



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Actividad antioxidante de *Russelia equisetiformis* en un modelo murino de cáncer

Tesis

Que para obtener el título de
Licenciado en Biología

Presenta:

Angeles Flores Yessica Jazmin

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez
Directora de Tesis

M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo
Asesor Interno

Ciudad de México 2021





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 (L-7 P.A.) de la unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la FES- Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez.

1 Índice

1. Introducción.....	6
2. Marco Teórico.....	7
2.1. Radicales Libres	7
2.1.1. Óxido nítrico	8
2.2. Daño celular mediado por radicales libres	8
2.3. Estrés oxidativo y cáncer	10
2.4. Cáncer de mama	10
2.5. El papel de los radicales libres en el proceso de carcinogénesis	11
2.6. Mecanismos antioxidantes.....	12
2.7. Terapia antioxidante	13
2.8. Metabolitos Secundarios.....	14
2.8.1. Clasificación	14
2.8.1.1. Biosíntesis.....	15
2.9. Quimiopreventivos y Biomarcadores.....	16
2.10. Plantas medicinales.....	17
2.11. Etnobotánica.....	18
2.12. Familia Plantaginaceae	18
2.12.1. Género <i>Russelia</i> Jacq.	18
2.12.1.1. Clasificación de <i>Russelia equisetiformis</i>	18
2.12.1.1.1. Descripción morfológica.....	19
2.12.1.1.2. Ecología.....	19
2.12.1.1.3. Distribución en México.....	20
2.12.1.1.4. Estudios Etnobotánicos	20
2.12.1.1.5. Estudios químicos.....	20
2.12.1.1.6. Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos.....	20
3. Justificación.....	21
4. Objetivos	21
5. Hipótesis.....	22
6. Metodología.....	22
6.1. Localidad de recolecta.....	22
6.2. Entrevistas y caminata etnobotánica	22
6.3. Identificación de metabolitos secundarios in situ	23
6.4. Obtención de extractos hidroalcohólicos y acuosos.....	23
6.5. Obtención de extractos secos.....	23

6.6.	Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios.....	23
6.6.1.	Alcaloides.....	23
6.6.2.	Flavonoides.....	24
6.6.3.	Taninos.....	24
6.6.4.	Compuestos fenólicos.....	25
6.6.5.	Esteroides.....	25
6.6.6.	Saponinas.....	26
6.6.7.	Cumarinas.....	26
6.6.8.	Quinonas.....	26
6.6.9.	Sesquiterpenlactonas.....	27
6.7.	Cuantificación de metabolitos primarios.....	27
6.7.1.	Carbohidratos.....	27
6.7.2.	Lípidos.....	27
6.7.3.	Proteínas.....	28
6.8.	Diseño Experimental.....	29
6.9.	Inducción de carcinogénesis con DMBA al modelo experimental.....	29
6.10.	Obtención del suero sanguíneo.....	30
6.11.	Obtención de homogenado de Hígado.....	30
6.12.	Cuantificación de proteínas en suero sanguíneo y homogenado de hígado.....	30
6.13.	Marcadores de Estrés oxidativo.....	30
6.13.1.	Cuantificación de nitritos.....	30
6.13.2.	Lipoperoxidación.....	30
6.13.3.	Actividad de la enzima catalasa.....	31
6.14.	Actividad antioxidante.....	31
6.14.1.	DPPH+.....	31
6.15.	Análisis estadístico.....	31
7.	Resultados.....	31
7.1.	Registro etnobotánico de <i>Russelia equisetiformis</i>	31
7.2.	Identificación in situ de metabolitos secundarios de <i>R. equisetiformis</i>	33
7.3.	Identificación de metabolitos secundarios en extractos secos.....	36
7.4.	Cuantificación de metabolitos primarios en extractos secos de <i>R. equisetiformis</i> 41	
7.5.	Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos secos de <i>R. equisetiformis</i>	42
7.6.	Marcadores de estrés oxidativo.....	43

7.6.1.	Cuantificación de nitritos en plasma sanguíneo y homogenado de hígado .	43
7.6.2.	Cuantificación de malondialdehído (MDA) en plasma sanguíneo y homogenado de hígado.	44
7.6.3.	Actividad de la enzima catalasa en homogenado de hígado.....	46
7.7.	Actividad antioxidante	47
8.	Discusión	48
9.	Conclusiones	56
10.	Agradecimientos.....	57
11.	Referencias	58
12.	Anexo	66

1. Introducción

La presente investigación se llevó a cabo en la localidad de Limón Chiquito, Cazonas de Herrera, Veracruz, y tuvo por objeto de estudio la evaluación de la actividad antioxidante de *Russelia equisetiformis* en un modelo de cáncer. *R. equisetiformis* es originaria de México, se le atribuyen diversas propiedades, entre las que destaca su elevada actividad antioxidante. Se evaluó la presencia de distintos metabolitos secundarios en las diferentes partes de la planta, así como un estudio etnobotánico. Se realizaron análisis fitoquímico *in situ* y en laboratorio, por medio de pruebas colorimétricas para los distintos metabolitos, como alcaloides (Reactivo de Dragendorf, Mayer y Wagner), flavonoides (Reacción de Shinoda), cumarinas (Prueba de Baljet), esteroides (Reacción de Liebermann-Burchard y prueba de Salkowski), fenoles (Reacción con FeCl_3), quinonas (Reacción de NaOH 5%), saponinas (Espuma), sesquiterpenolactonas (Reactivo de Baljet e hidroxilamina) y taninos (Gelatina-sal, formaldehído, FeCl_3). Complementariamente por medio de entrevistas etnobotánicas se realizó el estudio etnobotánico de la especie para la comunidad de Limón Chiquito, además de la evaluación de marcadores de estrés oxidativo (Óxido nítrico, Catalasa y lipoperoxidación) en plasma sanguíneo y homogenado de hígado.

El estudio etnobotánico mostró que *R. equisetiformis* se utiliza principalmente en tratamiento de diabetes, seguido de enfermedades de próstata, así como padecimientos renales. Su preparación es por medio de infusiones que se administran vía oral, procedimiento conocido comúnmente como “agua de tiempo”. El análisis fitoquímico de *R. equisetiformis* indica la presencia de los metabolitos: alcaloides, cumarinas, sesquiterpenolactonas, esteroides, quinonas, flavonoides y taninos. *R. equisetiformis* posee una elevada actividad antioxidante, debido a la gran cantidad y variedad de los metabolitos secundarios que presenta, sin embargo, no ejerce un efecto antioxidante en procesos de carcinogénesis, pues no logró disminuir los niveles de los marcadores de estrés, paradójicamente, al administrarse en ratones sanos, si ejerce esta propiedad.

2. Marco Teórico

2.1. Radicales Libres

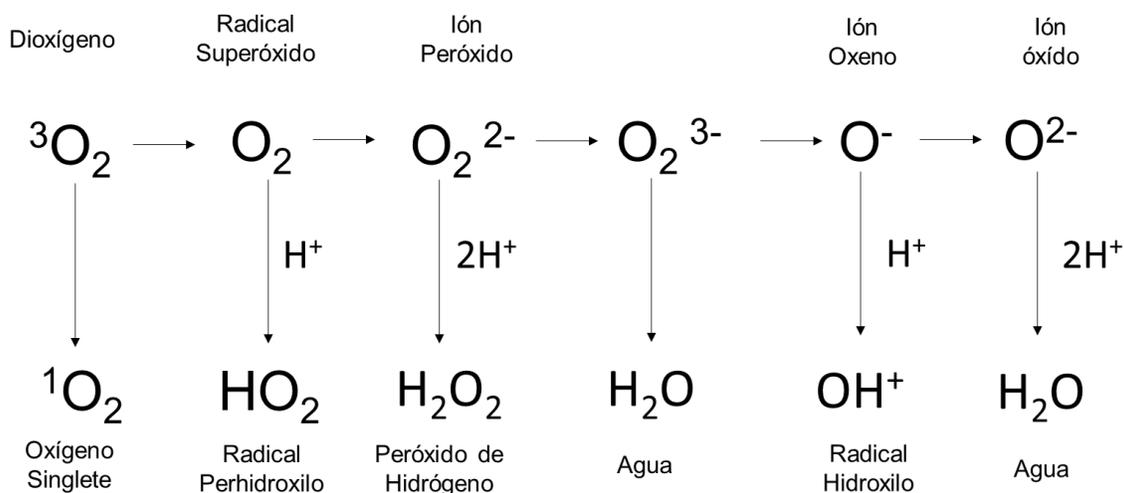
Los radicales libres son moléculas o átomos que poseen uno o más electrones desapareados, por ende, son altamente reactivos comparados con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (Martínez- Lazcano, *et al.*, 2010). Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen la capacidad de reaccionar con macromoléculas orgánicas conduciendo a daño celular y tisular, y consecuentemente a pérdida de la funcionalidad. Son generados como producto de nuestro metabolismo, así como por factores como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, algunos xenobióticos, entre otros. Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace (Maldonado, *et al.*, 2010).

Existen grupos de radicales libres como lo son las especies reactivas de oxígeno, las cuales normalmente se producen en los sistemas biológicos provenientes del metabolismo oxidativo mitocondrial, de la actividad de la enzima xantina oxidasa y en menor proporción de la autoxidación de catecolaminas y hemoproteínas que ocurre en el citoplasma, membrana nuclear, retículo endoplásmico y peroxisomas (Martínez- Lazcano, *et al.*, 2010). Como se muestra en la Figura 1, las principales especies reactivas de oxígeno son el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), al anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Figura 1

Generación de Especies reactivas de oxígeno a partir del estado triplete.



Nota: Tomado de Molina-Heredia F., 2012, El lado Oscuro de Oxígeno, SEBBM DIVULGACIÓN.

Otro grupo de radicales libres son las especies reactivas de nitrógeno, entre las que se ubican principalmente al óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$). Las especies reactivas de oxígeno pueden

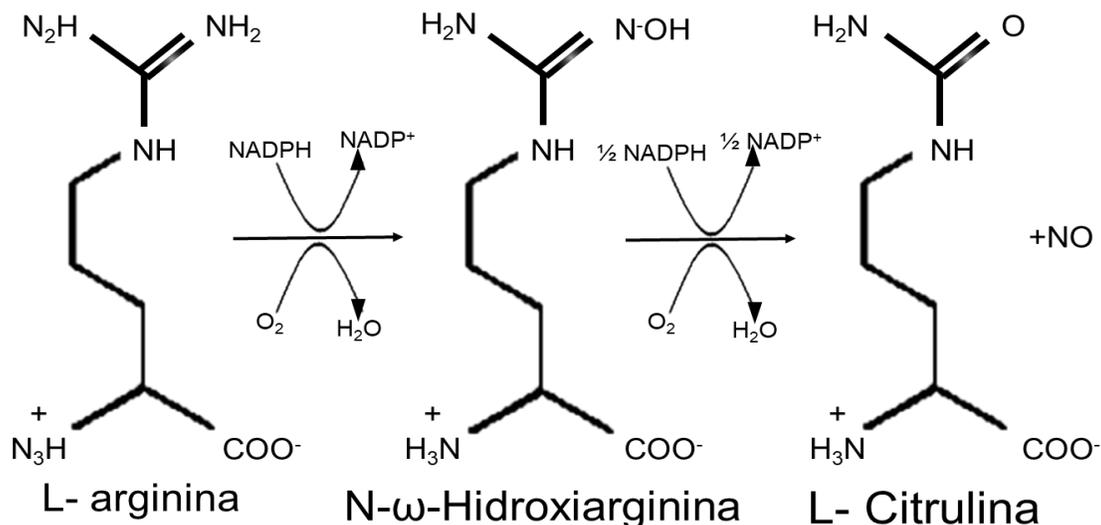
interactuar con el óxido nítrico formando nuevas especies como lo es el anión peróxinitrilo (ONOO^-), el cual posee un alto poder oxidante (Martínez- Lazcano, *et al.*, 2010).

2.1.1. Óxido nítrico

El óxido nítrico interviene en distintas funciones biológicas pues participa como constituyente del factor relajante derivado del endotelio, el cual puede relajar la musculatura lisa vascular, inhibir la agregación plaquetaria y disminuir o inhibir la transmisión del mensaje neural; también es importante en la respuesta inmune, debido a que los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus mecanismos citotóxicos (Maldonado, *et al.*, 2010). Las células sintetizan el óxido nítrico a partir del aminoácido L- arginina. Este proceso se efectúa como se observa en la Figura 2, por la enzima denominada óxido nítrico-sintasa, mediante dos reacciones sucesivas que requieren de NADPH y O_2 (Cuéllar, *et al.*, 2010).

Figura 2.

Formación del óxido nítrico y citrulina a partir de arginina.



Nota: Tomado de Centelles J., Esteban C. & Imperial S., 2004, Óxido nítrico: Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea, OFFARM, 23(11):96- 106.

La falta de regulación en la producción o disponibilidad del óxido nítrico se asocia con enfermedades tales como la hipertensión, la disfunción eréctil, algunos procesos neurodegenerativos y disfunciones del sistema inmune como el choque séptico (Centelles, *et al.*, 2004).

2.1.2. Daño celular mediado por radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno presentan una alta reactividad, tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de moléculas como los ácidos nucleicos, las proteínas, polisacáridos y los lípidos de las membranas celulares. Uno de los daños más representativos es la peroxidación lipídica de las membranas biológicas, pues en éstas se encuentran ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son especialmente vulnerables a la oxidación debido a que poseen en su estructura dobles enlaces de carbono extremadamente sensibles a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Este ataque a

los lípidos de membrana se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación, que tiene como producto final al malondialdehído (MDA). El malondialdehído posee toxicidad, debido a su alta reactividad con las proteínas y el ADN (Gutiérrez, *et al.*, 2014).

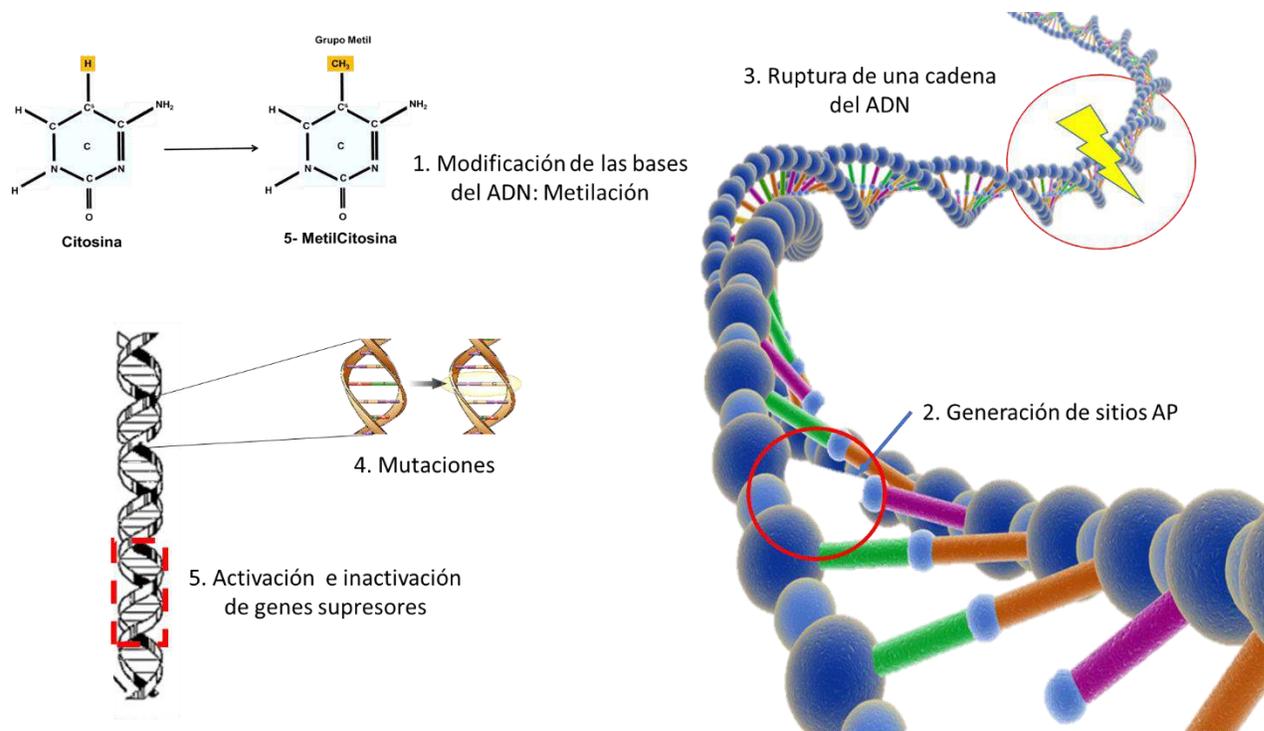
Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN entre los que se encuentran; ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las 2 hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas (*cross-links*) ADN o ADN- proteína, a través de diferentes mecanismos:

1. Modificación de las bases de ADN.
2. Generación de sitios AP.
3. Ruptura de una cadena de ADN.
4. Mutaciones.
5. Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores.
6. Daño endotelial que favorece la metástasis (Zorrilla, *et al.*, 2004)

Como se muestra en la Figura 3.

Figura 3

Tipos de daño al ADN



Los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica; este daño suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína. Mientras que en las enzimas puede impedir su actividad catalizadora y en los polisacáridos, ocasiona su despolarización, lo que da lugar a procesos degenerativos (Maldonado, *et al.*, 2010).

2.2. Estrés oxidativo y cáncer

Cuando existe una sobreproducción de radicales libres o deficiencia en los mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en la célula, se genera el llamado estrés oxidativo. Estos radicales libres pueden ocasionar procesos patológicos diversos siendo el cáncer uno de los más destacados. El cáncer se define como “una alteración caracterizada por el crecimiento tisular patológico, el cual tiene su origen en una proliferación persistente y prolongada de células anormales que desemboca en una patología, determinada ésta por la invasión y destrucción de los tejidos del cuerpo” (Diz, *et al.*, 2019).

El cáncer básicamente afecta el mecanismo de control que rige la diferenciación y proliferación de las células. En el proceso de peroxidación lipídica de estas estructuras, se produce en diferentes tejidos, sustancias mutágenas y factores cancerígenos derivados de ciertos ácidos grasos, que como productos de degradación originan hidroperóxidos, endoperóxidos, radicales alcoxil, enoles y aldehídos que actúan como agentes proneoplásicos con acción directa sobre el ADN nuclear y mitocondrial. Tanto la vejez como la aparición del cáncer están relacionados con la agresión de los radicales libres a los componentes celulares: membrana, núcleo y mitocondrias (Viada, *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo y el proceso tumoral que involucra el cáncer, se encuentran estrechamente relacionados a través de la oxidación del material genético (Maldonado, *et al.*, 2010). Morfológicamente, las células neoplásicas presentan un incremento en su actividad metabólica, por ende, requieren mayor cantidad de ATP producido por las mitocondrias, esta síntesis desmesurada contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno, aunado a que este tipo de células utiliza en mayor grado la vía de la glucólisis para la síntesis de ATP, que es mucho menos efectiva que la cadena respiratoria mitocondrial. Esta alteración favorece la fuga de electrones desde el complejo respiratorio hacia el citoplasma. Aunado a ello se suman las especies reactivas de oxígeno producidas por parte de las células inflamatorias que penetran el tejido tumoral, aumentando así el estrés oxidativo en el microambiente.

Además, las especies reactivas de oxígeno pueden actuar como mensajeros en las vías de transducción de señales intracelulares y promover el crecimiento y proliferación celular contribuyendo así, al desarrollo del cáncer. A sí mismo, cambios en el estado redox de algunos factores de transcripción pueden contribuir a la proliferación celular incontrolada.

Se estima que la carga mundial de cáncer aumentó a 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes en 2018. Uno de cada 5 hombres y una de cada 6 mujeres en todo el mundo desarrollan cáncer durante su vida, y uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres mueren a causa de la enfermedad. A nivel mundial, el número total de personas vivas dentro de los primeros 5 años de diagnóstico de cáncer se estima en 43.8 millones (IARC, 2018).

2.3. Cáncer de mama

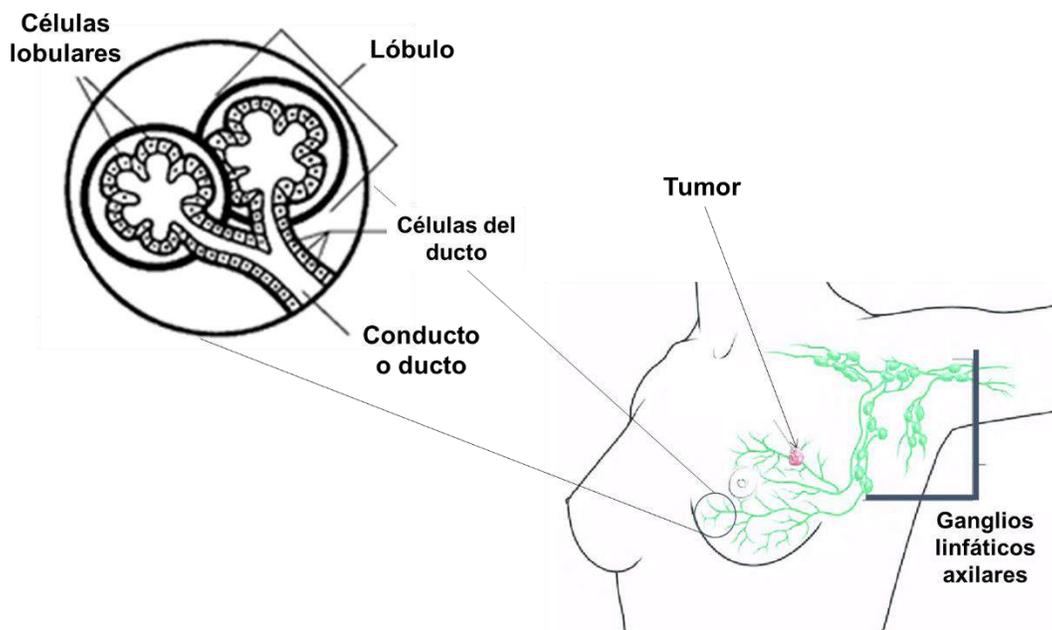
El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes y de mayor mortalidad entre las mujeres. De acuerdo con la Figura 4, en la anatomía normal de la mama existen dos estructuras primordiales: los conductos o ductos y los lobulillos. La mayoría de los carcinomas se localizan en los conductos.

Existen dos tipos de carcinomas los invasores y los no invasores o *in situ*. Los primeros son aquellos que en su crecimiento superan las paredes de la estructura en la que se encuentran y se expanden a los tejidos circundantes. Los carcinomas *in situ* nunca superan

las paredes del sitio donde se desarrollan, aun teniendo un tamaño considerable. Los invasores tienden a infiltrar los tejidos mamaros vecinos y a desprender grupos de células que llegarán a las axilas por los vasos linfáticos. En los carcinomas *in situ*, entre el 5 y 10% se extenderán más allá de la mama (Sanfilippo & Moreno, 2008).

Figura 4.

Anatomía de la mama



Nota: Modificado de Martínez, 2016, Anatomía de la Glándula mamaria y patologías más frecuentes, disponible en: <https://academiaradiologica.wordpress.com/2016/07/04/anatomia-de-la-glandula-mamaria-y-patologias-mas-frecuentes/>

Cuando el tumor llega a tener un centímetro de diámetro, se corre el riesgo de que algunas células se desprendan y se diseminen por otras partes del cuerpo (metástasis).

En el cáncer de mama, la mayoría se localiza en el cuadrante superior externo (por arriba y afuera del pezón), a partir de ahí, al primer lugar donde migraran las células metastásicas es a los ganglios de la axila, ya que las vías linfáticas drenan primero en este sitio. El cáncer de mama se inicia como una enfermedad localizada y cuando es invasiva al principio es asintomática y posteriormente sintomática. Esta última se divide en tres fases: localizada, regional y metastásica (Sanfilippo & Moreno, 2008).

2.4. El papel de los radicales libres en el proceso de carcinogénesis

El cáncer tiene un origen monoclonal y posteriormente se desarrolla como un proceso de carcinogénesis, que está caracterizado por el crecimiento incontrolado de células neoplásicas, entre otros fenómenos activados por diversos oncogenes. Requiere un clon de células y el desarrollo de múltiples eventos que comprenden 3 estadios:

1. Inducción de mutación en el ADN de una célula somática (iniciación)
2. Estimulación de la expansión tumoral del clon mutado (Promoción)
3. Malignización del tumor (Progresión) (Zorrilla, *et al.*, 2004)

Se ha comprobado que las especies reactivas de oxígeno y el proceso tumoral se encuentran estrechamente relacionados a través de la oxidación del material genético y la

formación de 8-oxo- 7, 8- dihidro- 2'- deoxiguanosina (8-oxo-dG), produciendo errores en la replicación del ADN, cambiando la guanina por timina en un 50% del ADN replicado (Maldonado, *et al.*, 2010); García, *et al.*, 2012).

Además de que se ha asociados a estas especies con el proceso de iniciación y el mantenimiento del fenotipo tumoral, donde H_2O_2 estimula la proliferación, migración y adhesión de estas células.

2.5. Mecanismos antioxidantes

Para contrarrestar estos niveles de radicales libres, nuestro organismo posee un sistema de defensa antioxidante, por lo cual un antioxidante es cualquier sustancia que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser; lípido, proteína, DNA, o cualquier otro tipo de molécula. La exposición a estos radicales libres de una variedad de fuentes ha hecho que los organismos desarrollen una serie de mecanismos que incluyen:

1. Remoción catalítica de radicales libres por enzimas
2. Unión de proteínas a metales pro-oxidantes
3. Protección contra daño, y
4. Estabilización de radicales libres con donadores de protones o electrones (Corrales & Muñiz, 2012).

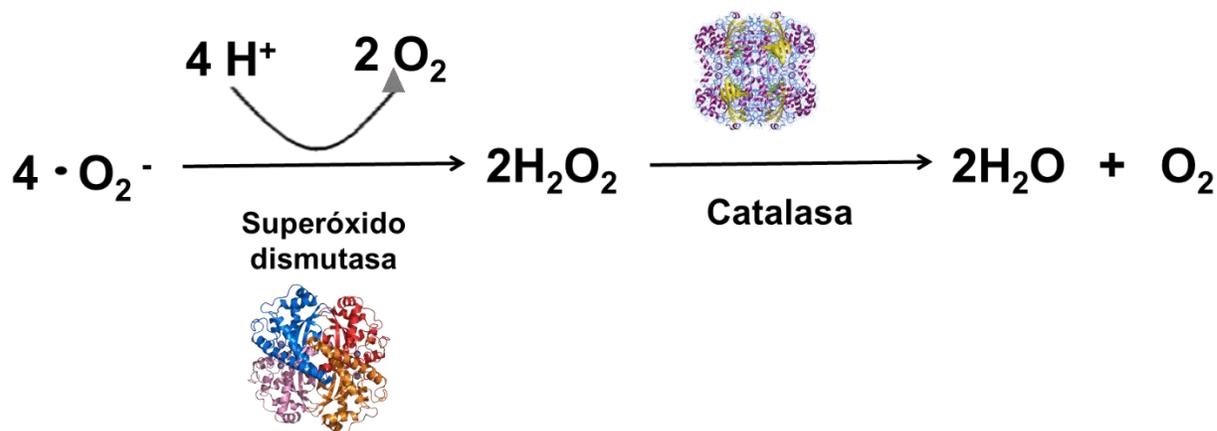
El sistema de defensa antioxidante se encuentra formado por elementos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que actúan conjuntamente para así proteger a la célula (Corrales & Muñiz, 2012).

El componente de tipo enzimático se considerada como la primera línea de defensa, que se encarga de evitar el cúmulo de especies reactivas de oxígeno catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los radicales libres. Dentro de este sistema se encuentran las enzimas:

- **Superóxido Dismutasa (SOD)** quien cataliza la disminución del superóxido (O_2^-) a Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 3). En células de mamíferos existen 2 tipos descritos de esta enzima: La enzima Cu-Zn localizada en el citosol y la enzima Mn principalmente en la mitocondria (Lodoño, 2012).
- **Glutación peroxidasa (GPx)** la cual es una selenoproteína que cataliza la reducción de hidroperóxidos y otros peróxidos orgánicos en agua y alcohol respectivamente, al mismo tiempo que oxida el glutación reducido (GSH) a glutación oxidado (GSSG) (Corrales & Muñoz, 2012). Esta enzima presenta una afinidad reducida para el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) encargándose de su degradación a concentraciones bajas y actuando como mecanismo complementario de la catalasa (Lodoño, 2012).
- **Catalasa:** La catalasa es una hemoproteína que se localizada principalmente en los peroxisomas y mitocondrias; se encarga de la conversión de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua y oxígeno molecular evitando así la formación del radical hidroxilo y el oxígeno singulete (Corrales & Muñoz, 2012). Cada molécula de esta enzima es capaz de convertir 6 millones de moléculas de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) sin la necesidad de otro tipo de sustrato (Lodoño, 2012) (Figura 4).

Figura 5.

Mecanismo de acción de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa



Por otro lado, los antioxidantes no enzimáticos son los que se obtienen mediante la ingesta de alimento, estos se unen a los radicales libres y los transfieren de sitios donde pueden provocar grandes daños a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos, o bien, los transforma en otros menos agresivos. Un primer grupo de antioxidantes no enzimáticos lo constituyen moléculas reductoras de pequeño tamaño e hidrosolubles, dentro de ellas tenemos al glutatión reducido y el ascorbato (Vitamina C). Pueden actuar tanto como pro o antioxidantes. Al ser hidrofílicos, no son efectivos frente a la peroxidación lipídica (Montero, 1996).

Un segundo grupo de antioxidantes no enzimáticos son las vitaminas liposolubles. Aquí se encuentran el α -Tocoferol (vitamina E), que es capaz de impedir las reacciones en cadena producidas por los radicales hidroperóxidos durante la peroxidación lipídica y el α -caroteno, que ofrece una protección eficaz frente al oxígeno singulete (Montero, 1996).

Las interacciones entre diferentes antioxidantes con varios metabolitos y sistemas de enzimas, constituye un área compleja, teniendo efectos sinérgicos e independientes unos de los otros. La acción de un antioxidante puede depender de la función apropiada de otros miembros del sistema, la protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, su reactividad hacia el estrés oxidativo y del estado de los antioxidantes con los cuales interactúa (Viada *et al.*, 2017).

2.6. Terapia antioxidante

Los antioxidantes no enzimáticos se pueden obtener a través de la dieta, estos pueden actuar de dos formas:

- 1- Previenen la generación excesiva de radicales libres
- 2- Después de producido el daño por los radicales libres, pueden controlar los niveles de éstos, evitando así que el daño continúe avanzando

Muchos de estos antioxidantes se encuentran en los alimentos que se consumen como parte de la dieta diaria. Las frutas y verduras, por ejemplo, además de proporcionar

antioxidantes, poseen macronutrientes que pueden prevenir mutaciones (Delgado, *et al.*, 2010).

Diversos estudios reportan que dicha “terapia antioxidante” es una alternativa para prevenir y combatir las distintas enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Sin embargo, a la hora de establecer los niveles diarios recomendables de antioxidantes, se deben tener en cuenta dos factores: si el individuo está sano o presenta algún tipo de patología y los niveles de antioxidantes son un parámetro más adecuado para la ingesta diaria, puesto que la metabolización en cada individuo es distinta.

Debido al uso de diferentes metabolitos para contrarrestar el estrés oxidativo, se conocen dos tipos: los primarios y secundarios, estos últimos presentes en muchos organismos. El metabolismo primario es el resultado de varias reacciones químicas catalizadas por las enzimas y proporciona a las células la energía y las macromoléculas indispensables para la construcción de las células tales como las proteínas, glúcidos, lípidos y el DNA (Roussos & Gaime, 1996).

Los glúcidos representan compuestos útiles como reserva energética, como material estructural y cementante. Los lípidos son compuestos de reserva energética y de carbono, componentes estructurales fundamentales de las membranas biológicas, entre otros. Las proteínas presentan un gran número de funciones entre las que destacan su actividad catalítica y hormonal. Los ácidos nucleicos por su parte, cumplen la primordial función de ser moléculas depositarias de la información genética (Ringulet & Viña, 2013).

2.7. Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios denominados también aleloquímicos, presentan diversos tipos de propiedades entre las que destacan la antiinflamatoria y antioxidante. Estos compuestos proceden del metabolismo de las plantas, dentro de las cuales algunos no tienen una función directa en procesos como respiración, fotosíntesis o transporte de nutrientes. Estos compuestos del metabolismo son sintetizados para cumplir distintas funciones como pueden ser de defensa ante agentes peligrosos, como patógenos o la presencia de animales herbívoros o bien para atraer insectos polinizadores. Los metabolitos secundarios no están presentes en todas las partes del vegetal en igual concentración, ni de igual manera en todas las especies vegetales, su producción suele estar acotada a un grupo taxonómico en particular. Hay además variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios, originadas por distintas reacciones químicas, lo que lleva a que aparezcan diferentes concentraciones de los mismos entre especies y entre individuos de una población (Ardoino *et al.*, 2013).

En virtud de su estructura, los metabolitos secundarios son químicamente reactivos; es decir, son aptos para ingresar en los sistemas vivos, interactuar y cambiar la estructura de un receptor o blanco molecular, y penetrar en las células donde pueden afectar varios procesos fisiológicos. De allí deriva su actividad biológica o farmacológica (Anaya & Espinosa, 2006).

2.7.1.1. Clasificación

Los metabolitos secundarios se dividen en tres grupos químicos principales, de acuerdo con las rutas mediante las cuales son sintetizados:

- **Compuestos nitrogenados:** comprenden principalmente a los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un grupo compuesto por cerca de 4000 estructuras conocidas, estos son fisiológicamente activos en humanos. Por otro lado, los glucósidos cianogénicos se consideran como los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa.
- **Terpenoides:** se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides; se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros.
- **Compuestos fenólicos:** se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos se refieren a sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otros (Ardoino *et al.*, 2013).

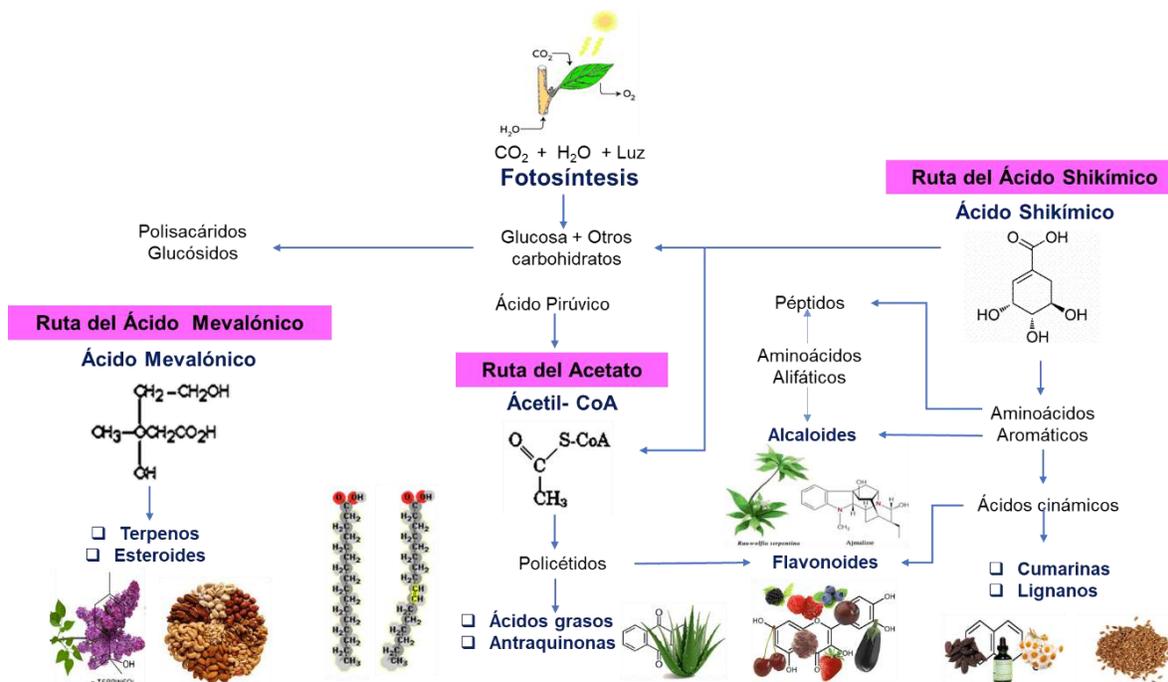
2.7.1.2. Biosíntesis

Se conocen en la actualidad tres grandes vías o rutas fundamentales que permiten la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Figura5):

- **Ruta del Ácido Mevalónico:** A partir de él, se forman unidades de prenilo que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, esteroides, carotenoides).
- **Ruta del Ácido Shikímico:** a partir de él, se forman los aminoácidos y desde ellos otros compuestos aromáticos más complejos (Fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides).
- **Ruta del acetato- malonato (ruta policética):** a partir del malonato y acetato se forman los policétidos (acetogeninas) y ácidos grasos (Avalos & Pérez-Urria, 2009).

Figura 6

Rutas metabólicas para la obtención de metabolitos secundarios, procedentes del metabolismo primario.



Nota: Modificado de Gutiérrez A. & Estévez A., 2009, Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI, *Rev. R. Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat.* (Esp) Vol. 103, N°2, pp 409- 419

La biosíntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de metabolitos secundarios es importante para la supervivencia de las plantas, puesto que algunos metabolitos interfieren en la interacción de la planta con su medio ambiente. En este sentido, también es relevante hacer notar que la biosíntesis y el almacenamiento de metabolitos secundarios o de sus precursores, ocurren en diferentes lugares de la célula vegetal. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

2.8. Quimiopreventivos y Biomarcadores

Genéricamente, quimiopreención significa la utilización de sustancias químicas para prevenir la aparición de una determinada enfermedad. Recientemente, se descubrieron nuevos usos y se revaloraron algunos metabolitos secundarios como agentes quimiopreventivos o sustancias que pueden prevenir problemas fisiológicos y

enfermedades humanas, entre las que se incluyen tanto metabolitos primarios como secundarios (Anaya & Espinosa, 2006).

Los quimiopreventivos pueden actuar a través de dos mecanismos principales:

- Extracelular: Reducen la formación de mutágenos y carcinógenos durante la preparación de los alimentos, así como su biodisponibilidad, aceleran el tránsito intestinal y modifican la flora microbiana intestinal. Además, inhiben la penetración de mutágenos y carcinógenos en las células
- Intracelular: Aumentan la actividad de enzimas involucradas en la neutralización de mutágenos y carcinógenos, e inhiben las actividades de las que participan las especies reactivas de oxígeno. También mejoran el sistema inmune, protegen al DNA de los carcinógenos e inhiben los efectos perjudiciales de los procarcinógenos sobre el DNA (Anaya & Espinosa, 2006).

Además, actualmente se trata de implementar el uso de biomarcadores de estrés oxidativo, el cual incrementa en condiciones patológicas. Estos tienen como objetivo desarrollar nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas para impedir o demorar la aparición de complicaciones tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Los biomarcadores ofrecen información sobre tres niveles progresivos de la enfermedad:

- a) Como parámetros medibles del daño a biomoléculas, tales como lípidos y proteínas;
- b) Como marcadores funcionales de funciones fisiológicas, por ejemplo, la función cognitiva;
- c) Como parámetros relacionados a una patología específica (Mañon, Garrido & Núñez, 2016).

2.9. Plantas medicinales

Las plantas constituyen un recurso valioso, entre ellas las denominadas “plantas medicinales”. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. De acuerdo con la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Bermúdez *et al.*, 2005).

Estas plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Bermúdez *et al.*, 2005).

2.10. Etnobotánica

La disciplina científica que estudia las relaciones entre el hombre y las plantas, a través del tiempo en diferentes ambientes, así como los usos que se les otorga a estas plantas es la etnobotánica (Hernández, 1979).

De acuerdo con Verde-Star, et al. (2016), el estudio de las plantas medicinales se lleva a cabo a través de una metodología a seguir, la cual, comprende las siguientes etapas:

1. Estudios Etnobotánico y etnofarmacológico.
2. Estudio Fitoquímico.
3. Estudio de Actividad biológica.

Muchos estudios etnobotánicos son de carácter descriptivo, haciendo difícil el análisis de la información obtenida, pero en los últimos tiempos se han venido desarrollando una serie de estimaciones cuantitativas del conocimiento tradicional que permiten estimar con mayor precisión el valor cultural de las especies en una comunidad particular. Esto puede contribuir a establecer planes de manejo para las especies utilizadas con mayor intensidad, así como estrategias para preservar el conocimiento tradicional (Domínguez, 1979).

Aunque en la actualidad existen técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos tradicionales aún constituyen una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición (Sharapin, 2000).

2.11. Familia Plantaginaceae

La familia Plantaginaceae está integrada por cerca de 90 géneros y 1900 especies de distribución cosmopolita, aunque con alta diversidad en zonas templadas. Los géneros mejor conocidos, posiblemente por su importancia como plantas de ornato y medicinal son *Angelonia* Bonpl., *Antirrhinum* L., *Bacopa* aubi., *Digitalis* spp., entre otras. En México. La familia está representada por 29 géneros y unas 206 especies, lo que lo ubica en el lugar 22 de las familias de angiospermas más diversas del país; los géneros con mayor número de especies son *Penstemon* (58), *Russelia* Jacq. (43) y *Plantago* (15) (Zacarias- Correa, et al., 2019).

2.11.1.1. Género *Russelia* Jacq.

Se nombra así en honor al naturalista escocés Alexander Russell (1715- 1768). Los miembros de este género presentan en común flores con forma de petardo. Las especies del género *Russelia* son principalmente arbustos, se encuentran en gran parte del mundo y son ligeramente resistentes a la sequía. Este género comprende 43 especies (INECOL 2010).

2.11.1.2. Clasificación de *Russelia equisetiformis*

Reino: Plantae
Filum: Traqueofita
Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Plantaginaceae
Género: *Russelia* Jacq.



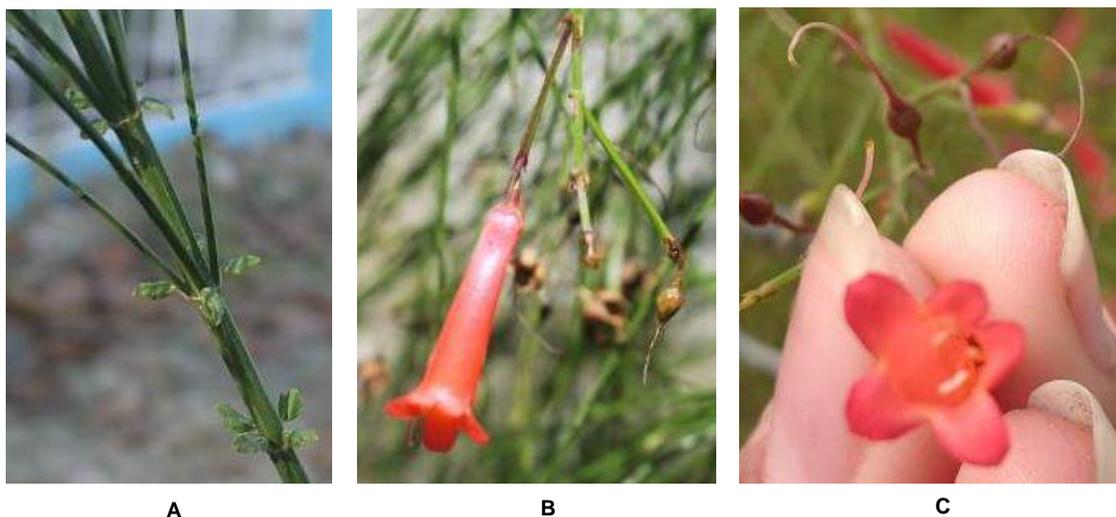
Especie: *Russelia equisetiformis* Schltld. & Cham
(GBIF, 2020)

2.11.1.2.1.1. Descripción morfológica

Planta de aproximadamente 1 m de altura profusamente ramificada con pequeñas hojas caducas, tallo verde brillante cuando joven y oscuro al madurar, poseen crestas prominentes en los ángulos y estrías entre ellos, además de entrenudos. Inflorescencia cerca de la parte superior de la planta, con 1 o 2 flores; las flores tienen brácteas pequeñas, los lóbulos del cáliz son ampliamente ovados, corola roja, su fruto es una capsula globosa que contiene semillas pequeñas color marrón claro, entre pelos blancos que contiene la capsula (Kreissig, 2019).

Figura 7.

Estructuras de Russelia equisetiformis.



Nota: A. Hojas, B. y C. Flor y fruto.

Las flores se asemejan a pólipos de coral, de ahí deriva su nombre al inglés de “coral plant”. Debido a su parecido externo con el *Equisetum*, se le nombro *Russelia equisetiformis* que significa “en forma de cola de caballo” (Kreissig, 2019).

2.11.1.2.2. Ecología

Poseen una adaptación a climas soleados/secos, puesto que su esbelto tronco es fotosintético. Sus flores son polinizadas principalmente por colibríes, sin embargo, también son atractivas para las mariposas (Kreissig, 2019).

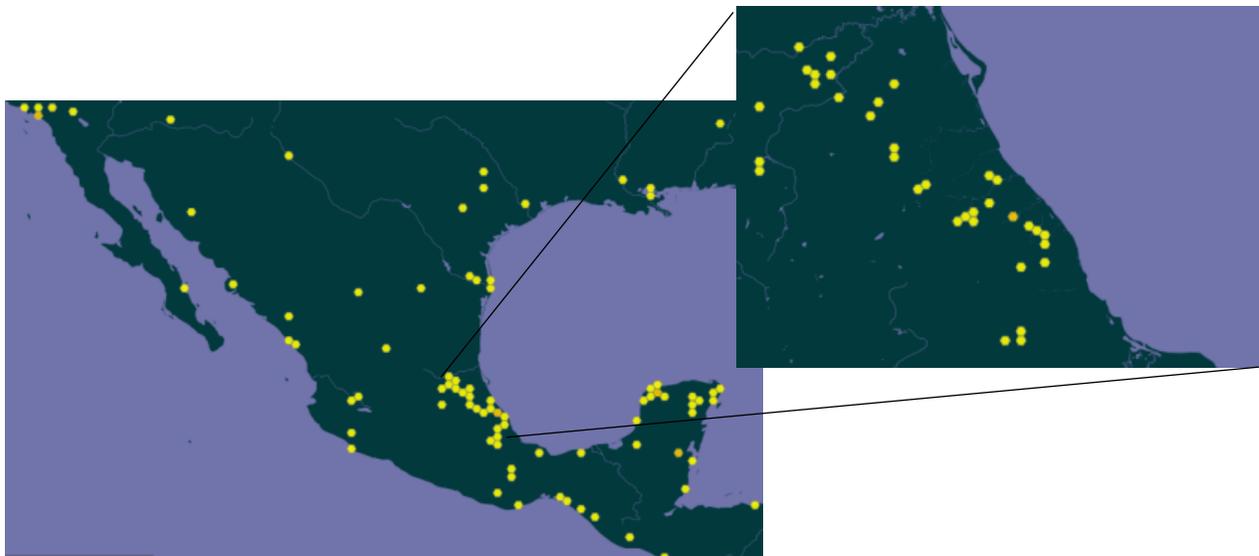
Esta planta es comúnmente usada en jardinería; se puede usar como seto, cerca viva, enrejado y también puede cultivarse en maceta; prefiere sitios soleados con suelo rico en materia orgánica (INECOL, 2019).

2.11.1.2.3. Distribución en México

De acuerdo con la Figura 7 *R. equisetiformis* es originaria de México y ampliamente distribuida en el mismo, además, se encuentra de manera introducida en América central, donde ha crecido prominentemente, así como en las islas del Caribe.

Figura 8

Distribución de Russelia equisetiformis en México.



Nota: Tomado de GBIF.org (20 de febrero de 2020). Disponible en: <https://www.gbif.org/species/5414601>

2.11.1.2.4. Estudios Etnobotánicos

En un estudio realizado en el año 2014 fueron colectados ejemplares de esta planta, en la Congregación del ejido Limón Chiquito. Encontrando que la especie está distribuida en áreas de vegetación asociadas a parcelas, bosque tropical subcaducifolio perturbado, así como en huertos familiares. Se realizaron entrevistas etnobotánicas las cuales mostraron que un 34% de la población entrevistada la utiliza para el mal de orín, 33% contra la diabetes, 13% le atribuye propiedades desinflamatorias y contra el cáncer, y un 7% considera que posee propiedades contra la tuberculosis. (Machuca *et al.*, 2014).

2.11.1.2.5. Estudios químicos

Un estudio realizado por Johnson, *et al.* (2011), identificó la presencia de 7 feniletanoides y 9 flavonoides en extracto metanólico acuoso, encontrando en mayor concentración el verbascosido.

Ríaz (2017) reportó la presencia de protocatecuato de metilo, ácido p- cumárico, ácido 4 hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido cafeínico, ácido siríngico y catequina en extractos metanólicos de *R. equisetiformis*.

2.11.1.2.6. Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos

De acuerdo con Awe, (2004) los extractos metanólicos de *R. equisetiformis* contienen compuestos con actividad antiinflamatoria y analgésica. Ríaz *et al* (2012), Comprobó que el extracto metanólico de *R. equisetiformis* presenta una mayor actividad antioxidante el

cual, al aumentar su concentración, es efectivo en la protección del DNA. Aunado a lo anterior, *R. equisetiformis* mostró un potencial antioxidante significativo en términos de eliminación de radicales libres.

Posteriormente el mismo Awe (2010) realizó un estudio en el cual, a ratas Wistar les indujo artritis y comprobó que a las ratas tratadas con extractos metanólicos de *R. equisetiformis* causaron un aumento en las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en el hígado y el bazo similar a las ratas tratadas con indometicina. También demostró que dicho extracto posee propiedades antioxidantes, como lo había propuesto él mismo anteriormente.

Ochi , *et al.* (2012), menciona en su estudio realizado a *R. equisetiformis*, que está posee propiedades de eliminación de radicales libres y antioxidantes. Además, en dicho estudio, se aisló un nuevo glucósido iridoide, 10- Ocinnamoyl sinuatol a partir de un extracto de hoja junto con 24 compuestos conocidos.

3. Justificación

El cáncer es una enfermedad multifactorial teniendo como tratamiento opciones sumamente agresivas e inespecíficas. En México, la práctica de la medicina tradicional se remonta a tiempos antiguos, teniendo diversidad de métodos empleados según las diferentes regiones del país. Estos métodos son comúnmente utilizados por personas de bajos recursos, los cuales, por ende, no gozan de servicios médicos adecuados que puedan costear. Limón Chiquito es un pequeño poblado ubicado en el estado de Veracruz, el cual posee una diversidad alta en especies vegetales, cuyos pobladores utilizan para sanar distintos padecimientos, entre los cuales se destaca el cáncer y la diabetes, enfermedades que ocupan los primeros lugares en causas de muerte, no solo en México, si no a nivel mundial. Bajo este criterio se evaluará la actividad antioxidante de *R. equisetiformis* en un sistema murino de cáncer.

4. Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la actividad antioxidante de *R. equisetiformis* en modelos murinos de cáncer.

Objetivos Particulares

- Realizar un estudio etnobotánico de *R. equisetiformis* en la localidad ejidal Limón Chiquito, Municipio Cazones de Herrera, Veracruz.
- Cuantificar los metabolitos primarios presentes en *R. equisetiformis*.
- Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en *R. equisetiformis*.
- Cuantificar la actividad antioxidante de *R. equisetiformis* mediante la captación de radicales libres.
- Evaluar la actividad antioxidante presente en los extractos hidroalcohólicos y acuosos de *R. equisetiformis* mediante marcadores de estrés oxidativo.

5. Hipótesis

Los extractos hidroalcohólicos y acuosos obtenidos de *R. equisetiformis* presentan propiedades antioxidantes que contrarrestarán los niveles de estrés oxidativo producto del proceso de carcinogénesis inducido con dimetilbenzantraceno (DMBA).

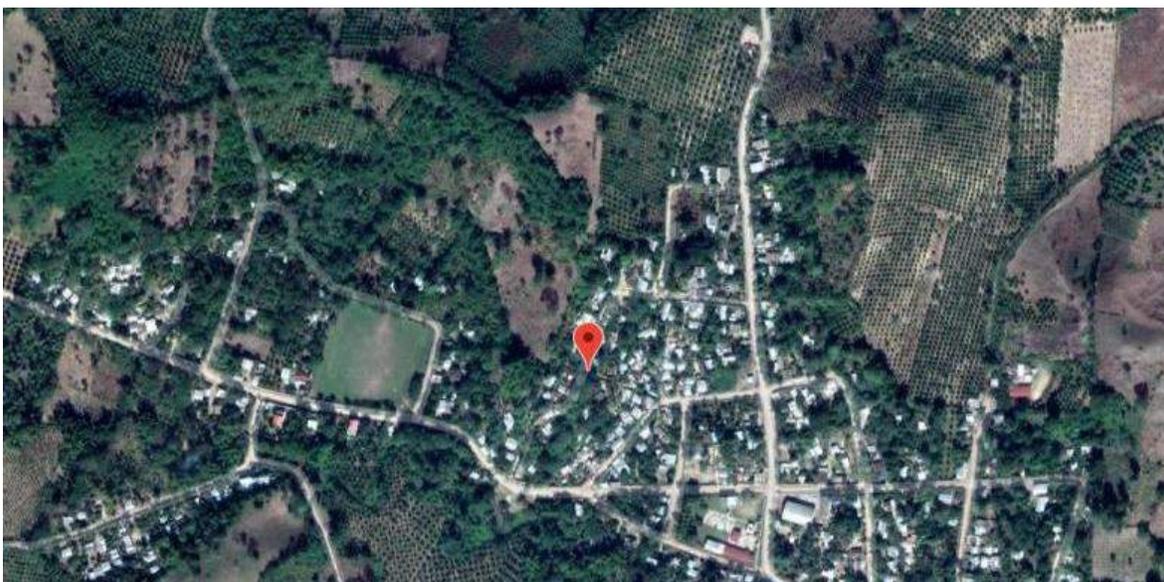
6. Metodología

6.1. Localidad de recolecta

Se realizó una recolecta de *R. equisetiformis* en septiembre de 2018 y marzo de 2019, en la localidad ejidal Limón Chiquito (20° 40' 49.3" N; 97° 16' 55.3" W), ubicada en el municipio de Cazonces de Herrera, Veracruz (Figura 9). Ubicado en una altitud de 10 metros, es hogar para 880 habitantes. Alrededor de 52.50 % de la población local son adultos (INEGI, 2019).

Figura 9

Mapa de la localidad ejidal de Limón Chiquito, Cazonces de Herrera, Ver., México (vista satelital).



Nota: Imagen tomada de Google Maps, 2020.

6.2. Entrevistas y caminata etnobotánica

Se realizó una caminata etnobotánica para ubicar al ejemplar, posteriormente se recolectaron ejemplares de *R. equisetiformis* para obtener 100 g de cada parte de la planta y con ello se realizaron los extractos hidroalcohólicos y acuosos. Además, se realizó un extracto hidroalcohólico y acuoso de planta completa, así como la dosis empleada por los pobladores de la localidad.

También se recolectaron dos ejemplares más para prensar, así como para su posterior identificación, la cual se realizó por el Herbario Nacional de México (MEXU).

Aunado a ello, se realizaron entrevistas (mínimo 50) de manera aleatoria a los pobladores acerca de *R. equisetiformis* para conocer sus usos, modos de preparación, parte empleada, entre otros.

6.3. Identificación de metabolitos secundarios *in situ*

Con el objetivo de evitar procesos de oxidación del material biológico se realizó un *screening* rápido *In situ* para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en cada una de las estructuras de *R. equisetiformis* utilizando las siguientes metodologías: Reactivo de Dragendorff, Mayer y Wagner (alcaloides), Cumarinas (Prueba de Baljet), Esteroides (Reactivo de Liebermann- Burchard y Prueba de Salkowski), Compuestos fenólicos (Reacción con FeCl₃), Flavonoides (Reacción de Shinoda), Quinonas (NaOH al 5%), saponinas (espuma), Taninos (gelatina-sal, FeCl₃, Formaldehído) y sesquiterpenolactonas (Prueba de Baljet).

6.4. Obtención de extractos hidroalcohólicos y acuosos

Primeramente, el material recolectado se sometió a un lavado exhaustivo con agua de grifo y posteriormente con agua des ionizada. Debido a la morfología de las hojas, flores, frutos, y raíz, solo se realizaron extractos acuosos. Los extractos se prepararon de la siguiente manera:

- Hidroalcohólicos (70:30): Los 100 g estructura se colocó en un litro de alcohol etílico al 70%. Se conservó en refrigeración durante un mes.
- Acuosos (1:1): En un litro de agua a punto de ebullición, se colocaron los 100g de cada estructura de la planta, durante 5 minutos, posteriormente se almacenó en botellas blancas.

6.5. Obtención de extractos secos

Se maceró la parte de la planta utilizada para cada extracto respectivamente, posteriormente se filtró para así, poder proceder a su evaporación. Una vez evaporada toda la fase líquida, se almacenó el extracto obtenido en frascos de vidrio. Posteriormente se registró su peso y se obtuvo el rendimiento final de cada uno.

6.6. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios

Se realizó además una identificación de metabolitos secundarios en laboratorio, preparando soluciones 0.01 g/ml, y después se realizaron diluciones 1:10, para obtener concentraciones de 0.001, 0.0001, 0.00001 g/ml del extracto seco con agua destilada, cloroformo o metanol según sea el caso, a las cuales se les aplicaron los ensayos realizados *in situ*, para la identificación de metabolitos, los cuales son:

6.6.1.1. Alcaloides.

La mayoría de los alcaloides en soluciones neutras o ligeramente ácidas, precipitan o dan coloraciones, como lo es el reactivo de Mayer (solución acuosa de tetrayodomercuriato de potasio), el reactivo de Wagner (solución de yodo en yoduro potásico) y el de Dragendorff (solución de Yoduro potásico bismúctico). Estos reactivos precipitan a los alcaloides de las soluciones acuosas débilmente acidificadas, bajo la forma de poli-yodatos complejos. Los precipitados pueden ser amorfos o cristalinos y de color variado: crema (Mayer), rojizo-anaranjado (Dragendorff), castaño-rojizo (Wagner) (Coy *et al.*, 2014). Para la prueba, por cada mililitro de extracto se le agregaron 1 ml de reactivo según sea el caso, la formación de un precipitado se considera positivo para la presencia de alcaloides.

Para la cuantificación se utilizó el método basado en la reacción con verde de bromocresol, a partir de una solución de atropina a una concentración de 0.1 mg/ml (Shamsa, *et al.*, 2008), se prepararon seis soluciones con concentraciones de 0.01 a 0.1 mg/m para la curva

de calibración. Para cada extracto se tomaron 5 ml, se transfirieron a un embudo de separación, al cual se le agregaron 5 ml de solución de verde de bromocresol y 5 ml una solución buffer de fosfato a pH 4.7. La mezcla se agitó, y el complejo formado se extrajo con cloroformo. Los extractos se recogieron en un matraz aforado de 10 ml y se completó a ese volumen con cloroformo. Las absorbancias del complejo en cloroformo se midieron a una longitud de onda de 470 nm y 420 nm.

6.6.1.2. Flavonoides.

Para la identificación de flavonoides se empleó la reacción de Shinoda la cual identifica aquellos flavonoides que tenga en su estructura un núcleo benzopirona, estos compuestos producen coloraciones rojizas cuando a las diluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado (Depolte, 2010). A 0.5 ml de los extractos se le adicionó un trozo de Magnesio y posteriormente 4 gotas de HCl concentrado, a continuación, se observa la coloración.

Para su cuantificación se usó la reacción de Tricloruro de aluminio (AlCl_3). El principio básico de este método colorimétrico es la formación de complejos estables de ácidos con el grupo cetona en el Carbono 4 o bien el grupo hidroxilo en el Carbono 3 o Carbono 5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides. Los complejos formados presentan un máximo de absorción a 415 nm (SAGARPA, 2019).

Se utilizó una curva patrón de quercetina 0.8 mg/ml en metanol. Se tomó 1 ml de extracto metanólico de cada muestra, posteriormente se le agregó 1 ml de AlCl_3 al 10% y 1ml de acetato de potasio 1M para después incubarlo en obscuridad durante 10 min y posteriormente se leyó su absorbancia a 415 nm.

6.6.1.3. Taninos.

Los taninos precipitan las proteínas o los alcaloides en solución. Originan desde opalescencia hasta precipitado. Se realizaron tres pruebas las cuales son:

I. 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 indicará 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 (Coy *et al.*, 2014). A 0.5 ml de cada extracto se le agregaron 0.5 ml de cloruro férrico y 0.2 ml de agua.

II. Reacciona con grenetina-NaCl. Esta técnica se basa en la habilidad de los taninos para precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas (Isaza, 2007). Para llevar a cabo esta prueba a 0.5 ml de cada extracto se le añadieron 0.5 ml de grenetina-NaCl, después se le agregaron 5 gotas de HCl concentrado y se dejó en reposo para la formación del precipitado.

III. Reacción con formaldehído. A 0.5ml de cada extracto se adicionaron 0.5 ml de formaldehído y se dejó en reposo 5 minutos para la formación del precipitado.

Para la cuantificación se llevó a cabo el método propuesto por Camacho (2012). Se utilizó una solución de Ácido tánico en Acetona al 70% a una concentración de 1 mg/ml. Se usó 1ml de cada extracto disuelto en Acetona al 70%, posteriormente se agregaron 5ml de yodato de potasio al 2.5%, se agita en el Vortex durante 1min para después incubarlo durante 7 min. Finalmente, se le agrega 1 ml de acetona al 70% y se lee su absorbancia a 550 mn.

6.6.1.4. Compuestos fenólicos.

Para la prueba de identificación se utilizó el método de Cloruro férrico (FeCl_3) el cual se basa en el ataque producido por el Ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro para la formación del complejo. Un cambio de color a azul, verde o negro indica la presencia de fenoles (Flores & Escudero, 2010). A 1 ml de una solución acuosa del extracto se le añadió 10 gotas de disolución FeCl_3 2.5%, para posteriormente evaluar el color.

La cuantificación se llevó a cabo por el método de Folin-Ciocalteu, en el cual los compuestos fenólicos reaccionan con dicho reactivo a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente. El mecanismo de reacción es una reacción de óxido-reducción (García, Fernández & Fuentes, 2015).

Se realizó una curva patrón de ácido gálico con concentraciones de 0.01 a 0.05 mg/ml. Para cada muestra se tomó 1 ml de extracto, se le adicionó 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N para posteriormente dejarlo reposar por 5 min, seguidamente se le adicionó 1.5 ml de Na_2CO_3 al 20%, se agitó y nuevamente se deja reposar por 30 min. Finalmente se registró la lectura en el espectrofotómetro UV- VIS a 760 nm.

6.6.1.5. Esteroides

I. La prueba de Lieberman-Burchard identifica cualquier esteroide o triterpenoide con un doble enlace (y en algunos casos aun insaturados). Estas pruebas específicas para esteroides con insaturación en sus anillos causan un cambio de color debido a la deshidratación que se da para la formación de dienos (Domínguez, 1979). Se preparó un extracto clorofórmico, se tomaron 0.5 ml de este extracto, se colocaron en otro tubo de ensayo y se le agregó 0.5 ml del reactivo de Lieberman, una coloración rosa, violeta, azul y verde indica la presencia de estos metabolitos.

II. Otra prueba que se utilizó para este metabolito fue la reacción de Salkowski que, en presencia de esteroides insaturados se forma un anillo de color rojo (Domínguez, 1979). Se realizó de igual manera, un extracto clorofórmico, posteriormente a 0.5 ml de dicho extracto se le agregaron 10 gotas de ácido sulfúrico, coloraciones amarillentas o rojitas indica la presencia de este metabolito.

Para la cuantificación de esteroides se realizó con una curva patrón de colesterol 1 mg/ml en cloroformo. El colesterol reacciona con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado. Se produce una pérdida de agua y una protonación del colesterol. Se constituyen en medio anhidro polímeros de hidrocarburos no saturados de intenso color verde azulado con máximos de absorbancia de 626 nm (Mekar, et al., 2016). Para cada muestra se ocupó 1 ml de extracto clorofórmico, posteriormente se adicionaron 2 ml de reactivo de Lieberman-Burchard, seguido de 1 ml de cloroformo. Se incubó durante 10 minutos y se leyó a 626 nm.

6.6.1.6. Saponinas.

Se refiere a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de esta, por lo que una característica de estos compuestos es que al sacudir las soluciones se forma una espuma abundante y relativamente estable (Depolte, 2010).

Se utilizó el método de la espuma, para ello se tomó 0.5 ml de cada extracto, se colocó en un tubo de ensayo, posteriormente se agitó vigorosamente para la formación de la espuma, si esta se forma deberá mantenerse por más de 1 minuto para considerar que hay presencia de saponinas.

No se realizó una cuantificación de saponinas ya que no se identificó dicho metabolito mediante la prueba de la espuma.

6.6.1.7. Cumarinas.

La prueba de Baljet es útil para identificar, en una estructura, el anillo lactónico. Este anillo reacciona con compuestos aromáticos nitrados generando, con previa ruptura de la lactona y por sustitución electrofílica en el anillo aromático, formando compuestos coloreados (Domínguez, 1979). Se tomó 0.5 ml del extracto y se le agregaron 200 μ L del reactivo del Baljet, una coloración naranja se considera positivo para el ensayo.

Para su cuantificación se realizó la reacción con Acetato de plomo descrita por Bravo & Jiménez (2011). Se utilizó una curva de calibración con Umbeliferona 2mg/ml en etanol. Se tomó 200 μ L de cada extracto etanólico, así como de las soluciones patrón. Posteriormente se agregaron 2 ml de agua destilada, 0.5 ml de Acetato de plomo al 5% y se aforó a 10 ml. Después se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Luego se tomó 1 ml del sobrenadante obtenido al cual se le agregó 4 ml de HCl 0.1 M. Finalmente se obtuvieron las absorbancias a 320 nm.

6.6.1.8. Quinonas

Las quinonas son muy abundantes en la naturaleza, en el reino vegetal se encuentran tanto en vegetales superiores como en hongos y bacterias. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas. Las antraquinonas son quinonas tricíclicas derivadas del antraceno y constituyen el grupo más interesante de quinonas. Pueden llevar funciones hidroxílicas en su estructura en diversas posiciones: si poseen dos grupos OH en las posiciones 1 y 2, tienen propiedades colorantes; si éstos se encuentran en las posiciones 1 y 8, el efecto es laxante (Alcántara, 2005).

Las quinonas α y β - hidroxiladas con la solución de hidróxido de sodio al 5% dan soluciones coloreadas que van del amarillo pasando por el rojo al violeta (Domínguez, 1979). En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 ml del extracto, se le agregaron 4 gotas de etanol y posteriormente 8 gotas de una solución de hidróxido de sodio al 5%.

La cuantificación de quinonas se realizó mediante espectrofotometría UV con una curva patrón de quercetina a una concentración de 1mg/ml en metanol. Se utilizó 1 ml de extracto metanólico por cada muestra al que se le agregó 3 ml de metanol (CH_3OH) y 3 ml de AlCl_3 al 2%. Luego se incubó durante 10 minutos para finalmente leer su absorbancia a 415 nm (Norma Ramal Cubana, 1994).

6.6.1.8.1. Sesquiterpenlactonas

Las sesquiterpenolactonas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono, son una clase de terpenoides con un anillo lactónico, que provienen biogenéticamente del farnesil difosfato. Se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean y con la terminación *ólido*, que indica la existencia de un grupo funcional lactónico (Villacorta, 2017).

Para su identificación se realizó la prueba de Baljet, la cual consiste en que a 0.5 ml del extracto etanólico se le adicionan 200 μ L del reactivo del Baljet, posteriormente se le agregan 4 gotas de hidróxido de potasio, una coloración naranja o rojiza se considera positivo.

Una de las formas de cuantificación de sesquiterpenlactonas en extractos vegetales es por medio de una solución alcalina de picrato de sodio. Esta reacción se basa en la formación de un complejo entre el ácido pícrico y la lactona α , β y γ insaturada, dicho complejo presenta coloración rojo claro a oscuro presentando una máxima absorción a longitud de onda de 495 nm (Orantes, 2008). La curva patrón se elaboró con estafiatina 0.0025 g en 2250 μ l de etanol. A cada extracto etanólico se le adicionan 2 ml de picrato de sodio, enseguida se deja incubar en obscuridad por 30 minutos para posteriormente medir su absorbancia a 495 nm.

6.7. Cuantificación de metabolitos primarios

6.7.1.1. Carbohidratos

Primeramente, se realizó la cuantificación de carbohidratos totales a través del método desarrollado por DuBois et al, el cual se basa en la deshidratación de carbohidratos con la adición del ácido sulfúrico, con esta reacción se forman derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), cuando este interactúa con el fenol facilita la formación de complejos que permiten la coloración de la solución y su cuantificación por espectrofotometría (López *et al*, 2017). Se utilizó una curva de calibración a partir de una solución de glucosa 100 mg/ml. Se tomó 1 ml de cada extracto, así como de las soluciones patrón, se agregó 0.5 ml de fenol al 5%, 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se incubó por 10 minutos. Posteriormente se agitó por 30 segundos y se colocó 20 minutos en baño de agua a temperatura ambiente; Finalmente se leyó a 490 nm.

Posteriormente se realizó la cuantificación de carbohidratos reductores por el método Miller (1959), el cual se basa en una reacción redox entre el ácido 3, 5- dinitrosalicílico (DNS) en presencia de calor y los azúcares reductores presentes en la muestra (Bello, Carrera & Díaz, 2006). Se empleó una curva de calibración con una solución patrón de glucosa 2 mg/ml. Para cada muestra se tomó 0.5 ml, así como de las soluciones patrón, se agregaron 0.5 ml del reactivo de DNS, se colocaron en baño maría a 100°C por 5 minutos. Se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añadió 5 ml de agua destilada, se agitó y se realizó la lectura a 540 nm.

Finalmente, la concentración de carbohidratos no reductores se obtuvo por la diferencia de los dos anteriores.

6.7.1.2. Lípidos

La cuantificación de lípidos totales se realizó por medio del ensayo de Sulfo-fosfo vainillina. Los lípidos insaturados reaccionan con el ácido sulfúrico en caliente con formación de iones

carbono. Posteriormente, éstos, en presencia de fosfo-vainilla dan una coloración rosada, la intensidad de dicho color es proporcional a la concentración de lípidos totales presentes en la muestra (Zöllner & Kirsch, 1962).

Se realizó una curva patrón de colesterol 1mg/ml en cloroformo. A cada muestra se le agregó 1 ml de solución cloroformo-metanol (2:1) y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se tomaron 100 ml del sobrenadante obtenido y se le agregó 1 ml de H₂SO₄, seguidamente se colocó a baño maría durante 10 minutos. Después se tomaron 100 ml de este y se le agregó 2.9 ml de vainillina al 10% en ácido fosfórico, al finalizar se leyó su absorbancia a 430 nm.

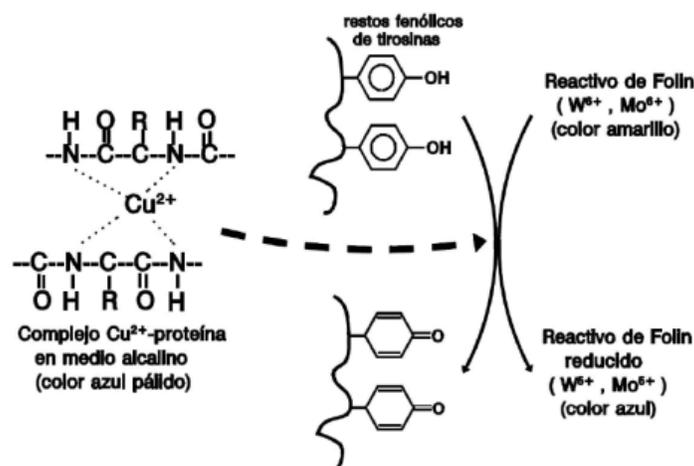
6.7.1.3. Proteínas

Se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry (1951); este método consta de dos etapas como se puede apreciar en la Figura 8, a continuación, se explican las 2 etapas:

- 1) Los iones Cu²⁺, en medio alcalino se unen a la proteína formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu²⁺-proteína tienen un color azul claro. Además, provoca un desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu²⁺ se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. Al producirse esa reacción se produce un cambio de color que puede ser cuantificado a una absorbancia de 660nm.

Figura 10

Reacción llevada a cabo por medio del método de Lowry



Nota: Tomado de Lowry H., Rosebrough I., Farr & Randall J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. Biol. Chem., 183:265-275

Se utilizaron 3 reactivos denominados “A”, “B” y “C” para preparar el reactivo D en una proporción de 50:0.5: 0.5 v/v, Cada reactivo se preparó de la siguiente forma:

- Reactivo A: contiene Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% en Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1M.
- Reactivo B: elaborado con Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$) al 1%
- Reactivo C: preparado con Tartrato de sodio-potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$)

Para cada muestra se tomó 1 ml, posteriormente se le agregó 5 ml del reactivo D y se dejó incubar por 15 minutos en obscuridad. Después se le agregó 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu mezclando bien cada muestra para luego incubarla nuevamente por 30 minutos en obscuridad. Finalmente se leyó su absorbancia a 580 nm.

6.8. Diseño Experimental

Se utilizaron ratones hembra CD1 obtenidos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Los procedimientos de experimentación se desarrollaron bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Los ratones se dividieron en 10 grupos con 6 ratones cada uno, aplicando en cada uno un tratamiento diferente vía oral, de acuerdo con la tabla siguiente:

Tabla 1

Grupos formados de ratones para el proceso de inducción de carcinogénesis

Grupo	Números de ratones	de los Tratamiento
1	1-6	Control DMBA
2	7- 12	DBMA+ Planta completa acuoso
3	13- 18	DMBA + Flor acuoso
4	19- 24	DBMA+ tallo
5	25- 30	Vehículo (Aceite de olivo)
6	31- 36	Tallo acuoso
7	37-42	Flor acuoso
8	43-48	Control
9	49-54	Planta completa (dosis doble)
10	55-60	Planta completa

6.9. Inducción de carcinogénesis con DMBA al modelo experimental

Se utilizó el modelo de carcinogénesis química de 7, 12- dimetilbenzantraceno (DMBA), el cual es un hidrocarburo policíclico aromático que participa en la etapa de iniciación dentro del proceso de progresión tumoral. Esta etapa se caracteriza por la activación metabólica de los procarcinógenos y su unión covalente con el ADN (aductos) lo que resulta en mutaciones específicas de genes susceptibles (Arcos, 2005).

El proceso de carcinogénesis se indujo en 4 grupos de estos ratones con DMBA como inductor, a cada ratón se le aplicó vía oral 50 μL , para así dar inicio al proceso de carcinogénesis durante 3 meses. Pasado este tiempo se le aplicó a cada ratón una dosis de 50 μl del extracto asignado, de acuerdo a la tabla 1.

Para analizar los marcadores de estrés oxidativo se cuantificaron nitritos (en relación con el óxido nítrico) y lipoperoxidación, además de estudiar la actividad de la catalasa.

6.10. Obtención del suero sanguíneo

Se sacrificó a los ratones por medio de la decapitación al término de los 3 meses más el tratamiento proporcionado a cada uno, la sangre obtenida se colectó en tubos Vacutainer con heparina, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero sanguíneo.

6.11. Obtención de homogenado de Hígado

Se realizó la extracción del hígado y bazo del ratón posterior a su sacrificio, el hígado fue perfundido con solución fisiológica de NaCl, se maceró con buffer (TRIS/pH 7.5) en una relación de 20g de hígado por 100mL de buffer, seguidamente se filtró y se centrifugó a 3000rpm durante 10 min para, finalmente, obtener el sobrenadante al que se le realizaron las siguientes pruebas. Respecto al bazo del ratón solo se tomaron sus medidas.

6.12. Cuantificación de proteínas en suero sanguíneo y homogenado de hígado

El ensayo de Biuret se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico, la intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas, por lo que se mide por espectrofotometría a 545 nm (Fujimoto, *et al.*, 1985).

Se preparó una curva de calibración a partir de una solución patrón de albumina purificada 10mg/ml. Para el contenido de proteínas en los extractos, se tomó 1 ml de una solución acuosa de cada uno y se le añadió 2 ml del reactivo de Biuret, se dejó reposar por 20 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a 545 nm.

La concentración de proteínas obtenida mediante este método fue empleada para registrar la concentración final de los marcadores de estrés oxidativo por mg/ml de proteína.

6.13. Marcadores de Estrés oxidativo.

6.13.1.1. Cuantificación de nitritos

La reacción de Griess se fundamenta en la formación de un cromóforo de la sulfanilamida con el nitrato en un medio ácido, seguido de un acoplamiento con amina bicíclicas, como el N.1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (Adarmes *et al.*, 2009).

Se preparó una curva patrón, utilizando como solución patrón de Nitrito de sodio (100 μM) y concentraciones de 0, 20, 40, 60, 70, 80, 90 μM . Se agregó en cada tubo la cantidad correspondiente de agua y solución patrón, posteriormente se adicionó 1 ml de Sulfanilamida e incubó por 15 min en oscuridad. Enseguida se agregó 1 ml de reactivo de NED y nuevamente se incubó durante 15 min en oscuridad, al finalizar el tiempo se leyó a 540 nm.

6.13.1.2. Lipoperoxidación

La principal sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBA) en el malondialdehído, él cual es un aldehído de tres carbonos altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos polinosaturados y también durante el metabolismo de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas. El malondialdehído puede combinarse con diversos grupos funcionales de proteínas, lipoproteínas, ARN y ADN (Fagali, 2011).

Se tomaron 0.1 ml de muestra, al cual se le añadió 0.1 ml de buffer TRIS-HCl, 0.1 ml de FeSO₄ y 0.1 ml de ácido ascórbico. Posteriormente se añadió 0.6 ml de agua destilada para completar el volumen de 1 ml. Esto se incubó a 37 °C durante 15 minutos.

Al finalizar este lapso se añadió 1 ml de ácido tricloroacético (TBA) y 2 ml de TBA, posteriormente se incubó por 15 minutos a 100 °C. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se leyó el sobrenadante a 532 nm.

La concentración de malondialdehído (MDA) se calculó usando el coeficiente de extinción del complejo MDA-TBA el cual es $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

6.13.1.3. Actividad de la enzima catalasa

Se determinó de acuerdo con metodología descrita por Chance y Machley (1995), este método se fundamenta en el principio de la enzima, la cual se determina a través de la descomposición de H₂O₂ (Aebi, 1984). En el espectrofotómetro UV se midió la descomposición del H₂O₂ a 240 nm, agregando 25 µl de cada una de las muestras de homogenado de hígado. Se tomó un dato cada 10 segundos durante 3 minutos.

Para calcular la actividad de la catalasa se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{UCAT/ ml} = ((\Delta A_{240}/\epsilon) (\text{FD de la reacción})) / \text{mg/ml de proteína}$$

Donde:

ε es el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a 240 nm (37.36 µmol⁻¹ml abs)

FD es el factor de dilución.

6.14. Actividad antioxidante

6.14.1.1. DPPH+

El ensayo de DPPH es una de las diversas técnicas empleadas para estimar la actividad secuestradora de radicales de compuestos específicos o extractos naturales. Esta técnica espectrofotométrica emplea el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH), que posee un espectro de absorbancia característico, con un máximo de absorbancia a 515 nm (Fagali, 2011).

Se empleó una solución de ácido ascórbico 4mg/ml para una curva de calibración. Para cada muestra se tomó 1 ml de solución metanólica, a cada una se le agregaron 2 ml de DPPH⁺ 1 µM, posteriormente se incubaron por 30 minutos protegidos de la luz. Al finalizar esta espera, se tomó su absorbancia a 517 nm.

6.15. Análisis estadístico

Se empleó la base del software estadístico SPSS, el cual incluye estadísticas descriptivas como la tabulación y frecuencias de cruce, estadísticas de dos variables, además pruebas T, ANOVA y de correlación.

7. Resultados

7.1. Registro etnobotánico de *Russelia equisetiformis*

De las entrevistas etnobotánicas realizadas a 50 personas, el 80% correspondió al género femenino y 20% al masculino (Figura 14), con un rango de edad entre 60 a 70 años (Figura

12). De acuerdo a la figura 11 el 24% de las personas entrevistadas, utilizan esta especie para tratar padecimientos del riñón, el mal de orín, así como para la diabetes principalmente. Para el tratamiento de estos padecimientos se emplea la planta completa; Su ingesta se realiza vía oral por medio de una cocción o como agua de tiempo, con un tiempo de tratamiento variable que puede abarcar un mes o hasta observar mejoría, es decir, sin un periodo de tiempo definido.

Figura 11

Padecimientos tratados con R. equisetiformis

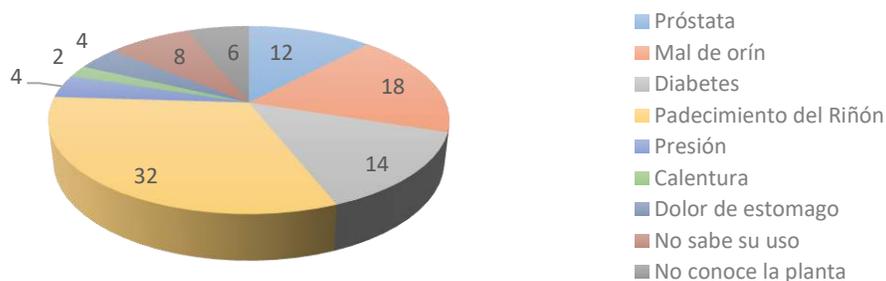
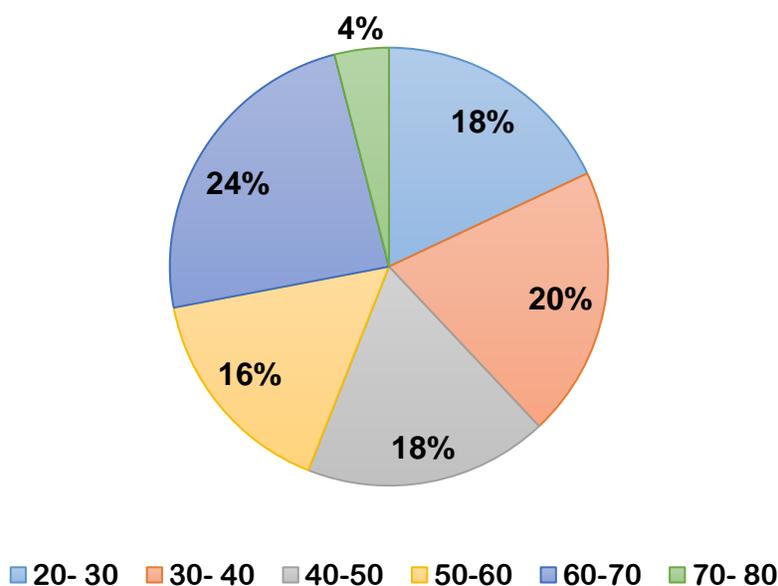
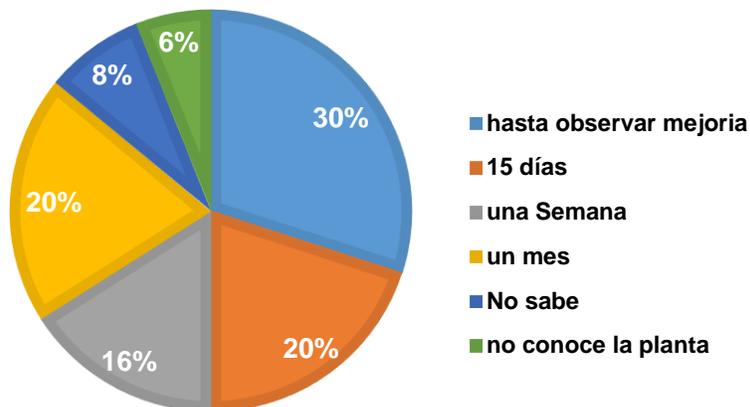


Figura 12

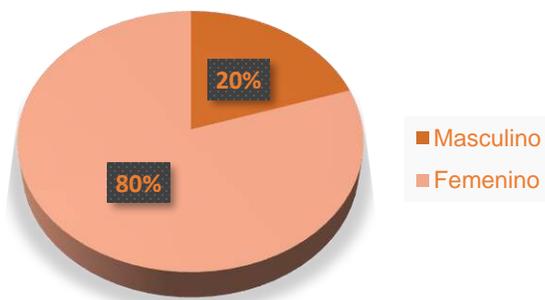
Rango de edad de la población entrevistada



Nota: edad en años y sin distinción de género.

Figura 13*Tiempo de tratamiento usando R. equisetiformis*

Nota: Tiempo en días

Figura 14*Género más entrevistado en el estudio etnobotánico.*

7.2. Identificación *in situ* de metabolitos secundarios de *R. equisetiformis*

Las pruebas de identificación *in situ* se realizaron con aproximadamente 0.1g de cada estructura de la planta (tallo, flor, fruto, hoja). En este primer estudio preliminar se encontró la presencia de todos los metabolitos mencionados anteriormente, a excepción de saponinas (Tabla 2).

Tabla 2.

Identificación se metabolitos secundarios en Russelia equisetiformis in situ

Metabolito	Reacción	Tallo "Claro"	Tallo "Oscuro"	Flor	Fruto	Hoja
Alcaloides	Dragendorff	- 	- 	- 	+	- 
	Wagner	- 	- 	- 	+	- 
	Meyer	- 	- 	- 	+	- 
Esteroides y esteroides	Liebermann-Burchard	- 	+	+	+	+
	Salkowski	+	+	+++	++	++
Flavonoides	Shinoda	+	-	++	++	-

Metabolito	Reacción	Tallo "Claro"	Tallo "Oscuro"	Flor	Fruto	Hoja
Compuestos Fenólicos	Fe Cl ₃	+	++	-	+++	-
						
Cumarinas	Baljet	-	+	+	+++	-
						
Quinonas	NaOH	++	++	++	+	+
						
Saponinas	Espuma	-	-	-	-	-
						
Sesquiterpenolactonas	Baljet	-	++	+	+	-
	NH ₂ OH·HCl	-	-	-	-	-
						

Metabolito	Reacción	Tallo "Claro"	Tallo "Oscuro"	Flor	Fruto	Hoja
Taninos	Gelatina-Sal	+	+	-		++
	FeCl ₃	+	+	-	-	
	Formaldehído	+	+			+

Nota: Resultados de las pruebas rápidas para la identificación de metabolitos secundarios.
 +: presencia escasa, ++: presencia relativamente abundante, +++: presencia abundante, -: no detectado

7.3. Identificación de metabolitos secundarios en extractos secos

Se realizaron extractos hidroalcohólicos (70:30) solamente de talla "claro", tallo "oscuro" y planta completa, mientras que de extractos acuosos (1:1) se realizaron de raíz, hoja, tallo, fruto y flor, incluyendo la dosis recomendada y planta. Los rendimientos obtenidos para cada extracto se observan en la Tabla 3. Además, se realizaron diluciones seriadas de los extractos secos para realizarle las pruebas de identificación rápida, los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 3*Rendimiento de los extractos secos de R. equisetiformis*

Parte de la planta	Tipo de Extracto	Rendimiento (%)
Planta completa	Acuoso	3.9983
Raíz		1.04175
Flor		4.75
Hoja		7.07
Fruto		5.913
Dosis recomendada		1.8075
Tallo		2.3981
Tallo "claro"		Hidroalcohólico
Tallo "oscuro"	3.9865	
Planta completa	5.1717	

Nota: Resultados expresados en porcentaje

Tabla 4*Identificación de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos de R. equisetiformis en cada dilución*

Extracto	Concentración (g/ml)	Alcaloides			Taninos		Esteroides			Fenoles	Flavonoides	Quinonas	Saponinas	Cumarinas	Sesquiterpenolactonas
		Wagner	Mayer	Dragendorff	G-NaCl	Formaldehído	FeCl ₃	Salvoski	Lieberman-Burchard	FeCl ₃	Shinoda	NaOH 5%	Espuma	Baljet	Baljet
Tallos "Claro"	0.01	+++	++	+	-	-	+++	+++	+	+++	++	+++	-	++	++
	0.001	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	++	-	+	+
	0.0001	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tallos "Oscuro"	0.01	+	++	+	+	+	+++	++	+	+++	++	+++	-	++	+++
	0.001	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	++	-	+	+
	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Planta Completa	0.01	+++	++	+++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	-	++	+++
	0.001	++	+	+	+	-	+	++	+	+	+	++	-	+	+
	0.0001	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: +: presencia escasa, ++: presencia relativamente abundante, +++: presencia abundante, -: no detectado

Tabla 5

Identificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Russelia equisetiformis* en cada dilución

Extracto	Concentración (g/ml)	Alcaloides			Taninos			Esteroides		Fenoles	Flavonoides	Quinonas	Saponinas	Cumarinas	Sesquiterpenolactonas
		Wagner	Mayer	Dragendorff	G-NaCl	Formaldehído	FeCl ₃	Salvoski	Liebermann	FeCl ₃	Shinoda	NaOH 5%	Espuma	Baljet	Baljet
Raíz	0.01	++	+++	+++	+++	+	-	++	++	+	+	+	-	+	+
	0.001	+	+	-	++	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	0.0001	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tallo	0.01	+	+	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
	0.001	-	-	+	-	++	+	-	++	+	+	++	-	+	++
	0.0001	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoja	0.01	+++	++	+	++	++	+++	+	+	+++	+++	+++	-	+	++
	0.001	+	+	-	+	+	-	-	-	++	-	++	-	-	+
	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flor	0.01	++	++	++	+	+	+++	++	++	+++	+++	+++	-	+++	+++
	0.001	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	++	-	+	+
	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0.00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruto	0.01	+	++	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+++	-	+++	+++
	0.001	+	+	-	++	+	-	+	-	+	++	++	-	+	+
	0.0001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.00001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Extracto	Concentración (g/ml)	Alcaloides			Taninos			Esteroides		Fenoles	Flavonoides	Quinonas	Saponinas	Cumarinas	Sesquiterpenolactonas
		Wagner	Mayer	Dragendorff	G-NaCl	Formaldehido	FeCl ₃	Salvoski	Liebermann	FeCl ₃	Shinoda	NaOH 5%	Espuma	Baljet	Baljet
Planta completa	0.01	++	-	++	++	-	+++		+	+++	-	+++	-	+++	+++
	0.001	-	-	+	++	-	-	+	+	+	-	++	-	+	+
	0.0001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0.00001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: +: presencia escasa, ++: presencia relativamente abundante, +++: presencia abundante, -: no detectado

7.4. Cuantificación de metabolitos primarios en extractos secos de *R. equisetiformis*

La cuantificación de los tres principales metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos y proteínas) se realizó según los métodos propuestos anteriormente a una concentración de 0.001 mg/ml.

Tabla 6

Cuantificación de metabolitos primarios

Metabolito	Extractos acuosos							Extractos hidroalcohólicos		
	Raíz	Tallo	Hoja	Flor	Fruto	Planta completa	Dosis recomendada	Tallo "claro"	Tallo "oscuro"	Planta completa
Lípidos	4.173	7.418	13.910	7.882	7.727	10.355	10.046	8.964	9.273	12.364
Carbohidratos totales	30.497	30.218	96.365	46.163	40.593	55.006	102.910	60.367	44.005	43.587
Carbohidratos reductores	3.150	11.230	12.527	12.972	6.412	6.819	6.745	15.492	12.713	12.416
Carbohidratos no reductores	27.346	18.988	83.837	33.190	34.181	48.186	96.164	44.874	31.291	31.170
Proteínas	73.587	140.686	154.857	91.685	141.027	159.808	200.956	215.297	150.930	114.051

Nota: cantidad expresada en mg/ml en 1 ml de cada muestra

7.5. Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos secos de *R. equisetiformis*

La cuantificación de metabolitos secundarios se llevó a cabo según los métodos descritos anteriormente, con una concentración de 0.01 g/ml del extracto seco en agua, cloroformo o metanol según la prueba a realizar, la tabla 7 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 7

Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos de R. equisetiformis

Metabolito secundario	Extractos acuosos							Extractos hidroalcohólicos		
	Raíz	Tallo	Hoja	Flor	Fruto	Planta completa	Dosis recomendada	Tallo "claro"	Tallo "oscuro"	Planta completa
Alcaloides	0.0804	0.0972	0.0827	0.0697	0.0846	0.0586	0.0762	0.1651	0.0984	0.0793
Compuestos fenólicos	3.944	20.864	55.649	13.724	17.376	23.635	45.869	23.635	29.406	31.296
Cumarinas	0.0200	0.0343	0.0781	0.0553	0.1071	0.0390	0.0570	0.0725	0.0607	0.0621
Esteroides	3.923	1.272	5.514	3.181	4.507	3.605	1.961	3.340	3.764	3.658
Flavonoides	0.0088	0.0392	0.0753	0.0653	0.0470	0.2380	0.0653	0.1993	0.2762	0.0507
Quinonas	9.520	8.636	17.273	34.056	16.684	57.611	27.284	41.122	68.014	47.207
Sesquiterpenolactonas	0.100	1.478	2.227	0.538	0.529	0.346	0.775	0.182	6.317	1.953
Taninos	7.425	3.712	8.735	1.747	4.367	18.563	3.494	11.356	25.333	4.149

Nota: Concentraciones expresadas en µg/ ml en 1 ml de muestra

7.6. Marcadores de estrés oxidativo

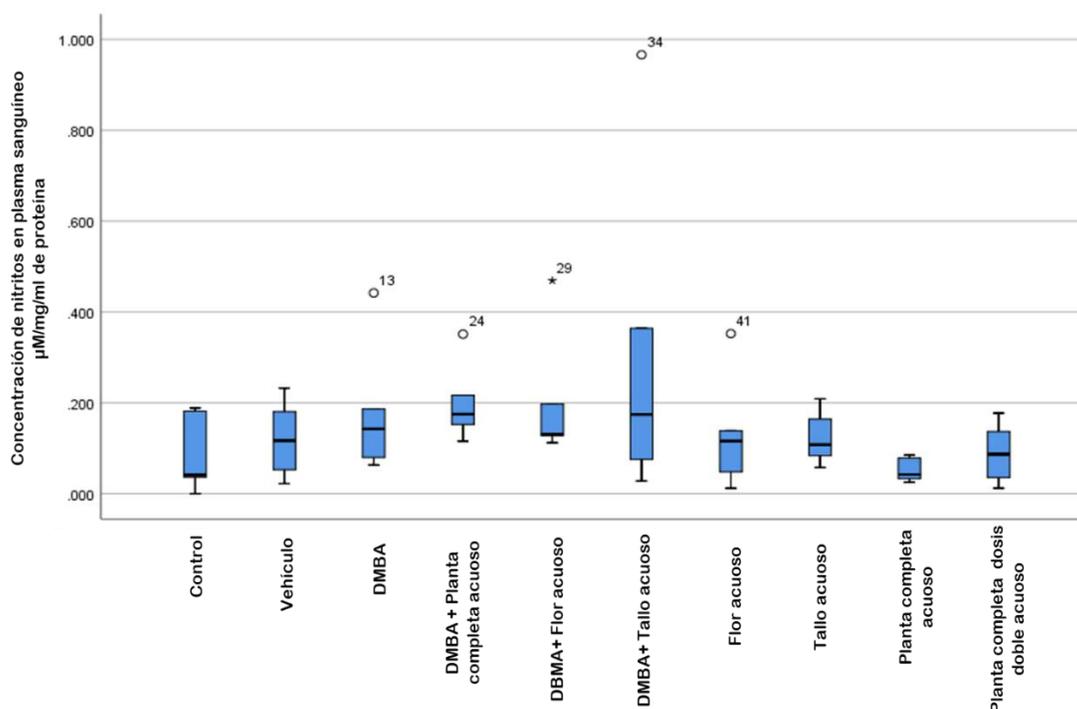
Se realizó un análisis estadístico con un nivel de confianza de $P > 0.05$. Los datos se analizaron de acuerdo con los 10 grupos formados y descritos en la tabla 1. Además, se realizaron diagramas de caja a cada marcador para una representación gráfica de los resultados.

7.6.1.1. Cuantificación de nitritos en plasma sanguíneo y homogenado de hígado

La concentración de nitritos en plasma sanguíneo no mostró significancia estadística ($p > 0.05$) para ninguno de los 10 grupos. No obstante, se observa en el grupo DMBA+flor acuoso un caso extremo con el ratón 29, mientras que los grupos DMBA, DMBA+planta completa acuoso, DMBA+tallo acuoso y flor acuoso presentan cada uno un valor alejado (ratones 13, 24, 34 y 41) con respecto del 50% central de la distribución. Además, el grupo DMBA+tallo acuoso presenta una mayor distribución de datos con respecto a los otros 9. Los grupos Control, DMBA+flor acuoso, así como planta completa acuoso presentan una distribución asimétrica positiva.

Figura 15

Cuantificación de nitritos en plasma sanguíneo de ratones CD1

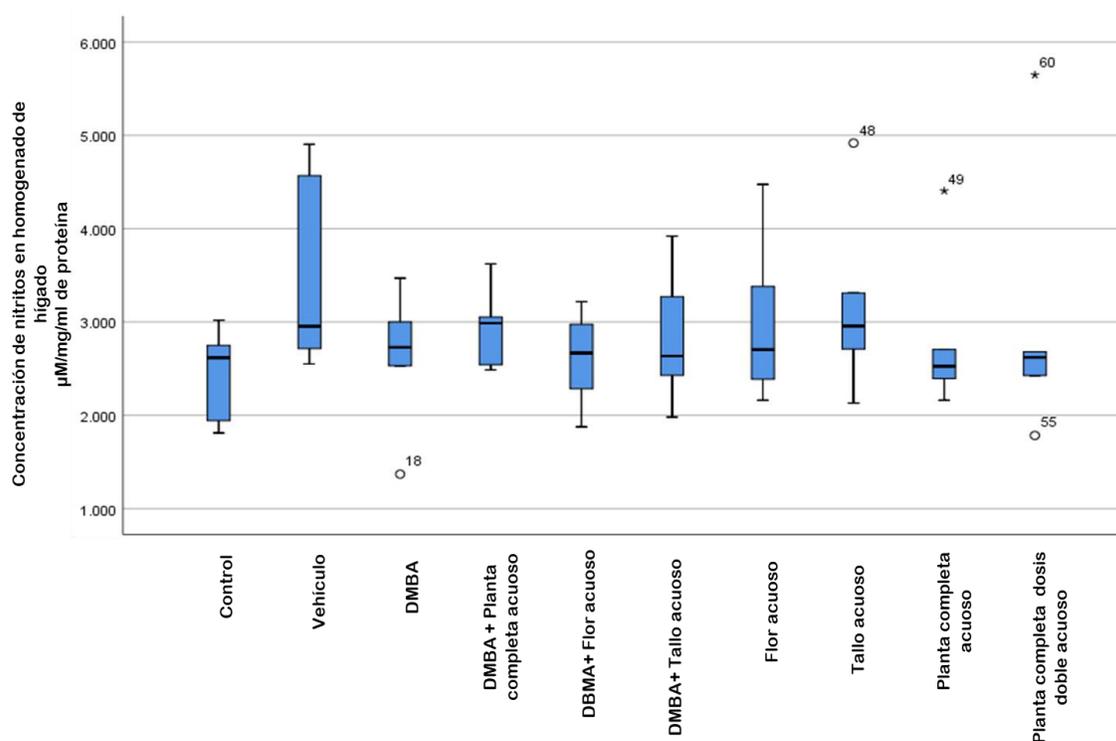


Nota: Concentración en mM/mg sobre concentración de proteína.

Los resultados obtenidos en el homogenado de hígado no presentaron diferencia significativa ($p>0.05$) para ninguno de los 10 grupos. El grupo de planta completa acuoso y el de planta completa dosis doble acuoso presentan cada uno un valor extremo (ratón 49 y 60) por encima del diagrama, mientras que los grupos de DMBA, planta completa dosis doble y tallo acuoso, presentan un valor (ratón 16 y 55) por debajo del 50% central de distribución en los dos primeros grupos y por encima (ratón 40) en el último grupo mencionado. Los grupos de DMBA+planta completa acuoso, así como planta completa dosis doble acuoso presentan distribución asimétrica negativa, mientras que el grupo control presenta una distribución asimétrica positiva.

Figura 16

Cuantificación de nitritos en homogenado de hígado de ratones CD1



Nota: Concentración en mM/mg sobre concentración de proteína.

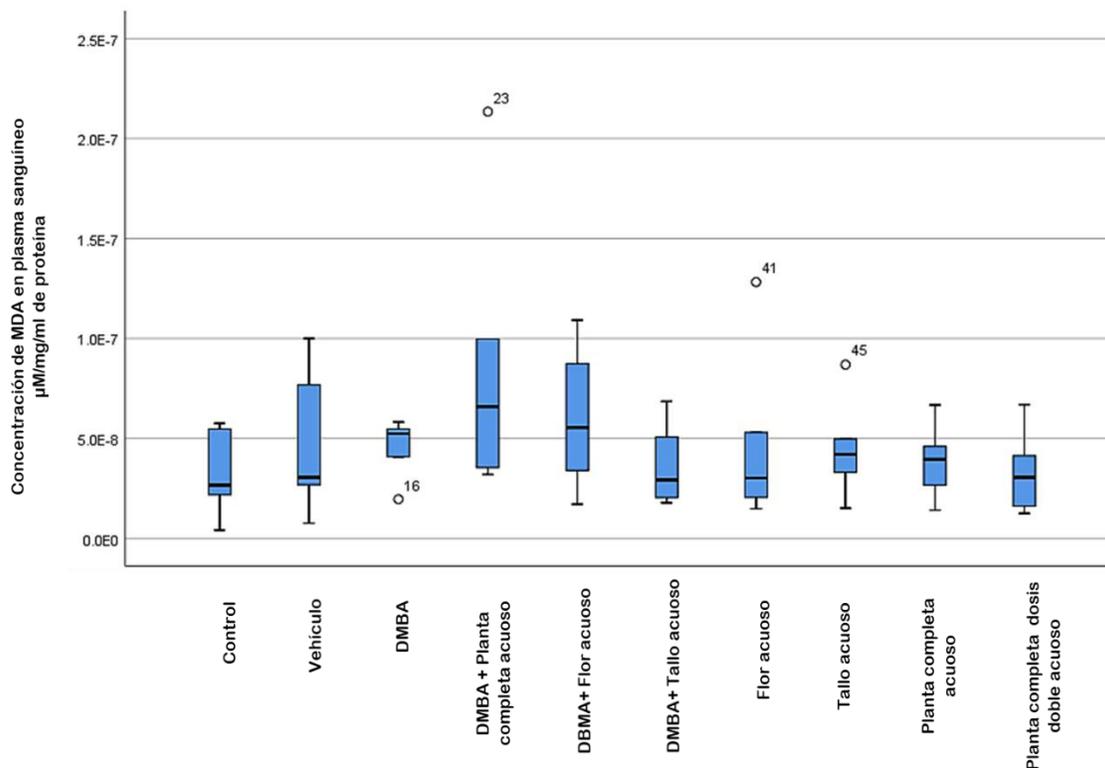
7.6.1.2. Cuantificación de malondialdehído (MDA) en plasma sanguíneo y homogenado de hígado.

En la cuantificación de MDA en plasma sanguíneo no mostró diferencia estadística significativa ($p>0.05$) para ningún grupo. Los grupos DMBA+planta completa acuoso, flor acuoso y tallo acuoso presentaron un valor por encima del 50% central de la distribución (ratón, 23, 41 y 45), mientras que el grupo DMBA presentó un valor (ratón 16) por debajo del 50% central de distribución. El grupo control y el grupo Vehículo presentan una asimetría positiva mientras que el grupo DMBA presentó asimetría negativa. Además de que los

grupos DMBA+planta completa acuoso y DMBA+flor acuoso, presentaron valores mayores de MDA con respecto al control positivo (DMBA). Los grupos tratados únicamente con extracto de planta completa acuoso y planta completa dosis doble acuoso presentaron los valores más bajos con respecto al control positivo.

Figura 17

Cuantificación de MAD en plasma sanguíneo de ratones CD1

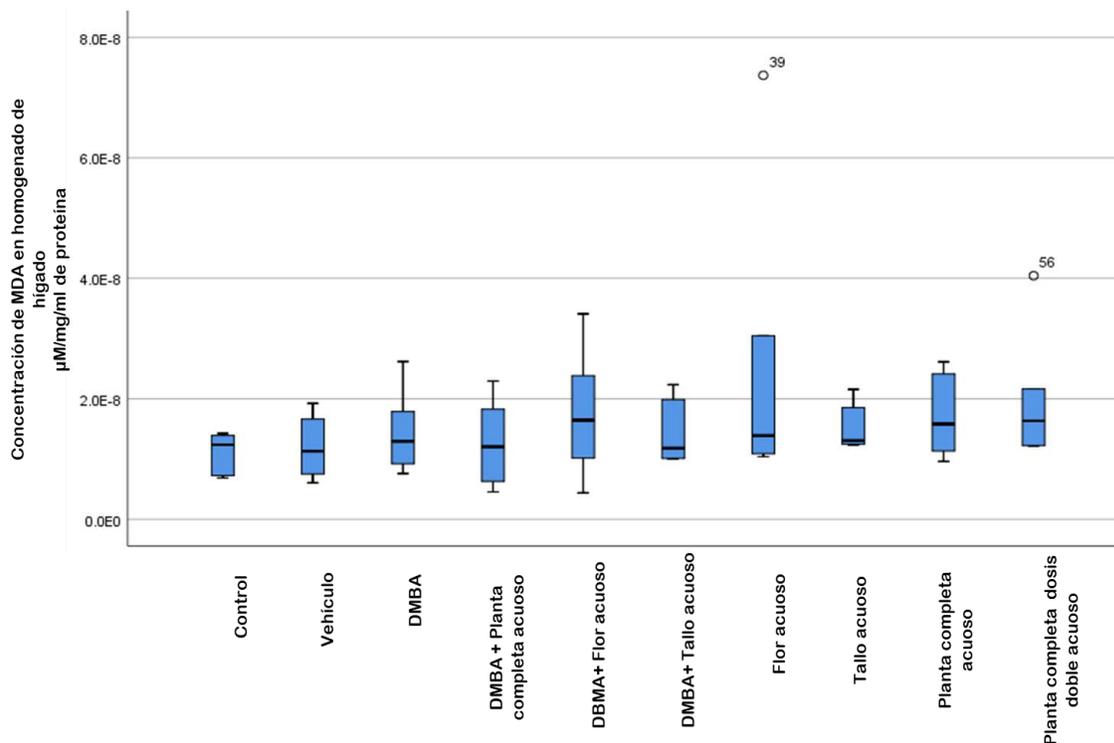


Nota: Concentración en µMol-1/ mg sobre concentración de proteína.

Respecto al homogenado de hígado, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en ninguno de los 10 grupos. Los grupos de flor acuoso y planta completa dosis doble acuoso presentaron cada uno un valor alejado en el ratón 39 y 56 respectivamente. El grupo control presentó asimetría negativa mientras que los grupos de DMBA + tallo acuoso y tallo acuoso presentaron asimetría positiva.

Figura 18

Cuantificación de MAD en homogenado de hígado de ratones CD1



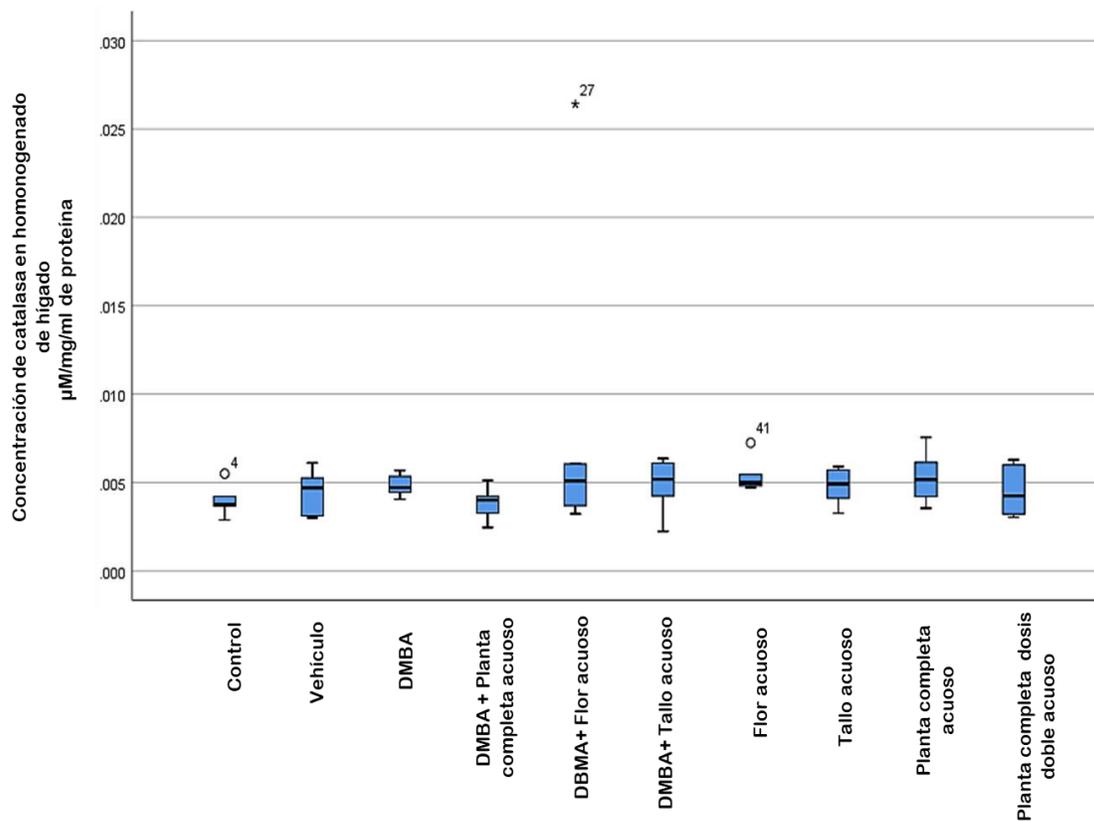
Nota: Concentración en $\mu\text{Mol-1/ mg}$ sobre concentración de proteína.

7.6.1.3. Actividad de la enzima catalasa en homogenado de hígado

En cuanto a la actividad de la enzima catalasa en homogenado de hígado, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) para ninguno de los 10 grupos. El grupo control, así como el grupo de flor acuoso presentan un valor (ratón 4 y 41) por encima del 50% central de la distribución. Los grupos que presentan asimetría positiva son 3 (control, flor acuoso y DMBA), mientras que solo el grupo de DMBA + planta completa acuoso presenta asimetría negativa.

Figura 19

Actividad de la catalasa en homogenado de hígado de ratones CD1



Nota: Actividad enzimática en UCAT/mg sobre concentración de proteína.

7.7. Actividad antioxidante

Se realizó mediante el método de DPPH+, obteniendo un porcentaje notable en cada muestra, como se observa a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7

*Capacidad antioxidante de los extractos de R. equisetiformis por medio de la prueba DPPH**

<i>Muestra</i>	Extracto	Captación de Radical Libre
Planta completa	Acuoso	65.42372881
Raíz		32.37288136
Flor		21.18644068
Hoja		74.06779661
Fruto		72.03389831
Dosis Recomendada		59.66101695
Tallo	Hidroalcohólico	56.10169492
Tallo "claro"		80.84745763
Tallo "oscuro"		80.33898305
Planta completa		79.49152542

Nota: Resultados expresados en porcentaje (%)

8. Discusión

El género *Russelia* Jacq tiene un uso principalmente ornamental, sin embargo, se han realizado estudios donde se le atribuyen propiedades importantes como antioxidantes y anti-inflamatorias. Dentro del estudio etnobotánica realizado por Machuca *et al.* (2014) acerca de *R. equisetiformis*, cita que los entrevistados la utilizan principalmente en el tratamiento del mal de orín y la diabetes. Además, le atribuyen características des inflamatorias, contra el cáncer y consideran que posee propiedades contra la tuberculosis. Acorde al estudio mencionado anteriormente, se corroboró su uso en enfermedades del riñón, para el mal de orín y la diabetes, agregando a esto, su uso en padecimientos de la próstata, dolor estomacal, para la calentura y la presión. De igual manera, se obtuvo la forma de ingesta y el tiempo de tratamiento, siendo predominante la cocción y agua de tiempo, así como seguir el tratamiento de un mes o hasta observar mejoría. El conocimiento etnobotánico dentro y fuera de una región o etnia, está condicionado a distintos factores socioculturales como, el género, la edad, la clase social, la religión, la escolaridad, el idioma hablado, la dieta, entre otros, siendo en su mayoría las mujeres las poseedoras del mayor conocimiento (Madamombe, Heike & Vázquez, 2009). Corroborando esta afirmación con este estudio etnobotánico, el 80% de la población entrevistada fueron mujeres entre 40 y 70 años.

En los estudios realizados por Kolawole, *et al.* (2007), Ochi, Matsunami, Otsuka *et al.* (2012) y Johnson *et al.* (2010), ha sido documentada la presencia de triterpenos, esteroides, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos en extractos metanólicos de hoja y planta completa. Sin embargo, no existe documentación alguna acerca de estudios en los que se

haya realizado extractos del resto de esta planta, como la raíz, la flor, el fruto y el tallo, tanto en su estadio juvenil, como maduro. En las estructuras de tallo “claro” y “oscuro”, flor y fruto se encontró la presencia de 8 metabolitos a excepción de saponinas, mientras que en la hoja solo se detectó la presencia de esteroides, quinonas y taninos. En la identificación de los metabolitos en los extractos secos de *R. equisetiformis*, se encontró la presencia de estos 8 metabolitos secundarios en cada parte de la planta, la mayoría a una concentración mínima de 0.001 mg/ml.

Respecto a la cuantificación de los 8 metabolitos secundarios se encontró en mayor cantidad los compuestos fenólicos, estando presentes en todas las estructuras siendo la de mayor concentración el extracto de hoja con 55.64 mg/ml, seguido del extracto de dosis recomendada con 45.86 mg/ml y posteriormente el extracto de planta completa hidroalcohólico con 31.29 mg/ml (Figura 18). Los compuestos fenólicos se destacan por su actividad antioxidante, así como por su abundancia en el reino vegetal.

Figura 20

Cuantificación de compuestos fenólicos de *R. equisetiformis*

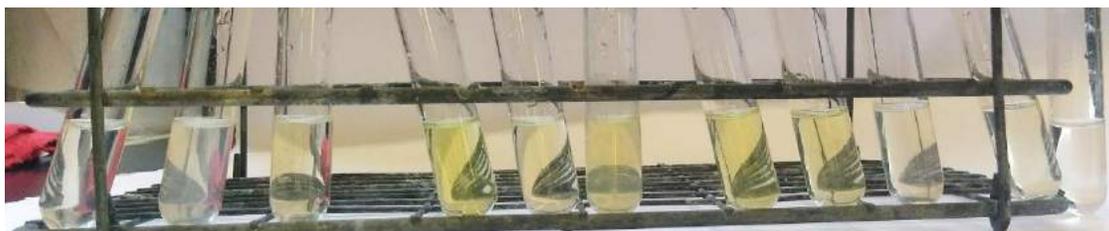


Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, hoja, Tallo, Flor, fruto, Dosis recomendada, Raíz; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo “oscuro” y tallo “claro”.

Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides, que en el caso de *R. equisetiformis*, Johnson, et al (2011) y Ríaz, et al. (2017) identificaron compuestos fenólicos así como 9 flavonoides, lo cual se corroboró con la cuantificación antes realizada, obteniendo una mayor concentración de flavonoides en el extracto de tallo “oscuro” hidroalcohólico con 0.27 mg/ml, seguido del extracto de planta completa acuoso con 0.23 mg/ml y en el extracto de tallo “claro” hidroalcohólico con 0.19 mg/ml, respecto a los 7 extractos restantes (Figura 19).

Figura 21

Cuantificación de Flavonoides



Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo “claro”. Y tallo “oscuro”

Los flavonoides se encuentran principalmente en partes aéreas, se ubican en la membrana del tilacoide de los cloroplastos. Entre estos se destaca la catequina o la quercetina, pues pueden directamente neutralizar especies reactivas de oxígeno, como el O_2^- , el H_2O_2 o el HClO. Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones y capturan radicales libres para generar un radical flavínico que es mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados (Quiñones, *et al.*, 2012). Los flavonoides modulan la reacción de los estrógenos ligándose a sus receptores con lo que se disminuye el riesgo de padecer cáncer de mama, además, se ha manifestado que los flavonoides pueden inhibir monooxigenasas dependientes del citocromo p-450, por ende, un papel potencial en la regulación de la actividad de carcinógenos. Sin embargo, las mismas propiedades que caracterizan sus propiedades antioxidantes, determinan que puede presentar efectos prooxidantes (Martínez *et al.*, 2002).

Hammed, *et al.* (2017) atribuyen el potencial hepatoprotector de *R.a equisetiformis* a los ya reportados flavonoides y compuestos fenólicos presentes en esta planta.

La concentración de taninos fue mayor en 3 extracto siendo estos los de tallo, tanto “oscuro” como “claro” hidroalcohólico y el de planta completa acuoso, con una concentración de 25.33, 11.356 y 18.563 mg/ml respectivamente (Figura 20).

Figura 22
Cuantificación de Taninos



Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo “claro”. Y tallo “oscuro”

Los taninos tienen la capacidad de unirse a macromoléculas y formar quelatos con cationes metálicos, pudiendo eliminar parcialmente cantidades representativas de hierro y cobre disueltos, posee propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica, vasoconstrictora, antibacteriana, antifúngica. Además de su ya conocida propiedad antioxidante, siendo los más eficaces para esta acción los taninos hidrolizables. Participan en procesos de óxido-reducción, consumiendo el oxígeno disuelto del medio, llevando a la formación de peróxidos y capturando los radicales libres generados (Silva, *et al.*, 2004; Álvarez, 2007).

En general, los polifenoles también pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular como el superóxido dismutasa, la catalasa o el glutatión peroxidasa. Poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos (Quiñones, *et al.* 2012).

Otro metabolito que se obtuvo en abundante cantidad fueron las quinonas, estando en mayor concentración en los extractos de tallo “oscuro” con 68.01 mg/ml, planta completa 57.61 mg/ml y planta completa hidroalcohólico con 47.12 mg/ml (Figura 21).

Figura 23
Cuantificación de quinonas



Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo "claro". Y tallo "oscuro"

Las plantas que contienen quinonas pueden comportarse como laxantes o purgantes según la dosis administrada. Las naftoquinonas se encuentran en las plantas frescas en forma heterosídica, liberándose la genina durante el proceso de desecación, pueden presentar actividad antibacteriana y fungicida, además algunas, pueden ser usadas como colorantes naturales. Por otra parte, las antraquinonas pueden tener funciones hidroxílicas en su estructura en diversas posiciones.

Los metabolitos que se obtuvieron en poca cantidad, comparados con los anteriores fueron los alcaloides y esteroides. Los esteroides se encontraron en todas las estructuras siendo el extracto de hoja acuoso el de mayor concentración con 5.514 mg/ml con respecto al extracto de tallo acuoso, quien obtuvo la menos concentración de entre los 10 extractos con 1.272 mg/ml (Figura22).

Figura 24
Cuantificación de esteroides

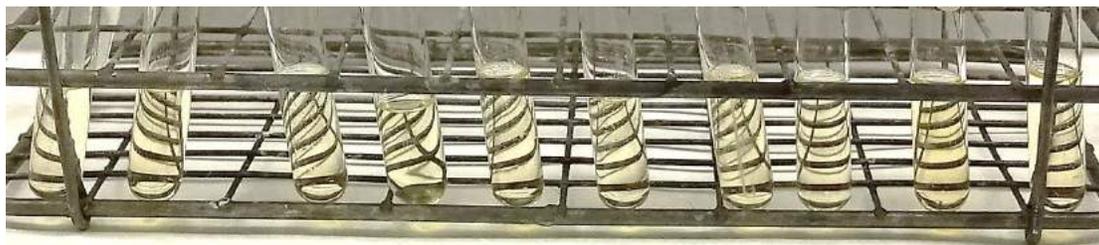


Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo "claro". Y tallo "oscuro"

Se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas. Sin embargo, el efecto hipocolesterolémico es el mejor caracterizado y documentado (Valenzuela & Ronco, 2004). De acuerdo con Awe, *et al.* (2012), *R. equisetiformis* posee un principio activo triterpenoide, el lupeol, el cual es el responsable de su propiedad antiinflamatoria.

La presencia de alcaloides en los extractos, tanto acuosos como hidrialcohólicos de *R. equisetiformis* fue mínima, con una concentración máxima de 0.1651 mg/ml en el extracto hidroalcohólico de tallo “claro” y con una concentración mínima de 0.0984 mg/ml en el extracto hidroalcohólico de tallo “oscuro” (Figura 23).

Figura 25
Cuantificación de Alcaloides

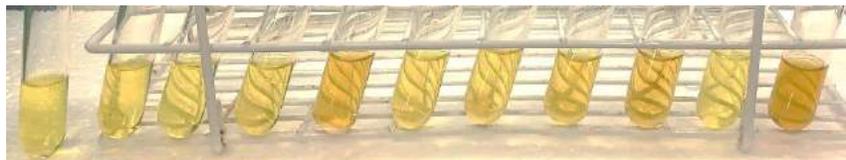


Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo “claro”. Y tallo “oscuro”

Los alcaloides presentan actividad sobre el sistema nervioso central, sobre el sistema nervioso autónomo, así como en el corazón y antitumoral, sin embargo, también existen alcaloides especialmente tóxicos como los alcaloides pirrolizidínicos del género *Senecio*, responsables de la toxicidad hepática originada por esta especie. Debido a esto, es bastante común, el no empleo de especies vegetales que contengan en abundante cantidad este metabolito, es preferible emplear el alcaloide aislado (Hesse, 1978). De acuerdo con lo anterior, se puede atribuir las propiedades depresoras del sistema nervioso central a *R. equisetiformis* descritas por Kolawole, *et al.* (2007). Awe, *et al.* (2010) evaluaron el efecto anticonvulsionante de extractos metanólicos de *R. equisetiformis*. En general el inicio promedio de las convulsiones se retrasó, mientras que la duración promedio de las convulsiones se redujo notablemente, Por tanto, sugirió que esta planta puede servir como terapia complementaria para el manejo y/o control de las convulsiones y la epilepsia infantil.

Las cumarinas y sesquiterpenolactonas, al igual que los alcaloides y esteroides, se encontraron en poca concentración, respecto a los otros metabolitos, siendo los extractos con mayor concentración de cumarinas el de hoja acuoso con 0.195 mg/ml, seguido del extracto de tallo “claro” hidroalcohólico con 0.181 mg/ml y el extracto de planta completa hidroalcohólico con 0.155 mg/ml. Respecto a la concentración de sesquiterpenolactonas los tres extractos con mayor concentración fueron el de tallo “oscuro” hidroalcohólico con 6.317 mg/ml, posteriormente el extracto de hoja acuoso con 2.227 mg/ml y finalmente el extracto de planta completa hidroalcohólico con 1.953 mg/ml (Figura 25).

Figura 26
Cuantificación de Sesquiterpenolactonas



Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo "claro". Y tallo "oscuro"

Las cumarinas poseen efectos sobre el sistema vascular, propiedades antioxidantes, antiinflamatoria, analgésica, antibacteriana, anticoagulante, además de su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel, debido a sus propiedades fotosensibilizantes (Wu, *et al.* 2009). Las sesquiterpenolactonas poseen importante actividad biológica, entre las que destacan la actividad citotóxica, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antifúngica, entre otras. Las concentraciones mayores de este metabolito se encuentran generalmente en las hojas, pero pueden estar distribuidas en toda la planta (Villacorta, *et al.*, 2017).

Awe y Makinde (2009) sugieren que *R. equisetiformis* tiene un potencial promotor del crecimiento del cabello, cuyo efecto puede atribuirse a la presencia de triterpenos y flavonoides en los extractos de plantas. Esta sugerencia fue comprobada por medio del monitoreo de los ratones usados para este estudio. En la Figura 27 se muestra un antes y después de administrarles el tratamiento del extracto de dosis doble durante 30 días.

Figura 27
Ratones del grupo 10 con pérdida de cabello.



(A)

(B)

Nota: A) ratón #56 con la calva avanzada, B) grupo 10 de ratones después de aplicarles el tratamiento de *R. equisetiformis* en dosis doble.

Siguiendo con el estudio, en los marcadores de estrés oxidativo, primeramente, los niveles más altos de nitritos en el plasma sanguíneo fueron encontrados en los grupos inducidos con DMBA y tratados con extracto acuoso de planta completa, flor y tallo. Mientras que el grupo que presentó valores menores incluso que el control, fue el grupo al que se le administró extracto acuoso de planta completa dosis doble. Esto puede atribuirse a que el extracto de dosis recomendada fue el que presentó mayor concentración de compuestos fenólicos, a comparación de los extractos acuosos de planta completa, flor y tallo. Respecto a los niveles de nitritos en homogenado de hígado, los valores más altos se presentaron en los grupos de vehículo y extracto acuoso de flor, siendo el valor más bajo el del grupo control. El óxido nítrico es partícipe en procesos biológicos simultáneos en el organismo, por ende, la falta de regulación en su producción o disponibilidad se asocia con enfermedades tales como la hipertensión, algunos procesos neurodegenerativos, disfunciones del sistema inmune, entre otros. La alteración de este equilibrio entre el óxido nítrico y su interacción con otros compuestos del organismo desencadena la aparición de sus productos secundarios tóxicos que son el superóxido y el peroxinitrito (Cuéllar, *et al.*, 2010).

El extracto acuoso de flor no posee un metabolito específico en abundante cantidad, sin embargo, se presentaron los 9 metabolitos cuantificados, pero en cantidades relativamente bajas. Presentando valores similares están los grupos de extracto acuoso de tallo, DMBA+ extracto acuoso de planta completa. De acuerdo con lo anterior, podemos confirmar lo reportado por Kolawole (2010), acerca de que los extractos metanólicos de *R. equisetiformis* pueden alterar la función hepática normal.

Los niveles más altos de MAD en plasma sanguíneo los obtuvo el grupo DMBA+extracto acuoso de planta completa, seguido del grupo DMBA+extracto de flor acuoso. El grupo cuyo valor fue menor es el control seguido del grupo tratado únicamente con extracto acuoso de planta completa. Los tres poseen cantidades importantes de compuestos fenólicos, quinonas, esteroides y sesquiterpenolactonas, aunque, como fue citado en los párrafos anteriores, con resultados opuestos. A pesar de las características beneficiosas de los compuestos fenólicos, la ingesta elevada y crónica puede desencadenar efectos adversos para la salud. Se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden alcanzar concentraciones tóxicas si su ingesta se encuentra entre el 1% y 5% total de la dieta diaria (Valencia, *et al.*, 2017). Por otra parte, los esteroides pueden ofrecer una protección frente a los tipos de cáncer más comunes como el de colon, mama y próstata. Este efecto se basaría en la intervención de estos metabolitos sobre la estructura y función de la membrana celular de las células tumorales y del huésped, vías de transducción de señales que regulan el crecimiento del tumor y apoptosis, función inmunitaria del huésped, así como el metabolismo del colesterol en el huésped (Palou, *et al.*, 2005). Hasta el momento, sin embargo, no ha sido demostrado si la ingesta crónica y elevada de este metabolito produce algún efecto tóxico. Mientras que a las sesquiterpenolactonas se les atribuyen propiedades citotóxicas, efectos tóxicos neurológicos, cardíacos y renales (Moreno, *et al.*, 2016). A diferencia de los metabolitos antes mencionados, las quinonas son un grupo con alta reactividad, por lo cual puede interactuar con numerosos sistemas biológicos, por ejemplo, como poseen un elevado potencial electrofílico pueden reaccionar químicamente con biomoléculas para modificarlas e inactivarlas de manera irreversible, tienen la capacidad de realizar ciclos redox y generar especies reactivas de oxígeno, además de algunas quinonas

que inhiben enzimas fundamentales, pues compiten por los sustratos de éstas (Quintero, 2016).

Los niveles de MAD en homogenado de hígado más altos fueron encontrados en el grupo tratado únicamente con extracto acuoso de tallo, seguido del grupo tratado solo con extracto acuoso de planta completa. El grupo control y el de DMBA+extracto acuoso de planta completa, presentaron entre ambos un valor muy similar. La peroxidación lipídica actúa en estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que alteran la permeabilidad de la membrana celular produciendo edema y muerte celular. Una vez que se inicia este proceso se convierte en una “cascada”, con una producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales, son los responsables de los efectos citotóxicos en las membranas (Venereo, 2002).

La actividad de la enzima catalasa medida en homogenado de hígado fue muy variable, puesto que, el valor más alto lo obtuvo el grupo de DMBA+extracto de flor acuoso, seguido de los grupos de extracto acuoso de planta completa y extracto acuoso de tallo, con valores similares entre éstos. El grupo que presentó el menor valor fue el de DMBA+extracto acuoso de planta completa.

Se corroboró que *R. equisetiformis* posee una gran cantidad de actividad antioxidante como lo reportó Ríaz, *et al.* (2012), realizando instantáneamente el secuestro de radicales libres por medio de la prueba de DPPH, siendo los extractos hidroalcohólicos de tallo, tanto “claro” como “oscuro”, ambos con un porcentaje de inhibición del 80%, siendo las estructuras de raíz y hoja las menos eficaces para esta tarea con un 21 y 32 % respectivamente (Figura 28).

Figura 28

Actividad antioxidante por medio del método DPPH



Nota: De izquierda a derecha: Extractos acuosos: planta completa, raíz, Flor, Hoja, Fruto, Dosis Recomendada Tallo; Extractos hidroalcohólicos: Planta completa, tallo “claro”. Y tallo “oscuro”

La prueba de DPPH es el método más utilizado en la medición de la capacidad antioxidante de una muestra, cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o una especie radical produce la forma reducida de DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color y, por tanto, pérdida de la absorbancia (Molyneux, 2004).

9. Conclusiones

- *R. equisetiformis* es utilizada para tratar diversas afecciones entre las que destacan los padecimientos del riñón, mal de orín y para tratar la próstata en la población de Limón Chiquito, Veracruz, México.
- Se cuantificaron 3 metabolitos primarios en *R. equisetiformis*, siendo las proteínas, las de mayor abundancia en esta especie.
- Se identificaron y se cuantificaron 8 metabolitos secundarios en *R. equisetiformis*, tanto en extractos acuosos como hidroalcohólicos en todas las estructuras de la planta, siendo los compuestos fenólicos, quinonas y taninos los más abundantes.
- *R. equisetiformis* posee una elevada actividad antioxidante, debido a la gran cantidad y variedad de los metabolitos secundarios que presenta, sin embargo, no ejerce un efecto antioxidante en procesos de carcinogénesis, puesto que eleva los niveles de los marcados de estrés oxidativo medidos en este estudio.
- Se recomienda el uso de *R. equisetiformis* como un tratamiento preventivo.

10. Agradecimientos

A la M. en C. Catalina Machuca por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, así como al M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo por el apoyo y atención durante este proceso.

A la comunidad de Limón Chiquito por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, con su hospitalidad y atención esto fue posible, sin olvidar mencionar a la señora Verónica Ramírez por su amabilidad y ayuda en todos los sentidos, siempre recordaré esa calidez que caracteriza la comunidad.

A mis amigos Javier Rodríguez por ser mi compañero a lo largo de la carrera, por compartir y conocer cada uno de sus gustos y aficiones, cada momento vivido y por vivir lo atesoro en mi corazón. A Jorge Sánchez de igual forma, por ser uno de mis mejores amigos, que, si bien hubo peleas, eso forja muchas veces las mejores amistades y no tengo duda de que la nuestra sea una. A Carlos Reyes por ayudarme cuando tenía dudas, así como alegrarme cada día estando en aquel laboratorio, sé que si en algún momento necesito tu ayuda o apoyo estarás para mí y lo agradezco mucho, aunque no me llames amiga por cosas tuyas, tu para mí si eres mi amigo y me agradas muchísimo. Así como a David Rivera por siempre estar ahí para hablar de cualquier cosa, con tu simple presencia me hacías relajarme y olvidarme de todo, te adoro. Gracias a cada uno de ustedes pude resolver muchísimos problemas, no solo en lo educativo, sino también en lo personal.

A mi padre Pedro Raymundo Angeles Flores por ser mi apoyo económico y moral durante toda mi vida, que, sin decir mucho, sé que siempre estará ahí, a mi madre Leticia Flores Timoteo, que, aunque no esté presente físicamente, ha sido un gran impulso y motivación para seguir adelante. También agradecer a mis hermanos, Leticia Ivette y Raymundo. Además de mi sobrino Alan Edmundo, con quien he estado a lo largo de 11 años, me anima y apoya cada vez que me encuentro mal, siempre sacándome una enorme sonrisa.

A cada una de mis mascotas que siempre han estado acompañándome en cualquier situación y siempre brindándome todo su amor y cariño desinteresadamente.

A cada grupo de música K-Pop y J- Pop del que soy fan (EXO, DAY6, NCT/WAYV, NU'EST, ASTRO, SUPER M, ONF, KIM WOOSEOK, JO1, WEi, CRAVITY) puesto que su música es una parte vital en mí, pues me ayuda a superar estados de ánimo, así como a seguir adelante viéndolos crecer y crear nuevas cosas. Son una gran inspiración.

Y por último quiero agradecerme a mí misma por ser capaz de terminar esta etapa de mi vida, que, si bien no fue lo que esperaba, me sirvió para aprender y conocer muchísimas cosas.

11. Referencias

- ❑ Adarmes H., Solís P., Müller A. & Gallehuillos, M. (2009). Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Medica Veterinaria*. 41: 255-259.
- ❑ Aebi H. (1984). Catalase *in Vitro*, *Methods in enzymology*, EISEVIER, Vol105, 121-126.
- ❑ Alcantara, 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, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Tesis de Maestría. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. Irapuato, Guanajuato.
- ❑ Álvarez J. (2007). Tanino: La Revolución Enológica Mito o Realidad. *Revista Enología*. 2(4): 1- 15.
- ❑ Anaya A. & Espinosa F. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*. 83: 4-13.
- ❑ Ardoino S. M., Boenes M.A. & Toso R. E. (2013). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Revista Ciencias Veterinarias*. 15 (1): 115- 116.
- ❑ Arcos J. (2005). Efecto preventivo de los flavonoides del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) germinado sobre el cáncer de mama inducido en un modelo animal. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. Tecnológico de Monterrey. 9- 13.
- ❑ Ávalos A. & Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- ❑ Awe E., Makinde J. & Olajide O. (2004). Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of extract of *Russelia equisetiformis* (Schlecht & Cham) Scrophulariaceae. *Inflammopharmacology*. 12(4): 399- 405.
- ❑ Awe O. & Makinde J. (2009). The hair growth promoting effect of *Russelia equisetiformis* (Schlect & Chan). *Journal of Natural Products*. 2: 70-73
- ❑ Awe E., Makinde J. & Ayoka O. (2010). Evaluation of the anticonvulsant property of *Russelia equisetiformis* (Schlecht & Chan). *Journal of Natural Remedies*. 10(1): 74-80.

- ❑ Awe E., Banjoko O.& Makinde M. (2010). Free radical scavenging: a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Russelia equisetiformis* (Schlect & Chan) (Scrophulariaceae). *Inflammopharmacol.* 18:179- 185.
- ❑ Awe E., Adeloye A. & Makinde J. (2012). Anti- inflammatory activity of *Russelia equisetiformis* Schlecht & Cham: identification of its active constituent. *J Intercult Ethnopharmacol.* 1(1): 25-29.
- ❑ Bello G, Carrera B & Díaz Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 Dinitrosalicílico, *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar.* 40(2):45-50.
- ❑ Bermúdez A., Miranda M., Velázquez D. (2005). La investigación botánica sobre plantas medicinales; una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INTERCIENCIA.* 30(8).
- ❑ Camacho H. (2012). Innovación de un Método Analítico para la Cuantificación de Taninos en una Fórmula Magistral para un Enjuague Bucal de Extracto de Encino. Tesis. FES Zaragoza. UNAM.
- ❑ Carmeliet P. & Jain R. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* (473): 298- 307.
- ❑ Centelles J., Esteban C. & Imperial S. (2004). Óxido nítrico: Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *OFFARM.* 23(11):96- 106.
- ❑ Chance, B. Machley, A. (1995). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2:764.
- ❑ Coronado M., Vega y León S., Gutiérrez R., Vázquez M. & Radilla C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr.* 42; 206-2012.
- ❑ Corrales L. & Muñoz M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas.* 10 (18): 2015-223.
- ❑ Coy C., Parra J., Cuca L., 2014, Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Revista elementos.* 4: 31-39.
- ❑ Cuéllar P., Solís M., et al. (2010). El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Universitaria,* 20(3):24-33.
- ❑ Diz R., R.F., Garza C., A., Olivas V., E. K., Montes E., J.G. & Fernández L., G. S. (2019). Cáncer y depresión: una revisión. *Psicología y Salud.* 29(1): 115-124.
- ❑ Delgado L., Betanzos G. & Sumaya M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia.* 18(50):10-15.
- ❑ Depolte C. (2010). Farmacognosia. Departamento de Química Farmacología y Toxicológica. Universidad de Chile

- ❑ Dolcet X., Llobet D., Pallares J. & Matias – Guiu X. (2005). NF-kB in developmet and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 446: 475-482.
- ❑ Domínguez, X. (1979). Métodos de investigación fitoquímica. LIMUSA. 1ra edición, México.
- ❑ Fagali N. (2011). Peroxidación de diferentes especies lipídicas; efecto de antioxidantes, Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 128- 138.
- ❑ Flores C. & Escudero, P. (2010). Reacción, Reactividad y Reconocimiento de Fenoles. Consultado el 9 de septiembre del 2019. Disponible en: https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/experimentos-analisis-funcional-2010/e4/e4a/reaccion-reactividad-y-reconocimiento-de-fenoles
- ❑ Fujimoto K., Goeke M., Olson J. & Klenk C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry.* 150: 76-85.
- ❑ García B., Saldaña A. & Saldaña L. (2012). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 12(2)187-196.
- ❑ García E., Fernández I. & Fuentes A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universidad Tecnológica de Valencia.
- ❑ GBIF.org. *Russelia equisetiformis*. (20 de febrero de 2020). Disponible en: <https://www.gbif.org/species/5414601>
- ❑ Gutiérrez A. & Estévez A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat.* (Esp). 103(2): 409- 419
- ❑ Gutiérrez- Salinas J., Mondragón- Terán P., García- Ortíz L., Hernández- Rodríguez S. & Núñez- Ramos N. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Méd Quir.* 19:446-454.
- ❑ Hamed O., Kamoru A., Mujeeb S., *et al.* (2017). Hepatoprotective Potential of *Russelia Equisetiformis* Plant Extract on drug- Induced Hepatotoxicity in Experimental Models. *Journal of Medical Science and Clinical Research.* 5(7): 24808-24815.
- ❑ Hernández A. & Hermosilla V. (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. Seminario de investigación. Universidad De San Carlos De Guatemala.

- ❑ Hernández Xolocotzi, E. (1979). "El concepto de etnobotánica". Cuadernos de Divulgación de INIREB 5:13-18.
- ❑ Hesse M. (1978). Alkaloid Chemistry. John Wiley Sons. Chichester. 231
- ❑ INECOL, Coralillo "*Russelia equisetiformis*", consultado el 01 de septiembre del 2018, disponible en: <http://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/planta-del-mes/37-planta-del-mes/525-coralillo-russelia-equisetiformis>
- ❑ International Agency for Research on Cancer. (2018). Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. World Health Organization. Geneva, Switzerland. N° 263
- ❑ Isaza J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*. 33:13-18.
- ❑ Johnson C. E., et al. (2008). Comparative Assessment of Total Phenolic Content in Selected Medicinal Plants. *Niger J Natl Prod Med*. 12-40.
- ❑ Johnson C. E., et al. (2011). Identification of the phenolic Components of *Vernonia amygdalina* and *Russelia equisetiformis*. *Journal of Natural Products*. 4: 57-64.
- ❑ Kolawole O., Makinde J. & Olajide O. (2007). Central Nervous System Depressant Activity of *Russelia equisetiformis*. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 22(1-2): 59- 63
- ❑ Kolawole O. & Kolawole S. (2010). Effects of *Russelia equisetiformis* methanol and aqueous extracts on hepatic function indices. *Biology and Medicine*. 2(3): 38- 41.
- ❑ Kreissig, K. (2019). Identify Common tropical and Subtropical Ornamental Plants by Flower Colour. Springer Spektrum. Germany. 37.
- ❑ Lodoño J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. 1ra edición. Corporación Universitaria Lasallista. 130-162.
- ❑ López A., Fernando C., Lazarova Z., Bañuelos R., Sánchez S. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista Anacem*. 6(1): 48- 52.
- ❑ López X, Taramuel A, Arboleda C, Segura F & Restrepo L. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista cubana de química*. 29(2):180-198.
- ❑ Lowry H., Rosebrough I., Farr & Randall J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. *Biol. Chem*. 183:265-275.

- ❑ Machuca C., Mendoza E. & Ramírez P. (2014). Estudio etnofarmacológico de *Russelia equisetiformis*, en el ejido Limón Chiquito, Cazonas de Herrera, Veracruz. Consultado el 01 de septiembre, disponible en: http://congresos.cio.mx/14_enc_mujer/cd_congreso/archivos/resumenes/S3/S3-BYQ24.pdf
- ❑ Madamombe, Heike & Vázquez, 2009. Género y conocimientos etnobotánicos en México y Zimbabwe. Un estudio comparativo. *Sociedades Rurales, producción y medio ambiente*, 9(18): 22-48.
- ❑ Maldonado O., Jiménez E., Guapillo M., Ceballos G. & Méndez E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico- degenerativas. *Rev. Med UV*. 33- 39.
- ❑ Mañon W., Garrido G.& Núñez A. (2016). Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 4(2), 62- 83.
- ❑ Martínez S., Gonzáles J., Culebras J. & Tuñón M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 16(6): 271- 278
- ❑ Martínez- Lazcano J., Boll-Woehrlen Ma. & De la Paz, M. (2010). Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Mensaje Bioquímico*. 34:43-59.
- ❑ Martín de Civetta M. & Civetta J. (2011). Carcinogénesis. *Salud pública de México*. 53(5): 405-414.
- ❑ Martínez V. (2016). Anatomía de la Glándula mamaria y patologías más frecuentes. Blog. Disponible en: <https://academiaradiologica.wordpress.com/2016/07/04/anatomia-de-la-glandula-mamaria-y-patologias-mas-frecuentes/>
- ❑ Mekar N., Indriyati W. & Shalihati A. (2016). Colorimetric Method for Total Phytosterols Content Analysis in Soybean (*Glycine max*), Soymilk, and Soy Yoghurt. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8(4): 1458- 1464.
- ❑ Mena L., Tamargo B., Salas E., *et al.* (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (Jaboncillo). *Revista cubana de plantas medicinales*. 20(1): 106- 116.
- ❑ Miller L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31(3): 426-428.
- ❑ Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrihydrazyl (DPPH) for estimatin activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 26(2): 211- 219.

- ❑ Montero M. (1996). Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. *Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 26(4).
- ❑ Moreno M., Núñez M., Kennedy M., *et al.* (2016). Toxicidad y evaluación biológica de los extractos orgánicos y acuosos de las hojas de *Calea urticifolia* (Asteraceae): búsqueda de sesquiterpenolactonas (STLs). Cartel. Universidad de El Salvador.
- ❑ Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999.) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- ❑ Norma Ramal Cubana (1994). Extracto fluido y extracto blando. NRAG 1129 Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

- ❑ Núñez A. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública.* 37(Supl): 644- 660.
- ❑ Nuestro México. COM. Limón Chiquito, Veracruz. Consultado el 18 de Agosto del 2019, disponible en: <http://www.nuestro-mexico.com/Veracruz-de-Ignacio-de-la-Llave/Cazones/Limon-Chiquito/>
- ❑ Ochi, M., Matsunami, k., Otsuka, H., *et al.* (2012). A new iridoid glycoside and NO production inhibitory activity of compounds isolated from *Russelia equisetiformis*. *J Nat Med* 66, 227-232.
- ❑ Orantes E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae).* Universidad De San Carlos De Guatemala Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacia. Recuperado de: bioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2698.pdf
- ❑ Palou A., Picó C., Bonet M., *et al.* (2005). El libro blanco de los Esteroles Vegetales. 2da Edición. Unilever Foods. España. 73- 87.
- ❑ Quintero C. (2016). Análisis funcional de genes que podrían codificar para quinonas reductasas de dos electrones de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. Universidad La Laguna.
- ❑ Quiñones M., Miguel M. & Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria.* 27(1): 76-89.
- ❑ Riaz M., Rasool N., Bukhari I., *et al.* (2012). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity studies of *Russelia equisetiformis*. *African Journal of Microbiology Research V.* 6(27): 5700- 5707.
- ❑ Riaz M., Rasool N., Iqbal M., *et al.* (2017). Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis of *Russelia equisetiformis* extract. *Bulgarian Chemical Communications.* 49(2): 354-359

- ❑ Ringulet J. & Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. 1ra edición. Editorial de la Universidad de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- ❑ Rojas L., Jaramillo C, & Lemus M. (2015). *Métodos Analíticos para la determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas*. 1ra edición. Universidad Técnica de Machala, Ecuador. 16-24.
- ❑ Roussos S. & Gaime I. (1996). Fisiología y Bioquímica de microorganismos utilizados en el proceso de fermentación en medio sólido, *E, Galindo* (Ed). *Fronteras en Biotecnología y bioingeniería*. 341- 348.
- ❑ SAGARPA, NOM 6130. Consultado el 14 de septiembre del 2019, disponible en: http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6130/sagarpa11_C/sagarpa11_C.html
- ❑ Sanfilippo J. & Moreno M. (2008). *Cáncer de mama*. Facultad de medicina, UNAM. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/eventos/seam2k1/2008/abr_01_ponencia.html
- ❑ Silva, H., *et al.* (2004). Actividades larvicida de taninos aislados de *Magonia pubescens* St. Hil. (*Sapindácea*) sobre *Aedes aegypti* (*Diptera, Culicidae*). *Revista da sociedade brasileira de Medicina Tropical*. 37(5): 396-399
- ❑ 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*. 32, 17- 20.
- ❑ Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia. Soporte. 27- 40.
- ❑ Valencia E., Ignacio I., Sosa E., *et al.* (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. 16: 15-29
- ❑ Valenzuela B., & Ronco M. (2004). Fitosteroles y fitoestanoles: Aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista chilena de nutrición*. 31(supl.1): 161-169.
- ❑ Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España. OmniaScience. 1-40.
- ❑ Venereo J. (2002). Daño oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev Cubana de Medicina Militar*. 31(2): 126- 133.
- ❑ Viada E., Gómez L. & Campaña I. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*. 21(1), 171-186.

- ❑ Villacorta J., Rivas R., Núñez M., *et al.* (2017). Cuantificación de sesquiterpenolactonas procedentes de las hojas de *Calea urticifolia* (Asteraceae) durante el año 2012. *Revista Minerva*. 1: 41- 50.
- ❑ Viñas G., Puig T.& Porta R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Med Clin (Barc)*. 139(4): 171-175.
- ❑ Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374.
- ❑ Wink, M., and Schimmer, O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. Sheffield Academic Press. Sheffield, England. 304.
- ❑ Wu, L., Wang X., Xu W., Farzaneh F., Xu R. (2009). The structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. *Current Medicinal Chemistry*. 16.
- ❑ Zacarías-Correa, A., Guzmán-Díaz, S. & Pérez-Calix, E. (2019). Taxonomía, distribución geográfica y ecológica del género *Penstemon* (Plantaginaceae) en la Faja Volcánica Transmexicana, México. *Acta botánica mexicana*, (126), e1428.
- ❑ Zöllner, N., Kirsch, K. (1962). Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Z. Gesamte Exp. Med.* 135: 545–561.
- ❑ Zorrilla, A., Eirez Izquierdo M., & Izquierdo Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1), 51-57.

12. Anexo



Entrevista etnobotánica

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad Multidisciplinaria de Investigación, L7/ P.A. Terapia Molecular



Russelia equisetiformis

Nº de entrevista

Fecha:

Nombre:

Edad:

Sexo:

1. ¿Con que nombre conoce la planta?
2. ¿Qué alimentos consume regularmente?
4. ¿Qué uso le da usted a la planta?
3. ¿Qué parte de planta usa?
5. ¿Cómo la consume/ aplica?
6. ¿Cuánto tiempo transcurrió desde la detección del problema hasta el inicio del tratamiento?
7. ¿Cuánto duro el tratamiento y con qué frecuencia?
8. ¿Cuáles fueron sus observaciones más importantes durante el tratamiento?
9. ¿Además de utilizar la planta tenía otro tratamiento? ¿cuál era?
10. ¿Presentó alguna molestia durante su uso?
11. ¿Al termino del tratamiento ha observado nuevas lesiones?

Nota:

Figura 29

Fotografías de la formación de tumores



Nota: El tumor del ratón 6 peso 22.06 g y midió 3.7 de largo por 3 cm de ancho.