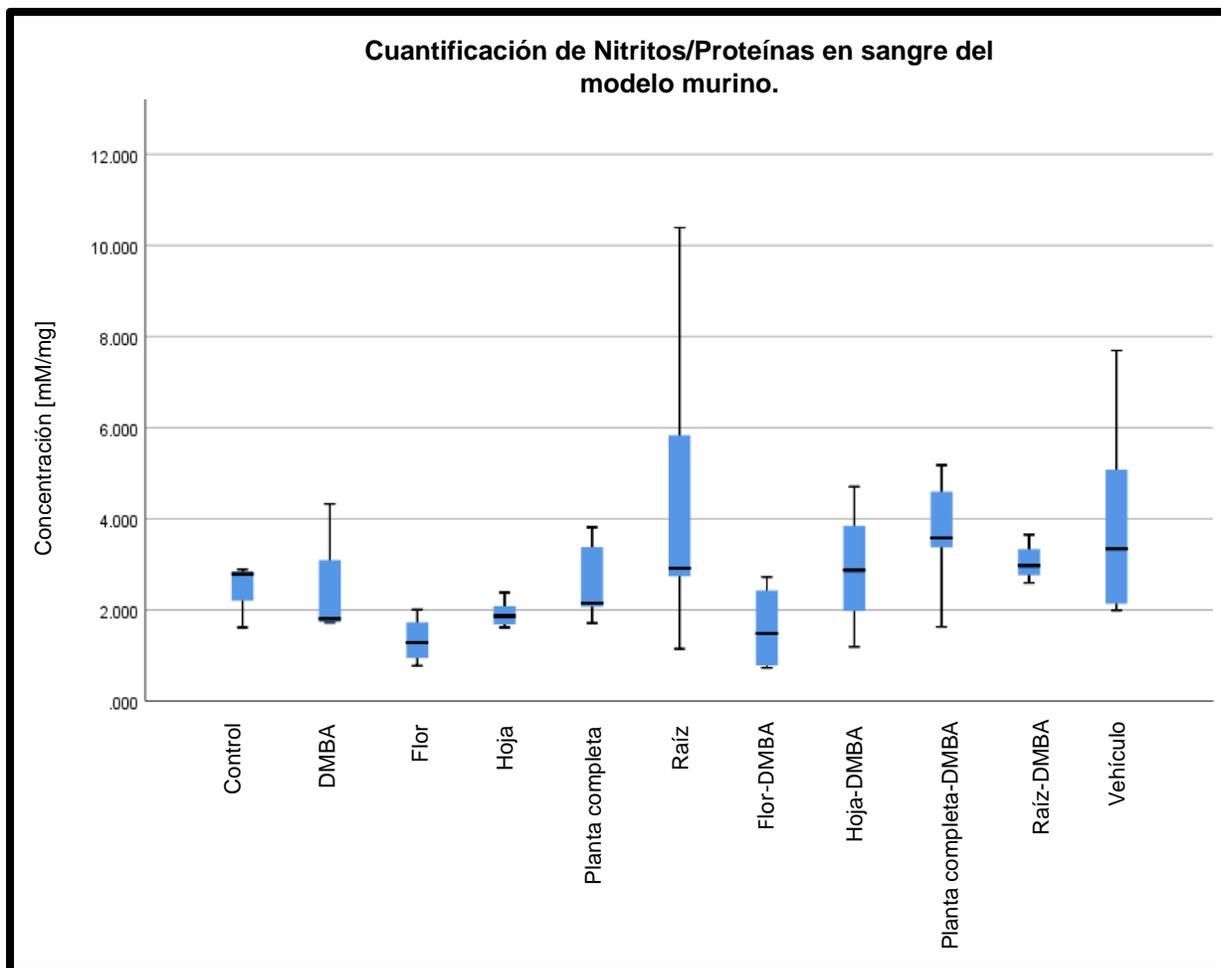


Gráfica 9. Prueba de Nitritos en homogenado de hígado de los ratones.

Esta gráfica muestra los resultados obtenidos en cuanto a los diferentes extractos en comparación con el grupo de solo DMBA. Se observa que los grupos con DMBA que se les ha suministrado uno de los extractos de la planta, presentan respuesta significativa en comparación con los grupos a los cuales no se les ha dado ningún extracto de la planta. Siendo la hoja y la planta completa los más significativos.

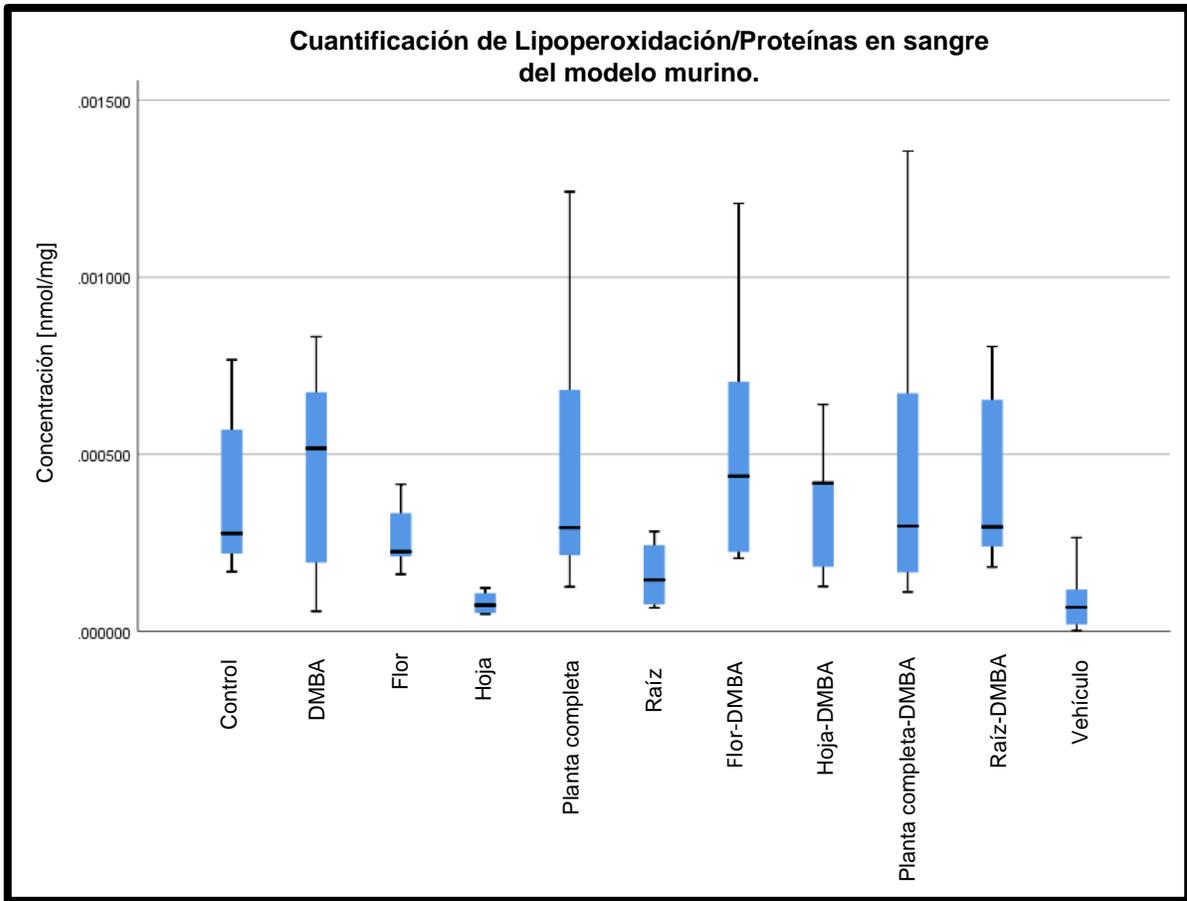


Gráfica 10. Prueba de lipoperoxidación en homogenado de hígado de los ratones.



Gráfica 11. Prueba de Nitritos en plasma de ratón.

En la gráfica, se observa que los grupos de hoja y planta completa con DMBA muestran que son significativos en cuanto al grupo de ratones que solo tiene DMBA, mostrando una disminución considerable en cuanto a la media. En esta gráfica, se observa que el grupo de flor con DMBA es el más significativo en contraste con el grupo de DMBA solo.



Gráfica 12. Prueba de lipoperoxidación en plasma de ratón.

En esta gráfica, se observa que el extracto de planta completa y raíz son los que presentan un mejor resultado, al compararlos con el grupo de DMBA.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

- **Registro etnobotánico**

Gracias a este estudio etnobotánico encontramos que la planta *Bidens Odorata cav.* utilizada principalmente para la anemia, colesterol y males de riñón. Con las entrevistas realizadas se obtuvo que la hoja, la raíz y la planta completa son las estructuras que mayormente se ocupan en la medicina tradicional de la región de Limón chiquito, Veracruz. Su modo de administración es en agua de tiempo alrededor de 15 días, la dosis de administración es al rededor de 50 g de la planta por cada litro de agua esto para una persona adulta con un peso de 60Kg en adelante, fue importante toda esta información para conocer la dosis que se les daría a los ratones inducidos a cáncer de mama.

Estudios hechos en la planta han mostrado sus diferentes propiedades curativas como por ejemplo Diana Moreno y colaboradores en 2017 registran que la planta *Bidens odorata cav.* mostro resultados favorables para contrarrestar los efectos de la hipocolesterolemia, por otro lado, Daniel Zavala y colaboradores en 2013 realizaron un estudio donde demuestran que la planta *Bidens odorata cav.* tiene efectos favorables como antidiarreico.

- **Cuantificación de metabolitos secundarios.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de cuantificación de los metabolitos secundarios en los extractos acuoso las sesquiterpenolactonas son las que se encuentran en mayor cantidad, sobre todo en la flor (1.0133 mg/mL) seguida por la hoja (0.8407 mg/mL) después se encuentran los esteroides/esteroides donde la mayor cantidad se encontró en la hoja (0.3976 mg/mL) y en raíz (0,1299 mg/mL), y en una menor cantidad las cumarinas en donde la hoja sobresalió (0.0466 mg/mL), las quinonas donde la hoja (0.0718 mg/mL) y la flor

(0.1228 mg/mL) fueron las que contenían más y los compuestos fenólicos teniendo mayor cantidad la hoja (0.0310 mg/mL) y la flor (0.0361 mg/mL). Mientras que en los extractos hidroalcohólicos por igual las sesquiterpenolactonas fueron las que tuvieron mayor presencia principalmente en la hoja (1.3602 mg/mL), la flor (0.6910 mg/mL) y la planta completa (0.5367 mg/mL), después se encuentran los esteroides/esteroles donde la planta completa (0.3054 mg/mL) y la hoja (0.1903 mg/mL) fueron las estructuras con mayor presencia, también se encontró presencia de quinonas mayormente en hoja (0.1108 mg/mL) y flor (0.1096 mg/mL) y por último los compuestos fenólicos en donde la hoja (0.0437 mg/mL) y la flor (0.0304 mg/mL) fueron los de mayor presencia.

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios que se encuentran en numerosas especies o familias de plantas. Estas moléculas han llamado la atención de los científicos por el amplio espectro de actividades biológicas. Los estudios de Martino y Sülsen en 2018 de relación estructura-actividad realizados a estas moléculas muestran características específicas en su estructura, que son las responsables de sus efectos antitumorales y citotóxicos, de acuerdo con las investigadoras que analizaron las propiedades de las sesquiterpenolactonas, al contener una gran cantidad de este metabolito la planta *Bidens odorata cav*, se puede afirmar que habrá una respuesta favorable si es utilizado como tratamiento alternativo medicinal.

Se cree que el grupo exometileno de la lactona desempeña un papel esencial en la citotoxicidad porque causa modificaciones estructurales tales como la saturación o adición reflejando la inhibición tumoral y la pérdida de la citotoxicidad se ha establecido que los anillos  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas y ciclopentenonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas o epoxiciclopentenonas presentes en lactonas sesquiterpénicas son esenciales para su actividad antitumoral (Martino y Sülsen, 2018).

En cuanto a los esteroides y esteroides no se tienen estudios documentados que ayuden a conocer las diferentes propiedades que contienen estos metabolitos en cuanto a la inhibición tumoral, pero uno de los padecimientos para los que se ocupa *Bidens odorata* cav. en la comunidad es para el control del colesterol, para lo cual los esteroides y esteroides han demostrado tener una respuesta positiva.

La acción de los esteroides vegetales se centra a nivel intestinal, en la absorción, la reesterificación y el eflujo de colesterol. Actúan en un primer nivel al desplazar de forma competitiva (por similitud estructural) al colesterol de las micelas que se forman en la luz intestinal, de manera que disminuye el colesterol que se absorbe, y se incrementa el que se elimina por vía fecal. Otro nivel de acción es por inhibición de la esterificación enzimática del colesterol en el enterocito, responsable de que una menor cantidad de colesterol se incorpore a los quilomicrones en formación. (Grovas *et. al.*, 2018)

Aunque las quinonas no se encuentran en una cantidad considerable en la planta *Bidens odorata* cav. se encontró una cantidad mayor a otros metabolitos, por lo tanto, hay investigaciones que nos mencionan con compuestos queloides han mostrado inhibición del crecimiento de células cancerígenas, ya que actúan como agentes alquilantes biorreductores. Las quinonas actúan como oxidantes y electrófilos, una adición nucleofílica a una biomolécula; representan una reducción que implica 1 o 2 electrones; juegan un papel clave como agentes biorreductores, potenciadores del estrés oxidativo y alquilación de nucleófilos celulares, y abarcan un amplio rango de biomoléculas. (Durán, *et. al.* 2013)

Dentro de los resultados se encuentran en menor cantidad las cumarinas y los compuestos fenólicos, dentro de la información encontrada para las cumarinas nos mencionan que, la cumarina fue aislada y purificada por primera vez por Voleg, en 1822, a partir del haba tonka (*Dipteryx odorata*). Más tarde fue sintetizada por Perkin en 1868. Se prohibió su uso por la

FDA en 1950, siendo clasificada erróneamente como carcinogénico y hepatotóxico a partir de resultados experimentales obtenidos en animal. Sin embargo, muchos derivados de cumarina han mostrado propiedades anticoagulantes, antitumorales e inmunoestimulantes (Okuyama, 1990).

Ha sido documentado que, 4-nietilesuletina, cumarina, umbeliferona y 4- hidroxycumarina son citostáticas para las células 1-lela, En la terapia antitumoral con cumarinas se ha propuesto que, ésta actúa en dos fases: inhibiendo el crecimiento de algunas células tumorales, y a través de la estimulación de ciertos componentes de la reacción inmune contra el tumor. (Okuyama, 1990)

Por otro lado, para los compuestos fenólicos encontramos que, los estudios indican que los compuestos fenólicos ejercen un efecto regulador sobre la homeostasis de la glucosa siguiendo los siguientes mecanismos de acción: a) formación de complejos, b) inhibición enzimática, c) afectación del transporte y d) estimulación de la secreción de hormonas de saciedad intestinales. Los flavonoides son los compuestos fenólicos de la dieta que podrían ser más efectivos en la regulación del metabolismo de carbohidratos ya que pueden inhibir enzimas, modular el transporte; así como, estimular la secreción de hormonas de saciedad. (Dueñas, et. al. 2018)

De acuerdo con los resultados obtenidos, uno de los principales aportes es, que gracias a la cuantificación de los metabolitos secundarios se observa que *Bidens Odorata cav.* contiene principalmente sesquiterpenlactonas, cumarinas y quinonas las cuales ya han demostrado tener propiedades antitumorales por lo tanto son de gran importancia para este estudio.

- **Determinación de la capacidad antioxidante**

En el análisis de DPPH se obtuvo como resultado que el extracto acuoso de flor (84.56%) y el extracto de planta completa (92.83%) son las estructuras con un porcentaje de inhibición mayor, mientras que en los extractos hidroalcohólicos la raíz (72.70%), la planta completa (75.39%) y la flor (75.79%) son los de mayor porcentaje de inhibición. Esto se puede deber a que son las estructuras que cuentan con mayor cantidad de metabolitos secundarios; principalmente las sesquiterpenolactonas, las cuales son moléculas que han llamado la atención de los científicos por el amplio espectro de actividades biológicas que presentan como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antibacterial. (Ruíz-Suárez, 2015)

Existe aún, poca información documentada acerca de la capacidad antioxidante de la planta *Bidens odorata* cav., por lo cual, el presente estudio representa una gran aportación respecto a las propiedades antioxidantes de la planta.

- **Evaluación de la capacidad antioxidante mediante marcadores des estrés oxidativo**

De acuerdo con las tablas de marcadores de estrés oxidativo se puede observar que los extractos de hoja, flor, raíz y planta completa son los que disminuyeron en mayor cantidad los efectos del DMBA suministrado a los ratones, esto de acuerdo con que las medias de los ratones que se les suministro el extracto se encuentran por debajo de la media que solo fueron infectados y no se les dio tratamiento. Coincide con lo dicho anteriormente, que los metabolitos encontrados solos que brindan las mayores propiedades antioxidantes ya que podemos encontrar que el interés en estas moléculas se justifica por las múltiples actividades biológicas que presentan, entre las que se destaca la actividad citotóxica. Así, da lugar la

inhibición de diversas funciones celulares que conducen a las células a la apoptosis. (Ruíz-Suárez, 2015)

Por otra parte, también se presenta una concentración alta de esteroides y esteroides y se ha demostrado que son capaces de inhibir el óxido nítrico (Díaz, et al., 2007).

También en menor cantidad, pero importante se encuentran las cumarinas, de las cuales hay que subrayar los efectos farmacológicos vinculados con sus acciones de tipo antioxidante e inmunomodulador (Ariza, et. al. 2007).

## CONCLUSIONES

- *Bidens odorata* cav. tiene diversos usos en la medicina tradicional para tratar: mal de riñón; disminuir las concentraciones de colesterol, en personas con diabetes controlar la concentración de glucosa en sangre; problemas de anemia y en la ayuda contra el cáncer, esto según los usos que se le dan en la Comunidad de Limón Chiquito, Veracruz.
- En cuanto al análisis fitoquímico demuestra la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios como: quinonas, compuestos fenólicos, esteroides/esteroides y en una gran mayoría de las estructuras de la planta las sesquiterpenolactonas tienen presencia.
- De acuerdo con las cuantificaciones realizadas, las estructuras de flor, hoja y raíz demostraron tener una mayor cantidad de metabolitos secundarios tanto en los extractos acuoso como hidroalcohólicos.

- En cuanto a la actividad antioxidante en los extractos acuosos e hidroalcohólicos, la hoja, flor, planta completa y raíz demostraron tener un mayor porcentaje de inhibición ante el DPPH.
- Según los marcadores de estrés oxidativo, el extracto acuoso de flor, hoja y raíz, mostraron una mayor disminución de nitritos en homogenado de hígado. Mientras que en los nitritos en plasma solo mostraron disminución en el extracto acuoso de flor.
- La peroxidación lipídica en homogenado de hígado mostró disminución en los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y raíz. Por igual en plasma, la peroxidación lipídica mostro disminución en los extractos acuosos de flor, hoja, planta completa y raíz.
- *Bidens odorata* cav. presenta gran capacidad antioxidante, ya que de acuerdo con los marcadores de estrés oxidativo la planta logró la modulación del proceso de carcinogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Ávalos, G., & Pérez-Urria, C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119-145.

- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libre, antioxidante naturales y mecanismos de protección. *Atenea* No. 494. 161-172.
- 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.
- Ariza Y., C. Rueda, J. Rincón, L. Linares y F. Guerrero. (2007). efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *hygrophila tytha leonar*. Medellín, Colombia. *VITAE*, revista de la facultad de química farmacéutica. ISSN 0121-4004 Volumen 14 número 2. págs. 51-58.
- Arteel, G.E. Leveraging Oxidative Stress Questions in vivo: Implications and limitations. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016, 595, 40-45.
- Audesirk, T., Audesirk, G. y Byers, B. 2008. *Biología: La vida en la tierra*. 8a edición. Pearson Education, Naucalpan de Juárez, México.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2009-10-10, <http://www.ru.tic.unam.mx/handle/123456789/1549>
- Bañuelos, F. N. 2007. Consideraciones metodológicas para el diseño de propuestas de desarrollo local/regional sustentable en comunidades indígenas. *Ra Ximhai*. Universidad Autónoma Indígena de México. 3(1):27-47. (<http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n8/2007-0934-remexca-6-08-01791-en.pdf>)
- Blainski, A., López, G. & Palazzo, C. (2013). Application and analysis of the Folin-Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules: Brazil*. 18, 6852-6865.

- Bowsler, C.; Steer, M.; Tobin, A. (2008). *Plant Biochemistry*. New York. USA. Garland Science. Taylor & Francis Group, LLC.
- 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
- Cárdenas J., E. Bargallón, A. Erazo, E. Maafs, A. Poitevin. (2013). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. México. Gaceta Mexicana de Oncología. 2013;12(Supl 3):4-55.
- Carvajal, C. (2019). *Lípidos, lipoproteínas y aterogénesis*. Consejo Editorial de EDNASSS.
- Chacón, M. (2009). CÁNCER: reflexiones acerca de incidencia, prevención, tratamiento y mitos. Argentina. Cuadernos de la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales - Universidad Nacional de Jujuy, núm. 37, 2009, pp. 181-193.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). "Chapter 24: Natural Products (Secondary Metabolites)". En Buchanan, B. B.; Grisse, W.; Jones, R. L. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, USA. American Society of Plant Physiologists.
- García, M., (2007), Conocimiento tradicional de los pueblos indígenas de México y sus recursos genéticos, Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas, México.
- Guija, H., Guija, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. Perú. *Horiz Med (Lima)* 2023; 23(2): e2158.

- 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>
- Díaz., Rodríguez, F., González, A., Ramírez, R., Bilbao, C., León, A., Jaime, A., Chirino, R. & Navarro, D. (2007). Androgens and androgen receptors in breast cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol.*; 105: 1-15.
- Hernández-Sánchez, K. M., Garduño-Siciliano, L., Luna-Herrera, J., Zepeda-Vallejo, L. G., Lagunas-Rivera, S., García-Gutiérrez, G. E., & Vargas-Díaz, M. E. (2018). *Antimycobacterial and hypolipemiant activities of Bidens odorata (Cavanilles). Journal of Ethnopharmacology, 222, 159–164.* doi:10.1016/j.jep.2018.04.028
- 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
- INEGI. Catálogo de claves de entidades federativas, municipios y localidades, octubre 2015. <http://geoweb.inegi.org.mx/mgn2k/catalogo.jsp>
- Korc, I., Bidegain M., Martell M. (1995). Radicales libres. Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *Rev Med Uruguay* 1995; 11: 121-135.
- 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-hidroxicumarina. *Rev Inst Nal Resp Mex*, 13 (4), 192-197.

- López, L. (2001). Saponósidos. *Ámbito Farmacéutico*.
- López-Legarda, Xiomara, Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, L. F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180-198.
- 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.
- Manual de Operaciones: Tamizaje fitoquímico. (2005). Guatemala. LIPRONAT. 9 p.
- Martin, J. (1997). Los taninos y su Tratamiento. Estos extractos vegetales, utilizados en las tenerías y en la crianza de vinos se muestran dañinos para los acabados de la madera, pero pueden bloquearse con determinados productos. *Boletín de Información Técnica* n° 188.
- Matino, S., Sülsen, P. (2018). *Sesquiterpene Lactones Advances in their Chemistry and Biological Aspects*. Springer. Inglaterra.
- Mayor, R. (2010). *Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante*. Asunción, Paraguay. *R. Rev. Inst. Med. Trop.* 2010;5(2):23-29.
- Meléndez Camargo, ME, Berdeja, B., & Miranda, G. (2004). Efecto diurético del extracto acuoso de *Bidens odorata* en la rata. *Revista de Etnofarmacología*, 95(2-3), 363–366. doi:10.1016/j.jep.2004.08.005
- Micocci, L. (2018). *Biomoléculas: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos*. Universidad Nacional del Litoral.

- Moreno, D. et. al. (2017). Evaluation of hypocholesterolemic activity of extracts of *Bidens odorata* and *Brickellia eupatorioides*. Universidad de Nuevo León, México. Pak. J. Pharm. Sci., Vol.30, No.2(Suppl), March 2017, pp.613-617.
- Muñeton, P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. Revista Digital Universitaria. 10 de septiembre 2009. Volumen 10. Número 9. ISSN: 1067-6079.
- 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.
- Muñoz J., Alvarado C., Encina Z. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. La Molina, Peru. Horizonte Médico, vol. 11, núm. 2, diciembre, 2011, pp. 93-100.
- Organización Mundial de la Salud. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra. OPS/OMS, 2002. <http://ss.pue.gob.mx/wp-content/uploads/2017/10/Medicina-Tradicional-2017-22.pdf>
- 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.
- Pinto M. (2013). Cumarinas: Versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica. Portugal. Departamento de Química Orgánica.

- 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.
- Repetto, M., Semprine, J. & Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In Tech. 3-24.
- Salamanca, G., Correa, I. & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. Colombia. Vol 25 no.2.
- Sánchez y García, F. (2022). Fitoquímica. México. FES Zaragoza.
- 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.
- Secretaria de Salud Pública. (2007). Boletín de práctica médica efectivas: cáncer de mama. Morelos, México.
- Strack, D. (1997). "Chapter 10. Phenolic Metabolism". En: Dey, P. M.; Harborne, J. B (eds.). Plant Biochemistry. London. UK. Academic Press.
- 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.
- 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>

- Zavala, D. et. al. (2013). Composition and Antidiarrheal Activity of *Bidens odorata* Cav. Universidad Autónoma Metropolitana. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2013, Article ID 170290, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/170290>
- Zapparoli, Z. M. 2012. Mujeres y prácticas curativas tradicionales. Reflexiones. Universidad de Costa Rica. 91(2):107-119.