UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efecto de extractos de *Heliotropium angiospermum* M., sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

LAURA IVON TORRES GONZÁLEZ

DIRECTORA DE LA TESIS

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

MÉXICO, D. F. JUNIO DE 2015

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efecto de extractos de *Heliotropium angiospermum* M., sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

LAURA IVON TORRES GONZÁLEZ

Tutor principal de la tesis:

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Comité tutoral

Presidente: Dra. Francisca Leonora Sánchez y García Figueroa

Vocal: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Secretario: Dra. Lucila Álvarez Barrera

Suplente: Dra. Juana Monroy Moreno

Suplente: Dra. Hortensia Rosas Acevedo

MÉXICO, D. F. JUNIO DE 2015

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Molecular, L-7 PA de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez.

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional de la alumna:

TORRES GONZÁLEZ LAURA IVON

Quien presenta como trabajo recepcional: **Efecto de extractos de *Heliotropium angiospermum* M., sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer.**

PRESIDENTE	Dra. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA FIGUEROA	
VOCAL	M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ	
SECRETARIO	Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA	Alvarez Barrera Lucila
SUPLENTE	Dra. JUANA MONROY MORENO	
SUPLENTE	Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO	Hortensia Rosas

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarles.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

México, D. F., a 13 de abril de 2015

FES ZARAGOZA CARRERA BIOLOGO UNAM

M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL

JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Escolar
c.c.p. Secretaria Técnica de la Carrera
c.c.p. Interesado

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:
Dra. Francisca Leonora Sánchez y García Figueroa
M. en C. Catalina Machuca Rodríguez
Dra. Lucila Álvarez Barrera
Dra. Juana Monroy Moreno
Dra. Hortensia Rosas Acevedo

Por el tiempo que me dedicaron en la revisión y correcciones de este trabajo, así como por sus comentarios y críticas constructivas que hicieron de ésta una mejor tesis, gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme las armas y formarme como una profesional de calidad.

Agradezco ante todo a la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio, porque sin conocerme tuvo el gran detalle de apoyarme en todo momento, gracias maestra por su paciencia y por darme la oportunidad de demostrarle que se pueden combinar los estudios y el deporte. Mil gracias por estar siempre en las buenas y en las malas, por brindarme su tiempo, por esas salidas a campo tan genuinas, por enseñarme que el trabajo de campo y el de laboratorio pueden llevarse de la mano, por demostrarme que cuando las cosas se hacen de buena gana, con paciencia y esfuerzo, estas salen mejor. Gracias por compartirme su conocimiento, por su cariño y amistad, pero sobre todo gracias por darme las herramientas necesarias para la culminación de este proyecto.

Al Dr. Ernesto Mendoza Vallejo que junto con la maestra Catalina han sido como unos padres para mí, gracias profe por siempre estar al pendiente y cuidarnos, por su confianza, paciencia y apoyo. Por ayudarme cuando ya no sabía qué hacer, por todas esas palabras de aliento y por guiarme siempre por un mejor camino.

A los verdaderos profesores de esta escuela que me motivaron a salir adelante y que contribuyeron en mi formación académica.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, a los que estuvieron conmigo desde los primeros semestres, a los que llegaron después y a aquellos que conocí por el futbol, gracias por su amistad, por todas las aventuras que juntos vivimos, por los que aún siguen aquí al pie del cañón, gracias por formar parte de mi vida y por hacer de esta escuela un lugar más agradable.

A la Comunidad del Ejido de Limón Chiquito por su sencillez y amabilidad, así como también de la disponibilidad que siempre tuvieron para el desarrollo de esta investigación. Así mismo quiero hacer un especial reconocimiento a la señora Verónica Ramírez por todo el apoyo que nos otorgó, muchísimas gracias.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada a mi madre María del Rosario, gracias a ti mamá porque siempre has estado a pesar de todas las dificultades, por apoyarme a seguir mis sueños, por darme la educación que sólo en casa es posible, por inculcarme esas ganas de vivir y de salir adelante; por darme tu amor incondicional ante cada una de mis rebeldías y por tratar de hacer de mí una mejor persona, te amo mamá y le gradezco a Dios por tenerte aquí conmigo, eres y siempre serás mi mayor motivación.

A ti papá José Amador por apoyarme a pesar de todo, por demostrarme que sin importar la adversidad siempre estarás conmigo, gracias papá por tu infinito amor.

A mi tía Guadalupe por su apoyo en todo este proceso, por abrirme las puertas de su casa, por preocuparse por mí y mis hermanos, y que aunque muchas veces la hice enojar, la quiero mucho y le estaré infinitamente agradecida.

A mi tío Guillermo por motivarme a seguir mis estudios, por herir mi orgullo diciéndome que si era cierto que era buena en una escuela de Oaxaca tenía que demostrar que también podía serlo en el D.F,...

A mi tía Reyna actual sobreviviente del cáncer, por darme una lección de vida y por demostrarme que cuando se tienen ganas de vivir hay que luchar por ello.

A mis hermanos Joseph y Nancy, que sin saberlo me han enseñado mucho; porque a pesar de las diferencias tengo la seguridad de que siempre van a estar ahí cuando los necesite.

En fin, a toda mi familia por creer en mí, por su amor y cariño infinitos, gracias.

A Carlos, gracias por estar conmigo en todo este proceso, por apoyarme en esta etapa llena de logros y culminaciones, por alegrar cada uno de mis días desde que llegaste a mi vida, por formar parte de ella y además ser alguien muy especial; por todas las aventuras que en poco más de un año hemos vivido, por cada sueño hecho realidad, gracias por ser una persona con la que se puede hablar libremente, por no dejarme ser un grinch, por todos esos chistes malos, por cada risa llena de felicidad; por compartir conmigo la pasión del futbol y por enseñarme que éste es más que un simple deporte...

A mis amigos, aquellos que me apoyaron desde que llegué al D.F., Luis, Karen y al ahora ya Doctor José Carlos, los quiero y los recordaré siempre. A Laura y Dieter por estar conmigo al inicio de la universidad, gracias por todos sus consejos. Gracias también al futbol por ser el detonante para encontrar a mis mejores amig@s, Bere, Karla, Karly, Nalleli, Xochiquetzali y Antonio, gracias por enseñarme a disfrutar de la vida, por todas esas risas y carcajadas, sobre todo por todas las aventuras que vivimos juntos.

Gracias en especial a Pedro, Karla Rojas y Bere, que más que amigos las considero como de la familia; por compartir conmigo las aventuras de campo y risas en el laboratorio, por hacer de éste un lugar más ameno; por el gran equipo que hicimos y porque trabajar con ustedes más que un gusto ha sido un verdadero honor, los quiero muchísimo niños y nunca los voy a olvidar.

ÍNDICE

Resumen 1

I. Introducción 2

II. Marco Teórico

2.1 Radicales libres 3
2.1.1 Biomecanismos de formación de radicales libres 3
2.1.2 Radicales libres, estrés oxidativo y su relación con el cáncer 3-4
2.1.3 Especies reactivas 4
2.1.4 Especies reactivas de oxígeno (ERO) 4-5
2.1.5 Especies reactivas de nitrógeno (ERN) 6
2.1.6 Óxido nítrico 7
2.1.7 Síntesis de óxido 7-8
2.1.8 Daño celular mediado por radicales libres 8-9
2.1.9 Papel de los radicales libres en las etapas de la carcinogénesis 9-10
2.1.9.1 Papel de las ERO y ERN en las etapas de la carcinogénesis 10-11
2.1.9.2 Acción de los radicales libres en diferentes tipos de Cáncer 11
2.1.9.3 Participación del óxido nítrico en el cáncer de mama 12

2.2 Mecanismos antioxidantes 12
2.2.1 Clasificación del sistema de defensa antioxidante 12-13
2.2.2 Catalasa 13-14
2.3 Terapia antioxidante 14
2.4 Fitoquímicos o metabolitos secundarios como antioxidantes 14-15

2.5 Familia Boraginaceae 15
2.5.1 Género *Heliotropium* 15-16
2.5.2 Clasificación Cladista de *Heliotropium angiospermum* 16
2.5.3 Sinónimos 16
2.5.4 Nombres comunes 16
2.5.5 Descripción morfológica 17
2.5.6 Hábitat 17
2.5.7 Ecología 17
2.5.8 Distribución 18
2.5.8.1 A nivel mundial 18
2.5.8.2 En México 18
2.6 Estudios de *Heliotropium angiospermum* 19
2.6.1 Estudios fitoquímicos 19
2.6.2 Estudios sobre la actividad biológica de *Heliotropium angiospermum* 20
2.6.3 Estudios toxicológicos 20

2.7 Etnobotánica 20
2.7.1 Etnofarmacología 21
2.8 Estudios etnobotánicos de *Heliotropium angiospermum* 21
2.9 Metabolitos secundarios 22
2.9.1 Alcaloides 22-23
2.9.2 Glicósidos cardiotónicos 23
2.9.3 Esteroides y triterpenos libres 23
2.9.4 Flavonoides 23-24
2.9.5 Taninos 24
2.9.6 Saponinas 24-25
2.9.7 Naftoquinonas y antroquinonas 25
2.9.8 Cumarinas 25-26
2.9.9 Lactonas sesquiterpénicas 26

III. Justificación 27

IV. Hipótesis 28

V. Objetivos

5.1 Objetivo general 28
5.2 Objetivos específicos 28

VI. Metodología

6.1 Localidad de colecta 29
6.2 Recopilación de información etnofarmacológica 29
6.3 Procesamiento del material vegetal 29
6.4 Obtención de los extractos 29
6.4.1 Hidroalcohólico 29
6.4.2 Acuoso 29
6.4.3 Obtención del extracto sólido 29
6.5 Identificación de metabolitos secundarios 30
6.5.1 Alcaloides 30
6.5.2 Glicósidos cardiotónicos 30
6.5.3 Esteroides y triterpenos libres 30
6.5.4 Flavonoides 31
6.5.5 Taninos 31
6.5.6 Saponinas 31-32
6.5.7 Naftoquinonas y antroquinonas 32
6.5.8 Cumarinas 32
6.5.9 Lactonas sesquiterpénicas 32

6.6 Inducción de carcinomas 32-33
6.7 Tratamiento con extractos hidroalcohólico y acuoso 33
6.8 Obtención de homogenado de hígado 33
6.9 Cuantificación de nitritos por el método de Griess Saltzman 34
6.10 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret 34
6.11 Actividad de catalasa por el método de Chance y Machley 35
6.12 Análisis estadístico 35

VII. Resultados

7.1 Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum* 36-37
7.2 Rendimiento de extracción de *Heliotropium angiospermum* 37-38
7.3 Análisis fitoquímico preliminar de extractos de *Heliotropium angiospermum* 38-39
7.4 Pruebas coloridas de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Heliotropium angiospermum*
7.4.1 Extracto hidroalcohólico 40-41
7.4.2 Extracto acuoso 41-42
7.5 Efecto de extractos de *Heliotropium angiospermum* sobre las concentraciones de nitritos 43
7.6 Efecto de extractos de *Heliotropium angiospermum* en la actividad de catalasa 44

VIII. Discusión

8.1 Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum* 45
8.2 Análisis fitoquímico preliminar de extractos de *Heliotropium angiospermum* 46-50
8.3 Efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* sobre las concentraciones de nitritos en el homogenado de hígado 50-52
8.4 Efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* en la actividad de 52-53
8.5 Consideraciones finales 53

IX. Conclusiones 54
X. Referencias 55-64
XI. Anexos

11.1 Carta MEXU, UNAM 65
11.2 Entrevista etnofarmacológica 66
11.3 Reacciones químicas utilizadas para detección de metabolitos 67-69
11.4 Fotografías de formación de tumores en ratones hembra CD-1 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Figura 2. Reacción general de óxido nítrico sintasa

Figura 3. Daño celular mediado por radicales libres.

Figura 4. Estadios del proceso carcinogénico.

Figura 5. Descomposición del peróxido de hidrógeno mediada por catalasa.

Figura 6. A) Heliotropium angiospermum, B) Hoja, C) Flores e Inflorescencia y D) Semillas.

Figura 7. Distribución mundial de *Heliotropium angiospermum.*

Figura 8. Distribución de *Heliotropium angiospermum* en México.

Figura 9. Estructura química de agliconas formando parte de glicósidos presentes en el extracto orgánico de las hojas de *Heliotropium.*

Figura 10. Estructura química de glicósidos presentes en el extracto orgánico de las hojas de *Heliotropium angiospermum* M. 1. Blumenol A, 2. Blumenol B, 3. Loliólido.

Figura 11. Pruebas coloridas del extracto hidroalcohólico de *Heliotropium angiospermum.*

Figura 12. Pruebas coloridas del extracto acuoso de *Heliotropium angiospermum.*

Figura 13. Formación de tumor en muslo derecho de ratón hembra CD-1 inducido con NiO.

Figura 14. Lesiones en oreja y patas de ratones hembra CD-1 inducidos con NiO.

Figura 15. Tumor presente en muslo izquierdo de ratón hembra CD-1 inducido con NiO.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Tabla 3. Isoformas del óxido nítrico sintasa (NOS)

Tabla 4. Daño celular mediado por RL.

Tabla 5. Acción de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis.

Tabla 6. Papel de los ERO y ENR en los estadios de carcinogénesis.

Tabla 7. Acción de los radicales libres en diferentes tipos de cáncer.

Tabla 8. Mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos.

Tabla 9. Alcaloides presentes en extractos de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 10. Glicósidos presentes en extractos de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 11. Reportes sobre la actividad biológica de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 12. Estudios etnobotánicos de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 13. Coloraciones de los flavonoides frente a la reacción de Shinoda.

Tabla 14. Grupos experimentales.

Tabla 15. Usos medicinales de *Heliotropium angiospermum* reportados en las entrevistas.

Tabla 16. Resumen del registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 17. Rendimiento de extracción de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 18. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de los cinco órganos de *Heliotropium angiospermum.*

Tabla 19. Análisis fitoquímico preliminar del extracto acuoso de los cinco órganos de *Heliotropium angiospermum.*

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje e incidencia de uso de *Heliotropium angiospermum.*

Gráfica 2. Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre la concentración de nitritos (μM/ mg de proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

Gráfica 3. Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre la actividad de la catalasa (μM de catalasa/ mg proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

ABREVIATURAS

ERO: Especies reactivas de oxígeno
EO: Estrés oxidativo
ADN: Ácido desoxirribonucleico
RL: Radical libre
RIS: Especies reactivas de hierro
RCS: Especies reactivas de cobre
$NO^{\cdot}$: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintetasa
NO^{+}: Catión nitrosoniuo
NO-: Anión nitroxilo
ONOO: Radical peroxinitrilo
NO_2: Dióxido de Nitrógeno
CaM: Calmodulina
TBH: Tetrahidroblopteina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatasa
FAD: Flavín adenín dinucleótido
FMN: Flavín mononucleótido
Gc: Guanidiciclasa
AINES: Agentes antiinflamatorios no Esteroideos
IFN-g: Interferón gamma
TNF-a: Factor de Necrosis Tumoral alfa
LPS: Lipopolisacárido bacteriano
CAT: Catalasa
SOD: Súper óxido dismutasa
NF-Kappa B: factor de transcripción nuclear
PBS: Buffer Fosfato Salino
Fas: es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado.
p21: el término se emplea para un gen humano localizado en el cromosoma 6 que codifica a un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina.
p53: gen supresor tumoral desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular.

"El cáncer abre muchas puertas. Una de las más importantes es tu corazón"...

Greg Anderson.

"Donde hay soberbia, allí habrá ignorancia; más donde hay humildad, allí habrá sabiduría"

Salomón

Resumen

Heliotropium angiospermum (Boraginaceae) mejor conocida como cola de alacrán, es una herbácea de amplia distribución neotropical. Caracterizada por presentar propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, digestivas, dermatológicas, cardiotónicas y anticancerígenas; utilizada en la Medicina Tradicional para tratar padecimientos del aparato digestivo y urinario, empleando tallo y hojas de dicha especie.

Se conoce poco sobre la fitoquímica de esta planta, estudios han reportado la presencia de alcaloides derivados de pirrolizidina, lindelofidina, y glicósidos como el blumenol A y B. Sin embargo, no se han desarrollado estudios que profundicen sobre su composición química, por ello, en el presente estudio se realizó el analisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* mediante reacciones de coloración y precipitación. Este consistió en una serie de reacciones específicas para cada metabolito secundario: glicósidos cardiotónicos (Baljet, Lieberman y Keller-Killani), alcaloides (Dragendorf y Mayer), taninos (gelatina-sal), flavonoides (Shinoda), saponinas (espuma), cumarinas (hidroxamato férrico), antroquinonas (Bornträger), esteroides y triterpenos libres (Lieberman) y lactonas sesquiterpénicas (Lieberman e hidroxamato férrico).

Además, se analizó la actividad antioxidante *in vivo* administrando 5 y 10 mg/Kg de extractos hidroalcohólico y acuoso a ratones hembra de la cepa CD-1 durante trece días e inducidos a un proceso carcinogénico con la finalidad de cuantificar la concentración de nitritos (Griees- Saltzman y Biuret) y la actividad de la enzima catalasa (Chance y Machley) en homogenado de hígado.

Se detectó la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos, saponinas, esteroides y triterpenos libres en el extracto hidroalcohólico, mientras que en el acuoso flavonoides, alcaloides, glicósidos cardiotónicos y cumarinas. Los resultados obtenidos indican que los extractos hidroalcohólico y acuoso disminuyen la concentración de nitritos en el homogenado de hígado, siendo mayor el efecto en los extractos a dosis de 5 mg/Kg. Con respecto a la actividad de catalasa se observó un incremento en la actividad de esta enzima, sobre todo en el grupo tratado con el extrato hidroalcohólico de hoja a dosis de 10 mg/Kg. En condiciones experimentales se mostró que los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* ejercen un efecto antioxidante.

I. Introducción

Durante el proceso evolutivo, con la aparición de organismos fotosintéticos, el oxígeno se acumuló de manera significativa en la atmósfera terrestre, hecho que hizo posible el desarrollo de la vida aeróbica (Hansberg, 2002). La utilización del oxígeno por las células resultó en el aumento en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual requirió el desarrollo de mecanismos antioxidantes (García *et al*., 2012).

Cuando existe un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, se establece una situación de estrés oxidativo (EO), que se caracteriza por su capacidad de reaccionar con distintas biomoléculas generando daños permanentes al ADN (Hart *et al*., 2012), dando como resultado patologías como el cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares (Llacuna, 2012).

El cancer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial ocasiondas por la interacción de factores genéticos y epigenéticos (físicos y químicos), que producen la degeneración de las células, originando lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos, que inicialmente se localizan en algún órgano o tejido y al no ser tratados oportunamente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis) (INEGI, 2013).

A nivel mundial, este padecimiento es considerado una de las principales causas de mortalidad. Siendo el cáncer de mama el más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos (OMS, Carga mundial de morbilidad, 2012). El cáncer de mama es una enfermedad sistémica que manifiesta una proliferación maligna de células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos y que presenta una capacidad de infiltración y metástasis, lo cual genera proliferación acelerada y no controlada, con fallas en el balance hormonal y en la capacidad de respuesta del tejido mamario (Elías *et al*., 2008; Martínez *et al.,* 2007; Moreno, 2009).

En diversos estudios se ha demostrado que la inducción o inhibición de la proliferación celular depende de las concentraciones de oxidantes y antioxidantes de la célula (Valko *et al.,* 2007). Ante esta premisa, estudios corroboran la reducción del riesgo de padecer algún tipo de cáncer con la ingesta de antioxidantes (Llacuna, 2012).

Bajo este contexto, se ha considerado a las plantas como principal fuente de compuestos antioxidantes. Por este motivo, investigaciones recientes se han enfocado en evaluar el efecto de terapias antioxidantes mediante la aplicación de compuestos extraidos de plantas.

Debido a las propiedades reportadas para *Heliotropium angiospermum* y a la variabilidad en su metabolismo secundario, en el presente estudio se realizò el análisis fitoquimico preliminar de los extractos hidroalcohólico y acuoso de dicha especie, mediante reacciones de coloración y precipitación; así como su actividad antioxidante en un modelo murino de cáncer.

II. Marco Teórico

2.1 Radicales libres

Un radical libre (RL) es un átomo o molécula que tiene en su estructura un electrón desapareado en su orbital exterior (Maldonado *et al.,* 2010), con gran capacidad de formar otros radicales por reacciones químicas en cadena, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica, lo que les confiere gran inestabilidad y reactividad, (Castillo *et al.,* 2003), lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas, como: las proteínas, fosfolípidos de membrana celular, ácidos nucleicos (ADN) y lipoproteínas de baja densidad. Primero oxidandolas y luego atacando sus estructuras. La vida media de un RL es de nanosegundos a milisegundos, tiempo necesario para captar un electrón de las biomoléculas, con el fin de lograr su estabilidad electroquímica (Sáez, 2009).

2.1.1 Biomecanismos de formación de radicales libres

La biogénesis de RL es un proceso que acontece y que es inherente a la naturaleza aerobia de los seres vivos, siendo el resultado natural de la oxido-reducción de las moléculas orgánicas (Sáez, 2009). Estos RL pueden formarse a través de tres biomecanismos; transferencia electrónica, pérdida de un protón de la molécula y ruptura homolítica de un enlace covalente (Maldonado *et al.,* 2010).

Productos del metabolismo celular, los RL son generados en mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, membrana nuclear, citoplasma y retículo endoplásmico (Pérez *et al.,* 2008; Lozada, 2009).

A nivel extracelular, la formación de RL se genera principalmente por factores físicos y químicos. Entre los físicos destacan la radiaciones ionizantes y entre los factores químicos, la contaminación ambiental, humo de cigarrillo, medicamentos, aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Adachi *et al.,* 2004).

2.1.2 Radicales libres, estrés oxidativo y su relación con el cáncer

En condiciones fisiológicas normales, el organismo mantiene un complejo sistema antioxidante, como el glutatión, las vitaminas C y E, así como enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) (Coulter *et al.,* 2007).

Cuando existe un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, se establece una situación conocida como estrés oxidativo (EO), que da lugar a un daño celular. El cual se agrava por reducción de sistemas antioxidantes, catálisis prooxidante o un aumento en los precursores de radicales libres, e inclusive, una combinación de todos ellos (Llacuna,

2012). Son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes; como la ateroesclerosis, el cáncer, el Alzheimer, la diabetes, enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, situaciones de daño por isquemia y repercusión en los tejidos, etc., (Mayor, 2010).

Particularmente la asociación entre cáncer y EO es compleja, ya que el EO resulta de un desequilibrio entre la producción de RL, así como de los sistemas antioxidantes del organismo, ya que ha sido demostrado que estas especies químicas pueden inducir varios tipos de cáncer; pero al mismo tiempo, estas células transformadas generan más radicales que las células normales (Hirota, 1999).

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial, caracterizada principalmente por un crecimiento anormal, una proliferación acelerada y no controlada de las células, con capacidad de formar un tumor y metástasis en diferentes tejidos. El estrés oxidativo y el proceso tumoral se encuentran estrechamente relacionados a través de la oxidación del material genético (Kuchino *et al*., 1987).

Desde 1990 distintas investigaciones señalan que una pequeña cantidad de oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, juegan un papel crucial como segundos mensajeros en la transducción de señales para la activación, diferenciación y proliferación celular. Parece ser que la inducción o inhibición de la proliferación celular depende de las concentraciones de oxidantes y antioxidantes en la célula. En un ambiente con un nivel reducido de estos agentes se estimula la proliferación; sin embargo, un ligero cambio hacia un ambiente oxidadante induce la apoptosis o necrosis celular. Por lo que se puede decir que la apoptosis es inducida por un estímulo moderado de oxidantes y la necrosis por un efecto oxidante intenso (Maldonado *et al.,* 2010).

2.1.3 Especies reactivas

Se forman como productos del metabolismo de los RL. Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ERO), del hierro (RIS), de cobre (RCS), y del nitrógeno (ERN). Estas especies químicas, se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (Martínez *et al.,* 2003).

2.1.4 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

El oxígeno es indispensable para los organismos aeróbicos, pero a su vez es potencialmente tóxico para todos los seres vivientes (Maldonado *et al.,* 2010). Muchas reacciones en las que participa el O_2 generan especies reactivas de oxígeno (EROs), que se producen por la reducción univalente de oxígeno, generando principalmente a radicales como: el anión superóxido (O_2^-), peróxido (O_2^{-2}) y el radical hidroxilo (•OH), este

último extremadamente reactivo (Valdez *et al.,* 2004), además de compuestos no radicales como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Tabla 1).

ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO			
RADICALES		**NO RADICALES**	
Anión Superóxido:	O_2^-	**Peróxido de hidrógeno:**	H_2O_2
Hidroxilo:	$^{\cdot}HO$	**Oxigeno singulete:**	$^1O_2$
Peróxido	O_2^{-2}	**Ozono**	O_3
Perhidroxilo:	$HO_2^{\cdot}$	**Ácido hipocloroso**	ClOH

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ERO). Modificado de Maldonado 2010; Pérez *et al.,* 2008; Lozada *et al*., 2009.

Las ERO regulan diversos procesos fisiológicos y pueden formarse en distintos tipos celulares como: fagocitos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos, en compartimentos como el citosol, membrana plasmática, retículo endoplásmico, etc., uno de los más importantes y con mayor formación de RL debido a su función primordial de producción de energía química es la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Fig.1) (Halliwell, 1997).

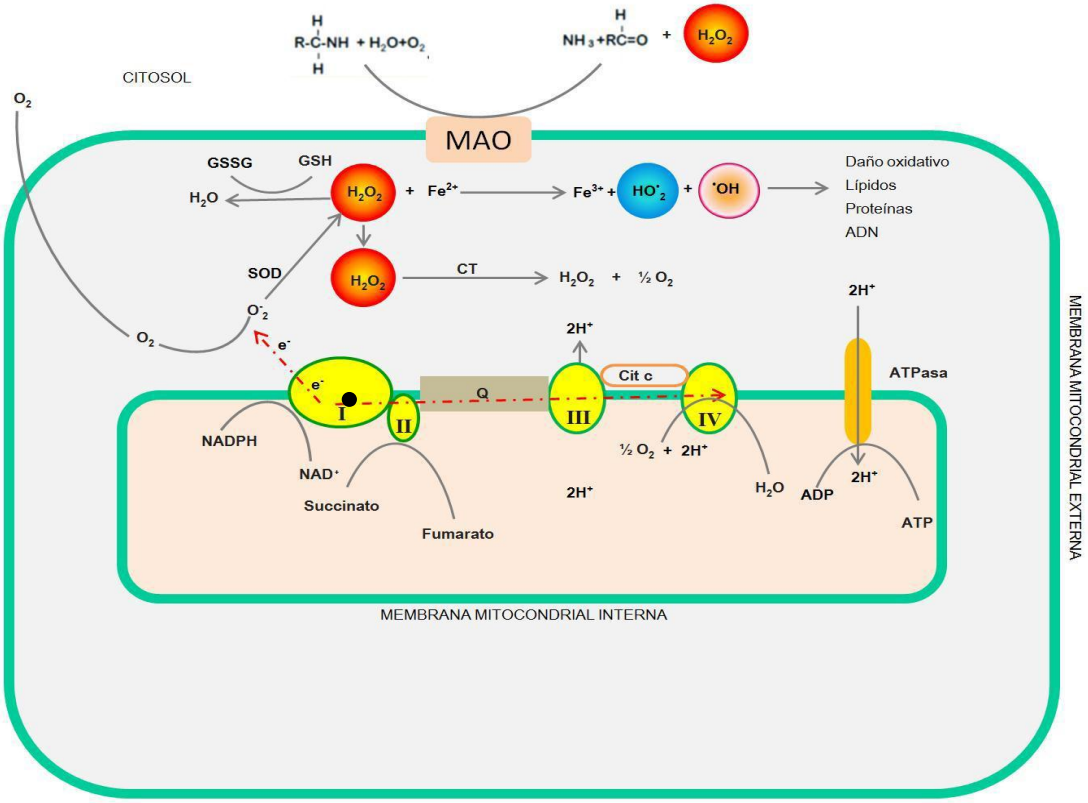


Fig. 1. **Cadena de transporte de electrones mitocondrial.** Es considerada la mayor fuente de formación de radicales libres. Cercadel 5 al 10% del oxígeno, incorpora electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria, responsable de laformación del anión O^-_2 y $HO^{\cdot}_2$, que por acción de la superóxido dismutasa (SOD) se origina una especie más reactiva, el H_2O_2, que en presencia de metales de transición en estado reducido como Fe^{3+} (II), Cu (I), Co (II) y Ni (II), es transformada en otramucho más reactiva: el ·OH, a través de la reacción de Haber-Weiss o Fenton. Imagen tomada de: Krinsky, 1992.

2.1.5 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

El representante más sobresaliente de las ERN es el óxido nítrico (• NO), el cual, es un radical libre diatómico, de vida media corta y sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) (Fig. 2) (Saavedra *et al.,* 2004). Bajo ciertas condiciones el • NO puede ser convertido a otras ERN (Tabla 2), tales como: el catión nitrosonio (NO+), anión nitroxilo (NO-), peroxinitrito ($ONOO^-$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2) (Pérez *et al.,* 2008).

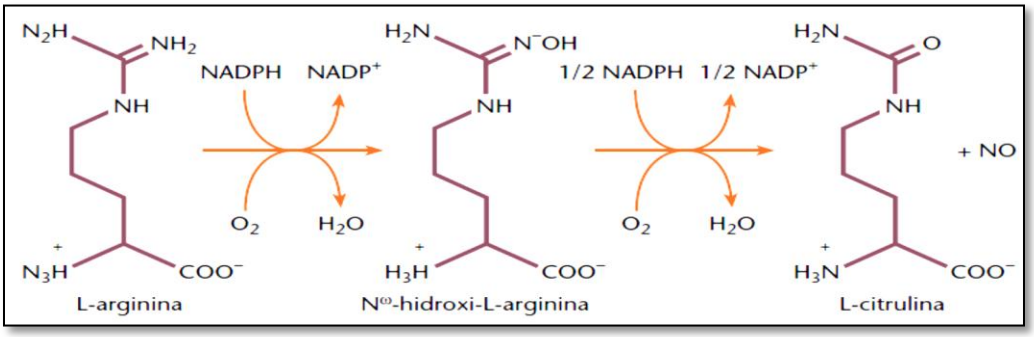


Figura 2. Reacción general de óxido nítrico sintasa. Tomado de: Krinsky, 1992.

ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO			
RADICALES		**Pro-radical**	
Óxido Nítrico:	($NO^{\cdot}$)	Ácido nitroso:	(HNO_2)
Dióxido de Nitrógeno:	($NO_2^{\cdot}$)	Catión nitrosilo:	(NO^+)
		Anión nitrosilo:	(NO^-)
		Tetróxido dinitrogenado:	(N_2O_4)
		Trióxido dinitrogendo:	(N_2O_3)
		Peroxinitrito:	($ONOO^-$)
		Ácido peroxinitroso:	(ONOOH)
		Catión nitrilo:	(NO_2^+)

Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno (ERN). Modificado de: Haliwell, 2006.

Las ERN pueden alterar la estructura de diversas macromoléculas, como es el caso de las moléculas de ADN en donde provocan, junto con las especies reactivas de oxígeno, rotura de la cadena de nucleótidos; si el daño es extenso, la célula será incapaz de funcionar y morirá, ya sea por necrosis o apoptosis en donde la membrana celular y otros organelos son “atacados” por los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno, poniendo en riesgo la integridad del tejido y, en su caso, el órgano afectado (Hernández, 2014). Por este motivo, la producción excesiva de ERN está asociada a diversas patologías, tales como la diabetes mellitus, la isquemia-reperfusión y diversos procesos inflamatorios (Grenfell, 2006).

2.1.6 Óxido nítrico (NO)

El NO es un gas incoloro escasamente soluble en agua (<2 mmol), bajo condiciones de 25 °C, 1 atm de presión y humedad ambiente presenta una vida media de 3.8 a 6.2 s. Se caracteriza por presentar un electrón no apareado en su capa de valencia externa, lo que lo convierte en una molécula paramagnética con naturaleza de radical libre.

Este gas media efectos fisiológicos cuando se produce en pequeñas cantidades (<10 μM), interviniendo en procesos como la neurotransmisión, la vasodilatación, la repuesta inmune, pues los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus mecanismos citotóxicos (Maldonado *et al.,* 2010). En contraste los efectos patológicos se generan cuando el $NO^{\cdot}$ se produce en concentraciones elevadas (Duchen *et al.,* 2004), induciendo la formación de ERN.

2.1.7 Síntesis de óxido nítrico

El NO es producido en las células por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (tipo I, dependiente de Ca^{2+}; tipo II, no regulada por Ca^{2+}; y tipo III, dependiente del sistema Ca^{2+}-calmodulina) (Tabla 3), actuando como activador de la guanilato ciclasa la cual incrementa la concentración del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), facilitando así la transmisión neuronal, promoviendo la relajación vascular, inhibiendo la proliferación de células de músculo liso vascular, la agregación y adherencia de plaquetas y leucocitos. Las concentraciones en un organismo vivo se encuentran entre 10 nM a 1 μM (Ferrer et al., 1998).

Isoforma	Otro nombre	Peso molecular	Regulación	Localización
NOS tipo I	nNOS o bNOS	155 Kda	Ca^{++}/calmodulina	Neuronas del SNC y SNP, neuroglias, islotes del páncreas
NOS tipo II	INOS	125 Kda	Expresión inducida por citosinas y endotoxinas	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos y otros
NOS tipo III	eNOS	135Kda	Ca^{++}/calmodulina	Endotelio vascular, riñon y plaquetas

Tabla 3. Isoformas del óxido nítrico sintasa (NOS). Tomado de: Ferrer *et al.,* 1998.

La síntesis de óxido nítrico puede ser regulada por glucocorticoides y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que reducen la producción de este gas, así como por los propios niveles de NO a través de mecanismos de retroalimentación negativa.

El NO puede ser cuantificado a partir de sus metabolitos estables como NO^{-}_{2} y NO^{-}_{3}, a través de métodos directos (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas,

cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detectores electroquímicos, resonancia electrónica paramagnética quimioluminiscencia) y por métodos indirectos (espectrometría de masas, espectrometría de UV-Vis y métodos electrométricos). Sin embargo la técnica más utilizada es la detección colorida con el reactivo de Griess. Esta reacción involucra la formación de un cromóforo mediante la diazoación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguida por la unión de una amina bicíclica (Hernández, 2013).

2.1.8 Daño celular mediado por radicales libres

Si bien es cierto que los RL son productos sintetizados de manera natural en el organismo, cuando se generan de manera excesiva pueden provocar daño celular en diferentes macromoléculas (Tabla 4).

Daño celular mediado por RL	
Macromolécula	**Daño generado**
LÍPIDOS	Peroxidacion lipídica provocada por el $HO^{\cdot}_2$, oxígeno singulete ($^1O_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$). Generando pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como de los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana lipídica.
ENZIMAS	Los radicales pueden impedir su actividad catalizadora, ocasionando la despolimerización de polisacáridos, lo que da lugar a procesos degenerativos. En el ácido hialurónico, la exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial.
PROTEÍNAS	El radical hidroxilo tiene un espectro amplio de reactividad sobre aminoácidos fisiológicos, además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos. Esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica. El daño oxidante suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína.
ADN	Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, delecciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes.

Tabla 4. Daño celular mediado por RL. Modificado de Kim *et al*., 2002; Maldonado *et al*, 2010; Stadman *et al*., 2003; Venereo, 2002.

El daño celular es ejercido principalmente por la peroxidación de lípidos de la membrana, permitiendo el paso de radicales libres y calcio, el cual genera daño mitocondrial, liberando al medio intracelular más radicales libres, los cuales provocan una reacción en cadena, oxidando a su paso proteínas, carbohidratos, lípidos de membrana (mitocondrial, nuclear y de retículo) incluso el propio DNA (Colak, 2008; Venereo *et al.,* 2002) (Fig. 3)

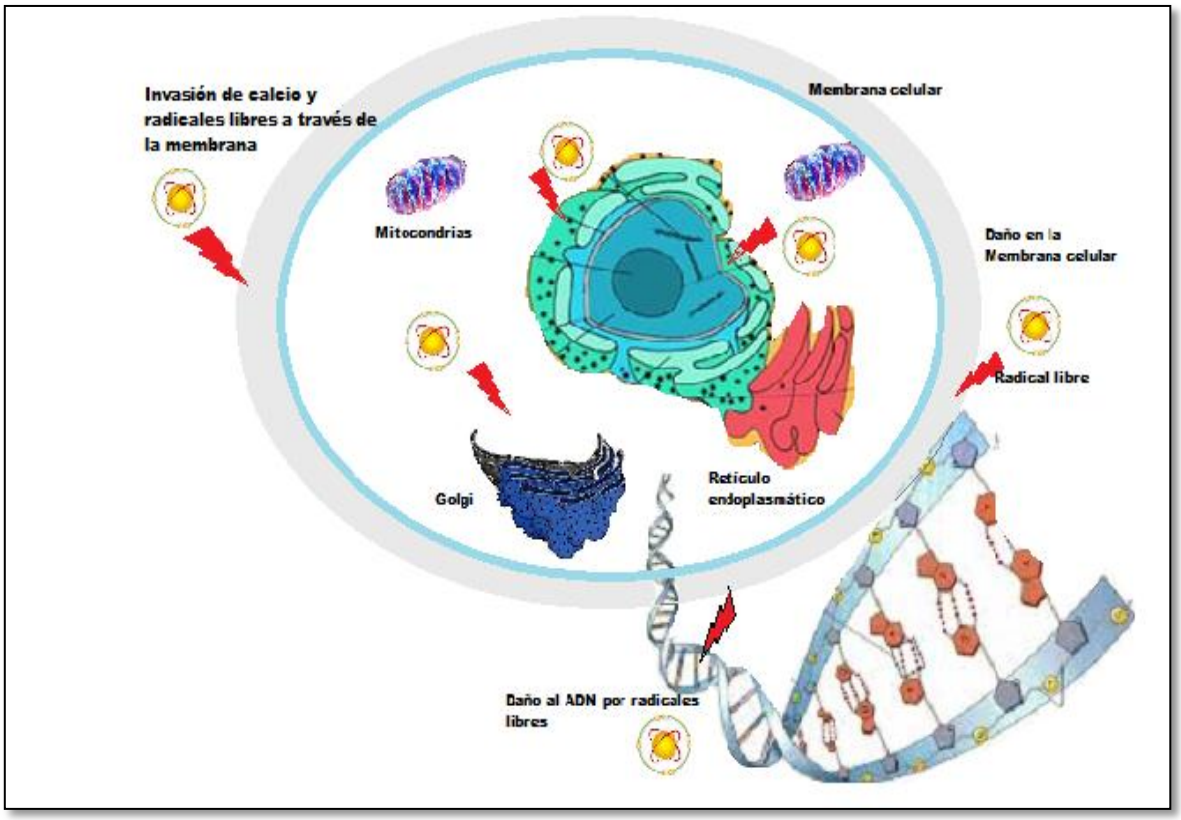


Figura 3. Daño celular mediado por radicales libres.

2.1.9 Papel de los radicales libres en las etapas de la carcinogénesis

El estrés oxidante y el proceso tumoral se encuentran estrechamente relacionados a través de la oxidación del material genético, siendo la molécula de ADN uno de los principales blancos del ataque por radicales libres en la célula y las modificaciones que sufre como consecuencia de esos ataques son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular (Zorrilla, 2004).

En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las especies reactivas del oxígeno (ERO), que llegan al interior del núcleo celular ya sean generadas como consecuencia de un agente externo, así como consecuencia de procesos metabólicos celulares (Shi *et al.,* 1996).

Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, como la ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o dos de sus hebras (García *et al*., 2012), modificación de bases nitrogenadas y la formación de uniones cruzadas, produciendo sitios apirimidínicos, provocando a su vez ruptura de la cadena de ADN y por ende inestabilidad genética. En la tabla 5 se describen los efectos de los radicales libres sobre el ADN durante el proceso carcinogénico.

Acción de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis	
Efecto sobre el ADN	**Acción de los radicales**
Modificación de bases del ADN	La acción del $^{\cdot}OH^{\cdot}$ da lugar a más de 20 modificaciones y entre ellas la más frecuente es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) que tiene un potencial altamente mutagénico al igual que la 5-hidroximetil-2-desoxiuridina.
Depurinación de bases del ADN y formación de sitios AP	Se generan por ruptura del enlace glicosídico, que puede resultar del ataque al azúcar por parte del $OH^{\cdot}$, radiaciones ionizantes y H_2O_2.
Rupturas de una cadena del ADN	Escisión del enlace fosfodiéster. por ataque químico o de radicales libres a la porción desoxirribosa del esqueleto del ADN.
Mutaciones	Por un incremento en la velocidad de la mutagénesis endógena como efecto del ataque por EROS
Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores	Inducido por oxidantes como el H_2O_2, $O_2^{\cdot}$, oxígeno hiperbárico y el ozono.
Inducción de metástasis	El ataque por radicales libres a las células endoteliales causa la liberación de proteasas que pueden con posterioridad, degradar la membrana basal y generar compuestos químicos que atraen a las células tumorales

Tabla 5. Acción de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis. Tomado Goncharova *et al.,* 1996 y Reid *et al.,* 1991; García *et al.,* 2001; Lo *et al.,* 1996; Lafrenie *et al.,* 1992; Salim, 1992; Guyton, 1993; Nakamura *et al.,* 1998.

2.1.9.1 Papel de las ERO y ERN en las etapas de carcinogénesis

El cáncer se desarrolla como un proceso microevolutivo que requiere de la acumulación de múltiples eventos que tienen lugar en un clon de células y comprenden 3 estadios (Fig. 4), de tal manera que la acción ejercida por los radicales será diferente en cada etapa del proceso carcinogénico (Tabla 6) (Dreher *et al.,* 1996):

1. Iniciación: inducción de mutación en el ADN de una célula somática.
2. Promoción: estimulación de la expansión tumoral del clon mutado.
3. Progresión: malignización del tumor.

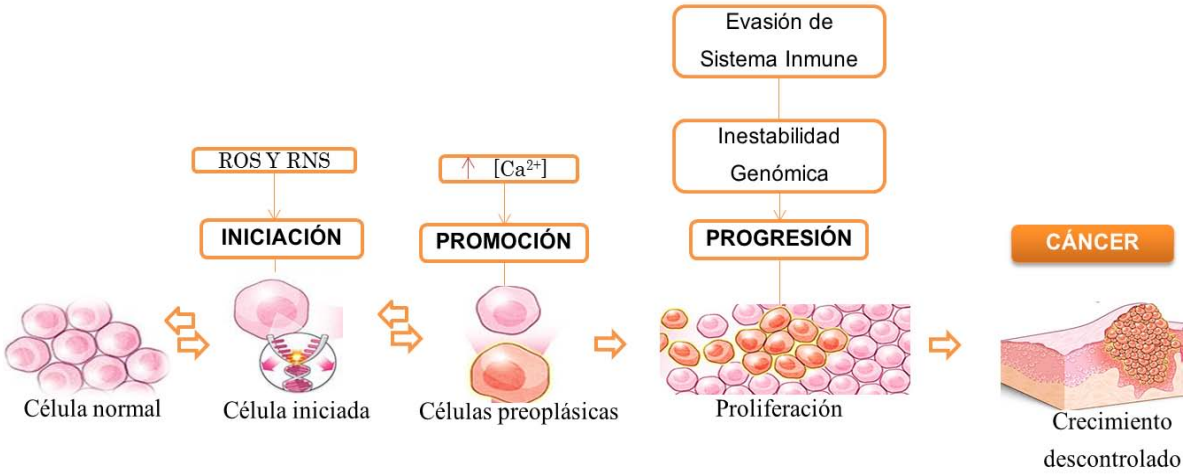


Figura 4. Estadios del proceso carcinogénico. Tomado de: Zorrilla, 2004.

La angiogénesis constituye uno de los procesos de gran significación en el desarrollo y posterior difusión de las células tumorales. En un estudio realizado en 1998 se destaca el posible papel de las ERO en este evento, donde los breves episodios de hipoxia-reoxigenación, sobre las células del endotelio microvascular humano, causaron la formación de ERO y la activación del factor de transcripción nuclear (NF-Kappa B), acelerando significativamente el grado de morfogénesis tubular o neovascularización que define este proceso (Valko *et. al*., 2007).

ESTADIO	EFECTO	ACCIÓN
INICIACIÓN	Modificación permanente del material genético	Formación del $^{\cdot}OH^{-}$, generado por la interacción del H_2O_2 con el hierro (Fe^{2+}) o cobre (Cu^{2+}) constitutivos, unidos o cercanos al ADN, o liberados en el interior celular a causa del estrés oxidativo. Incremento del calcio (Ca2+) libre intracelular que una vez liberado conduce a la activación de endonucleasas que fragmentan al ADN (proceso que normalmente tiene lugar durante la apoptosis).
PROMOCIÓN	Incremento notable del Ca2+ citosólico	Inducción de proto-oncogenes como c-fos o de forma indirecta, modificando la fosforilación de factores transcripcionales por proteína quinasa C dependiente de Ca^{2+} (PKC), o del factor NF-kappa B que tiene bajo su control una gran variedad de genes
PROGRESIÓN	Crecimiento acelerado de las células, la evasión de la vigilancia inmunológica y la invasión de otros tejidos.	Generación de lesiones adicionales al ADN, e incremento de su inestabilidad genómica, acompañándose de una disminución de las enzimas antioxidantes. Por otro lado, los leucocitos activados originan un proceso inflamatorio crónico y conducir a la muerte celular por citotoxicidad o inducir la muerte apoptótica.

Tabla 6. Papel de los ERO y ENR en los estadios de carcinogénesis. Modificado de Valko *et al*., 2007.

2.1.9.2 Acción de los radicales libres en diferentes tipos de cáncer

En la actualidad diversos estudios experimentales han comprobado la participación de los RL en diferentes tipos de cáncer, muestra de ello son los mecanismos que presentan dichos radicales durante la transformación maligna de una célula. En la tabla 7 se describen algunos de estos mecanismos.

Tipo de cáncer	Acción de los Radicales Libres
Gástrico	Inducen la expresión de uPAR (activador del receptor uroquinasa de plasminógeno) vía Erk-1/2 y AP-1, estimulando sucapacidad invasiva, aumnetando la 8-oxo-dG (Kim *et al.,* 2005).
Leucemia linfoide	Aumento de la peroxidación de MDA y 8-oxo-dG (Sánchez *et al.,* 2006).
Pulmón	Aumento de la peroxidación de 8-oxo-dG (Feig *et al.,* 1994).
Ovario	Aumento de la peroxidación de 8-oxo-dG (Oliva *et al.,* 1997).
Mama	Mutaciones en BRCA1/2 (Mann *et al.,* 2006), aumento de 8-oxo-dG (Oliva *et al.,* 1997).
Próstata	Mutan p53 y ocurre una sobreexpresión de Bcl-2 (Lin *et al.,* 2005), Aumento de 8-oxo-dG (Feig *et al.,* 1994 y Oliva *et al.,* 1997).

Tabla 7. Acción de los radicales libres en diferentes tipos de cáncer. Tomado de Sánchez *et al*., 2006.

2.1.9.3 Participación del NO en el cáncer de mama

La biología neoplásica es compleja ya que su efecto depende de varios factores como pueden ser el micrombiente tumoral, la temporalidad y el origen, asi como las células diana (Buga *et al.,* 2000), sin embargo se ha comprobado que la molécula de NO es un mediador fundamental dentro de este proceso.

Algunos estudios relacionan a la enzima NOS en tumores de mama y ginecológicos en donde perjudican el flujo sanguíneo en el tejido tumoral debido a la presencia de altas concentraciones de NO (Gutiérrez, 2010). Sin embargo, experimentalmente se ha encontrado que existen agentes como la doxorrubicina y el 5-fluoroacilo los cuales generan resistencia en células de carcinoma mamario al mostrar un incremento en la tasa de síntesis proteíca, pudiendo ser atenuados al administrar dosis bajas de NO (Trédan *et al.,* 2007), resultando este en un mejoramiento a la respuesta tanto anivel clínico como histopatológico.

2.2 Mecanismos antioxidantes

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen RL. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina antioxidantes (Mayor *et al.,* 2010).

Un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por interacción y estabilización de especies reactivas o por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida (Hernández *et al.,* 2014). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno para evitar alteraciones de moléculas, su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos.

2.2.1 Clasificación del sistema de defensa antioxidante

Los organismos aeróbicos poseen sistemas antioxidantes que permiten la neutralización de los RL, a través de dos mecanismos (Tabla 8), el enzimático (catalítico) y el no enzimático (estequiométrico) (Lozada *et al.,* 2009; Pérez *et al.,* 2008; Maldonado *et al.,* 2010; Allen, 2000).

Enzimáticos Mecanismo de acción: Catalítico	**Enzimas que constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidante y éstas proporcionan una función protectora frente a los oxidantes biológicos, disminuyendo la concentración intracelular de radicales libres.**	
Clasificación	**Modo de acción**	**Biogeneración**
Superóxido dismutasa (SOD)	$O^-_2 \rightarrow H_2O_2$	Mitocondria (Mn-SOD), Citosol (Cu-Zn-SOD)
Catalasa (CAT)	$H_2O_2 \rightarrow H_2O$	Interior de glóbulos rojos
Glutatión peroxidasa (GPx)	$H_2O_2 \rightarrow H_2O$	Citosol, membranas celulares
No enzimáticos **Preventivos** Mecanismo de acción: estequiométrico	**Constituida por secuestradores de radicales libres residuales que no hayan podido ser neutralizados por las enzimas antioxidantes.**	
Clasificación	**Modo de acción**	**Biogeneración**
Trasnferrina y lactoferrina	Quelantes	Citosol, membranas celulares
Ceruloplasmina	Quelantes	Plasma
Secuestradores Mecanismo de acción: estequiométrico	**Inhiben la cadena de iniciación de reacciones de radicales libres o rompen la cadena de propagación de la misma**	
Clasificación	**Modo de acción**	**Biogeneración**
ß-carotenos	Recicladores	Metabolismo de plantas
Vitamina C	Recicladores	Frutas y verduras
Bilirrubina	Inhibe peroxidación	Metabolismo de grupos hemo

Tabla 8. Mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimático. Modificado de Lozada *et al*., 2009; Pérez *et al*., 2008; Maldonado *et al*., 2010; Allen, 2000).

2.2.2 Catalasa

Catalasa (CAT) es un anezima antioxidante que se encuentra en altas concentraciones en hígado y riñón, presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa. Se caracteriza por estar involucrada en la protección frente a la acción destructiva del H_2O_2 producto del metabolismo celular, la radiación ionizante y dismutación del radical superóxido. Proceso que ocurre por la descomposición celular del H_2O_2 en agua y oxígeno (Fig. 5) (Sudagev *et al*., 2011), evitando así que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, especies de oxígeno que son muy reactivas.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalasa}} H_2O + \tfrac{1}{2} O_2$$

Figura 5. Descomposición del peróxido de hidrógeno mediada por catalasa.

Actualmente han sido identificados tres grupos de catalasas: Mn-catalasas, catalasas-peroxidasas y catalasas monofuncionales, éste último, con un peso aproximado de 250,000 daltones, se presenta en la mayoría de los organismos aeróbicos (Díaz, 2003).

En el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, evitando el envejecimiento, ayudando a la prevención de mutaciones, y ciertos tipos de cáncer (Sugadev *et al.,* 2011).

2.3 Terapia antioxidante

Diversos estudios indican que la inducción o inhibición de la proliferación celular depende de los niveles de oxidantes y antioxidantes de la célula (Valko *et al.,* 2007).

Existen evidencias de la participación del estrés oxidativo en el carcinogénesis y su desactivación por los antioxidantes. Ante este panorama, estudios corroboran la reducción del riesgo de padecer algún tipo de cáncer con la ingesta de antioxidantes (Llacuna, 2012), que pueden estar presentes en algunos alimentos ricos en vitaminas o suplementos vitamínicos o en su defecto en formulaciones que contengan estas sustancias anioxidantes, con el objetivo que estas generen un papel preventivo, de ataque y protección contra diversos tipos de cáncer, a esto se le denomina como terapia antioxidante (Galati *et al.,* 2004).

2.4 Fitoquímicos o metabolitos secundarios como antioxidantes

Los fitoquímicos o metabolitos de las plantas son la principal fuente de antioxidantes. La mayoría de ellos son moléculas activas que ayudan a mantener el equilibrio redox y por ende se define como antioxidantes. Estas moléculas se clasifican generalmente como metabolitos primarios y secundarios, en función de su papel en el metabolismo de la planta.

Los metabolitos primarios comprenden a los azúcares comunes, aminoácidos, proteínas, purinas y pirimidinas de los ácidos nucleicos; mientras que los de mayor importancia debido a su posible acción biológica son los metabolitos secundarios, los cuales incluyen a los alcaloides (derivados de aminoácidos), terpenos (un grupo de lípidos) y compuestos fenólicos (derivados de hidratos de carbono), etc. (Andreescu *et al.,* 2011). Estos metabolitos al ser metabolizados en nuestro organismo producen efectos benéficos para nuestra salud (Castañeda *et al.,* 2008).

Los extractos de plantas, principalmente aquellos que contien metabolitos secundarios poseen inhibidores eficaces de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Por ende, los antioxidantes de origen vegetal con este tipo de propiedades podrían tener gran importancia como agentes terapéuticos en varias enfermedades causadas por el estrés oxidativo (Sen *et al.,* 2010 y Benzie, 2003)., entre las que destaca el cáncer, donde la participación de las ERO juegan un papel prepoderante (López *et al.,* 2012).

Reconociendo a las plantas como medicinales debido a que son una fuente potencial de sustancias bioactivas por la complejidad y variabilidad de su metabolismo secundario, se están realizando estudios con el objetivo de encontrar fitofármacos que modulen de manera selectiva algún punto clave dentro del proceso carcinogénico.

2.5 Familia Boraginaceae

Boraginaceae es una familia cosmopolita compuesta por 130 géneros y unas 2300 especies (Takhtajan, 1996; Mabberley, 1997) de árboles, arbustos, bejucos, trepadoras o hierbas anuales o perennes; con distribución geográfica en regiones templadas, subtropicales y tropicales del mundo, excepto Australia. Presentes en gran variedad de hábitats; en América central y Sudamérica, las especies están presentes desde el nivel del mar hasta los 4000 metros de altura. Esta familia cuenta con algunas especies de importancia económica, principalmente como plantas medicinales: diuréticas, desinfectantes, hemostáticas, etc. (García, 1975), ornamentales (*Cordia* L., *Cynoglossum* L., *Heliotropium* L.) o maderables como *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.).

La ubicación de la familia Boraginaceae ha sido controvertida dentro del gran grupo de las Asteridae, no obstante recientemente ha sido asignada al orden Boraginales ó a Solanales (Thorne, 1983; Judd *et al*., 2003). Géneros importantes: *Cordia* (320), *Heliotropium* (260), *Tournefortia* (150), *Onosma* (150), *Criptantha* (150), *Phacelia* (150).

2.5.1 Género *Heliotropium*

Los Heliotropos (*Heliotropium*) es un género de planta de la familia Boraginaceae con 250 a 300 especies. *Heliotropium* se reconoce dentro de las Boraginaceae por sus frutos secos, y el estilo entero o solo bífido (no dividido en 4 lóbulos). Como muchas Boraginaceae, la inflorescencia está enroscada en el ápice, con las flores insertados hacía un solo lado (cima helicoidal).

Son hierbas anuales o perennes o a veces arbustos pequeños; plantas hermafroditas. Hojas pecioladas. Inflorescencias en cimas helicoidales o flores solitarias a lo largo de los tallos frondosos, de color blanco y morado; sépalos 5, libres o casi libres hasta la base; corola tubular, 5-lobada; estambres 5, insertos en la garganta del tubo de la corola; ovario 4-carpelar, frecuentemente 4-lobado, estilo terminal o ausente, estigma 1, de forma variable. Frutos secos, separados en 2 ó 4 nuececillas al madurarse (Gibson *et. al*., 1970). Género principalmente ruderal y arvense (Miller, 2009; Nash y Moreno, 1981). Se distribuye en las regiones del matorral xerófilo, bosques tropicales caducifolios y perennifolios, dunas costeras, manglar (Nash y Moreno, 1981; Duno *et al*., 2010). En Veracruz se encuentra desde el nivel del mar hasta los 1900 m (Puebla) (Nash y Moreno, 1981).

El género *Heliotropium* fue descrito por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum* 1: 130. 1753. La especie tipo es: *Heliotropium europaeum* L. *Heliotropium* es el nombre genérico que deriva de *Heliotrope* (*Helios* que significa en griego "sol", y *tropein* que significa "volver") y se refiere al movimiento de la planta mirando al sol.

2.5.2 Clasificación Cladista de *Heliotropium angiospermum*

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Boraginales Juss. ex Bercht. y J. Presl

Familia: Boraginaceae Juss.

Género: *Heliotropium* L.

Especie: *angiospermum* M.

2.5.3 Sinónimos

Heliophytum parviflorum (L.) DC., *Heliophytum portoricense* Bello, *Heliotropium foetidum* Salzmann ex DC., *Heliotropium humile* Lam., *Heliotropium lancifolium* Sessé y Moc. *Heliotropium latifolium* Willd. ex Lehm., *Heliotropium oblongifolium* M. Martens y Galeotti *Heliotropium parviflorum* L., *Heliotropium parviflorum* Sessé y Moc., *Heliotropium patibilcense* Kunth, *Heliotropium rugosum* M. Martens y Galeotti, *Heliotropium scorpioides* Kunth, *Heliotropium simplex* Meyen, *Heliotropium synzystachyum* Ruiz y Pav., *Schobera angiosperma* (Murray) Britton, *Schobera angiosperma* (Murray) Scop., *Schobera hirsuta* Raf., *Synzistachium peruvianum* Raf., *Tournefortia synzystachya* (Ruiz y Pav.) Roem. y Schult.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Recuperado el 16 de Febrero de 2015 de: http://www.tropicos.org/Name/4000959?tab=synonyms

2.5.4 Nombres comunes

Nombres usados en español:
Cola de alacrán (El Tajín, Ver.), Rabo de mico (Yucatán) (Martínez, 1979), Alacrancillo (Veracruz), Yerba del espasmo (según Galeotti) (Nash y Moreno, 1981), Cola de mono (Duno *et al.,* 2010), Rabo de alacrán.

Nombres en idiomas indígenas de México:
Macapura (guarigia, Sonora), Ne-maax (maya, Yucatán), Soguilla (San Bernardo, Sonora), Tascuyu-tuuan (totonaca, El Tajín, Ver.), Totoli-ya capipilol (chililico, Huejutla, Hgo.), Nemax (Quintana Roo), Nej ma'ax, nej sina'an, ta ulu'um ma'ax (maya).

CONABIO. Ficha informativa. *Heliotropium angiospermum* M. Recuperado el 17 de Febrero de 2015 de: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm#1.Nombres

2.5.5 Descripción morfológica

Heliotropium angiospermum es una herbácea que mide entre 15 cm a 2 m. de altura, presenta hojas alargadas con forma de lanza, sus flores pequeñas son blancas y numerosas, en espigas formando una inflorescencia parecida a la cola de alacrán, frutos muy arrugados de 2 a 3 mm de largo, y contienen dos semillas (Fig. 6).

A) B) C) D)

Fig. 6. A) *Heliotropium angiospermum*, B) Hoja, C) Flores e Inflorescencia y D) Semillas. Fotografías tomadas por Ernesto Mendoza Vallejo, 2014.

2.5.6 Hábitat

Originaria del sur de Estados Unidos de América, Chile y Bolivia. Habita en clima cálido y semicálido, en Veracruz se reporta desde el nivel del mar hasta los 1900 m.s.n.m. Asociada a bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, además de matorral xerófilo. Está presente en áreas de vegetación perturbada y crece a orillas de caminos.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 16 de Febrero de 2015 de: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7164

2.5.7 Ecología

Especies que contienen alcaloides pirrolizidinicos son visitados a menudo por lepidopteras, para abastecerse con estas sustancias. Parece que son la materia prima para producir ferohormonas de algunos grupos, o para utilizarlos para la defensa química. En la península de Yucatán se considera no sólo como medicinal, sino también como melífera y tóxica.

CONABIO. Ficha informativa. Heliotropium angiospermum. Recuperado el 18 de Febrero de 2015 de: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm#5. Biología y ecología

2.5.8 Distribución

2.5.8.1 A nivel Mundial:

A nivel mundial, *Heliotropium* angiospermum se localiza en países como: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Caribe, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Perú, Estados Unidos y Venezuela (Fig. 7).

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Recuperado el 27 de marzo de 2015 de: http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2603005&tab=distribution

Figura 7. Distribución mundial de *Heliotropium angiospermum* M.

2.5.8.2 En México:

Heliotropium angiospermum se localiza en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Fig. 8).

CONABIO. Ficha informativa. *Heliotropium angiospermum.* Recuperado el 18 de Febrero de 2015 de: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm#2.Origen y distribución geográfica

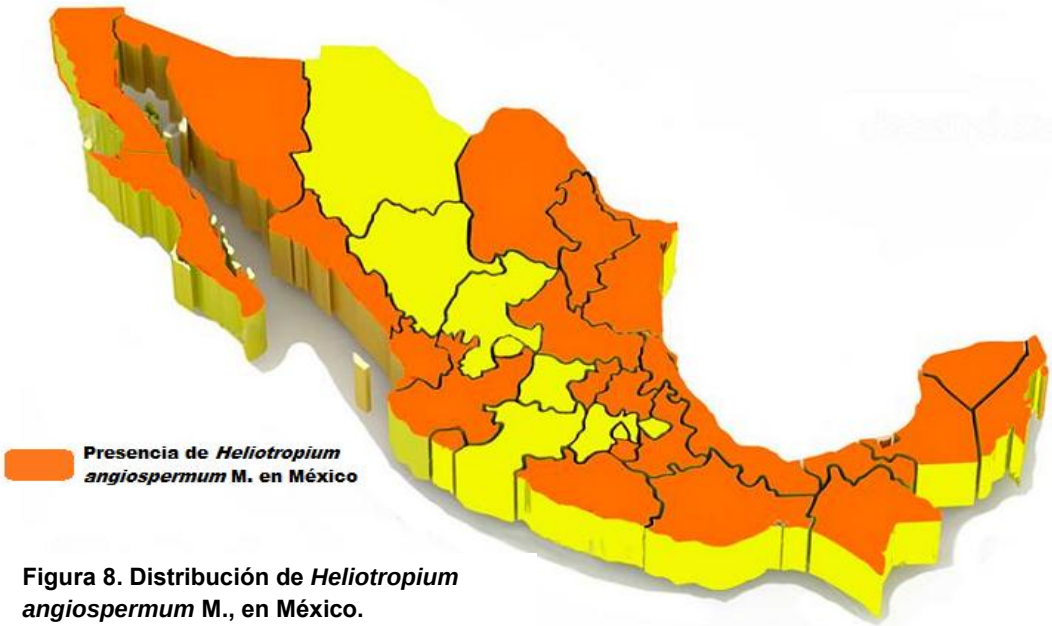


Figura 8. Distribución de *Heliotropium angiospermum* M., en México.

2.6 Estudios de *Heliotropium angiospermum*

Autores como Erosa *et al*., (2009) reconocen la presencia de algunos glicósidos en extractos orgánicos de *Heliotropium angiospermum*; por otra parte Chataing (2004) y Feng (1964) estudiaron algunas de las actividades biológicas reportadas para dicha especie. En las tablas 9 y 10 se describen algunos de los estudios fitoquímicos realizados en extractos de *Heliotropium angiospermum*, mientras que la figura 9 presenta algunos de los glicósidos detectados.

2.6.1 Estudios fitoquímicos

Estructura	Metabolito detectado	Referencia
Planta completa	Alcaloides de pirrolizidina lindelofidina, hidroxi-metil-l-2-epopxi-pirrolizidina, retronecina, supinidina y tachelantamidina.	Birecka *et al.,* 1987. BDMTM, 2009
Hoja	Alcaloides espermidina, espermina, y putrecina.	Birecka *et al.,* 1987. BDMTM,2009
Inflorescencia	Alcaloides espermidina, espermina.	Birecka *et al.,* 1987. BDMTM, 2009
Tallo y hojas	Alcaloides de pirrolizidina	BDMTM, 2009

Tabla 9. Alcaloides presentes en extractos de *Heliotropium angiospermum*.

Estudio	Extracto	Metabolito detectado	Referencia
Secondary Metabolites from *Heliotropium angiospermum*	Extracto orgánico de hojas de *Helitropium a*.	Glicósidos como blumenol A y B, además de loliólido.	Erosa *et al*., 2009
		β-sitosterol, α-amirina y β-amirina	

Tabla 10. Glicósidos presentes en extractos de *Heliotropium angiospermum*.

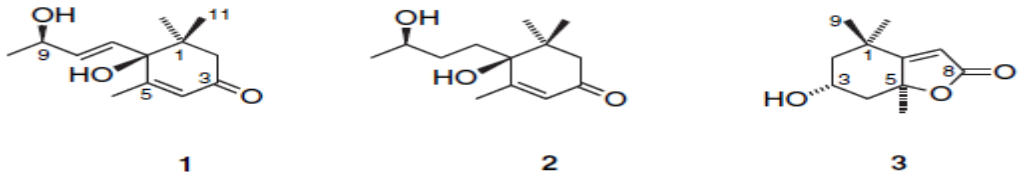


Figura 9. Estructura química de agliconas formando parte de glicósidos presentes en el extracto orgánico de las hojas de *Heliotropium angiospermum* M. 1. blumenol A, 2. blumenol B, 3. Loliólido. Tomado de Erosa *et al.,* 2004.

2.6.2 Estudios sobre la actividad biológica de *Heliotropium angiospermum*.

Reporte farmacológico	Referencia
El extracto acuoso obtenido de hojas y tallos presentó un ligero efecto estimulante en tejido de útero aislado de rata.	Feng *et al.,* 1964, BDMTM, 2009
Los extractos de *Heliotropium angiospermum* M. son promisorios de actividad antiparasitaria.	Chataing N., 2004
Los experimentos preliminares indican que pueden inhibir el crecimiento de *Tripanosoma cruz*i y *Leishmania mexicana* in vitro.	

Tabla 11. Reportes sobre la actividad biológica de *Heliotropium angiospermum*. Modificado de: BDMTM, 2009.

2.6.3 Estudios Toxicológicos

Algunos reportes de la BDMTM (2009) indican que en Barbados algunos niños que tomaron dosis altas de la decocción de la planta, se envenenaron causándoles la muerte. En un ensayo realizado en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América, se observó la aparición de sarcomas en 4 de10 ratas, en el sitio donde se inyectó un extracto de la planta (Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana), y afecta el ADN. Es ampliamente usado como medicinal debido a la presencia de varios alcaloides (Duno *et al.,* 2010).

2.7 Etnobotánica

La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica, que en su concepción más amplia estudia el lugar de las plantas en la cultura y la interacción directa de las personas con las plantas (Ford, 1978) sin limitarse a ningún tipo de sociedades, centrandose en los grupos humanos cuya relación con la naturaleza es más directa (Pardo *et. al*., 2003).

Para llevar a cabo una investigación etnobotánica, autores como Bennett *et al*., (2000) y Gómez *et al*., (2002) mencionan la necesidad de utilizar técnicas o métodos que permitan un mejor análisis de los datos recolectados en campo. Prance (1991) agrupa estos métodos dentro de lo que denomina “etnobotánica cuantitativa” en la cual existen fases que van desde la documentación del conocimiento tradicional, determinaciones cuantitativas, evaluaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas, hasta el desarrollo de mecanismos para la compensación a la comunidad (Bermúdez *et al.,* 2005); todo ello con el fin de conservar la diversidad biológica y cultural (Cunningham, 2001 y Ladio, 2006).

2.7.1 Etnofarmacología

Es reconocida como: la exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados o conocidos por el hombre (Verde, 2002); teniendo como objetivo principal rescatar y documentar una herencia cultural importante antes de que se pierda, e investigar y evaluar los agentes utilizados, además de mantener una amplia perspectiva multidisciplinaria del uso humano de las drogas crudas en el contexto tradicional, correlacionando e integrando datos científicos ofrecidos por una variedad de disciplinas y subdisciplinas.

Se sabe que desde hace muchos años las plantas han sido utilizadas colectivamente como remedios caseros y que de esta forma se administran dosis que hacen posible tratar cierta afección, obteniendo resultados favorables. A las plantas que reúnen estas características se les denomina como "plantas medicinales", las cuales continen uno o más principios activos, que administrados en la dosis adecuada, producen un efecto curativo frente a las afecciones del hombre y de los animales (OMS, 2002).

2.8 Estudios etnobotánicos de *Heliotropium angiospermum*

Estos estudios son presentados en la tabla 12, en donde se describen las estructuras de la planta que tienen mayor uso medicinal, así como sus propiedades y forma de uso.

Categoría de uso	Parte utilizada	Propiedad terapéutica	Forma de uso	Referencia
Medicinal	Tallo y hojas	Enfermedades gastrointestinales	Agua de tiempo	CONABIO, 2011
Tóxica	Tallo y hojas	Cancerígena	Extractos	Duno *et al*., 2010
Medicinal	Hojas	Colitis Diarrea Gastroenteritis Disentería	Agua de tiempo	BDMTM UNAM, 2009
Medicinal	Raíz	Empacho	Infusión	BDMTM UNAM, 2009
Medicinal	Hojas	Para sanar granos del cuerpo	Baños o lavados locales	BDMTM UNAM, 2009
Medicinal	Hojas	Infecciones respiratorias	Infusión	BDMTM UNAM, 2009
Medicinal	Hojas	Antiinflamatorio	Cataplasma	BDMTM UNAM, 2009
Medicinal	Tallos y hojas	Anticancerígeno	Agua de tiempo	
Medicinal	Hojas	Antiinflamatorio Curación de heridas	Infusión o Cataplasma	Erosa *et al*., 2009

Tabla 12. Estudios etnobotánicos de *Heliotropium angiospermum.* Modificado de: CONABIO, 2011 y BDMTM, 2009.

2.9 Metabolitos Secundarios

Al igual que los animales, hongos, algas y bacterias, las plantas realizan funciones fisiológicas en las que están implicadas rutas metabólicas, como son la respiración celular y la síntesis de proteínas, procesos esenciales para mantener la vida (Taiz *et al.,* 2006).

Dentro de estos procesos se encentra la fotosíntesis, a través de la cual, plantas, algas y algunas bacterias generan compuestos que servirán para la síntesis de diferentes sustancias (Seigler, 2001). De éstas, las que se pueden emplear con fines medicinales se denominan principios activos.

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal (Pengelly, 1996). Son clasificados según su estructura química, en dos grupos: en el primero se encuentran los productos resultantes del metabolismo primario, como lo son, procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción. Mientras que los productos derivados del metabolismo secundario no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizadas como defensa, adaptación y que permiten interacción ecológica de la planta con su entorno (Bruneton, 2001).

Los metabolitos secundarios con mayor relevancia debido a su actividad biológica y que son de gran interés para la industria farmaceútica son por mencionar algunos: los alcaloides, flavonoides, esteroides y triterpenos libres, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, saponinas, quinonas, taninos y cumarinas.

2.9.1 Alcaloides

Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas: al estado libre como glicósidos o formando sales con ácidos orgánicos (Arango, 2008).

No existe una definición exacta para los alcaloides, son considerados como: “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Maldoni, 1991).

En cuanto a su estado natural, los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (cocaína, nicotina, pilocarpina), en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semilla (piperina, arecolina), en corteza (quinina, tubocurarina), en la raiz (emetina y cefalina).

Este grupo de metabolito es el de mayor importancia para la industria farmacéutica debido las propiedades que presenta, entre las que destacan: antiinflamatorios, emolientes y diuréticos, propiedades anestésicas, eméticas, analgésicas, sedante, antiséptico, además de ser un potente agente anticancerígeno, antineoplásico y un potente estimulante del sistema nervioso central (Kutchan, 1995; Ghosh, 2000).

2.9.2 Glicósidos cardiotónicos

Son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo lactónico insaturado, que actúan sobre el músculo cardiaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardiaca (Marínez, 2002).

Los cardiotónicos se encuentran distribuidos principalmente en las hojas de plantas de las familias Scrofulariaceae, Apocynaceae, Liliaceae, Ranunculaceae y Moraceae. Los bufanólidos se han encontrado también en ranas del género Bufus, y en las alas de mariposas monarca.

Los glicósidos han sido considerados de interés por su potencial uso farmacológico, poseen acción tónica y fortalecedora del corazón, es decir, aumentan su fuerza contráctil y regulan su ritmo, mientra que algunas tienen propiedades diuréticas, especies del género Bufus han tomado mayor relevancia por su potencial anticancerígeno.

2.9.3 Esteroides y Triterpenos Libres

Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonado de seis unidades de isopreno derivados del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Éstos pueden contener grupos hidroxilo, cetona, aldehído y ácidos carboxílicos, muy relacionados con los esteroides.

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, constituyendo un grupo de más de 100 esqueletos distintos. Son importantes para la industria farmacéutica ya que presentan propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas y antioxidantes.

2.9.4 Flavonoides

Son compuestos de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos (C_6-C_3-C_6) compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Martinez, 2002). Caracterizados por ser polifenólicos y solubles en agua.

Existen al menos diez clases de flavonoides que se encuentran presentes en todas las estructuras de la planta, entre estas encontramos principalmente a: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavanoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las xantonas y las auronas (Martino, 2000).

Entre los efectos benéficos para el hombre, se ha reconocido que flavonoides como la quercetina, kampferol y miricetina tienen cualidades farmacológicas y protectoras para la salud, demostrando que algunos modulan el sistema inmune y las respuestas antiinflamatorias.

Estas cualidades se deben a que los flavonoides desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos del daño oxidativo; es así como son reconocidas sus actividades antialérgicas, antiinflamatorias, antivíricas,a anticancerosas y antioxidantes, ya que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Igualmente, afectan una gran cantidad de enzimas y proteínas asociadas a la fotofosforilación. Por ello tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Castro *et al*., 2013).

2.9.5 Taninos

Son compuestos químicos no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales, de reacción acida y de sabor muy acre. Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. Producen la precipitación de soluciones de gelatina y de alcaloides. Los taninos precipitan las proteínas en solución y se combinan con ellas haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas.

En medicina se emplean como astringentes del extracto gastrointestinal y de las escoriaciones de la piel. En el tratamiento de las quemaduras las proteínas de los tejidos expuestos precipitan y forman una capa protectora antiséptica bajo la cual tiene lugar a la regeneración de los tejidos (Ávalos *et al.,* 2009), además presentan propiedades antioxidantes, antinflamatorias, antibacterianas, cicatrizantes, hemostática, dermatológica, para el tratamiento de hemorroides y ulceras de la boca (Botanical-online).

Botanical online. Recuperado el 15 de Marzo de 2015 de: http://www.botanical-online.com/medicinalestaninos.htm

2.9.6 Saponinas

Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico. Tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas, que es la principal característica para su reconocimiento (Hostettman, 1995). Tienen un sabor acre y amargo, se utilizan como producto mucolítico ya que provocan un aclaramiento del mucus denso, facilitando la expectoración, mediante una ligera acción irritativa sobre las mucosas gástricas.

Se encuentran principalmente en varias familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae (Agavaceae). En el reino animal, las estrellas

de mar constituyen el único ejemplo de animales con saponinas esteroides (Martínez, 2001).

Son consideradas como precursores únicos de medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos. Sin embargo algunas saponinas esteroides han mostrado diversas actividades biológicas como: antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, ictiotóxica, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, hemolítica, antimicótica, etc.; también son utilizadas como coadyuvantes de la acción de otras plantas, ya que facilitan la oabsorcion de los principios activos incrementando su eficacia (Ávalos *et al.,* 2009).

2.9.7 Naftoquinonas y antroquinonas

Son compuestos orgánicos de origen natural altamente reactivos, se han utilizan como colorantes y pigmentos cuyos tonos van desde el amarillo al rojo. Estructuralmente, son compuestos cíclicos derivados del naftaleno. Estos compuestos y sus derivados son, en la actualidad de una gran importancia, debido a que pueden participar en distintos procesos biológicos esenciales para los seres vivos, ya que presentan una notable actividad biológica y poseen gran potencial antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, antiespasmódico, insectisida, antiviral y anticancerígeno.

Algunos ejemplos de Naftoquinonas sintetizadas de origen vegetal son: la lawsona, colorante naranja que se encuentra en las hojas y tallos de la henna, la juglona, colorante marrón que se aísla en las especies del género *Juglans* y le confere,en parte, el color característico a la cáscara de nuez, la plumbagina, el lapachol, pigmento amarillo que se encuentra en la corteza y la madera de los géneros *Tabebuia* y *Tecoma*, la alkanina y shikonina que se encuentran en las raíces de especies que pertenecen principalmente a los géneros *Alkanna, Lithospermum, Echium, Onosma* y *Anchusa* de la familia Boraginaceae (Cantú *et al*., 2012).

2.9.8 Cumarinas

Las cumarinas son compuestos derivados de la α-benzopirona. Ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en la familia Umbeliferae y Rutaceae; se encuentran en todas partes de la planta desde la raíz a flores y frutos siendo más abundantes en estos últimos; se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos (Arango, 2010).

Presentan un amplio rango de actividad biológica por ejemplo: la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la aguda hepatoxicidad y carninogenicidad de ciertas aflatoxinas, la actividad astrogenica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantotoxina,la acción

insecticida de los surangin A y B, entre otros: cabe destacar también las aplicaciones de las cumarinas como saborizantes y perfumería (Lacy *et al.,* 2004).

2.9.9 Lactonas Sesquiterpénicas

Son terpenos con un esqueleto de 15 átomos de carbono, que tienen en su estructura una lactona. Representan los componentes activos de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae (Dupuy *et al.,* 2008).

Estos compuestos se obtienen a partir de hojas y flores de plantas como *Milleria quinqueflora, Viguiera sylvatica, Decachaeta thieleana*, *Vanillomopsis arborea* y *Arnica montana*, entre otras. Algunos ensayos demuestran que los extractos de estas plantas, así como también, las lactonas sesquiterpénicas purificadas poseen propiedades antiinflamatorias (García *et al.,* 2001, Humar *et al.,* 2003), antibacterianas y antifúngicas (Coll *et al*., 2007), además de ser el principio activo responsable del sabor amargo de diferentes drogas.

III. Justificación

A nivel mundial, el cáncer es considerado una de las principales causas de mortalidad. La Organización Mundial de la Salud en el 2013 le atribuyó a esta enfermedad aproximadamente 7.6 millones de defunciones, ocupando México el tercer lugar con mas de 128 millones de casos al año. Así mismo reporta entre los más comunes al cáncer de próstata, cérvix, pulmón, y estomago; siendo el cáncer de mama el más común entre las mujeres de nuestro país (OMS, 2013).

Hoy en día se sabe que existen diferentes factores que ocasionan el cáncer. En las ultimas decadas el estrés oxidativo a cobrado gran importancia, éste se caracteriza por su capacidad de reaccionar con distintas biomoléculas generando daños permanentes al ADN, implicados en la carcinogénesis (Hart *et al*., 2012). Para su tratamiento han sido empleados agentes citotóxicos (vincristina, vinblastina, taxol y camptotecina) y tratamientos como la radioterapia, los cuales no son selectivos y afectan tanto a las células cancerígenas como a las normales, además de generar mayor cantidad de RL ocasionando efectos adversos.

Debido a ello, se hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas, que puedan demostrar su eficacia, asi como disminuir los efectos adversos en el manejo de esta enfermedad. Por tal motivo en el presente estudio se evaluó el potencial modulador de radicales libres de los extractos de *Heliotropium angiospermum* en un modelo murino.

IV. Hipótesis

Los extractos de *Heliotropium angiospermum* estimularán la respuesta antioxidante debido a la presencia de moléculas que modulen el potencial redox durante el proceso de carcinogénico.

V. Objetivos

5.1 General

Evaluar el efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* M., sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer.

5.2 Específicos

- Registrar el contexto etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum.*
- Realizar un análisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólico y acuoso de raíz, tallo, hoja, semilla y flor de *Heliotropium angiospermum*.
- Determinar el efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de tallo y hoja de *Helitropim angiospermum* sobre la concentración de nitritos en el homogenado de hígado de ratones de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólico y acuso de *Heliotropium angiospermum* sobre la actividad enzimática de catalasa en homogenado de hígado de ratones de la cepa CD-1.

VI. Metodologia

6.1 Localidad de colecta

La colecta de *Heliotropium angiospermum* se realizó en los meses octubre y noviembre del año 2013 en la Comunidad el Limón Chiquito, Cazones de Herrera Veracruz (20° 40' 44.4'' N, 97° 16' 43.5'' O a 15 msnm). Posteriormente, la especie fue identificada y cotejada en laboratorios del MEXU, UNAM (Anexo 11.1).

6.2 Recopilación de información etnofarmacológica

Se obtuvo al realizar entrevistas (Anexo 11.2) a informantes clave (dirigidas únicamente a los habitantes de la localidad que han utilizado dicha especie) (Robeneau, 1986), en esta entrevista se tomaron como datos más relevantes el sexo y la edad del individuo que la utiliza, la forma de preparación, fresuencia de uso, asi como la forma de administración, dosis empleada y padecimiento tratado.

6.3 Procesamiento del material vegetal

La raíz, el tallo, las hojas, semillas y flores de *Heliotropium angiospermum* fueron separadas, pesadas y lavadas con agua destilada. Posteriormente se quito el exceso de agua con papel absorbente a cada estructura vegetal fresco y se trituraron en un molino de mano.

6.4 Obtención de extractos

6.4.1 Extracto Hidroalcohólico

Cada 100 g de material triturado de *Heliotropium angiospermum* fueron colocados en 500 ml de una mezcla etanol-agua (70:30) y preservados en frascos ámbar durante un mes en una campana de extracción a tempreatura ambiente. Pasado ese tiempo, cada extracto se filtró al vacío con papel Whatman No. 1.

6.4.2 Extracto acuoso

Cada 100 g de material vegetal de cada una de las estructuras de *Helitropium angiospermum* fueron sometidos a un cocimiento en 1400 mL agua destilada durante 5 minutos posteriores a la ebulliciòn, finalmente la solución se filtró con gasas y fueron almacenadas frascos ámbar en refrigeración.

6.4.3 Obtención del extracto sólido

Cada 50 mL de los extractos hidroalcohólico y acuso fueron colocados en cristalizadores de 125 x 65 a temperatura ambiente en una campana de extracción para la obtención del extracto seco.

6.5 Pruebas para la detección de metabolitos secundarios (Anexo 11.3)

6.5.1 Alcaloides

Las técnicas de reconocimiento se basan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tugsteno formando precipitados, generados al existir un intercambio del anión del reactivo en acción, que reemplaza a los aniones que conforman las sales de los alcaloides.

Para su identificación se realizaron pruebas de precipitación en medio ácido, utilizando sales de metales pesados como el reactivo de Wagner (precipitado naranja pardo), Dragendorff (precipitado naranja rojizo) y Meyer (precipitado blanco o de color crema). Para los ensayos, se utilizó un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, finalmente se observó la coloración correspondiente para cada reacción.

6.5.2 Glicósidos Cardiotónicos

Son heterósidos formados por una parte glucídica constituida por una o varias unidades de azúcar y un aglicón, con un núcleo esteroídico (C27, tetracíclico) unido a un anillo lactónico insaturado. Para su identificación se emplearon reactivos de coloración para cada una de las unidades constituyentes, para los azúcares se utilizó el Reactivo Keller-Killiani (coloración esperada verde o pardo), para el núcleo esteroidal el Reactivo Lieberman-Burchard (coloración esperada azul o verde para el núcleo esteriode y rojo a naranja pardo para el nucleo triterpénico) y para la lactona, el Reactivo de Baljet (coloración esperada rojo a naranja estable). Para los ensayos, se utilizó un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, finalmente se observó la coloración correspondiente para cada reacción.

6.5.3 Esteroides y Triterpenos Libres

Son compuestos con un esqueleto carbonado de seis unidades de isopreno derivados del escualeno. Éstos pueden contener grupos hidroxilo, cetona, aldehído y ácidos carboxílicos, muy relacionados con los esteroides y que en contacto con soluciones ácidas forman dobles enlaces dando tonalidades rojas, azules o verdes. Para su identificación se utilizó el reactivo de Lieberman-Burchard (coloración esperada azul o verde para el núcleo esteriode y rojo a naranja pardo para el nucleo triterpénico) en medio ácido utilizando un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, finalmente se observó la coloración correspondiente para la reacción.

6.5.4 Flavonoides

Son estructuras de tipo C6-C3-C6 con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno, solubles en mezclas hidroalcoholicas. Estos pueden formar complejos con metales como Mg^{2+} y Fe^{3+}, que al acidularlas viran a reacciones coloreadas.

Para su deteccción se utiliza la reacción de Shinoda, una de las reacciones más específicas para denotar su presencia, donde el magnesio metálico es oxidada por el ácido clorhídrico concentrado dando como producto al hidrogeno molecular y cloruro de magnesio. Este último forma complejos con los flavonoides dando coloraciones definidas según el núcleo del flavonoide. Estas coloraciones pueden ser las siguientes:

Tipo de Flavonoides	Color de la Reacción de Shinoda
Chalconas	No hay coloración
Auronas	No hay coloración
Isoflavanonas	No hay coloración
Isoflavonas	Amarillo- rojizo
Flavanonas	Azul-magenta-violeta-rojo
Flavononoles	Rojo-magenta
Flavonas y Flavonoles	Amarillo-rojo

Tabla 13. Coloraciones de los flavonoides frente a la reacción de Shinoda.

Para su identificación se utilizó la reacción de Shinoda, utilizando un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, finalmente se observó la coloración correspondiente para la reacción.

6.5.5 Taninos

Son polifenoles que tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta propiedad para su identificación se utilizó el reactivo gelatina-sal el cual produce un precipitado blanco. Para el ensayo, se utilizó un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, posteriormente se espero la formación del precipitado.

6.5.6 Saponinas

Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos.

Para su identificación se relizaron los ensayos de espuma y, se utilizó el reactivo de Lieberman Burchard (coloración esperada azul o verde para el núcleo esteriode y rojo a

naranja pardo para el nucleo triterpénico) preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, utilizando un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, finalmente se observó la coloración correspondiente para la reacción y la formación de espuma para el ensayo.

6.5.7 Naftoquinonas y Antroquinonas

Son pigmentos naturales que poseen grupos carbonilo, hidroxilo o metilo como sustituyentes en forma libre o condensada. La técnica de identificación se basa en la capacidad que tienen las quinonas de formar complejos de color rojo cereza al ser tratadas con soluciones alcalinas.

Para identificarlas se empleó la reacción de Bornträger-Kraus (forma complejos de color cereza) utilizando un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, posteriormente se observó la coloración correspondiente para la reacción.

6.5.8 Cumarinas

Para su identificación fueron utilizados los reactivos de hidroxamato férrico (formación de coloración violeta) y Baljet (coloracion o precipitado de color rojo), preparando un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, posteriormente se observó la colorcion correspondiente de ambos reactivos, estableciendo como positiva la presencia de cumarinas al ser ambas pruebas positivas.

6.5.9 Lactonas Sesquiterpénicas

Son terpenos con un esqueleto de 15 átomos de carbono, que tienen en su estructura una lactona. Para su identificación fueron utilizados los reactivos de Hidroxamáto Férrico (formación de coloración violeta) y Lieberman Burchard (coloración esperada azul o verde para el núcleo esteriode y rojo a naranja pardo para el nucleo triterpénico), utilizando un patrón de 0.1 g/mL de extracto concentrado, preparando disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL. Ambas pruebas deben ser positivas para concluir la presencia de este metabolito secundario.

6.6 Inducción de carcinomas

Se utilizaron 45 ratones hembra de la cepa CD-1 de 45 días de edad. La inducción de carcinoma se realizó con modificaciones en el método estandarizado por Ortíz *et al.,* (1995). Se inyectó en la mama izquierda una dosis única intramuscular de 20mg/Kg de NiO (óxido de niquel) (Sigma, grado RA) a 9 grupos de 5 ratones hembra, CD-1 (Anexo 11.4).

La inducción de carcionoma fue realizada el 5 de Noviembre de 2013, los organismos fueron mantenidos en condiciones de bioterio hasta el momento de su sacrificio.

6.7 Tratamiento con extractos hidroalcohólico y acuoso

Después de tres meses de la inducción a carcinoma con NiO (periodo en el que Ortíz *et al*., 1995 reportan ya dio inicio el proceso carcinogénico) se evaluó el efecto antioxidante administrando de manera oral dosis de 5 y 10 mg/Kg de extractos hidroalcohólico y acuoso (hoja y tallo respectivamente) de *Heliotropium angiospermum* durante 13 días (promedio de uso medicinal registrado en las entrevistas etnobotánicas). A continuación se muestra el orden de aplicación de los extractos a los difererentes grupos (tabla 14):

Grupo	Condición
C-	Control negativo (Sin ningún tratamiento)
V	Vehículo (Aceite de Oliva)
C+	Control positivo (Inducción de carcinoma con NiO)
EHH 5 mg/Kg	Extracto Hidroalcohólico Hoja + NiO
EHH 10 mg/Kg	Extracto Hidroalcohólico Hoja + NiO
EHT 5 mg/Kg	Extracto Hidroalcohólico Tallo + NiO
EHT 10 mg/Kg	Extracto Hidroalcohólico Tallo + NiO
EAH 5 mg/Kg	Extracto Acuoso Hoja + NiO
EAH 10 mg/Kg	Extracto Acuoso Hoja + NiO
EAT 5 mg/Kg	Extracto Acuoso Tallo + NiO
EAT 10 mg/Kg	Extracto Acuoso Tallo + NiO

Tabla 14. Grupos experimentales.

6.8 Obtención de homogenado de hígado

Se procedio a sacrificar a los organismos mediante decapitación (al siguiente día del término del tratamiento con los extractos), después de la necropsia, se extrajo el hígado, enseguida se lavó con solución fisiológica de NaCl al 0.9% y se perfundido con PBS, posteriormente se agregaron 100 ml de medio de homogenización por cada 20 g de hígado, se maceró con ayuda de un mortero con pistilo, se filtró con un embudo y una gasa simple, se recogió el filtrado en tubos cónicos para centrifugar y se mantuvieron en un medio frio, a continuación, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, por último se colecto el sobrenadante y se mantuvo en frio hasta el momento de su análisis.

Durante este proyecto de investigación se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para el Cuidado de los Animales de Laboratorio).

6.9 Cuantificación de nitritos por el método de Griess Saltzman

La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo magenta por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como N-(1-naftil) etilendiamina. Esta reacción detecta los nitritos en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales, como el plasma, sangre, orina, etc.

Para su cuantificación se realizó una curva patrón con una solución patrón de $NaNO_2$ (J.T. Baker, grado RA) en concentraciones de 0 a 100 µM, la cual se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

Una vez obtenidas las lecturas de la curva patrón, se procedio a tratar las muestras de hígado. Para lo cual, se tomaron 50µL de muestra, adicionando de manera secuencial 1 mL de sulfanilamida 2% (p/v) en H3PO4 al 5% (v/v) incubándose durante 15 minutos en la obscuridad y a temperatura ambiente; seguido de la adición de 1 ml de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (J.T. Baker, grado RA), incubándose a temperatura ambiente en la obscuridad durante 15 minutos antes de leer la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

6.10 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

Se basa en la formación de un cromóforo violeta por la reacción del Cu^{2+} y cuatro grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. En esta reacción, la intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos presentes en la muestra.

Con base en lo anterior se preparó una curva patrón de albumina de huevo (Sigma) (10 mg/ml), realizando disoluciones de 0 a 10 mg/ml de concentración. Posteriormente, se adicionó de manera secuencial 2 mL de reactivo de Biuret, incubándose a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de leer la absorbancia a 545 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

La concentración proteica de las muestras problema se realizó tomando 50 µL de homogenado de hígado, a las cuales se agrego de manera secuencial 2 mL de reactivo de Biuret, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y posterioemente se leyó la absorbancia a 545 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

6.11 Cuantificación de la actividad de catalasa por el método de Chance y Machley

Protocolo basado con modificaciones en el método estandarizado de Chance y Machley, el cual se fundamenta en el principio de que la enzima catalasa es capaz de reducir al H_2O_2 en una molécula de agua y ½ de oxigeno molecular (Chance *et al*., 1954). Para determinar esta reacción se midio la descomposición del H_2O_2 a 240 nm en el espectrofotómetro UV (UNICO, S-2150 UV).

Se mezclarón 50 µL del homogenado de ígado de raton con 3000 µL de sustrato (H_2O_2 27 mM en solución PBS, pH 7.0) (LASA, grado RL)) en una cubeta de cuarzo. Posteriormente, se registró la absorbancia a 240 nm cada 10 s durante 5 min.

Se calculó el cambio en la absorbancia a 240 nm por minuto (ΔA_{240}) como la pendiente de la parte lineal de la gráfica de A_{240} contra el tiempo. La actividad de catalasa se calculó con la siguiente ecuación:

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

Donde ε es el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a 240 nm (37.36 µmol-1mLAbs); y FD es el factor de dilución (1500/50= 30). Esta ecuacion fue corrigida por la concentración de proteína en cada muestra (método de Biuret).

6.12 Análisis estadístico

Para comparar los valores experimentales obtenidos entre los grupos mediante las lecturas del método de Griess y Biuret, así como los de la actividad enzimática de catalasa se utilizó un análisis de varianza (ANOVA).

Para la comparación de las medias entre los grupos cuando hubo diferencias significativas entre ellos se aplicó la prueba de Bonferroni. El nivel de significación estadística fue de $p<0.05$. Todos los cálculos se efectuaron con el auxilio del programa SPSS para Windows, versión 12.0 (2003).

.

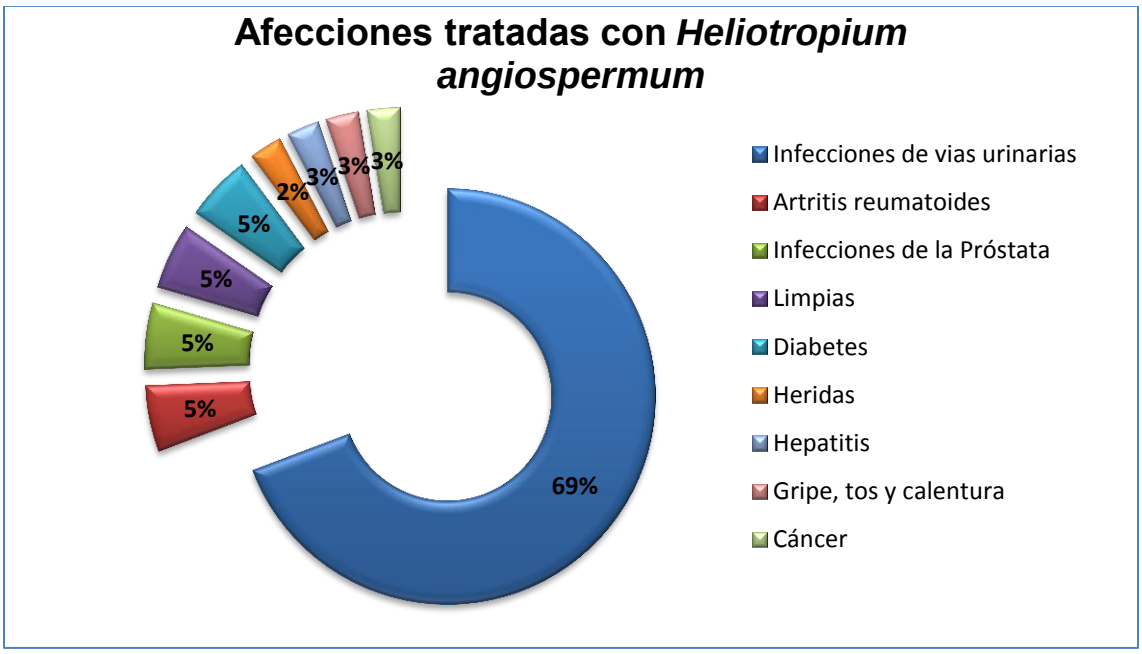
VII. Resultados

7.1 Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum.*

Es importante mencionar que este registro etnofarmacológico está fundamentado en una entrevista directa a informantes clave que hicieron uso de esta planta; los datos más representativos se muestran a continuación:

Se aplicaron un total de 38 entrevistas, lo cual representa al 2.52% de la población, de las cuales el 71% corresponden al sexo femenino y el 29% al sexo masculino, que se encuentran en un rango de edad entre los 23 y 84 años.

El 69 % de los entrevistados utilizan la planta en padecimientos de las vías urinarias, mientras que los restantes en el tratamiento de artritis reumatoide, diabetes, gripe, tos y calentura, entre otros. En la gráfica 1 se agruparon los datos tomando en cuenta las 38 entrevistas realizadas así como las afecciones tratadas con dicha especie.



Gráfica 1. Porcentaje e incidencia de uso de *Heliotropium angiospermum*.

A su vez, las entrevistas arrojaron datos como que las estructuras mas utilizadas son el tallo y la hoja, mientras que la forma de administración mas utilizada fue como agua de tiempo, tomando preparados del cocimiento e infusiones de dichas estructuras durante un periodo de tiempo de 7 días a 1 mes, siendo la administración de forma oral en dosis de 25 g de planta por litro de agua aproximadamente. En la Tabla 15 se muestran se describen los resultados de *Heliotropium angiospermum* reportados en las entrevistas y en la tabla 16 se presenta el resumen de todo el registro etnofarmacológico.

Usos medicinales	Parte utilizada	Forma de preparación	Forma de administración
Infecciones de las vías urinarias	Hoja Flor Raíz Tallo Toda la planta	Cocimiento Licuado	Agua de tiempo
Artritis reumatoide	Hoja	Cocimiento Infusión Asado	Agua de tiempo Tópico
Infección de la Próstata	Tallo	Cocimiento	Agua de tiempo
Limpias	Toda la planta	Ninguna	Barrido
Diabetes	Hoja	Cocimiento	Agua de tiempo
heridas	Hoja	Cocimiento	Cataplasma
Hepatitis	Hoja	Cocimiento	Agua de tiempo
Gripe, tos y calentura	Hoja	Cocimiento	Agua de tiempo
Cáncer	Hoja	Cocimiento	Agua de tiempo

Tabla 15. Usos medicinales de *Heliotropium angiospermum* reportados en las entrevistas.

Nombre común: Cola de alacrán	
Nombre totonaco	Tascuyu-tuuan
Rango de edad de población	23-84 años
Uso	Medicinal
Forma de reparación	Agua de tiempo, infusión y cocimiento.
Dosis	Tallo y hoja: aprox. 25g/ Litro de agua
Frecuencia de uso	7 dias a 1 mes

Tabla 16. Resumen del registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum*.

De estos datos se puede inferir que es la población femenina de el Limon Chiquito la que más emplea a *Heliotropium angiospermum* como método preventivo y curativo para dieversas enfermedades entre las que destacan la diabetes, infecciones respiratorias y cáncer. Estos resultados son parecidos a los reportados por la CONABIO y la BDMTM, aunque cabe destacar que padecimientros como infecciones de las vías urinarias y próstata, además de artritis reumatoide, son contribuciones del estudio etnofarmacológico para *Heliotropium angiospermum* en dicha comunidad.

7.2 Rendimiento de extracción de *Heliotropium angiospermum*.

Se obtuvo un extracto hidroalcohólico (70:30) de semilla y hoja con aspecto de masa granulada de color café oscuro, por el contrario el de raíz, tallo y flor fue homogéneo de consistencia blanda.

El rendimiento de extracción se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \mathrm{R} = \frac{\mathrm{EO\ (g)}}{\mathrm{TMV\ (g)}} * 100$$

En donde por cada 100 g de material vegetal en las diferentes condiciones de extracción, R es el rendimiento, EO es el extracto obtenido y TMV es el total de la muestra vegetal (Tolosa *et. al*., 2002). En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos en cada estructura vegetal de *Heliotropium angiospermum*, en esta se observa que es el extracto hidroalcohólico el que genera un mayor rendimientro de extracción, siendo la hoja y flor las estructuras vegetales más redituables en ambos extractos.

Solvente de extracción	Proceso de extracción	EXTRACTO	RENDIMIENTO				
		Estructura vegetal	R	T	H	S	F
Etanol-agua (70:30)	**Macerado 1 mes**	**Hidroalcohólico**	**2.73g**	**2.36g**	**3.01g**	**2.88g**	**3.19g**
Agua	**Cocimiento por 5 minutos posteriores a la ebullición.**	**Acuoso**	**0.29g**	**0.26g**	**1.42g**	**1.11g**	**1.02g**

R: Raíz; T: tallo; H: hoja; S: semilla; F: flor

Tabla 17. Rendimientos de los extractos en cada estructura de *Heliotropium angiospermum*.

7.3 Análisis fitoquímico preliminar de metabolitos secundarios presentes en los extractos hidrolcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* M.

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar de las cinco estructuras vegetales (raíz, tallo, hoja, semilla y flor) de *Heliotropium angiospermum*, obteniendo en total 10 extractos; 5 hidroalcohólicos y 5 acuosos, los cuales fueron analizados mediante una serie de reacciones específicas para detectar cada metabolito secundario.

En las tablas 18 y 19 se pueden observar los resultados del análisis de los extractos de *Heliotropium angiospermum*, en dichas tablas se pone de manifiesto que son los extractos hidroalcohólicos de hoja y semilla en donde fueron detectados una mayor cantidad de metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, glicósidos cardiotónicos y saponinas. En el caso del extracto acuoso, las estructuras que presentan mayor cantidad de metabolitos son: hoja, semilla y flor, en el cual se detectaron cumarinas, alcaliodes, glicósidos cardiotónicos y flavonoides.

Metabolito secundario	Ensayo	Extracto hidroalcohólico				
		R	T	H	S	F
Alcaloides	Dragendorff Mayer	+	+	+++	+++	++
Glicósidos cardiotónicos	Keller-Killiani Lieberman-Burchard Baljet	++	++	+++	++	++
Esteroides y triterpenos libres	Lieberrman-Burchard	+	-	-	+	-
Flavonoides	Shinoda	+	-	-	-	-
Taninos	Gelatina sal	-	-	-	-	-
Saponinas	Espuma	+	-	+++	+	-
Cumarinas	Baljet	-	-	-	-	-

R: Raíz; T: tallo; H: hoja; S: semilla; F: flor
+ Presencia escaza, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No identificado

Tabla 18. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de los cinco órganos de *Heliotropium angiospermum*.

Metabolito secundario	Ensayo	Extracto acuoso				
		R	T	H	S	F
Alcaloides	Dragendorff Mayer	++	++	+++	+++	+++
Glicósidos cardiotónicos	Keller-Killiani Lieberman-Burchard Baljet	-	+	+	+++	+
Esteroides y triterpenos libres	Lieberrman-Burchard	-	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+	++	++	++
Taninos	Gelatina sal	-	-	-	-	-
Saponinas	Espuma	-	-	-	-	-
Cumarinas	Baljet	+++	-	++	+++	+++

R: Raíz; T: tallo; H: hoja; S: semilla; F: flor
+ Presencia escaza, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No identificado

Tabla 19. Análisis fitoquímico preliminar del extracto acuoso de los cinco órganos de *Heliotropium angiospermum.*

7.3.1 Pruebas coloridas de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum*.

Figura 11. Pruebas coloridas del extracto hidroalcohólico de *Heliotropium angiospermum*.

Alcaloides EHH (Reactivo de Dragendorff)

Blanco 2 mg/mL 6 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Dragendorff
La formación de un cromóforo naranja-amarillento es indicativa de presencia de alcaloides.
EAF: Extracto Acuoso de Flor
EAS: Extracto Acuoso de Semilla

Alcaloides EHH (Reactivo de Wagner)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Wagner
La formación de un cromóforo color marrón es positivo para esta reacción.
EAF: Extracto Acuoso de Flor
EAS: Extracto Acuoso de Semilla

Glicósidos cardiotónicos EHH (Reactivo de Keller Killiani)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Glicósidos cardiotónicos EHT (Reactivo de Keller Killiani)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Keller- Killiani
La prueba es positiva si se forma un cromóforo azul o azul verdoso.
EHH: Extracto Hidroalcohólico de Hoja

Glicósidos cardiotónicos EHH (Reactivo de Baljet)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Glicósidos cardiotónicos EHT (Reactivo de Baljet)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Baljet
Para la lactona se puede observar desde un color rojo a naranja estable.
EHH: Extracto Hidroalcohólico de Hoja
EHT: Extracto Hidroalcohólico de Tallo

Saponinas EHH (Reactivo gelatina sal-formación de espuma)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Como se observa en la imagen, la formación de espuma indica presencia de saponinas.

Esteroides y triterpenos libres EHH (Reactivo Lieberman Burchard)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Esteroides y triterpenos libres EHR (Reactivo Lieberman Burchard)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Lieberman Burchard
La coloración azul y/o verde claro indica presencia del Núcleo esteroidal, mientras que la coloracion rojo-naranja o pardo es indicativa de núcleo triterpénico.
EHH: Extracto Hidroalcohólico de Hoja
EHR: Extracto Hidroalcohólico de Raíz

Figura 12. Pruebas coloridas del extracto acuoso de *Heliotropium angiospermum*.

Flavonoides EAF (Reacción de Shinoda)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Flavonoides EAS (Reacción de Shinoda)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Flavonoides EAH (Reacción de Shinoda)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

La **reacción de Shinoda** es positiva cuando se observa la formación de un cromóforo que puede virar del amarillo al naranja o al rojo cereza. En este caso se nota la presencia de Flavonoles al generarse un cromóforo naranga.
EAF: Extracto Acuoso de Flor
EAS: Extracto Acuoso de Semilla
EAH: Extracto Acuoso de Hoja

Glicósidos cardiotónicos EAH (Reactivo de Keller Killiani)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Glicósidos cardiotónicos EAS (Reactivo de Keller Killiani)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Keller Killiani
Cromóforo azul o azul verdoso indica presencia de azucares, específicamente de 2-desoxiazúcares.
EAS: Extracto Acuoso de Semilla
EAH: Extracto Acuoso de Hoja

Alcaloides EAF (Reactivo de Meyer)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Alcaloides EAS (Reactivo de Meyer)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Meyer
La coloración naranja-amarillenta es indicativa de presencia de alcaloides
EAF: Extracto Acuoso de Flor
EAS: Extracto Acuoso de Semilla

Alcaloides EAH (Reactivo de Draguendorff)

Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Alcaloides EAT (Reactivo de Draguendorff)

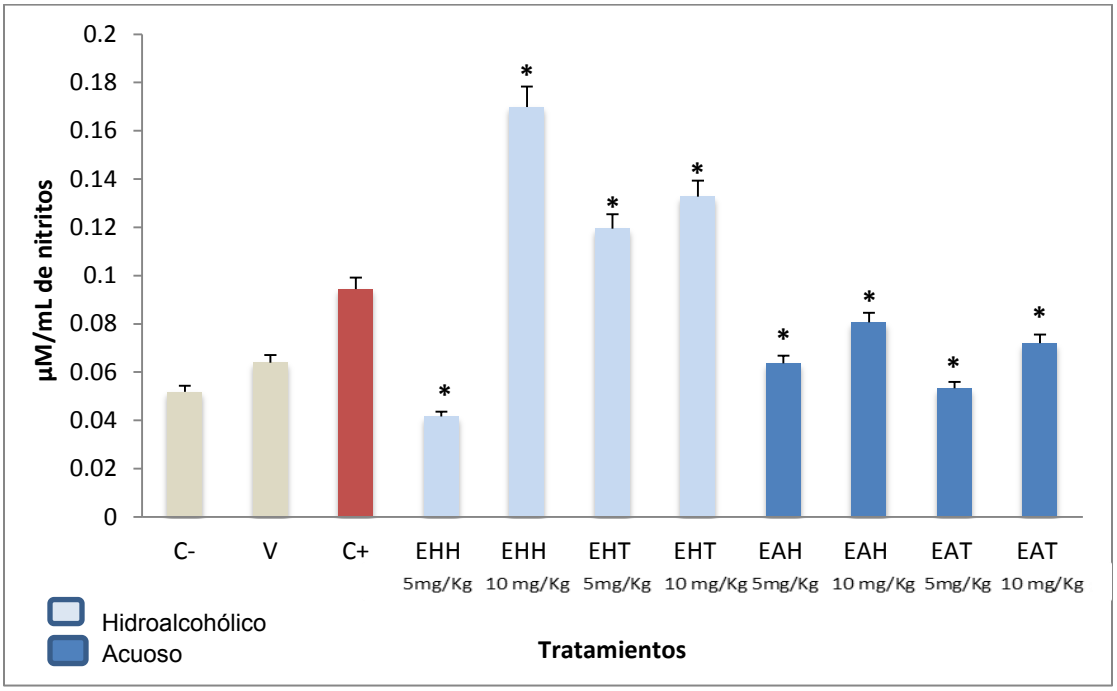
Blanco 2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

Reactivo de Draguendorff
El precipitado marron es indicativo de presencia de alcaloides
EAH: Extracto Acuoso de Hoja
EAT: Extracto Acuoso de Tallo

7.4 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Helitropium angiospermum* sobre las concentraciones de nitritos.

Los resultados indican un aumento significativo en las concentraciones de nitritos en el homogenado de hígado en el grupo inducido a cáncer con óxido de niquel con respecto al control negativo. Por el contrario, se observa que los grupos inducidos a cáncer y tratados con los extractos hidroalcohólico y acuoso de hoja de *Helitropium angiospermum* en dosis de 5 mg/Kg disminuyeron las concentraciones de este. De la misma manera, el grupo inducido a cáncer y tratado con el extracto acuoso de tallo a dosis de 5 mg/Kg muestra una disminución significativa en la concentración de nitritos con respecto al control positivo (Gráfica 2).

Cabe destacar que los extractos hidroalcohólicos generaron un aumento en las concentraciones de nitritos, lo cual, se ve reflejado principalmente en los extractos hidroalcohólicos de hoja en dosis de 10 mg/Kg y de tallo en 5 y 10 mg/Kg.



Gráfica 2. Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre la concentración de nitritos (µM/ mg de proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1. * Valores con diferencia significativa con respecto a C+ $p<0.05$

C⁻: Control negativo (sin ningún tratamiento)
V: Vehículo (aceite de oliva)
C+: Control positivo (inducción a cáncer con NiO)

Extracto hidroalcohólico + NiO

EHH: Extracto Hidroalcohólico Hoja
EHT: Extracto Hidroalcohólico Tallo

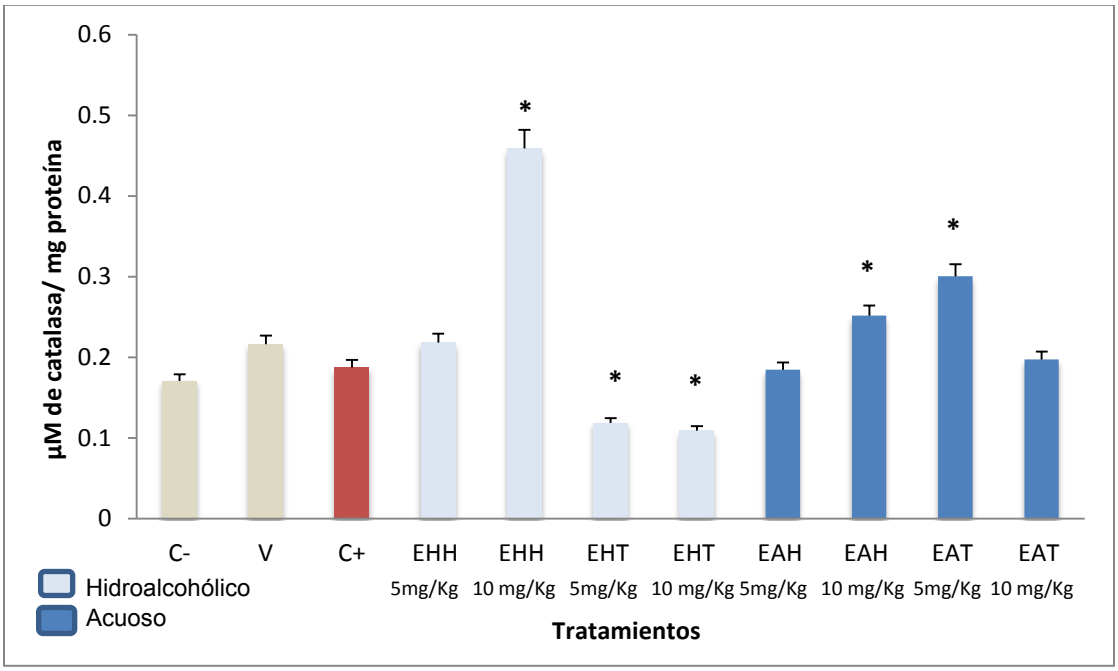
Extracto acuoso + NiO

EAH: Extracto Acuoso Hoja
EAT: Extracto Acuoso Tallo

7.5 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Helitropium angiospermum* en la actividad enzimática de catalasa.

Los resultados indican que la actividad enzimática de catalasa practicamnete no se modifica en el grupo inducido a cáncer con óxido de niquel con respecto al control negativo. Por el contrario los grupos inducidos a cáncer y tratados con los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Helitropium angiospermum* aumentaron la actividad de esta enzima antixodante. Los extractos hidroalcohólico y acuoso de hoja a dosis de 10 mg/Kg y acuoso de tallo de 5 mg/Kg presentan las actividades más significativas al aumentar la activdad enzimática, esto con referencia al control positivo (Gráfica 3).

Es importante destacar que en los grupos inducidos a cáncer y tratados con los extractos hidroalcohólicos de tallo en dosis de 5 y 10 mg/Kg generaron una disminución de la actividd enzimática.



Gráfica 3. Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre la actividad de la catalasa (µM de catalasa/ mg proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1. * Valores con diferencia significativa con respecto a C+ p <0.05.

C−: Control negativo (sin ningún tratamiento)
V: Vehículo (aceite de oliva)
C+: Control positivo (inducción a cáncer con NiO)

Extracto hidroalcohólico + NiO

Extracto acuoso + NiO

EHH: Extracto Hidroalcohólico Hoja
EHT: Extracto Hidroalcohólico Tallo
EAH: Extracto Acuoso Hoja
EAT: Extracto Acuoso Tallo

VIII. Discusión

8.1 Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum*.

Desde las épocas más remotas de la humanidad, las sociedades han recurrido al uso de las plantas como fuente de medicamentos. Según la OMS, el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades de atención primaria de salud (UICN 1993). Se ha provocado por consiguiente, un aumento en el interés científico y en la comprobación científica de las propiedades atribuidas a las plantas medicinales. Además ha surgido gran interés por conocer las plantas que con fines medicinales utilizan las distintas comunidades. Wong *et al*., (2001) definen la etnobotánica como el estudio de la interacción entre la población y su medio ambiente, incluida las plantas que utilizan.

La Etnofarmacología es un área multidisciplinaria fundamentada en la observación, descripción e investigación experimental de los recursos (vegetal, animal o mineral) usados como medicamentos por los pueblos indígenas. La visión de esta disciplina ha cambiado durante los últimos 34 años consolidándose como un medio potencial para la validación y optimización del conocimiento tradicional (Etkin *et al*., 2005; Heinrich, 2001; Jaeger, 2005; Verpoorte *et al*., 2005). Bajo este esquema el estudio fue dirigido a un registro etnofarmacologico al aportarnos datos relevantes para el posterior diseño experimental.

Existen diversos estudios etnofarmacológicos y etnobotánicos dirigidos hacia la familia Boraginaceae, particularmente para el Género *Heliotropium* con algunas especies principales: *Heliotropium curassavicum* L., *Heliotropium indicum* L., *Heliotropium arborescens* L. y *Heliotropium europaeum* L. Las cuales presentan propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, digestivas, dermatológicas, cardiotónicas, antihelmínticas, abortivas, cicatrizantes, antigotosas y antipireticas. Siendo las propiedades diuréticas y hemostáticas el distintivo en ésta familia. Sin embargo son pocos los estudios realizados a *Heliotropium angiospermum* M., la cual presenta propiedades diuréticas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, digestivas, dermatológicas y cardiotónicas (Barajas *et al.*, 2005).

El estudio etnofarmacológico de *Helitropium angiospermum* reflejó que en la Comunidad el Limón Chiquito la especie medicinal es utilizada en padecimientos de las vías urinarias, artritis reumatoide y diabetes, asi como también para la curación de heridas. De igual manera, se corrobora el uso de tallo y hojas (CONABIO, 2011) de esta planta en la comunidad, observando que la raíz no es una estructura utilizada por la población, aun cuando existen reportes de la BDMTM (2009) de que la infusión elaborada con la raíz sirve para curar el "empacho".

Cabe destacar que autores como Chataing (2004) y Barajas (2005) reportan distintas actividades biológicas para la familia Boraginace y el género *Helitropium* como antiparasitario y antinflamatorio, además, a este género se le atribuyen propiedades

antioxidantes, principalmente por la presencia de compuestos y/o metabolitos secundarios que pueden modular esta actividad en distintos procesos celulares.

8.2 Análisis fitoquímico preliminar de los metabolitos secundarios detectados en los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum*.

Estudios químicos de *Heliotropium angiospermum* han demostrado que uno de los principales metabolitos biosintetizados por esta especie, son los alcaloides derivados de la pirrolizidina. Lo que se corrobora con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que fueron los alcaloides el grupo de metabolitos secundarios detectados en todas las estructuras vegetales de los extractos hidroalcohólico y acuso.

Sin embargo, dado que la cantidad de precipitado es proporcional a la concentración de alcaloides en la muestra, puede inferirse que las hojas, semillas y flor son los órganos de la planta donde tiene lugar la mayor acumulación de estos metabolitos secundarios, aunque cabe mencionar que raíz y tallo presentan concentraciones apreciables.

Nota: en cada prueba para la detección de los metabolitos la formación del cromóforo y/o precipitado aumenta con respecto a las concentraciones experimentales (2 mg/mL 4mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL).

De la planta entera se han aislado alcaloides de pirrolizidina, lindelofidina, hidroxi-metil-l-2-epopxi-pirrolizidina, retronecina, supinidina y tachelantamidina, de la hoja la espermidina, espermina y putrecina, y de la inflorescencia sólo los dos primeros (Bireka *et al*., 1987; BDMTM, 2009; CONABIO, 2011).

A los alcaloides presentes en algunas plantas se les atribuyen actividades citotoxicas, además de ser un potente agente anticancerígeno, antineoplásico y estimulante del sistema nervioso central (Kutchan, 1995; Ghosh, 2000), razón por la cual son utilizadas en el tratamiento contra el cáncer. Este grupo de metabolito es el de mayor importancia para la industria farmacéutica debido las propiedades que presenta, entre las que destacan: antiinflamatorios, emolientes y diuréticos, propiedades anestésicas, eméticas, analgésicas, sedante, antiséptico. Otros estudios remarcan la importancia farmacognóstica de la familia Boraginaceae y de algunas de sus especies las cuales debido a la presencia de alcaloides son utilizadas en trastornos gastrointestinales y respiratorios (Barajas *et al*., 2005).

El segundo grupo que presenta mayor abundancia en los cinco órganos analizados son los glicósidos cardiotónicos. El blumenol A y B son glicósidos aislados de esta planta, principalmente en tallos y hojas (Erosa *et al.,* 2009). Después de aplicar las pruebas de coloración se determinó la presencia de glicósidos principalmente en semilla, tallo, hoja y flor de ambos extractos.

Los glicósidos han sido considerados de interés por su potencial uso farmacológico, poseen acción tónica y fortalecedora del corazón, actuando directamente sobre la contractilidad del musculo cardiaco (miocardio) y sobre la circulación auricula-ventriculo,

mientras que algunas tienen propiedades diuréticas, especies del género Bufus han tomado mayor relevancia por su potencial anticancerígeno.

Recientemente se demostró la capacidad de los glicósidos para inhibir tumores en etapa de carcinogénesis, esto utilizando concentraciones bajas de los mismos y asi ejercer un efecto citoprotector, el cual puede ser empleado en futuras terapias tanto para enfermedades neurodegenerativas como el el tratamiento del cáncer (Ahmed *et al.,* 2008 y Langenhan *et al.,* 2005).

Otro de los metabolitos detectados principalmente en el extracto ocuoso fueron los flavonoides, específicamente de flavonoles al dar positivo para la reacción de Shinoda al formarse un cromóforo naranja. Las hojas, semillas y flores presentaron una mayor abundancia para el extracto acuoso, a diferencia del alcohólico que solo se identificó en la raíz..

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que le confiere la capacidad de secuestrar hierro y otros metales de transición (Escamilla *et al.,* 2009), generando acción antioxidante y destructor de radicales libres. Entre los mecanismos moleculares postulados para explicar esta propiedad se encuentra la capacidad como atrapadores de radicales libres, como donadores de hidrógeno, su potencial como agentes reductores y agentes quelantes. Por ello desempeñan un papel fundamental en la protección frente daños a nivel oxidativo, es así como son reconocidas sus actividades antialérgicas, antiinflamatorias, antivíricas, anticancerosas y antioxidantes y protectoras del hígado.

Asi mismo, los flavonoides afectan una gran cantidad de enzimas y proteínas asociadas a la fotofosforilación. Por ello tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la diabetes mellitus, cardiopatías, la aterosclerosis y el cáncer (Castro *et al*., 2013).

La presencia de este tipo de metabolito en *Heliotropium angiospermum* hace posible que se valide el uso terapéutico de esta planta, asi como su función antioxidante y citoprotectora, ya que este compuesto esta implicado con los componentes polifenólicos que presentan un mecanismo de acción reductora en la interaccion con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, retirando el oxígeno reactivo de radicales hidroxilo e hidroperóxidos, bloqueando de esta manera la acción deletérea de dichas sustancias (Zulueta, 2009).

Por otra parte, existe un considerable interés en el uso de los isoflavonoides en la prevención del cáncer, ya que el consumo con la dieta de los isoflavonoides daidzeina y genisteina, los cuales están presentes en la soja, reducen sustancialmente la probabilidad de padecer cánceres de mama o próstata en humanos.

La presencia de flavonoles en el extracto acuoso de *Heliotropium angiospermum* dentro de los que se manifiesta con mayor importancia la quercetina, compuesto que no ha sido reportado para esta especie, pero que influye dentro de las propiedades reportadas para

la familia Borginaceae, teniendo como principal propiedad la protección intestinal, propiedad que sin saberlo ha sido retomada por los pobladores de la comunidad el Limón Chiquito, Cazones de Herrera, Veracrúz.

La quercetina es uno de los flavonoides más abundantes en los alimentos, siendo reconocida por sus propiedades antialérgicas, aniticancerígenas, antioxidantes, además de evitar la permeabilidad intestinal. Este compuesto ha demostrado mejorar la función de la barrera del intestino, al ejercer un efecto de "sellado" debido a su papel en el ensamblaje y expresión de proteínas de unión que son indispensables para que solo los nutrientes y el agua que necesitamos traspasen la barrera intestinal (Santos *et al.,* 2000).

En el hígado se ha descrito que la quercetina es capaz de inhibir la activación de células estrelladas, asi como la producción de óxido nítrico, modificando las vías de expresión de proteínas celulares (Kawada *et al.,* 1998). En estudios *in vitro* se ha comprobado que flavonoides como el kaempferol y la qeurcetina, inhiben la expresión de óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por LPS (Autore *et al.,* 2001). Asi mismo, han mostrado eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica de fosfolípidos de membrana y la peroxidación de glóbulos rojos (Ursini *et al.,* 1994).

Otros flavonoles detectados en el extracto acuoso de *Helitropium a*ngiospermum y que no han sido reportados en esta especie, son el kaempferol y la miricetina, los cuales junto con la quercetina modulan las concentraciones intracelulares de glutatión aumentando su nivel en un 50% induciendo así, el sistema antioxidante y contribuyendo a la prevención de enfermedades (Myhrstad *et al.,* 2002).

Los resultados también indican la presencia de saponinas, cuamrinas y esteroides y triterpenos libres pero distribuidos de manera indistinta en los extractos, asi como también en los órganos de la planta.

Las saponinas fueron detectadas únicamente en el extracto hidroalcohólico en tres de las cinco estructuras, con mayor concentración en hoja, raíz y semilla, mientras que los esteroides y triterpenos libres se identificaron en raíz y semilla también del extracto hidroalcohólico. Las cumarinas fueron detectadas solamente en el extracto acuoso de la raíz, hoja, semilla y flor de dicha especie. Es importante destacar que este es el primer estudio en los que se reportan la presencia de flavonoides, cumarinas, saponinas y esteriodes y triterpenos libres en *Heliotopium angiospermum.*

Los esteroides y triterpenos libres fueron detectados en el extracto hidroalcohólico, estos compuestos son importantes para la industria farmacéutica ya que presentan propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas, antioxidantes, anticancerígenas, citotóxicas y antimicrobianas (Tholl *et al*., 2006). Estudios demuestran que este tipo de metabolito puede inhibir la señalización del factor NF-κB el cual es el principal regulador de los procesos inflamatorios y de cáncer, demostrando que la presencia de este metabolito en la planta puede ejercer un potencial anticancerígeno (Salminen *et al.,* 2008).

Otro metabolito detectado en el extracto hidroalcohólico son las saponinas, estas son consideradas como precursores únicos de medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos. Además algunas saponinas se han relacionado con diversas actividades biológicas como: antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, antifertilidad, antihepatotóxica, hemolítica, antimicótica, etc. Además de ser utilizadas como coadyuvantes de la acción de otras plantas, ya que facilitan la absorción de los principios activos incrementando su eficacia (Ávalos *et al.,* 2009).

Estudios indican que los efectos de las saponinas están relacionados con sus propiedades de disrupción de membranas celulares y de formación de micelas con ácidos biliares, además de generar efectos citotóxicos sobre células tumorales 549, HeLa, HL-60, KB (Sparg *et al.,* 2004 y Puangpraphant *et al.,* 2011).

Por último, se detectó la presencia de cumarinas, metabolito reconocido por pertenecer a la gran familia de los compuestos fenólicos que demuestran diversas actividades biológicas como lo son: antitumoral, antiinflamatorios, antisépticos, analgésicos; algunas se conocen como inhibidores de la inducción de tumores por carcinogénesis química; esto debido a la habilidad para inhibir el desarrollo de ciertas enzimas como transcriptasa (Domínguez, 2002).

Las cumarinas se caracterizan por poseer una variedad de patrones de oxigenación sobre el núcleo de la benzopirona, siendo la oxigenación en C-7 la más común entre las cumarinas naturales (Arango, 2010). Algunos de estos compuestos presentan un amplio rango de actividad biológica, por ejemplo el dicumarol ejerce una acción anticoagulante y antibacterial, la novobiocina presenta acción antibiótica, hepatoxicidad aguda y carninogenicidad de ciertas aflatoxinas, mientras que el cumestrol presenta actividad astrogenica, acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantotoxina, acción insecticida de los surangin A y B (Lacy *et al.,* 2004).

Los estudios fitoquímicos realizados en plantas medicinales, preferentemente en aquellos que son utilizadas como antinflamatorios y anticancerígeno nos lleva a comprobar que estas especies contienes compuestos flavónicos y/o cumarínicos (Hirano *et al.,* 1994). Aunque el mecanismo de acción de estos compuestos anticancerígenos no se conoce con exactitud, se ha descubierto que es debido a diferentes procesos como alteraciones enzimáticas.

La actividad biológica de las cumarinas como anticarcinogénica se debe a la posición del grupo carbonilo y conjugación con el doble enlace en el anillo lactónico, desarrollando así, un dipolo que ayuda a la orientación y acoplamiento de la molécula en un ambiente biológico apropiado (Domínguez, 2002).

Investigadores como Chang y Geahien (1992) mostraron que el mecanismo de acción anticancerígeno de las cumarinas es debido a la inhibición de la proteína-tirosinaquinasa

ocasionado por aquellos compuestos o metabolitos que presentan funciones lactónicas o carbonílicas como es el caso de flavonoides, cumarinas y quinonas.

Al realizar estudios *in vitro* con flavonoides y cumarinas para comprobar la citotoxicidad y sus propiedades anticancerígenas, se concluyó que los mecanismos anticancerígenos se deben a la incorporación de timidina y que este puede suprimir la síntesis de ADN (Sánchez *et al.,* 2001), ya que las cumarinas y los flavonoides inhiben las células tumorales por un mecanismo glicósido aeróbico bloquendo la ATP-asa de Na^+ y K^+.

El hecho de que se observe en el extracto hidroalcohólico una mayor presencia de metabolitos secundarios con respecto al extracto acuoso es explicado por la solubilidad de los metabolitos, la cual es mayor en un extracto hidroalcohólico. Lo que se corrobora en diversos estudios que indican la eficacia de extractos hidroalcohólicos, puesto que estas disoluciones son más eficientes que el agua en la extracción de compuestos fenólicos (Yilmaz *et al.,* 2006).

Además existen parámetros como el tiempo y la tempreatura que influyen en la optimización del proceso de extracción, ya que algunos compuestos pueden degradarse o transformarse en otras moléculas, de tal manera que se modifica la actividad biológica de los compuestos de interés (Maier *et al*., 2008). Es por ello que la extracción hidroalchohólica se realizó durante un tiempo equivalente a un mes a temperatura ambiente. Mientras que la extracción acuosa se realizó a 5 min a punto de ebullición, lo cual según lo reportado puede comenzar la degradación y/o transformación de las moléculas de interés.

En contraste y a pesar de lo reportado bibliográficamente, pudiéndose transformar o no el compuesto de interés, es el cocimiento de la especie vegetal y por ende la realización de un extracto acuoso, la forma de extracción más utilizada en la comunidad de estudio.

8.3 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre las concentraciones de nitritos.

El cáncer se ha relacionado con un estrés oxidativo persistente, entendido como una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres, principalmente las especies reactivas de oxigeno (ERO) y del nitrógeno (ERN), y los mecanismos de defensa antioxidantes. Aunque la administración de agentes que disminuyan la inflamación pueden ser un recurso para evitar estas condiciones, en los casos de tratamientos contra el cáncer, se emplean agentes citotóxicos, los cuales no son selectivos y afectan tanto a las células cancerígenas como a las normales ocasionando efectos adversos. Ante este panorama, se han realizado grandes esfuerzos a nivel mundial para encontrar fármacos novedosos contra esta patología, los cuales han dado lugar al aislamiento e identificación de productos naturales con actividad anticancerígena los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina, así como el taxol y la camptotecina son ejemplos de este tipo de compuestos (Hileman *et al*., 2004).

Algunos estudios han observado que pacientes con cáncer avanzado presentan concentraciones plasmáticas de ERO más elevadas que los individuos sanos, mientras que los niveles de actividad enzimática de los sistemas antioxidantes como CAT, GPx y SOD se hallan disminuidos (Sharma *et al*., 2009).

Ante esta premisa, la presente investigación se enfocó en evaluar el posible efecto antioxidante de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre las concentraciones de nitritos, moléculas reconocidas por estar implicadas en el proceso carcinogénico al generar mutaciones en p53 (Díaz, 2004).

Existen evidencia de que el óxido de níquel induce procesos carcinogénicos en los humanos, generando la exposición prolongada del mismo cáncer de pulmón y nasal, debido a la alta actividad genotóxica y mutagénica que dicho compueto presenta (Hong *et al*., 2013). Siendo capaz el ion níquel de inducir heterocromatinización mediante la unión a los complejos de ADN-histonas y el inicio de la condensación de cromatina, lo que lleva a la desregulación de la señalización celular, alteraciones epigenéticas e incluso a la inducción de alteraciones en la estructura de la cromatina, la metilación del ADN y modificaciones de las histonas que en conjunto contribuyen al proceso de iniciación y progresión tumoral (Costa *et al*., 2005 y Ariata *et al*., 2009). Partiendo de lo anterior, se reconoce que la actividad de los nitritos se ve afectada con la exposición de compuestos que alteran la producción de dicha molécula.

Los resultados obtenidos en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1 indican una disminución de las concentraciones de nitritos con la aplicación de extractos en dosis de 5 mg/Kg del extracto hidroalcohólico de hoja, asi como de las dosis de 5 mg/Kg de los extractos acuosos de hoja y tallo de *Helitropium* angiospermum, aun cuando la concentración de radicales libres es elevada en estos organismos.

Posiblemente esta actividad antioxidante es mediada por los glicósidos cardiotónicos que presentan un alto potencial quimiopreventivo contra las especies reactivas de oxígeno (Albert, 2010), y compuestos fenólicos como flavonoides y cumarinas. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición (Haysteen, 1983). Mientras que la actividad biológica de las cumarinas como anticancerígena se debe a la posición del grupo carbonilo y conjugación del doble enlace en el anillo lactónico, desarrollándose asi un dipolo que ayuda a la orientación y acoplamiento de la molécula en un ambiente biológico apropiado (Domínguez 2002). Es por ello que la presencia de este tipo de metabolitos desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica.

Asi mismo es importante mencionar que los extractos hidroalcohólico y acuoso a dosis altas incrementaron la concentración de nitritos en el homogenado, lo cual podría estar

ocasionado por la presencia de compuestos como alcaloides pirrolizidínicos o mezclas de estos, los cuales son reconocidos por generar cirrosis hepática e inclusive de ocasionar dañor al ADN. Por estos motivos, el uso de *Heliotropium angiospermum* se reconoce como riesgoso, ya que puede ser tóxica y causar envenenamientos de personas, sobre todo niños (Duno *et al*., 2010).

Los reportes sobre la actividad biológica de extractos de *Heliotropium angiospermum* destacan la actividad de los metabolitos presentes en dichos extractos en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales; debido a la presencia de varios alcaloides. Por otro lado, se menciona que el uso de las hojas de *Heliotropium angiospermum* administradas como infusión o cataplasma es de alta utilidad, asi como agente antiinflamatorio (Erosa *et al*., 2009).

Estudios señalan la activdad del NO como medidor fisiológico, ya que en bajas concentraciones esta molécula es necesaria para generar los efectos antiinflamatorios y antitrombóticos. En cambio cuando estas concentraciones son altas el NO conduce a daño mitocondrial y a modificaciones en el ADN, e incluso a la producción de mas radicales libres como peroxinitritos (Tuncyurek *et al*., 2006).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio sobre las concentraciones de nitritos en el homogenado de hígado infieren que *Heliotropium angiospermum* presenta un efecto significativo sobre la regulación de dicho compuesto, lo que confirma el uso referido del tallo y hojas para el tratamiento y prevención de diversas patologías que conlleven procesos inflamatorios, entre las que destaca en cáncer.

8.4 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* en la actividad enzimática de catalasa

Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos celulares, en condiciones normales tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo, constituyendo uno de los primeros mecanismos de defensa contra la oxidación inducida por RL (Peraza, 2008).

La actividad enzimática de catalasa fue evaluada en el homogenado de hígado de raton, obteniendo como resultado un incremento de la actividad antioxidante en el grupo tratado con los extractos hidroalcohólico de hoja a dosis de 10 mg/ Kg y acuoso de hoja y tallo a dosis de 10 y 5 mg/Kg respectivamente mostrando las actividades más significativas, esto con respecto al control positivo inducido con NiO. Lo que nos indica una disminución de radicales libres y estimulación del sistema antioxidante de catalasa. Por el contrario, los extractos hidroalcohólicos de tallo en dosis de 5 y 10 mg/Kg son los únicos que muestran una disminución significativa de la actividad enzimática.

Abdulghader et al., (2008) determinaron que en *Heliotropium europaeum* la actividad de la enzima catalasa se incrementa de manera proporcional incrementando las dosis de extractos acuosos de hoja (0 a 2.5 g/ml de agua). Por lo obtenido en los resultados de la presente investigación se puede inferir que *Helitropium angiospermum* al pertenecer a la misma familia que *Heliotropium europaeum* comparten aleloquímicos que están generando un aumento de la actividad de esta enzima en los extractos acuosos.

El hecho de que la actividad de catalasa se vea afectada de manera sustancial en el hígado, se debe a que este órgano es blanco en los procesos de tumoración (Lutoslawska *et al*., 2003). Motivo por el cual, se puede inferir que la elevación de la actividad de esta enzima se debio a que en los organismos evaluados ya se había instalado el proceso carcínogénico, razón por la cual se dio un aumento en la producción de radicales libres y por ende la activación de los mecanismos antioxidantes. Siendo como se mencionába anteriormente la elevacion de la actividad enzimática de catalasa uno de los primeros mecanismos en contrarrestar este daño oxidativo.

8.5 Consideraciones finales

Aunque la administración de agentes que disminuyen la inflamación pueden ser un recurso para evitar condiciones de estrés oxidativo, en los casos de tratamientos contra el cáncer aún no existen agentes que sean selectivos, por tal motivo una de las alternativas es la terapia antioxidante, siendo los de origen natural los de mayor interés.

Asi mismo, investigaciones recientes han demostrado que los extractos de plantas, principalmente aquellos que presentan metabolitos secundarios poseen inhibidores eficaces de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Motivo por el cual, tienen gran importancia como agentes terapéuticos en varias enfermedades causadas por dicha condición (Sen *et al.,* 2010 y Benzie, 2003), una de las más importantes es el cáncer, donde la participación de las ERO juegan un papel prepoderante (López et al., 2012).

La presencia en los extractos de compuestos fenólicos como flavoniodes y cumarinas, asi como de glicósidos cardiotónicos que presentan un alto potencial quimiopreventivo contra las especies reactivas de oxígeno hace posible la actividad biológica que demostraron los extractos en los modelos de estudio.

Sin embargo se infiere que la actividad biológica expuesta en la presente investigación se debe al conjunto de metabolitos presentes en los extractos y no a la actividad biológica que presentan por separado, demostrándose así la eficacia de *Heliotropium angiospermum* ante los fenómenos de daño oxidativo como probable regulador del estrés oxidativo generado durante un proceso carcinogénico, confirmando que la utilización de *Helitropium angiospermum* es efectivo para el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios.

9. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

- Las estructuras más utilizadas en la comunidad el Limón Chiquito son: el tallo, la hoja y la planta completa.

- Se identificó la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos, saponinas, esteroides y triterpenos libres en el extracto alcohólico, mientras que en el acuoso, cumarinas, flavonoides, alcaloides y glicósidos cardiotónicos.

- Los extractos hidroalcohólicos de hoja y acuoso de hoja y tallo a dosis de 5 mg/Kg disminuyen las concentraciones de nitritos en el homogenado de hígado.

- Al aplicar los extractos hidroalcohólico y acuoso de hoja a dosis de 10 mg/Kg se generó un aumento de la actividad enzimática de catalasa.

X. Referencias Bibliográficas

- Abdulghader K., Nojavan M., Naghshbandi N. Chemical stress induced by heliotrope (Heliotropium europaeum L.) allelochemicals and increased activity of antioxidant enzymes. Pak J Biol Sci. 2008; 11(6):915-9.

- Adachi M., Zhang Y., Zhao X., Minami T., Kawamura R., Hinoda Y. Clin Cancer. 2004. (10); 3853-62.

- Ahmed M., Fayed S., Hossein H., Tash F. Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma. Dis Markers. 2008;(15): 283-91.

- Albert A., Savarimuthu I., Gabriel M., Khalid S. Chemopreventive potential of β-Sitosterol in experimental colon cancer model - an In vitro and In vivo study. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2010;10:24.

- Allen R., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med. 2000. 28(3): 463-499.

- Andreescu, S. In Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011. Downloaded by UNAM on February 26, 2015 | http://pubs.acs.org. Publication Date (Web): November 17, 2011

- Arango G. Alcaloides y compuestos nitrogenados (Manual). Medellín. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica; 2008: 5-16.

- Arango G. Compuestos derivados del ácido shimico (Manual). Medellín. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica; 2010: 8-3.

- Arita A., Costa M. Epigenetics in metal carcinogenesis: Nickel, arsenic, chromium and cadmium.Metallomics. 2009; 1:222–228.

- Autore G., Rastrelli L., Lauro M. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extrac of Crescentia alata its derived flaconols. Life Sci. 2001; 70:523-534.

- Ávalos A., Pérez E. Metabolismo secundario de plantas, Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2009; 2 (3): 119-145.

- Barajas M., Fernández A., Galindo A. Diversidad y composición de la familia Boraginaceae en el departamento de Santander (Colombia). Caldasia. 2005; 27(2):151-172 http://www.unal.edu.co/icn/publicaciones/caldasia.htm

- Bennett B., Prance G. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of northern South America. Econ. Bot. 2000; 54: 90-102

- Benzie I. Evolution of dietary antioxidants. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2003; 136:113–126.

- Bermúdez A., Oliveira M., Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia. 2005; 30 (8):453-459.

- Birecka H., Birecki M., FrohlichSource M. Evidence for Arginine as the Endogenous Precursor of Necines in Heliotropium, Plant Physiology, 1987; 84: (1) 42-46.

- Botanical online. 2015. Consulta electrónica: http://www.botanical-online.com/medicinalestaninos.htm

- Bruneton J. Farmacognosia; Fitoquímica, plantas medicinales. 2ª ed. España. Editorial Acribia. 2001; 1099 p.

- Buga G., Ignarro L. Nitric oxide: biology and oathology. EUA: Academic Press. 2000.

- Cantú G., Palomo L., Nery F., López L., Barajas B. Naftoquinonas: de simples pigmentos amoléculas terapéuticas. Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Biológicas. 2012; 14 (2): 48-56.

- Castañeda C., Ramos E., Ibáñez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas Revista Horizonte Médico. 2008; 8 (1).

- Castillo R., Huerta P., Carrasco R., Rodrigo R. Estrés oxidativo y daño renal. CIMEL. 2003; 8 (1), 43-52.

- Castro V., Rüngeler P., Murillo R., Hernandez G., Mora H., Pahl I. Study of sesquiterpene lactones from Milleria quinqueflora on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B as molecular target. Phytochemistry. 2013; 53: 257-263.

- Chance B, Machley AL. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology; 1954; 2:764–75.

- Chang C., Geahien R. Protein-tyrosine kinase inhibition: mecanis-based discobery of anitutmor agents . Journal of Natural Products. 1992: 55:1529-1550.

- Chataing B. Las actividades biológicas de compuestos naturales purificados de plantas venezolanas (tesis de posgrado). Universidad de los Andes. Venezuela. 2004

- Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules. JMB. 2008; 27: 1-16.

- Coll A., Mercado M., Grau A. Catalán C. Lactonas Sesquiterpénicas de *Smallanthus siegesbeckius* (Heliantheae, Asteraceae) Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2007; 6 (5): 187-188.

- CONABIO. 2015. Ficha informativa. *Heliotropium angiospermum* M. Consulta electrónoca: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm#1.Nombres

- CONABIO. 2015. Ficha informativa. *Heliotropium angiospermum* M. Consulta electrónoca: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm#5. Biología y ecología

- CONABIO. 2015. Ficha informativa. *Heliotropium angiospermum* M. Consulta electrónoca: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm#2.Origen y distribución geográfica

- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. en Capital Nat. México.

- Costa M., Davidson T., Chen H., Ke Q., Zhang P., Yan Y., Huang C., Kluz T. Nickel carcinogenesis: Epigenetics and hypoxia signaling. Mutat. Res. 2005; 592:79–88.

- Coulter I., Hardy M., Morton S., Hilton L., Tu W., Valentine D. Antioxidants vitamin C and vitamin E for the prevention and treatment of cancer. J Gen Intern Med. 2007; 21: 735-44.

- Cunningham A. Etnobotánica aplicada. Pueblos, uso de plantas silvestres y conservación. Ed. Nordan. WWF-UK. UNESCO. Kew Graden, Uruguay. 2001; 310 p.

- Díaz A. La estructura de las catalasas REB 2003; 22 (2): 76-84.

- Díaz A. Óxido nítrico, mutagénesis y cáncer. Rev. Cubana Invest Biomed. 2004; 23(3):184-189.

- Domínguez O. Elucidacion estructural y actividad antimicrobiana de los metabolitos presentes en Rhoeo discolor L. Hér Hance. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biolóicas y Agropecuarias. 2002. Pp. 21-25.

- Dreher D., Junod A. Role of oxygen free radicals in cancer development. Europ J Canc. 1996; 324:30-8.

- Dunchen R. Section III: Mitochondria, β-cell function, and type 2 diabetes. Roles of mitochondri in the health and disease. Diabetes. 2004; 53 (1): 96-102.

- Duno de Stefano R. *Heliotropium angiospermum*. Flora de la Península de Yucatán, en línea (consultado 10/03/2015).

- Dupuy L., Murillo R., Bonilla V. Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) 2008; 56 (3): 1063-1073.

- Elías, S., Contreras, A. Llanque, C. Cáncer o carcinoma de mama. Revista Paceña Med Fam. 2008; 5 (7): 14-23.

- Erosa G., Peña L., Sterner O. Secondary Metabolites from Heliotropium angiospermum, J. Mex. Chem. Soc. 2009; 53 (2): 44-47.

- Escamilla C., Cuevas E., Guevara F. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev. Fac. Med. UNAM. 2009; 52(2):73-75.

- Etkin, N.L. and E. Elisabetski. 2005. Seeking a transdisciplinary and culturally germance science: The future of Ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology 100: 23-26.

- Feig D., Reid T., Loeb L. Reactive oxugen species in tumorigenesis. Cáncer Res. 2004; 54 (1): 890-894.

- Feng P., Haynes J., Magnus E., Plimmer J. Further pharmacological screening of some west Indian medicinal plants. J. Pharm. Pharmacol. 1964; 16: 115-117.

- Ferrer V., Fonseca C., García E., Martínez F. Óxido nítrico, importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. Medissan. 1998; 2 (3): 45-53.

- Ford, R. Introduction. En Ford R (Ed.) The nature and the status of ethnobotany. Anthropological Papers Nº 67. Universtity of Michigan. Ann Arbor, MI, EEUU. 1978. 29-32 pp.

- Galati G., O´Brien P. Potencial toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free Radic Biol Med. 2004; 37: 287- 303.

- García B. Flora medicinal de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional. Vol. 2. Bogotá. 1975.

- García T., Pérez T. Especies reactivas del oxígeno y cáncer: mecanismos de acción. Ed. Biomedic- CECAM. 2001.

- García T., Saldaña B., Saldaña G. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2012; 12(2): 187-196.

- Ghosh B. Polyamines and Plant Alkaloids. Indian Journal Exp. Biol. 2000; 38 (11): 1086-91.

- Gibson D. Boraginaceae. En: Flora of Guatemala. Fieldiana Bot. 1970; 24 part 9(1-2): 111-167.

- Gómez V. Plant use knowledge of the Winikina Warao: The case for questionnaires in ethnobotany. Econ. Bot. 2002; 56: 231-242.

- Goncharova E., Nadas A., Rossman T. Serum deprivation but not inhibition of growth per se, induces a hypermutable state in Chinesse hamster G12 cells. Cancer Res. 1996; 56:752-6.

- Grenfell A., Velazquez A., Sierra M. Óxido nitrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. Revista de Endocrinología y Nutrición. 2006; 14: 118-124.

- Gutiérrez G. Eficacia de la suplementación con L-Arginina (vs Placebo) sobre Respuesta al Tratamiento Quimioterapéutico Neoadyuvante en Pcientes con Cáncer de mama (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacionl. Escuela Superior de Medicina. 2010.

- Guyton K., Kensler T. Oxidative mechanism in carcinogenesis. Brit Med Bull. 1993; 49:523-44.

- Haliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology 2006; 141:312–22.

- Halliwell B. Antioxidants and human disease: A general introduction. Nutr Rev. 1997; 55 (Suppl. 1): 44-52.

- Hansberg T. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico.2002; 26: 19-54.

- Hart C., Cohen R., Norwood M., Stebbing J. The emerging harm of antioxidants in carcinogenesis. Future Oncol. 2010; 8 (5): 535-548.

- Haysteen B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. Biochem Pharmacol. 1983; 32:1141-8.

- Heinrich, M. Editorial: Journal of Ethnopharmacology: an interdisciplinary journal devoted to indigenous drugs. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 76 (2), 137_138.

- Hernández, R. Actividad antioxidante de *Asclepias curassavica* L., en modelo de cáncer. Tesis de Licenciatura. UNAM, México. 2013; 1-14, 27, 32.

- Hernández R., Gutiérrez S., García O., Mondragón T., Ramírez G., Núñez R. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. Artículo de revisión Med Int Méx. 2014; 30:295-308.

- Hileman E., Liu J., Albitar M., Keating M., Huang P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. Cancer Chemother Pharmacol. 2004;53:209–19.

- Hirano T., Gotoh M., Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cell Life. 1994; 55, 1061-1069.

- Hirota K., Murata M., Sachi Y., Nakamura H., Takeuchi J. and Mori K. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-κB. J Biol Chem. 1999; (274); 27891-7.

- Hong S., Magdy S., Costa M. Nickel and Epigenetic Gene Silencing. Genes Open acces. 2013; 1:1-5.

- Hostettman K., Marston A. Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Saponins. 1995.

- Humar M., García P., Castro V., Merfort I. Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T-lymphocytes in whole blood. Biochem. Pharmacol. 2003; 65: 1551-1563.

- INEGI (2013). Estadísticas a propósito del Día mundial contra el cáncer 2013. Consulta electrónica: http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/mama0.pdf

- Jaeger, A. 2005. Is traditional medicine better off 25 years later?. Journal of Ethnopharmacology 100: 3-4.

- Judd W., Campbell C., Kellogg E., Stevens P., Donoghue M. Plants Systematics: A Phylogenetic Approach. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 2003.

- Kawada N., Seki S., Inoue M., Kurobi T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the function of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. Hepatology. 1998; 27: 1265-1274.

- Kim H. y cols. Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. Mech Aging and Develp. 2002; 123: 1589-1595.

- Kim M., Cho H., Jung M., Hong M., Lee S., Shin B., Ahn B.,Jung Y. Extracellular signal regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells. Int J Oncol. 2005; 26(6): 1669-1674.

- Krinsky N. 1992. Mechanisms of action of biological antioxidants. Proc Soc Exp Biol Med. 2000; 248-54.

- Kuchino Y., Mori F., Kasai H., Inoue H., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E., Nishimura S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. Nature. 1987; 327:77–79.

- Kutchan T. Alkaloid biosynthesis: The basis for metabolic engineering of medicinal plants. Plant Cell. 1995; 7: 1059-1070.

- Lacy A., O´Kennedy R. Studies on coumarins –related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. Curr Pharm Des. 2004; 10(30): 3797-3811.

- Ladio A. Los desafíos actuales de la etnobotánica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2006; 5(2):27-3.

- Lafrenie R., Shaughnessy S., Orr F. Cancer cell interactions with injured oactivated endothelium. Cancer Metastasis Res. 1992; 11:37-88.

- Langenhan J., Peterrs N., Guzei I., Hoffman F., Thorson J. Enhancing the anticancer properties of cardiac glycosides by neoglycorandomization. Proc. Natl Acad. Sci. 2005; 102:12305-12310.

- Lin J., Wang J., Jiann B., Yu C., Tsai J., Huang J., Wu T. Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression whit histopathological features in prostatic cáncer. J. Formos Med Assoc. 2005; 104 (11): 864-867.

- Llacuna L., Mach N. Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. Rev Esp Nutr Hum Diet. 2012; 16(1):16-24.

- Lo Y., Wong J., Cruz T. Reactive oxygen species mediated cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. J Biol Chem. 1996; 271:15703-7.

- López A., Lazarova Z., Bañuelos V., Sánchez R. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades Rev. ANACEM 2012; 6 (1): 48-53.

- Lozada M., García L. Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2009; (17): 172-9.

- Lutoslawska G., Tkaczk J., Panczenco B., Hubner W., Skierska E. Plasma TBARS, blood GSH concentrations, and erythrocyte antioxidants enzyme activities in regulatory and anovulatory menstrual cycles. Clin. Chim Acta. 2013; 331: 159.163.

- Mabberley D. The plant book. Second. ed. Cambridge Univ. Press. 1997.

- Maier T., Goppert A., Kammerer D., Schieber A., Carle R. Optimization of a process for enzyme.assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace.Eur. food Res. Technol. 2008; 227: 267-275.

- Maldonado O., Nahúm E., Bernabé M., Ceballos G., Méndez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev. Med. UV. 2010.

- Maldoni B. Alkaloids: Insolation and purification. Journal on Chemical Education. 1991; 68:700-703.

- Mann G., Thorne H., Balleine R., Butow P., Clarke C., Edikins E., Evans G., Fereday S., Hann E., Gattas M., Giles G., Goldblatt J., Hopper J., Kathleen C. Consortium for

Research in Familial Breast Cáncer. Analysis of cáncer risk and BRCA2 mutation prevalence in the kConFab familial breast cance resource. Breast Cancer Res. 2006; 8 (1): 1-12.

- Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 1979.

- Martínez M. Saponinas Esteroides. Manual. Medellin. Universidad de Antioquia. Facultad de Químca Farmacéutica. 2001.

- Martínez A. Esteroides cardiotónicos (Manual) Universidad de Antioquia. Faculatad de Químca Farmacéutica. Medellín. 2002.

- Martinez C., Vargas C., Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev. Fac. Med. UNAM. 2003; 46:229-235.

- Martínez J., González A., Martínez J., Rivera L. Cáncer de mama en: Boletín de práctica médica efectiva. Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaria de Salud. 2007; 1-6 pp.

- Martin G. Etnobotánica: Manual de métodos. Nordan-Comunidad. Montevideo, Uruguay. 2001; 240 pp.

- Martino V. Los flavonoides como promisores agentes preventivos y terapéuticos. Acta Farm. Bonaerense. 2000; 19(4): 303-308.

- Mayor O. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop. 2010; 5 (2): 23-29.

- Miller J. 2009. Heliotropium. En: Flora de Nicaragua, versión en línea (consultado 10/03/2015).

- Moreno S. Variabilidad del gen CYP19 y su asociación con el cáncer de mama. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México. 2009. Pp 3-5.

- Myhrstad M., Carlsen H., Nordstrom O., Blomhoff R., Moskaug J. Flavonoids increase the intracelular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalitical subunit promoter. Free Radic Biol Med. 2002; 32: 386-393.

- Nakamura Y., Gindhart T., Winterstein D., Tomita I., Seed J. y Colburn N. Early Superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epitelial JB6 cell. Carcinogenesis 1998; 9:203-7.

- Nash y Moreno P. Boraginaceae. In: A. Gómez-Pompa (ed.) Flora de Veracruz 1981; 18: 1-154. INIREB, Xalapa, Veracruz.

- Newman D. and Cragg, G. “Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.” J. Nat. Prod. 2007; 70: 461-477.

- Oliva M., Ripoll F., Muniz P., Iradi A., Trullenque R. and Valls Y. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorerectal tumors from a Spanish community. Molecular Carcinogen. 1997; (1): 232-43.

- OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. Geneva. 2002. Disponible en: http://www.amhb.org.brmedia/estrategia.pdf

- OMS. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. 2013. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/

- Ortíz A., Castillo R., Beausoleil I. Carcinogénesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Revista Cubana de Oncología, 1995.
- Pardo M., Gómez E. Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. Anales de Jardín Botánico de Madrid. 2003; 60(1): 171-182.

- Pengelly A. The constituents of Medicinal Plants. 2nd Ed. U. K. Cabi Publishing. 1996.

- Peraza R. Catalasa: En Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas (Konisberg M) Manual Moderno. 2008; 183 -199.

- Pérez A., Abilés J., Castaño J. Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. Nutrición Clínica en Medicina. 2008; (2): 45-64.

- Prance G. What is the ethnobotany today? J. Ethnopharmacol. 1991; 32: 209-216.

- Puangpraphant S., Berhow De Mejia E. Mate (*Ilex paraguariensis St ilaire*) saponins induce caspace-3dependet apoptosis in human colon cancer cell in vitro. Food Chem. 2011; 125: 1171-1178.

- Reid T., Fry M., Loeb L. Endogenous mutations and cancer. Princess Takamatse Symp. 1991; 22: 224-9.

- Robineau, L. Encuestas sobre Medicina Tradicional Popular en una zona rural y medicina marginal de la República Dominicana. MOSCOSOA. 1986; 4: 226-265.

- Saavedra M., Calderón C., Sierra C., Cortés R., Gaona Z., Clemente G. Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. 2004; ISSN-0188-137X. pp 27-46.

- Sáez T. Biopatología de los radicales libres. Fac Med Valencia. 2009; 32: 283-300.

- Salim A. Removing oxygen-derived free radicals delays hepatic metastases and prolongs survival in colonic cancer. A study in the rat. Oncology. 1992; 49:51-62.

- Salminen A., Letonen M., Suuronen T., Kaarnirante K., Huuskonen J. Terpenoides: natural inhibitors of NF-kB signaling with anti-inflamatory and anticancer potential. Cell Mol. Life Sci. 2008; 65: 2979-2999.

- Sánchez I., Calderón J., Ruíz B., Tellez J., Calzada L., Taboada J. In vitro Cytotoxicity of flavonoids against MK2 and C6 tumor cells Phytother 2001; 15: 290-293.

- Sánchez M., Torre J., Tormos C., Iradi A., Oliva M., Muniz P. Impairmet of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2deoxyguanosine in advanced epitelial ovarian carcinoma of a Spanish community. Cancer Lett. 2006; 233(1): 28-35.

- Santos J., Benjamin M., Yang P., Prior T., Perdue H. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 2000.; 278 (6): G847-G854.

- Sharma A., Tripathi M., Satyam A., Kumar L. Study of antioxidant levels in patients with multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2009;50:809–15.

- Segler D. Plant Secondary Metabolism. Kluewer. Nueva York. 2001; 17-31.
- Sen S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy YSR and De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines, current status and future prospect. Int J Pharm Sci Rev Res. 2010;3(1), 91.
- Shi X., Jiang H., Mao Y., Ye J., Saffiotti U. Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and ADN damage. Oncology. 1996; 106:27-38.
- Sparg S., Ligth M., Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. J. Ethnopharmacol. 2004; 94: 219-343.
- Stadtman E., Levine R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids 2003; 25: 207- 218.
- Sugadev R., Ponnuswamy M., Sekar K. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes" Int J Biochem Mol Biol. 2011; 2(1): 67–77.
- Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. USA. 2006; 211-241.
- Takhtajan A. Diversity and clasification of flowering plants. Columbia University Press. Nueva York. 1996.
- Tholl D. Terpene syntethases and the regulation diversity and biological roles of terpene metabolits. Curr. Opinion Plant Biol. 2007; 9: 297-304.
- Thorne F. Proposed new realignments in the angiosperms. Nord. J. Bot. 1983; 3: 85-117
- Tolosa L., Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica . 2002; 43:1-2. 187-204.
- Trédan O., Galmarinin C., Patel K., Tannock I. Drug resistance and the solid tumor microenviroment. J Natl Cancer Inst. 2007; 99: 41-54.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2015. Consulta electrónica: http://www.tropicos.org/Name/4000959?tab=synonyms
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2015. Consulta electrónica: http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2603005&tab=distribution
- Tuncyurek P., Yenisey F., Soyder A., Bocakci T., Cevikel M. Nitric oxide as an Independent Regulatory Factor in Regenerating Rat Liver. Acta chir belg. 2006: 106: 581-587.
- UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2015. Consulta electrónica: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7164
- UICN. 1993. Directrices Sobre Conservación De Plantas Medicinales. Suiza. 58pp
- Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanimns of cellular activation. Free Rad Biol Med. 1994; 16: 547-553.

- Valdez P., Mendoza N. Estrés oxidativo, diabetes mellitus y enfermedad periodontal. Una revisión sistemática. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2004; 7(2):103-108.

- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 2006; 160:1-40.

- Valko M., Dieter L., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2007; 39: 44-84.

- Vásquez A., Cala M., Miranda I., Tafurt G., Martínez J., Stashenko E. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de Salvia aratocensis, Salvia Sochensis, Bidens reptons y Montanoa ovalifolia. Scientia Technica. 2007; 13(33):205-7.

- Venereo G. y Justo R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cub Med Mil. 2002; 311: 26-133.

- Verde L. Estudio etnofarmacológico de tres áreas de montaña de Castilla-la Mancha. Universidad de Murcia. Facultad de Biología departamento de Biología Vegetal (Botánica) Murcia (España). 2002; Pp 3-4.

- Verpoorte, R. Y.H. Choi, H.K. Kim. 2005. Ethnofarmacology nd systems biology: A perfect holistic match. Journal of Ethnopharmacology 100: 53-56.

- Wong, Jennifer L. G.; Thornber, Kirsti & Baker, Nell. 2001. Evaluación de los recursos de productos forestales no madereros, 13. Food Agricultural Organization, FAO. Roma. 124pp

- Yilmaz Y., Toledo R. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industy byproducts and effects of solvent on extraction of grape seed polyphenols. Journal of Food Composition and Analysis. 2006; 19: 41-44.

- Zorrilla A., Eirez M., Izquierdo M. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. Rev.Cubana Invest Biomed. 2004; 22 (1): 51-57.

- Zulueta A., Esteve M., Fríjola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capaccity products. Food Chemistry. 2009; 114(1): 310-316.

XI. ANEXOS

ANEXO 11.1 Carta MEXU, UNAM

Instituto de Biología

Universidad Nacional Autónoma de México

Locandonia schismatica

HERBARIO NACIONAL DE MÉXICO

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

México D. F., a 2 de junio de 2015

Pas. Biol. Laura Ivon Torres González
Pas. Biol. Alejandra Berenice Ramírez Mendoza
Biól. Catalina Machuca Rodríguez
Biól. Pedro Hernández Ramírez
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
UNAM
Presente

Agradezco su interés por la donación de un ejemplar botánico de la especie *Heliotropium angiospermum* Murray (Boraginaceae) que es el respaldo de los proyectos de investigación de las tesis de licenciatura "Efecto de extractos de *Heliotropium angiospermum* M. sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer" y "Actividad antioxidante de los extractos del *Heliotropium angiospermum* M. en un modelo de cáncer" que se realizan en el laboratorio de Terapia Molecular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental, FES Zaragoza, UNAM.

El Herbario Nacional de México (MEXU) agradece su atención por el donativo y se compromete al resguardo y a la conservación adecuada de este ejemplar.

Sin más por el momento le envió un cordial saludo.

Atentamente

M. en C. Alberto Reyes-García
Encargado del Programa de Donaciones del Herbario Nacional de México (MEXU)

3er. Circuito Exterior, Cd. Universitaria. Apdo. Postal 70-367 C.P. 04510 México, D.F. Tels. (+55) 5622-9070, 9071, Fax: (+55) 5550-1760
mexu@ibiologia.unam.mx www.ibiologia.unam.mx

ANEXO 11.2 ENTREVISTA ETNOFARMACOLÓGICA

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de estudios superiores Zaragoza

Unidad Multidisciplinaria de Investigación, L. 7 P.A Terapia Molecular

ENTREVISTA ETNOFARMACOLÓGICA

No. de entrevista:_____

Fecha:_____

Sexo:_____

Nombre del entrevistado: _____

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

2.- ¿Qué alimentos consume regularmente?

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

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

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

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

7.- ¿Le advirtieron sobre algún efecto adverso sobre el uso de esta planta?

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

9.- ¿Cómo fue su aplicación?

10.- ¿Cómo inicio y progresó su padecimiento?

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

12.- Cuánto duró el tratamiento? ¿Con que frecuencia utilizaba la planta?

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

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

15.- ¿Presento algunas molestias durante el uso?

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

Nota:

ANEXO 11.3 Reacciones químicas para la detección de metabolitos secundarios

FLAVONOIDES

Reacción de Shinoda
La muestra a identificar se disuelve en etanol (C2H6O (J.T. Baker, grado RA)), y se le adicionan limaduras de Magnesio (Mg (J.T. Baker, grado RA)), a continuación, se agrega gota a gota ácido clorhídrico (HCl), hasta la formación de una coloración rojiza, naranja o violeta.

GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

Reactivo de Baljet
Se disuelven 0.25g de ácido pícrico (C6H3N3O7 (Meyer, grado RA)) en 25 mL de etanol (C2H6O (J.T. Baker, grado RA)) y 2.5g de hidróxido de sodio (NaOH (J.T. Baker, grado RA)) en 25 mL de agua. Esta prueba de identificación es positiva cuando se forma un cromóforo rojizo.

Reactivo de Keller-Killiani
Se prepara disuelviendo 1 g de cloruro de hierro hexahidratado (FeCl3 • 6H2O (Mallinckrod, G.A), 2% en ácido acético (C2H4O2 (J.T. Baker, grado RA)), posteriormente se aplica 1 mL a los extractos e inmediatamente se adiciona gota a gota ácido sulfúrico (H2SO4 (Meyer, grado RA)). La reacción es positiva cuando se forma un cromóforo verde o pardo.

Reactivo de Lieberman-Burchard
Se mezcla 1mL de cloroformo (CHCl3 (J.T. Baker, grado RA)) y 1 mL de anhídrido acético (C4H6O3 (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo se forma el cromóforo con coloraciones roja-naranja, el cual indica la presencia de un núcleo triterpénico; en cambio si este es azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

ALCALOIDES

Reactivo de Wagner
En 25 mL de agua se disuelve 0.31g de yodo sublimado (I sublimado (J.T. Baker, grado RA)) y 0.5 g de yoduro de potasio (KI (Meyer, grado RA)). En esta reacción se genera un precipitado de color naranja-rojizo.

Reactivo de Dragendorff
Se prepara mezlclando 2 g de nitrato de bismuto pentahidratado ($Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (J.T. Baker, grado RA)) en 5 mL de ácido nítrico (HNO_3(Meyer, grado RA)) al 30% con una solución de 6.8 g de yoduro de potasio (KI (Meyer, grado RA)) en 12.5 mL de agua, posteriormente se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 25 mL. La adición de este reactivo a una solución ácida de alcaloides genera un precipitado naranja rojizo.

Reactivo de Mayer
Se disuelven 0.65 g de bicloruro de mercurio ($HgCl_2$ ((J.T. Baker, grado RA)) en 30 mL de agua y 2.5 g de yoduro de potasio (KI (Meyer, grado RA)) y se afora a 50 mL. Esta reacción genera la formación de un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético ($C_2H_4O_2$ (J.T. Baker, grado RA)) y etanol(C_2H_6O (J.T. Baker, grado RA)), si existe presencia de alcaloides.

ESTEROIDES Y TRITERPENOS LIBRES

Reactivo de Lieberman-Burchard
Para su preparación, se mezclan 1mL de cloroformo (CHCl3 (J.T. Baker, grado RA)) y 1 mL de anhídrido acético (C4H6O3 (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo a la muestra patrón, se genera un cromóforo roja-naranja, el cual indica la presencia de un núcleo triterpenico; en cambio si es azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

SAPONINAS

Ensayo de Espuma
Consiste en agitar las muestras hasta la formación de espuma, la prueba será positiva si la espuma es estable por 15-30 minutos.

Reactivo de Lieberman-Burchard
Se mezcla 1mL de cloroformo ($CHCl_3$ (J.T. Baker, grado RA)) y 1 mL de anhídrido acético ($C_4H_6O_3$ (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo a la muestra la reacción debe formarse un cromóforo roja-naranja, elcual indica la presencia de un núcleo triterpenico; en cambio si es de color azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

Reactivo de Hidroxamato Férrico
Se prepara una solución de clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% etanol (C2H6O (J.T. Baker, grado RA)) y hidróxido de sodio (NaOH(J.T. Baker, grado RA)), se calienta de 2-5 min a 100 °C hasta la aparición de una espuma de color rojizo, posteriormente se enfría y acidula con ácido clorhídrico (HCl (J.T. Baker, grado RA)) y se añade cloruro de hierro (FeCl3 (J.T. Baker, grado RA)). E sta prueba es positiva si se forma un cromóforo violeta.

CUMARINAS

Reactivo de Baljet
Se disuelven 0.25g de ácido pícrico (C6H3N3O7 (Meyer, grado RA)) en 25 mL de etanol (C2H6O) y 2.5g de hidróxido de sodio (NaOH (J.T. Baker, grado RA)) en 25 mL de agua. Esta prueba de identificación es positiva cuando se genera un precipitado o coloración rojiza.

Reactivo de Hidroxamato Férrico
Se prepara una solución de clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% etanol (C2H6O (J.T. Baker, grado RA)) y hidróxido de sodio (NaOH(J.T. Baker, grado RA)), se calienta de 2-5 min a 100 °C hasta la aparición de una espuma de color rojizo, posteriormente se enfría y acidula con ácido clorhídrico (HCl (J.T. Baker, grado RA)) y se añade cloruro de hierro (FeCl3 (J.T. Baker, grado RA)). E sta prueba es positiva si se forma un cromóforo violeta.

Para considerar como positiva la presencia de Cumarinas ambas pruebas deben ser positivas.

NAFTOQUINONAS Y ANTROQUINONAS

Reacción de Bornträguer-Kraus
Los extractos se trataron con una solución de hidróxido de potasio (KOH (J.T. Baker, grado RA)) al 5%, posteriormente se filtró y acidulo con 3 gotas de ácido clorhídrico (HCl (J.T. Baker, grado RA)), se sacudió con benceno (C6H6 (J.T. Baker, grado RA)) y se dejó en reposo durante 3 horas, posteriormente se observa la separación de la fase bencénica, a la cual se le añade una solución

de hidróxido de amonio (NH4OH (J.T. Baker, grado RA)) 2%. Si se presenta un cromóforo que va de rosa a rojo intenso la prueba es positiva.

TANINOS

Reactivo Gelatina-Sal
Se disuelven 0.25g de grenetina en 25 mL de agua, en una solución al 10% de cloruro de sodio (NaCl (J.T. Baker, grado RA)), la prueba se considera positiva si existe la formación de un precipitado blanco.

Reacción de Cloruro Férrico
A los extractos se les adiciona de 2-5 gotas de cloruro férrico hexahidratado (Mallinckrod, G. A.) al 10 %. La formación de un cromóforo verde, azul o negro da positiva la prueba.

Las dos pruebas son necesarias para comprobar la presencia de este metabolito.

ANEXO 11.4 Fotografías de formación de tumores

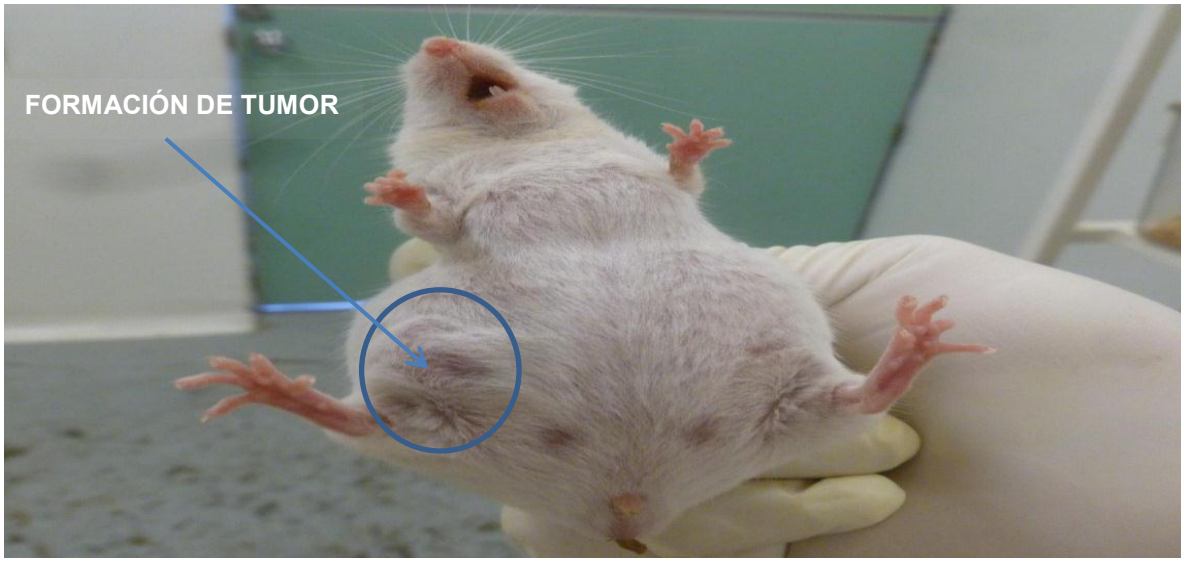


Fig. 13. Formación de tumor en muslo derecho de ratón hembra CD-1 inducido con NiO

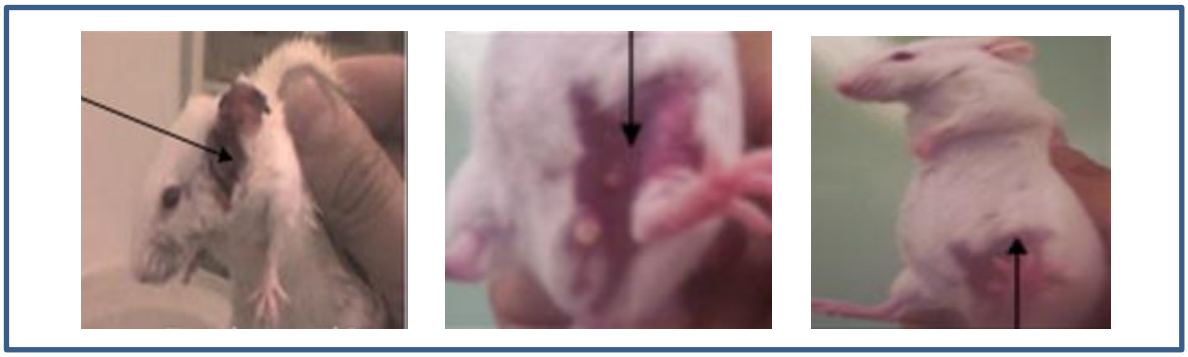


Fig. 14. Lesiones en oreja y patas de ratones hembra CD-1 inducidos con NiO.

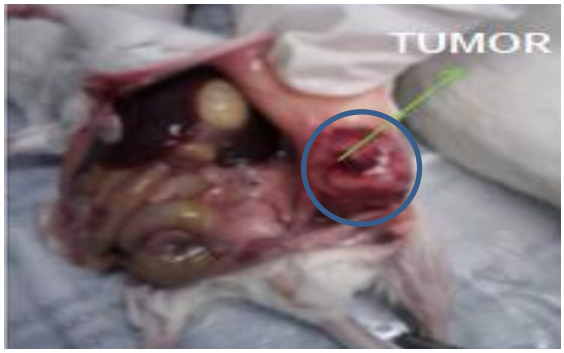


Fig. 15. Tumor presente en muslo izquierdo de ratón hembra CD-1 inducido con NiO.