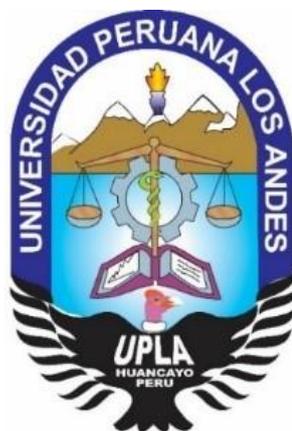


**UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**DOCTORADO EN MEDICINA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CITOTOXICIDAD  
DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE PETALOS DE  
FLORES ANARANJADAS DE *Tropaeolum majus* L. EN  
LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS DE MAMA**

Presentada por:  
MSc. CLARA RAQUEL ESPINOZA SILVA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN MEDICINA

Huancayo – Perú

2019

## HOJA DE CONFORMIDAD DE LOS JURADOS EVALUADORES

Dr. Juan Manuel Sanchez Soto  
Director

Dr. Roberto Jesús Bernardo Cangahuala  
Jurado

Dra. Salomé Ochoa Sosa  
Jurado

Dr. Miguel Raul Mercado Rey  
Jurado

Dr. Milton Antonio Tello Cruz  
Jurado

Dr. Jesús Armando Caveró Carrasco  
Secretario Académico

**ASESOR:**  
**Dr. GUSTAVO BASTIDAS PARRAGA**

## **DEDICATORIA**

Dedico todo mi trabajo y esfuerzo a mis hijos y esposo que son mi motor y motivo para seguir superándome. A mi madre quien me dio tiempo y dedicación en mi formación como persona. A mi padre que en paz descansa quien con su ejemplo inculcó en mí el estudio y superación. A mis hermanos que compartieron mi niñez y juventud.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por acompañarme, protegerme en todo momento.

Al Dr. Gustavo Bastidas por el asesoramiento de este trabajo de tesis.

Al Dr. Antonio García de la Universidad Autónoma de Madrid por el acceso a su laboratorio y desarrollo de protocolos para citotoxicidad.

Al Dr. Víctor Fernández que en paz descansa.

# ÍNDICE

	Pág.
CARÁTULA	i
JURADOS	ii
ASESOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
SOMMARIO	xiii
INTRODUCCIÓN	xv

## CAPÍTULO I

### PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema	17
1.1.1 Formulación del problema	19
1.2 Objetivos	20
1.2.1 Objetivo general	20

1.2.2 Objetivos específicos	20
1.3 Justificación e importancia	21

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

2.1 Antecedentes de la investigación	23
2.1.1 Antecedentes Internacionales	23
2.1.2 Antecedentes Nacionales	29
2.1.3 Antecedentes Regionales	31
2.1.4 Antecedentes locales	31
2.2 Bases teóricas	31
2.3 Marco conceptual	46
2.3.1 Definiciones conceptuales	46
2.3.2 Definiciones operacionales	49
2.4 Hipótesis de la investigación	50

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

3.1 Tipo de investigación	52
3.2 Diseño de la investigación	53

3.3 Lugar y periodo de la ejecución	53
3.4 Población y muestra	54
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	54
3.5.1 Instrumento de recolección de datos	54
3.5.2 Análisis de validez y confiabilidad del instrumento	55
3.6 Técnicas de procedimientos de recolección de datos	55

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**

4.1 Resultados	63
----------------	----

## **CAPITULO V**

### **DISCUSIÓN**

5.1 De la extracción de los compuestos fenólicos	77
--	----

CONCLUSIONES	85
--------------	----

RECOMENDACIONES	86
-----------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	87
---------------------------	----

ANEXOS	96
--------	----

## RESUMEN

La investigación de polifenoles es considerada un campo prometedor en el tratamiento y la prevención del cáncer de mama. Se han realizado algunos estudios in vitro en algunas líneas celulares cancerígenas, y, en el presente trabajo se tuvo como objetivo general evaluar in vitro la citotoxicidad de los extractos fenólicos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus* L. en líneas celulares de cáncer de mama, y como objetivos específicos relacionar el tipo de solvente con mejor rendimiento para la extracción de compuestos fenólicos y la concentración de compuestos fenólicos con actividad citotóxica. Se probaron cuatro tipos de solventes para la extracción de polifenoles: Etanol al 99%, etanol 80% (etanol: agua), metanol al 99% y metanol al 80% (metanol:agua). Se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos totales por el método Folin Ciocateu, y la capacidad antioxidante por el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo). Se realizó la identificación de los compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta velocidad. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y se determinó la citotoxicidad celular utilizando el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), contemplando un control positivo con 5-FU (Fluorouracilo) y un control negativo con DMSO (Dimetil sulfóxido). Se obtuvo un mayor rendimiento de compuestos fenólicos con metanol al 80% (701,81 mg de AG/mL) y capacidad antioxidante medida en porcentaje de inhibición de  $75,26 \pm 0,23$  %. Se identificaron al ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico y rutina en los extractos. Se observó que al incrementar la concentración de extracto fenólico y 5-FU el porcentaje de viabilidad celular disminuía. Los compuestos fenólicos mostraron mayor toxicidad en células MCF-7 que con 5-FU a la misma

concentración. Se determinó que la dosis de compuestos fenólicos necesario para reducir in vitro el 50 % de células cancerígenas de mama IC<sub>50</sub> fue de 57,54 ug / mL.

**Palabras claves:** Fenólicos, Anticancer, Tropaeolum majus L.

## ABSTRACT

Polyphenol research is considered a promising field in the treatment and prevention of breast cancer. Some in vitro studies have been carried out in some cancer cell lines, and in the present work the general objective was to evaluate in vitro the cytotoxicity of the phenolic extracts of orange flowers of *Tropaeolum majus* L. in breast cancer cell lines, and as specific objectives to determine the type of solvent with better performance for the extraction of phenolic compounds and to evaluate the concentration of phenolic compounds with cytotoxic activity. Four types of solvents were tested for the extraction of polyphenols: 99% ethanol, 80% ethanol (ethanol: water), 99% methanol and 80% methanol (methanol: water). The content of total phenolic compounds was quantified by the Folin Ciocateau method, and the antioxidant capacity by the DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) method. The phenolic compounds were identified by high-speed liquid chromatography. Cytotoxicity assays were performed on MCF-7 breast cancer cell lines and cellular cytotoxicity was determined using the MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) method, contemplating a positive control with 5-FU and a negative control with DMSO (di metil sufoxid). A higher yield of phenolic compounds was obtained with 80% methanol (701.81 mg of AG / mL) and antioxidant capacity measured in percentage of inhibition of  $75.26 \pm 0.23\%$ . Caffeic acid, coumaric acid, chlorogenic acid and rutin were identified in the extracts. It was observed that increasing the concentration of phenolic extract and 5-FU the percentage of cell viability decreased. Phenolic compounds showed greater toxicity in MCF-7 cells than with 5-FU at the same concentration. It was determined that

the phenolic compounds dose needed to reduce 50% of IC50 breast cancer cells in vitro was 57.54 ug / mL.

**Key words:** Phenolics, Anticancer, Tropeolum majus L.

## SOMMARIO

La ricerca sui polifenoli è considerata un campo promettente nel trattamento e nella prevenzione del cancro al seno. Alcuni studi in vitro sono stati condotti su alcune linee cellulari tumorali e nel presente lavoro l'obiettivo generale era di valutare in vitro la citotossicità degli estratti fenolici di fiori d'arancio del *Tropaeolum majus* L. in linee cellulari di cancro al seno, e come obiettivi specifici per determinare il tipo di solvente con prestazioni migliori per l'estrazione di composti fenolici e per valutare la concentrazione di composti fenolici con attività citotossica. Sono stati testati quattro tipi di solventi per l'estrazione di polifenoli: 99% di etanolo, 80% di etanolo (etanolo: acqua), 99% di metanolo e 80% di metanolo (metanolo: acqua). Il contenuto dei composti fenolici totali è stato quantificato mediante il metodo Folin Ciocateau e la capacità antiossidante del metodo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilidrazilo). I composti fenolici sono stati identificati mediante cromatografia liquida ad alta velocità. Le analisi di citotossicità sono state eseguite su linee cellulari di carcinoma mammario MCF-7 e la citotossicità cellulare è stata determinata utilizzando il metodo MTT (Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo), contemplando un controllo positivo con 5-FU e un controllo negativo con DMSO. Una maggiore resa di composti fenolici è stata ottenuta con 80% di metanolo (701,81 mg di AG / ml) e capacità antiossidante misurata in percentuale di inibizione di  $75,26 \pm 0,23\%$ . L'acido caffeico, l'acido cumarico, l'acido clorogenico e la rutina sono stati identificati negli estratti. È stato osservato che aumentando la concentrazione di estratto fenolico e di 5-FU la percentuale di vitalità cellulare è diminuita. I composti

fenolici hanno mostrato una maggiore tossicità nelle cellule MCF-7 rispetto a 5-FU alla stessa concentrazione. È stato determinato che la dose di composti fenolici necessaria per ridurre il 50% delle cellule di carcinoma mammario IC50 in vitro era di 57,54 ug / mL.

**Parole chiave:** Fenolica, Antitumorale, *Tropaeolum majus* L.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es actualmente un problema de salud pública a nivel mundial, y nuestro país no es ajeno esto debido a la alta mortalidad como por la discapacidad que produce. De acuerdo a las estadísticas en el Perú es la segunda causa de muerte siendo el cáncer de mama la de mayor incidencia en mujeres. En Perú, se estima que la incidencia de cáncer es de 157.1 casos por 100 000 habitantes, siendo de mayor prevalencia en mujeres que en varones.<sup>1</sup>

Para el tratamiento de cáncer, en el mercado existen una gama de drogas quimioterapéuticas para inducir la muerte de células neoplásicas, sin embargo, a lo largo de la historia, los productos vegetales han demostrado ser fuentes valiosas de nuevos medicamentos contra el cáncer. Las plantas son una fuente útil de compuestos antitumorales con mucha importancia clínica, por lo que, es importante rastrear los productos de origen natural con experimentos in vivo y/o in vitro, como los ensayos de citotoxicidad como uno de los indicadores de actividad antitumoral inicial.<sup>2</sup>

Los estudios in vitro son una herramienta muy útil para determinar el potencial citotóxico de diversos componentes bioactivos de las plantas y que pueden ser usados como fármacos y agentes anticancerígenos.

Existen evidencias científicas en la que muestran que los compuestos fenólicos poseen entre otros efectos anticancerígenos en la salud, debido a que poseen actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos son antioxidantes capaces

de detener la reacción en cadena de los radicales libres debido a su capacidad de donar hidrógeno a partir de los grupos hidroxilos presentes en los fenólicos.<sup>2</sup>

El mastuerzo es una planta de origen peruano, con flores de colores amarillo, rojo y anaranjado con muchos biocomponentes entre ellos los compuestos fenólicos, y en mayor proporción en flores anaranjadas, por lo que consideramos en el presente trabajo identificar el solvente con el que se obtenga un mayor rendimiento de extracción e identificar los compuestos fenólicos que lo componen. De este modo determinar si los extractos metanólicos tienen efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7.

El resultado del desarrollo del trabajo nos ayuda a determinar la posible aplicabilidad de los compuestos fenólicos de flores de mastuerzo ya sea para su consumo directo o mediante su purificación, como alternativa para la prevención del cáncer de mama debido a su actividad antioxidante, y de esta manera tener una alternativa a este problema social que va cada vez en aumento en nuestra sociedad.

**LA AUTORA**

# CAPÍTULO I

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema

Mundialmente el cáncer es un problema de salud pública, información publicada en diversos medios a nivel mundial. “El cáncer en Latinoamérica ocupa el segundo lugar de las causas de muerte y, de igual manera en el Perú, el cáncer muestra tasas de incidencia altas para todos los cánceres en hombres y mujeres en los últimos años”. Entre las neoplasias más comunes se encuentran el cáncer de mama, del cuello uterino y el de la próstata.

Datos estadísticos mostrados en el Boletín epidemiológico de Perú<sup>1</sup> editado por el Ministerio de Salud muestra “que los tipos de cáncer más frecuentes fueron los de cérvix (21,9%), piel (12,3%) y estómago (11,4%). En el sexo masculino, los tipos de cáncer más frecuentes fueron los de estómago (19,2%), piel (16,2%) y próstata (14,1%); mientras que, en el sexo femenino

los más frecuentes fueron los de cérvix (32,9%), mama (13,2%) y piel (10,4%)”.

También menciona que “las regiones que tuvieron un alto porcentaje de casos de cáncer de cérvix diagnosticados mediante una técnica de tamizaje el año 2016 fueron Junín (69,5%), Lima Metropolitana (69,2%), Ancash (57,7%), Madre de Dios (55,0%) y Loreto (50,9%). En Junín en año 2016 se han reportado 430 nuevos casos de cáncer”.<sup>1</sup>

A pesar de que “existe gran cantidad y diversidad de fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer, la mortalidad por esta enfermedad continúa incrementándose, debido en parte a que las células cancerosas no se encuentran en la misma fase del ciclo celular, constituyendo la radioterapia o quimioterapia inofensivo para toda la población de dichas células”<sup>2</sup>. Otro de los problemas se relaciona con la inestabilidad genética de las células cancerosas<sup>3</sup>, lo que ocasiona que se formen nuevos clones de células resistentes a los fármacos empleados. Por esta razón es que la búsqueda de nuevos fármacos para combatir o prevenir el cáncer debe continuar.

Hosseini menciona que “algunos fármacos anticancerosos han sido obtenidos de plantas<sup>4</sup>, por lo que es razonable suponer que se pueden aislar más sustancias con propiedades terapéuticas anticancerosas de especies vegetales, especialmente de aquellas usadas empíricamente por la población”.

Existe en el mundo aproximadamente 250,000 especies vegetales, de las cuales 150,000 están en los trópicos.<sup>5</sup> Una de las estrategias empleadas se

basa en elegir plantas que de manera tradicional se vienen empleando en la medicina herbolaria<sup>6</sup>.

Perú es un país con una gran biodiversidad y con tradición en el empleo de la medicina herbolaria, lo que lo convierte en una gran fuente potencial de compuestos de origen vegetal para el tratamiento del cáncer.

Existen trabajos realizados con otros componentes como el isotiocianato de bencilo en las plantas de *Tropaeolum majus*, pero aún no existe en el argot científico estudios con compuestos polifenolicos de esta planta.

El interés de nuestro estudio se centra en el *Tropaeolum majus*, conocida en nuestro medio como “mastuerzo”; planta empleada ya desde el tiempo de nuestros ancestros para el tratamiento de muchas enfermedades, debido a que en su composición muestra componentes activos que tienen propiedades antioxidantes, por lo que se propone preparar extractos fenólicos, caracterizarlos y probar su citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de mama.

### **1.1.1 Formulación del problema**

#### **Problema General**

¿Cuál es la actividad citotóxica de los extractos fenólicos de los pétalos de flores anaranjadas del *Tropaeolum majus* en líneas células tumorales de mama MCF-7?

## **Problemas específicos**

¿Cómo influye el tipo de solvente en el rendimiento durante la extracción de compuestos fenólicos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus*?

¿Cuál es la concentración con actividad citotóxica de los extractos fenólicos de los pétalos de flores anaranjadas del *Tropaeolum majus* en la citotoxicidad de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7?

## **1.2 Objetivos de investigación**

### **1.2.1 Objetivo general**

Evaluar in vitro la citotoxicidad de los extractos fenólicos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus* en líneas celulares de cáncer de mama, en el Laboratorio del Instituto Teófilo Hernando de la Universidad Autónoma de Madrid y el Laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Correlacionar el tipo de solventes con mejor rendimiento para la extracción de compuestos fenólicos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus*
- Identificar los compuestos fenólicos de extractos de flores anaranjadas de mastuerzo

- Correlacionar la concentración de extracto fenólicos de pétalos de flores color anaranjado del *Tropaeolum majus* en la citotoxicidad de células cancerígenas de mama.

### 1.3 Justificación e importancia

#### Relevancia o valor teórico o científico

Entre los años 60 y 70, investigadores de Estados Unidos iniciaron varias investigaciones con plantas que poseían actividad anticáncer<sup>7</sup>.

El (NCI) Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América, desarrolló un programa de trabajo con ratones y otros modelos de animales empleando la línea celular L1210 (leucemia linfocítica) para evaluar la capacidad antineoplásica de las plantas. Seguidamente a este estudio evaluaron la actividad de las plantas a través de pruebas *in vitro* usando las líneas celulares de leucemia linfocítica murina (P388) y carcinoma nasofaríngeo humano (KB).

“Ya en 1981 se habían evaluado 114,000 extractos procedentes de 35,000 plantas<sup>6</sup>. Los resultados del programa de NCI condujeron a la obtención de productos naturales que se han empleado como agentes quimioterapéuticos<sup>7</sup>. Actualmente ya existen en el mercado de Estados Unidos de Norteamérica aproximadamente 141 medicamentos contra el cáncer y aproximadamente el 67 % de éstos son de origen natural”<sup>8</sup>.

Los medicamentos de origen natural se pueden clasificar en productos semisintéticos derivados de un producto natural, de origen natural, y también

los productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural<sup>6</sup>. Se consideran como productos naturales aquellos producidos por plantas, bacterias y organismos marinos.<sup>8</sup>

En el Perú contamos con una amplia biodiversidad en plantas con compuestos fitoquímicos farmaconutracéuticos entre ellos el mastuerzo con presencia en su composición con compuestos bioactivos que servirán para ser utilizados en pruebas para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas de mama.

### **Relevancia social o práctica**

En los años ochenta, “surge el interés de la industria farmacéutica mundial por fuentes con actividad biológica, proveniente de las plantas medicinales conocidas ancestralmente y otros recursos naturales como alternativa a las estrategias de diseño de fármacos. Es la Organización Mundial de la Salud la que promueve el uso de plantas medicinales y sus derivados en el tratamiento de patologías de alto índice social como el cáncer”.<sup>9</sup>

El desarrollo del presente trabajo nos permitirá darle un valor agregado a una planta autóctona de nuestro país, para la extracción de metabolitos con potencial de inhibición de células cancerígenas. De este modo contar con una materia prima al alcance de los pobladores de la zona, ayudando a prevenir los problemas de aparición de neoplasias de mama.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes de la investigación**

Se detalla a continuación algunos antecedentes de investigación referido a los compuestos fenólicos y su potencial anticancerígeno

##### **2.1.1 Antecedentes Internacionales**

- **Flores comestibles como fuentes de compuestos fenólicos con potencial bioactivo<sup>11</sup>**

Las flores comestibles son ampliamente utilizadas, pero aún queda mucho por hacer en relación con su potencial bioactivo y su correlación con la presencia de compuestos fenólicos. El objetivo de este estudio fue determinar el perfil fenólico individual en los

extractos hidrometanólicos y las preparaciones de infusión de cuatro muestras de flores diferentes (Dahlia mignon, Rosa damascena 'Alexandria' y R. gallica 'Francesca' en R. canina, Calendula officinalis L., y Centaurea cyanus L.) y su potencial bioactivo (capacidad antioxidante, antiproliferativa y antibacteriana).

Todas las flores estudiadas presentaron diferentes perfiles con respecto a su composición fenólica y potencial biológico revelado. El potencial bioactivo de las flores estudiadas fue moderado, los extractos hidrometanólicos de pétalos de rosa mostraron los mejores resultados para los ensayos antioxidantes y antibacterianos, mientras que las propiedades antiproliferativas solo estuvieron presentes en algunas de las líneas celulares probadas, para los extractos hidrometanólicos, en los cuales la dalia y rosa mostró los mejores resultados.

Estos resultados demuestran que las flores comestibles se pueden utilizar como fuente de compuestos fenólicos con potencial bioactivo, que se pueden aplicar en el sector alimentario, como alimentos y como ingredientes naturales de las fuentes.

- **La flora africana como potencial de lucha contra la multidroga multidroga del cáncer<sup>12</sup>**

Los continuos esfuerzos de científicos de diversos campos son necesarios no solo para comprender mejor el mecanismo por el cual se producen las células cancerígenas resistentes a múltiples fármacos

(MDR), sino también para impulsar el descubrimiento de nuevos compuestos citotóxicos para luchar contra los fenotipos de MDR. La presente revisión informa sobre la contribución de la flora africana en el descubrimiento de posibles fitoquímicos citotóxicos contra las células cancerosas MDR.

Se utilizaron bases de datos científicas como PubMed, ScienceDirect, Scopus, Google Scholar y Web of Knowledge para recuperar publicaciones relacionadas con plantas africanas, compuestos aislados y células cancerosas resistentes a los medicamentos. Los datos se analizaron para destacar la citotoxicidad y los modos de acción de extractos y compuestos de las plantas africanas más destacadas. Además, se han proporcionado umbrales y puntos de corte para la citotoxicidad y los modos de acción de los fitoquímicos.

La mayoría de los datos publicados relacionados con el potencial antiproliferativo de las plantas medicinales africanas fueron de Camerún, Egipto, Nigeria o Madagascar. La citotoxicidad de compuestos fenólicos aislados en plantas africanas estaba generalmente mucho mejor documentada que la de los terpenoides y alcaloides.

La flora africana representa un enorme recurso para nuevos compuestos citotóxicos. Para desentrañar todo el potencial, se deben

fortalecer los esfuerzos en todo el continente para enfrentar el desafío de una lucha exitosa contra el cáncer de MDR.

- **Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos<sup>13</sup>**

Cordero menciona que “para avanzar en el estudio de la biodiversidad vegetal colombiana, considerada como fuente potencial de productos farmacológicamente activos, es necesario establecer sistemas de evaluación de actividad biológica que permitan detectar productos activos en patologías de alto impacto social y económico, como es el cáncer”.

“Este trabajo describe la implementación de una metodología preliminar in vitro para determinar la potencial actividad anticáncer de extractos vegetales, evaluando su citotoxicidad sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos, midiendo indirectamente la masa celular mediante los ensayos colorimétricos de reducción del MTT (metil tiazol tetrazolio) y tinción con SRB (Sulforodamina B)”.

“Se adaptaron los cultivos de las líneas celulares HT-29, MCF-7, SiHa y HEp-2; igualmente se seleccionaron los parámetros para la valoración de citotoxicidad: concentración de MTT, densidad celular y periodo de tratamiento; se comprobó la sensibilidad de las líneas celulares al agente quimioterapéutico Doxorubicina-HCl y se evaluó la citotoxicidad de extractos de especies vegetales colombianas,

evidenciando la utilidad de la valoración como herramienta para bioguiar la búsqueda de extractos activos”.

- **Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549<sup>14</sup>**

Diaz, en su trabajo en plantas medicinales sobre carcinoma de pulmón se planteó “el objetivo fue evaluar el efecto de 10 extractos de plantas medicinales sobre el crecimiento de la línea celular humana de carcinoma de pulmón A549. El efecto de los extractos sobre las células tumorales se midió a través de un ensayo colorimétrico mediante el empleo del bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio a concentraciones entre 3,9-250 µg/mL durante 72 h y se calculó la concentración citotóxica media para cada uno”.

“Del total de los extractos evaluados solo cuatro (*Parthenium hysterophorus*, *Bixa orellana*, *Momordica charantia* y *Cucurbita maxima*) evidenciaron concentraciones citotóxicas medias inferiores a 100 µg/mL. A excepción de *Parthenium hysterophorus*, las restantes se emplean en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer. Se estudiaron también los extractos de *Cecropia peltata*, *Melia azedarach*, *Annona glabra*, *Artemisia absintium*, *Lepidium virginicum* y *Bidens pilosa* y no mostraron efectos citotóxicos significativos en los estudios”.

“Es muy importante recalcar que el conocimiento etnobotánico representa una herramienta importante en la selección de plantas

medicinales, y de ese modo en la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento del cáncer”.

- **Fenólicos vegetales: extracción, análisis y sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas<sup>15</sup>**

En la oncología médica, la resistencia a múltiples fármacos (MDR) de las células cancerosas sigue siendo un impedimento importante. Estamos en busca de nuevos agentes antiproliferativos para superar las células tumorales resistentes a los medicamentos.

En el presente estudio, se investigó la citotoxicidad de 7 compuestos fenólicos de origen natural que incluyen dos isoflavonoides alpinumisoflavone (1) y laburnetin (2), un biflavonoid amentoflavone (3), tres lignans pycnanthulignene A (4), pycnanthulignene B (5) y syringaresinol (7) y una xantona, euxanthone (6) contra 9 líneas celulares de cáncer sensible a fármacos y MDR.

El ensayo de reducción de resazurina se usó para evaluar la citotoxicidad de estos compuestos, mientras que el ensayo de caspasa-Glo se usó para detectar la activación de caspasas. El ciclo celular, el potencial de membrana mitocondrial (MMP) y los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se analizaron todos a través de citometría de flujo.

Los valores de IC50 para los fenólicos en investigación variaron desde 5,91  $\mu\text{M}$  (hacia células CEM / ADR5000 de leucemia) hasta 65,65  $\mu\text{M}$  (hacia células de MDA-MB-231-BCRP con adenocarcinoma resistente a fármacos) durante 1, 27,63  $\mu\text{M}$  (hacia células CCRF-CEM leucémicas) a 107.57  $\mu\text{M}$  (hacia células MDA-MB-231-pcDNA) para 2, desde 5.84  $\mu\text{M}$  (hacia células CEM / ADR5000) a 65.32  $\mu\text{M}$  (hacia células de carcinoma de colon HCT116 (p53 (-/-)) para 4 y 0.20  $\mu\text{M}$  (hacia las células CCRF-CEM) a 195.12  $\mu\text{M}$  (hacia la leucemia CEM / ADR5000) para la doxorubicina.

Los fenólicos 3, 5, 6 y 7 muestran efectos citotóxicos de selectividad en las líneas de células cancerosas. Los compuestos 1 y 4 indujeron apoptosis en células CCRF-CEM, mediadas por la pérdida de MMP y aumentaron la producción de ROS. Los compuestos fenólicos estudiados y principalmente isoflavonoides 1 y lignano 4 son productos citotóxicos naturales potenciales que merecen más investigaciones para desarrollar medicamentos antineoplásicos novedosos contra cánceres resistentes a medicamentos multifactoriales.

### **2.1.2 Antecedentes Nacionales**

- **Actividad citotóxica in Vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria Lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central** <sup>16</sup>

El objetivo del estudio fue determinar la actividad citotóxica de las fracciones procedentes de la combinación 1:1 del extracto

etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) y el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) en cultivos de líneas celulares cancerosas de glándula mamaria (MCF-7), pulmón (H-460) y Sistema nervioso central (SF-268). Estudio que fue realizado en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Perú.

“Para el fraccionamiento de la mezcla 1:1 de *Annona* más *Krameria* se preparó una columna cromatográfica de 50 cm de longitud empleando diclorometano, diclorometano: acetato de etilo y CHCl<sub>3</sub>:MeOH como sistemas de elusión de polaridad creciente, obteniéndose 186 fracciones. Se evaluaron las fracciones 2 a 83 en cultivo de células cancerosas de glándula mamaria (MCF-7), de pulmón (H-460) y del sistema Nervioso central (SF-268)”.

“Todas las fracciones fueron ensayadas en duplicado. Aquellas fracciones que presentaron un porcentaje de crecimiento de células cancerosas (%G) <50% en alguna de las tres líneas celulares fueron ensayadas nuevamente a cinco concentraciones, para determinar finalmente la concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de las células cancerosas (GI 50). Se consideraron activas aquellas fracciones con una GI 50 <10 µg/mL”.

“Las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación de los dos productos naturales frente a los cultivos de las líneas celulares tumorales MCF-7, H-460 y SF-268 mostraron una GI 50 de 1,6, 1,4 y 1,4 µg/mL respectivamente”.

“Las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación de Annona más Krameria mostraron acción citotóxica in vitro frente al cultivo de células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y del sistema nervioso central”.

### **2.1.3 Antecedentes Regionales**

No existen

### **2.1.4 Antecedente Locales**

No existen

## **2.2. Bases teóricas**

### **Cáncer**

Cuando se habla de “cáncer se refiere a más de 100 formas de enfermedad. Es muy cierto que casi todos los tejidos del cuerpo pueden desarrollar malignidades, incluso algunos producen varios tipos, inclusive recalcar que, cada tipo de cáncer tiene características únicas. Sin embargo, a pesar de esto, el proceso básico que produce los diversos tumores parece ser completamente similar. Razón por la cual se emplea la palabra cáncer de manera genérica”.<sup>17</sup>

“Las células que se encuentran en un cuerpo y que se encuentran sanas conviven en una especie de condominio interdependiente y complejo es donde

una célula regula la proliferación de la otra. Es así que las células se reproducen sólo cuando la instrucción es dada por otra célula vecina”.

“En cambio, las células del cáncer violan este esquema y no respetan los controles usuales de proliferación dictando sus propias reglas de reproducción.<sup>18</sup> Además las células cancerosas poseen la propiedad de migrar de un sitio a otro, iniciando en invadir los tejidos circundantes y producen masas en diferentes sitios del organismo (metástasis). La metástasis es la característica maligna y que inclusive se considera como la parte final de la progresión del tumor. Y, con pocas excepciones, todos los cánceres pueden formar metástasis”.

Actualmente se sabe, “que las células tumorales descienden de una célula ancestral común y, por lo general años antes de que el tumor sea palpable, iniciaron un programa de reproducción inapropiada”.<sup>19</sup>

Es importante manifestar que “la transformación maligna de una célula se produce a través de la acumulación de mutaciones en genes específicos de dicha célula.<sup>19</sup> Por lo que los genes proporcionan la clave para entender el proceso y raíz del cáncer humano, estos se encuentran en el núcleo celular, dentro de la molécula de ADN cromosomal. El gen especifica la secuencia de aminoácidos que deberá unirse para formar una proteína particular. Es así que las proteínas son el trabajo de los genes, y cuando un gen se prende, la célula responde sintetizando la proteína codificada. Las mutaciones en los genes pueden perturbar a la célula cambiando las cantidades y actividad de la proteína producida”.

“Los proto-oncogenes y los genes supresores, constituyen sólo una porción pequeña del de conjunto total de genes. Es debido a que cuando estos tipos de genes son normales, orquestan el ciclo de vida de la célula a través de una intrincada secuencia de eventos razón por la cual una célula se agranda y divide”.

“Entonces los proto-oncogenes estimulan el crecimiento mientras que los genes supresores lo inhiben. Y de esta manera cuando los proto-oncogenes están mutados se pueden convertir en oncogenes carcinogénicos que conducen la célula hacia una multiplicación excesiva” .<sup>20</sup>

“Algunos de los oncogenes formados actúan imitando las señales de crecimiento, lo que conlleva a que células tumorales generen algunas de sus propias señales de crecimiento de este modo reducen su dependencia a los estímulos del micro ambiente de los tejidos normales”.<sup>21</sup>

“Estos genes supresores de tumores codifican para proteínas que inhiben la división celular, por lo que las mutaciones en estos genes causan que las proteínas producidas sean inactivas y de este modo privan a la célula de los frenos para restringir la proliferación celular”.<sup>20</sup>

Las mutaciones son fundamentales para la transformación de una célula normal en una célula cancerosa, para el desarrollo de propiedades malignas de las células cancerosas y para la adaptación de las células cancerígenas a su entorno. La tasa de cambio genético es especialmente grande cuando una célula cancerosa enfrenta obstáculos para su supervivencia. Dado que las mutaciones,

junto con la proliferación, son tan importantes para la supervivencia de un cáncer.<sup>21</sup>

En el tratamiento del cáncer, la preocupación es la proliferación celular porque es la razón principal por la cual las células cancerosas son tan mortales es que proliferan más, durante su vida que las células normales. El proceso de proliferación celular tiene lugar en una secuencia de eventos bien definida llamada ciclo celular.<sup>22</sup>

### **Teoría de estrés oxidativo persistente como causa de cáncer**

La teoría del estrés oxidativo persistente propone que los niveles crónicamente elevados de ROS (especie reactiva de oxígeno) a los que están expuestas las células cancerígenas contribuyen a su supervivencia y progresión.

Si es lo suficientemente extrema, las condiciones de oxidación acentúan las poblaciones de células cancerosas, matando a un porcentaje de las células. Sin embargo, ahora está bien establecido que los niveles leves de ROS pueden estimular la proliferación celular y la progresión del cáncer. Por ejemplo, un estudio reciente en pacientes con cáncer colorrectal informó que las células de carcinoma, pero no las células normales correspondientes o tumores benignos, fueron estresados oxidativamente (medido por modificaciones oxidativas a bases de ADN).

Este estudio también informó que las tasas de proliferación de células cancerosas estaban positivamente correlacionadas con los niveles de estrés

oxidativo. Otros estudios también informaron que las células cancerosas exhiben más daño en el ADN que las células normales adyacentes y que los pacientes con cáncer muestran niveles más altos de producción de ROS y daño en el ADN que sujetos.

Claramente, una forma en que las condiciones oxidativas pueden facilitar la progresión del cáncer es aumentando la tasa de mutaciones clásicas. Las mutaciones clásicas pueden ser inducidas directamente por daño oxidativo al ADN e indirectamente a través de cambios epigenéticos. Las condiciones oxidativas también pueden aumentar la proliferación de células cancerosas a través de otros medios.<sup>22</sup>

### **Líneas celulares cancerígenas**

El desarrollo de un cultivo más allá del cultivo primario da como resultado una "línea celular".

La importancia de una línea celular radica en su capacidad de proporcionar una fuente renovable de material celular para estudios repetidos. Los modelos de línea celular deben reflejar las propiedades de sus cánceres originales, por ejemplo, el mantenimiento de la histopatología cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes, características genotípicas y fenotípicas, expresión génica y sensibilidad a fármacos.

Sin embargo, debido a que frecuentemente son líneas celulares de crecimiento rápido de tumores poco diferenciados que generalmente se seleccionan para el crecimiento in vitro, las líneas celulares de uso generalizado

no siempre reflejan necesariamente las encontradas en la mayoría de la enfermedad clínica.

Prácticamente todos los tipos de células cancerosas ahora se pueden cultivar en cultivo. Los estudios clásicos de Hayflick y Moorhead a principios de la década de 1960 demostraron que los fibroblastos humanos diploides podían experimentar un número limitado de divisiones (aproximadamente 50) en cultivo antes de entrar en "crisis" y senescencia.

La mayoría de las líneas celulares de cáncer sufrirán un número indefinido de divisiones, y las líneas celulares inmortales pueden extenderse a miles de divisiones. Para que una línea celular se convierta en "continua" (en lugar de "finita"), las células deben estar presentes en niveles bajos en la cultura inicial que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente o las células deben experimentar "transformación". Esta transformación puede producirse a través de sustancias químicas o medios virales.

Una vez que se ha establecido una nueva línea celular, debe caracterizarse y confirmarse que está libre de contaminación. A medida que las líneas celulares pasan por un número cada vez mayor de pasajes, pueden perder ciertas características, como las características de diferenciación; sin embargo, también pueden demostrar una mayor homogeneidad a medida que emergen los subclones que crecen más rápidamente. Las existencias de las líneas celulares deben congelarse periódicamente en una variedad de números de pasos para proporcionar un recurso renovable.

Como sistemas modelo, las líneas celulares poseen una serie de ventajas sobre las culturas primarias.

Como se mencionó anteriormente, su fuerza predominante es la capacidad de repetir estudios con un sistema de cultivo bien caracterizado que puede usarse en múltiples laboratorios. Con un cultivo continuo, surgirá una población celular relativamente homogénea a diferencia de un cultivo primario que puede contener muchos tipos de tipos de células estromales e infiltrantes que pueden complicar la interpretación de los datos.<sup>23</sup>

### **Cáncer de mama (seno)**

Un concepto importante que ha surgido del estudio del desarrollo de los senos es que la unidad lobulillar ductal terminal o TDLU, que se identificó como el sitio de origen de la neoplasia mamaria más común, el carcinoma ductal, corresponde a una etapa específica de desarrollo de la mama. el parénquima mamario, los lóbulos tipo 1 (Lob 1). Esta observación es respaldada por estudios comparativos de senos normales y con cáncer obtenidos en la autopsia.

Encontraron que el parénquima no tumoral en las mamas asociadas al cáncer contenía un número significativamente mayor de conductos terminales hiperplásicos, Lob 1 atípico y carcinomas ductales in situ originados en Lob 1 que aquellos senos de mujeres sin cáncer de mama. Lob 1 se ve afectado por procesos preneoplásicos y neoplásicos. El hallazgo de que Lob 1, que son estructuras indiferenciadas, se origina en la neoplasia más indiferenciada y agresiva adquiere relevancia a la luz de que estas estructuras son más

numerosas en el seno de mujeres nulíparas, que a su vez tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama.

El Lob 1 encontrado en el seno de las mujeres nulíparas nunca pasó por el proceso de diferenciación, mientras que las mismas estructuras, cuando se encuentran en el pecho de las mujeres posmenopáusicas parous lo hicieron.

También se han encontrado estructuras lobulares más diferenciadas afectadas por lesiones neoplásicas, aunque originan tumores cuya malignidad está inversamente relacionada con el grado de diferenciación de la estructura parental, es decir, los lobulillos tipo 2 (Lob 2) originan carcinomas lobulares in situ, mientras que los lóbulos tipo 3 (Lob 3) dan lugar a lesiones mamarias más benignas, como lóbulos hiperplásicos, quistes, fibroadenomas y adenomas, y lobulillos tipo 4 (Lob 4) a adenomas lactantes.

De estas observaciones se concluyó que cada compartimento específico de la mama da origen a un tipo específico de lesión y también proporciona la base para un nuevo concepto biológico de que la diferenciación de la mama determina la susceptibilidad a la transformación neoplásica.<sup>24</sup>

### **Estadísticas en Perú y el Mundo**

El Cáncer constituye un problema de salud mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que para el 2030, 21,3 millones de personas desarrollarán la enfermedad y que aproximadamente 13,1 millones de personas morirán. Lamentablemente la tendencia va en aumento, y no es ajeno a esto los países en vías de desarrollo, donde actualmente representan las dos terceras partes de los casos que ocurren a nivel mundial.

El cáncer es una enfermedad potencialmente curable y prevenible. Un tercio de los casos pudiesen ser prevenidos si se aplicarían los modelos de atención y se destinaran los recursos pertinentes.

Esta enfermedad varía geográficamente de un país a otro e incluso varía entre una región y otra en un mismo país, por lo que los registros de cáncer en la población son esenciales ofreciendo datos reales sobre los patrones de la enfermedad, permitiendo tomar decisiones sobre políticas de salud.

La incidencia mundial de cánceres más comunes son los de pulmón, mama, colon/recto, estómago, próstata y cérvico uterino.<sup>25</sup>

De acuerdo con el Ministerio de Salud, luego de las enfermedades cardiovasculares, “el cáncer es la segunda causa de muerte en el Perú. Desde la creación del Plan Esperanza, en el año 2012, el Estado ha invertido aproximadamente S/.2 millones en la prevención y tratamiento del cáncer. No obstante, según reportes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), además del énfasis en los chequeos periódicos y la buena alimentación, un factor muy importante en la prevalencia de este mal es la infraestructura pública y los hábitos de vida”.<sup>1</sup>

"En Lima, los patrones del cáncer han cambiado en los últimos cinco años porque los estilos de vida son diferentes. A mejores condiciones de vida, como acceso a agua potable, electricidad, postas médicas y alimentos frescos, disminuyen las enfermedades infecciosas y aumentan las crónicas no transmisibles como la diabetes, hipertensión y cáncer. Por el contrario, donde la población está obligada a comprar agua de reservorios, no cuenta con servicios de salud óptimos o carece de una cultura de prevención en salud, son

más altas las posibilidades de contagio de virus o bacterias que pueden generar cáncer”, explica el INEN.<sup>1</sup>

“Las estadísticas corresponden al Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2004-2005, el más reciente difundido por el INEN. A la fecha, los especialistas del Departamento de Epidemiología y Estadística del Cáncer de dicho organismo trabajan en una actualización, que incluirá a los 60.710 casos de cáncer registrados entre el 2010 y el 2012 en Lima: a la sazón, los de 27.845 hombres y 32.865 mujeres”.

"Si comparamos el número de casos, vemos que la tasa de incidencia en Lima ha aumentado. Hasta el 2005 era de 180 casos por cada 100 mil habitantes. Al 2012, la tasa aumentó a 216 por cada 100 mil habitantes, en parte porque la expectativa de vida ha aumentado y los limeños son menos reacios a los chequeos médicos. Pese a ello, el patrón geográfico del diagnóstico se mantiene”.<sup>25</sup>

Así, “Miraflores y San Isidro reúnen a la mayor cantidad de pacientes con cáncer de mama, colon y de páncreas; mientras que, en Villa María del Triunfo, Carabaylo y Villa El Salvador predominan los casos de cáncer de cuello uterino y de estómago#”.<sup>26</sup>

### **Ensayos in vitro**

Los ensayos in vitro tienen el propósito de evaluar la actividad celular o molecular. Los ensayos de tipo celular emplean células intactas, en tanto que los moleculares buscan la actividad dentro de un sistema aislado, como es el caso de las enzimas, receptores o ADN.<sup>27</sup>

### **MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)**

La reducción metabólica es el principio en el cual se basa el Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) ejecutada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que se convierte en un compuesto llamado formazan de color azul, permitiendo determinar la funcionabilidad de las mitocondrias de las células tratadas. Este método ya es muy utilizado en muchos trabajos para medir supervivencia y proliferación celular, y reportado en muchos trabajos de investigación.

La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas.

### **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos representan un gran grupo de moléculas con una variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de las plantas. Los compuestos fenólicos incluyen moléculas de señalización, pigmentos y sabores que pueden atraer o repeler, así como compuestos que pueden proteger a la planta contra insectos, hongos, bacterias y virus. La mayoría de los compuestos fenólicos están presentes como ésteres o glucósidos en lugar de como compuestos libres. Los taninos y la lignina son polímeros fenólicos.

Los taninos se usan comercialmente como colorantes y astringentes, y la lignina es responsable de la rigidez estructural de las células y los tejidos, y es esencial para el desarrollo del flujo sanguíneo vascular.

Los “compuestos fenólicos son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático. El fenol es la estructura en la que se basa todo el grupo. El anillo aromático en este caso es el benceno”.

Los fenoles son en muchos aspectos similares a los alcoholes de estructuras alifáticas donde el grupo hidroxilo está unido a una cadena de carbonos. El grupo hidroxilo fenólico, sin embargo, está influenciado por la presencia del anillo aromático.

Debido al anillo aromático, el hidrógeno del hidroxilo fenólico es lábil, lo que hace que los fenoles sean ácidos débiles.

Los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno. El término es algo engañoso ya que tiende a hacer que la gente piense en polímeros de moléculas de fenol individuales. Por supuesto, tales polímeros existen. Los compuestos fenólicos son característicos de las plantas y, como grupo, generalmente se encuentran como ésteres o glucósidos casi nunca como compuestos libres. Premisa importante cuando se desea extraer fenoles de los tejidos vegetales.<sup>28</sup>

### **Componentes fenólicos y su efecto en la salud**

Existe un gran cuerpo de evidencia de que los compuestos fenólicos tienen efectos en la salud humana. Quizás el más antiguo aplicación médica de compuestos fenólicos es el uso de fenol como un antiséptico. Debido a sus efectos secundarios negativos en los tejidos vivos, incluidos formación de ampollas, especialmente en concentraciones más altas. El fenol todavía se usa

como anestésico oral en pastillas para la garganta, en una concentración típica de 1.4%.

### **Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos**

Como parte del metabolismo normal, se generan radicales. Los radicales, son compuestos con electrones libres (es decir, no apareados).

Los radicales son muy reactivos y, cuando no se controlan, pueden causar daño oxidativo a las moléculas de una célula y, por lo tanto, tener un impacto negativo en el metabolismo celular. Un exceso de radicales puede causar estrés oxidativo.

Los compuestos que pueden eliminar radicales también se conocen como antioxidantes. Los antioxidantes más conocidos son la vitamina C, vitamina E y también se encuentran los compuestos fenólicos.<sup>28</sup>

### **Mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.)**

El mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) también conocido como capuchina, mastuerzo, chagas o berros mexicana, tiene como centros de diversidad Brasil, Perú, Colombia y el sur de México a Patagonia. También es conocida como marañuela en Cuba, capuchinha en Brasil, Jacinto en Puerto Rico, mastuerzo de las Indias en España, Chin-lien-hua en China, capuchino en Italia, pero es originaria de Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia. En el Perú, los nativos colocaban una hoja de mastuerzo sobre las heridas para desinfectar y cicatrizar.

“En el siglo XVI los españoles llevaron la planta al viejo mundo, y lo desarrollaron como plantas ornamentales, y recién en 1684 el holandés

Bewerning aconsejó usar las hojas como verdura y medicina, sugirió su cultivo en los jardines de los conventos (de ahí su nombre "capuchina"). En el Imperio Inca se celebraba una boda, se frotaba a la pareja soberana ritualmente con hojas y flores de mastuerzo porque se la consideraba afrodisíaca. Por lo que suponemos que consideraban al mastuerzo estimulante de los sentidos, en este caso probablemente sexuales".<sup>29</sup>

Pertenece a la familia Tropaeolaceae y es un escalador herbáceo anual, con un tallo circular, alternos verdes peludas, hojas enteras y grandes, flores bonitas que van del amarillo al color rojo<sup>30</sup>, siendo su taxonomía:

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.).<sup>30</sup>

Nombre científico	<i>Tropaeolum majus</i> L.
Reino	Plantae.
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares).
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas).
División	Magnoliophyta (plantas con flor).
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas).
Subclase	Rosidae.
Orden	Geraniales.
Familia	Tropaeolaceae.
Género:	Tropaeolum.
Epíteto específico	Majus
Epíteto específico	L.

Fuente: Espinoza et.al 2017

Los aspectos florales de esta especie destacan por su riqueza de fitoquímicos: compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas, flavonoides, vitaminas, minerales. Las flores contribuyen al mejoramiento de la estética de algunos alimentos, además, aportan sustancias biológicamente activas como vitaminas C, A, niacina, riboflavina, minerales como fósforo, calcio, potasio y hierro beneficiando la salud de quien las consume. Las rosas, violetas y capuchinas se usan como alimento por sus características organolépticas y valor nutricional se pueden considerar un alimento funcional.

Entre los compuestos biológicamente activos, los compuestos fenólicos, son muy conocidos como compuestos se asocian con la prevención de enfermedades crónicas degenerativas. Los compuestos fenólicos forman uno de los grupos de metabolitos en el reino vegetal más numerosos y ampliamente distribuidos, diversas estructuras fenólicas comúnmente conocidas, producto del metabolismo secundario vegetal. Los compuestos fenólicos están muy asociados con el color, así como también a las características sensoriales, nutritivas y propiedades antioxidantes.

Los carotenoides que también se encuentran en los pétalos de flores de mastuerzo son otro importante grupo de compuestos activos en los alimentos vegetales, que además de su función como precursores de la vitamina A, y además poseen capacidad antioxidante.

Las plantas son como ya es sabido organismos autótrofos, además de realizar el metabolismo primario, poseen un metabolismo secundario que les permite producir compuestos de naturaleza química y acumularlos, sintetizan

además una gran variedad de estos productos secundarios que contienen un grupo fenol. Son estos llamados compuestos fenólicos y derivan todas ellas del fenol, que es un anillo aromático con un grupo hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres y glucósidos).

En el grupo se encuentran moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos, también se encuentran pigmentos flavonoides.<sup>31</sup>



Figura 1. Flor anaranjada de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.)

Fuente: Espinoza et. al 2017

## 2.3. Marco conceptual

### 2.3.1 Definiciones conceptuales

- **Cáncer**

“Es un tumor maligno, ulceroso y duro, que tiende a invadir y destruir los tejidos orgánicos circundantes”.<sup>17</sup>

- **Líneas Celulares cancerígenas**

“Las células HeLa (también conocidas como “células MePa” o simplemente “Hela”) son un tipo particular de células de cultivo celular, que frecuentemente son usadas en investigación científica. Las células HeLa son un linaje celular humano más antiguo y utilizado con mayor frecuencia. La línea del cual pertenecen estas células fueron extraídas de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida el 8 de febrero de 1951 extraída de una paciente llamada Henrietta Lacks, que debido al cáncer quien falleció el 4 de octubre de ese mismo año”.<sup>23</sup>

- **Ensayos in vitro**

“Los ensayos in vitro tienen el propósito de evaluar la actividad celular o molecular. Los ensayos de tipo celular emplean células intactas, en tanto que los moleculares buscan la actividad dentro de un sistema aislado, como es el caso de las enzimas, receptores o ADN”.<sup>23</sup>

- **Apoptosis celular**

“La apoptosis es una vía de muerte o destrucción celular programada provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, este fenómeno puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. La apoptosis posee una función muy importante en los organismos, pues hace posible la destrucción de las células dañadas,

previniendo la aparición de enfermedades como el cáncer, consecuencia de una reproducción indiscriminada de una célula dañada”.<sup>23</sup>

- **Cultivo celular**

“El cultivo celular es el proceso mediante el cual las células, ya sean células procariotas o eucariotas, pueden cultivarse en condiciones controladas. El término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares, especialmente células animales”.<sup>23</sup>

- **Polifenoles**

“Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Pueden ser subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como los flavonoides, lignina, y taninos condensados”.<sup>17</sup>

- **Extracción**

“Es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, estos poseen distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interface”.<sup>17</sup>

### 2.3.2 Definiciones operacionales

- **Viabilidad celular**

“La viabilidad celular se refiere a la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular”.<sup>23</sup>

- **IC50**

“La mitad de la concentración inhibidora máxima (IC50) es una medida de la efectividad de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica”.

“Esta medida cuantitativa indica qué cantidad de un fármaco particular u otra sustancia (inhibidor) se necesita para inhibir a la mitad un proceso biológico dado (o un componente de un proceso, es decir, una enzima, célula, receptor celular o microorganismo). Los valores se expresan típicamente como concentración molar”.<sup>23</sup>

- **Concentración de compuesto bioactivo**

“Son las cantidades cuantificadas por de algún compuesto biológicamente activo que será utilizada para realizar alguna función”.

- **Actividad citotóxica**

“Es la cualidad de algunas sustancias para ser tóxicas. Las sustancias químicas son un ejemplo de agentes tóxicos en ciertas células

del sistema inmune etc. La citotoxicidad puede medirse por el test Trypan blue (TB), el test MTT, el test de la sulforhodamina B (SRB), test WST, test clonogénico etc”.<sup>23</sup>

## **2.4 Hipótesis de la investigación**

### **Hipótesis general:**

Los extractos metanólicos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus* reportan actividad citotóxica en líneas celulares cancerígenas de mama.

### **Hipótesis específicas:**

- La polaridad de los solventes influye en el rendimiento durante la extracción de compuestos fenólicos de pétalos de flores anaranjadas del *Tropaeolum majus*.
- A concentraciones entre 20 ug/mL a más los extractos fenólicos de flores anaranjadas del *Tropaeolum majus* tienen efecto en la citotoxicidad células tumorales de mama.

En la tabla 2 se muestra la operacionalización de variables

**Tabla 2.** Operacionalización de variables

<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>NOMBRE DE LA VARIABLE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>PARA EXTRACCIÓN</b>			
VARIABLE ASOCIADA	Tipo de solvente	Etanol, Etanol:agua, Metanol, Metanol:agua	Se verifica las diluciones y concentraciones de los solventes
VARIABLE SUPERVISIÓN	Rendimiento	ug de AG/mL	Se cuantifica el contenido de compuestos fenólicos
<b>PARA LA EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR</b>			
VARIABLE ASOCIADA	Concentración de extractos	ug. de extracto fenólico	Se verifica la concentración de extracto y cuantificación de compuestos fenólicos totales y mediante la cuantificación de la concentración por HPLC
VARIABLE SUPERVISIÓN	Actividad citotóxica	Coloración medida por espectrofotometría	Muerte (apoptosis) celular por el método MTT

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1. Tipo de investigación<sup>33</sup>**

Según su finalidad: Básica

Según el alcance temporal: Sincrónica

Según su profundidad: Descriptiva - Explicativa

Según el número de mediciones: transversal

Según su fuente: Datos primarios

Según su carácter: Cuantitativo

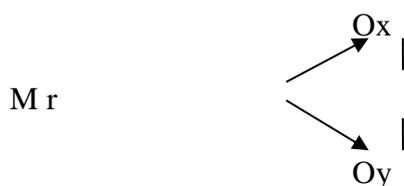
Según el ambiente en el que tiene lugar: De laboratorio

Según la observación o manipulación de la variable: correlacional

Según el tipo de conocimiento: Científico

### 3.2. Diseño de la investigación<sup>34</sup>

La investigación hizo uso de diseño de la investigación correlacional bajo el siguiente esquema:



Donde:

M : Muestra

O<sub>x</sub> : Observación de la variable 1

O<sub>y</sub> : Observación de la variable 2

r : Relación entre las dos variables

### 3.3. Lugar y periodo de la ejecución

El presente trabajo de tesis se realizó en el “laboratorio de investigación” de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional del Centro del Perú, y en el Instituto Teófilo Hernando de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid – España, el periodo de ejecución comprendió de marzo del 2016 a diciembre del 2017

### 3.4. Población y muestra

- **Población:**

No aplica para este tipo de trabajo de investigación.

- **La muestra**

Extractos metanólicos de *Tropaeolum majus* L. de pétalos de flores anaranjadas provenientes de la Estación experimental Mantaro – El Mantaro, extraídas con metanol.

- **Tipo de muestreo:** No probabilístico

Fue en función al requerimiento de muestra definido en el protocolo.

Criterios de inclusión: Se tomó las flores que hayan desarrollado completamente y tengan el máximo contenido de compuestos fenólicos.

Criterio de exclusión: Se eliminaron flores marchitas y dañadas por cortes.

### 3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.5.1 Instrumento de recolección de datos

Para la medición de las variables se utilizó la técnica de observación directa, que es un método de registro visual de lo que ocurre permitiendo obtener datos cualitativos y cuantitativos de las características y condiciones de experimentación. El instrumento usado

fue una ficha registral de los datos según el experimento que se muestra en el anexo 2.

### **3.5.2 Análisis de validez y confiabilidad del instrumento**

La validez y confiabilidad de los instrumentos utilizados fueron ponderados de acuerdo a las publicaciones científicas en bases de datos como scopus, medline, science direct, pubmed, reportados por autores diversos.<sup>35,36,37,38</sup>

### **3.6. Técnicas de procedimientos de recolección de datos**

Para el procesamiento de los datos y preparación de las distintas tablas y figuras producto del estudio experimental se utilizó el programa de cálculo Microsoft Excel versión 2010 para realizar los cálculos de las medidas de tendencia central como la media.

Las técnicas se detallan seguidamente.

#### **- Extracción de compuestos fenólicos**

Las flores de mastuerzo fueron recolectadas del invernadero de la estación experimental “El Mantaro” de la Universidad Nacional del Centro del Perú. Se separaron los pétalos de flores anaranjadas, visiblemente sanas, enteras.

Los pétalos de flores de mastuerzo fueron secados por liofilización para garantizar la conservabilidad de los compuestos bioactivos, y luego se almacenaron en campanas de desecación protegidas de la luz.

Para la extracción de los compuestos fenólicos se realizaron las pruebas con cuatro tipos de solventes:

Metanol al 99%

Metanol al 80% (metanol: agua)

Etanol al 99%

Etanol al 80% (etanol: agua)

“Se empleó el método de extracción por maceración o inmersión <sup>32</sup> proceso de extracción sólido-líquido en donde el producto sólido (pétalos de flores de mastuerzo) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante, que son los que se desea extraer”.

“Para la extracción de los compuestos fenólicos, se pesaron 10 g de material vegetal seco (polvos de flores de mastuerzo), se procedió a macerar las muestras de los vegetales en los solventes en estudio en proporción de 8:2 respectivamente, se dejó macerar por 24 horas en frascos ámbar bajo condiciones de oscuridad con agitación constante a una temperatura de 4 °C, una vez cumplido el tiempo se filtró al vacío sobre el papel filtro Whatman N°42”.

“Los extractos obtenidos fueron concentrados en un rotaevaporador a 40 °C y a una presión reducida de 110 mbar, hasta la completa evaporación

del disolvente y un volumen final aproximado de 18 a 20 mL de extracto concentrado. Los extractos concentrados fueron llevados a congelar en presencia de nitrógeno gaseoso en viales de 30 mL de color ámbar estériles, y fueron almacenados a una temperatura de refrigeración 4 °C hasta su uso. Para la purificación los extractos se pasaron por una columna C18”.

### **Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu**

“Se cuantifico mediante el método de Folin-ciocalteu reportado por Vuong<sup>35</sup> que se basa en la oxidación en medio básico de los grupos hidroxilos de los fenoles por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 755 nm para ser cuantificado por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico”.

“Para realizar las lecturas de la absorbancia se ejecutó en un ambiente adecuado evitando la presencia de la luz ya que los extractos son fotosensibles”.

“En un tubo de prueba protegido de la luz se colocaron 500  $\mu$ L de muestra (extractos metanólicos de pétalos de flores de mastuerzo en sus diferentes concentraciones), 250  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, 1250  $\mu$ L de carbonato de sodio al 7,5 %, la mezcla se homogenizo en un vórtex”.

“Se deja reposar por espacio de 30 minutos en la oscuridad, se corrió un blanco empleando 250  $\mu$ L de agua bidestilada en lugar de muestra. Los valores de absorbancia se leyeron a 755 nm. El contenido de compuestos

fenólicos totales se calculó utilizando una curva estándar de ácido gálico (anexo 1). Los resultados se expresaron como equivalente de mg de ácido gálico /mL de extracto metanólico”.

### **Identificación de compuestos fenólicos**

El perfil de compuestos fenólicos fue obtenido mediante los procedimientos propuestos por Chirinos *et. al*<sup>40</sup> con algunas modificaciones. Las fracciones fueron separadas en una columna de fase reversa HPLC Waters 2695 (Waters, Milford, MA) equipado con una inyector y detector con arreglo de diodos y el software Empower. Los datos espectrales se registraron de 320 nm durante la corrida.

La columna usada para la separación de los compuestos fenólicos fue X-terra RP 18 (5 um, 250 x 4,6 mm) (Waters Milford, MA) a 30 °C. La fase móvil estuvo conformada por solvente (A) agua: ácido fórmico (95:5 v/v, pH 2) y solvente (B) acetonitrilo. La muestra y la fase móvil fue filtrado a través de un filtro Millipore 0,22 um tipo GV (Millipore, Bedford, MA) antes de la inyección. Los compuestos fenólicos fueron identificados y cuantificados comparando los tiempos de retención con un patrón.

### **Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH.**

Se determinó mediante el método de DPPH (di fenil picrazil) reportado por Thaipong *et. al*<sup>40</sup> como se describe.

“Se preparó la solución de trabajo con radical DPPH• (1 N) disuelto en metanol al 80% . Las muestras de los extractos (150 µL) fueron expuestas al radical DPPH• (2850 µL), se homogenizaron en un vortex por 30 segundos y llevados a oscuridad por aproximadamente 20 minutos antes de su lectura a 517 nm en el espectrofotómetro. Los cálculos fueron expresados en porcentaje de inhibición para ello se utilizó la ecuación de la curva de calibración trolox (Anexo 2). El porcentaje de inhibición se expresó con la siguiente formula”:

$$\% I = \left( \frac{A_0 - A_m}{A_0} \right) \times 100$$

Donde:

$A_0$  = Absorbancia del blanco de muestra (2850 µL de DPPH• + 150 µL de metanol al 80%), después de 20 minutos.

$A_m$  = Absorbancia de la muestra (2850 µL de DPPH• + 150 µL de extracto de muestra), después de 20 minutos.

#### **- Ensayos de citotoxicidad**

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con la metodología utilizada por Chaudhary *et al.*<sup>41</sup> . Para evaluar la citotoxicidad de los extractos se emplearon las líneas celulares MCF-7 (Cáncer de mama).

“Las células se propagaron en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium, Cellgro, Herndon Sigma® ) suplementado con 2 mL de glutamina (Sigma® - Aldrich, St. Louis, USA),

10 % de suero fetal bovino (SFB, SIGMA® ), y gentamicina 50 mg (Sigma® -Aldrich, St. Louis, USA) . A la par se utilizaron cultivos confluentes (80-90%) de la línea celular, utilizando para la exclusión con azul de tripano (Sigma® -Aldrich, St Louis, USA) para comprobar su viabilidad”.

“Se cuantificó el número de células tomando 10 uL de suspensión celular y se diluyó con 90 uL de Trypan Blue (0,4%) para luego hacer el conteo en cámara de Neubauer y de acuerdo a este realizar diluciones hasta llegar a  $5 \times 10^5$  cel /mL .Luego se colocaron 5,000 células/pozo en un volumen de 100  $\mu$ L de medio DMEM en microplacas de 96 pozos (Corning Inc. Costar®), seguidamente se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub> en incubadora de cultivo”.

“Posteriormente se prepararon diluciones de los extractos en DMEM a una concentración final de 6, 12, 24, 48 y 96  $\mu$ g/mL, se adicionaron 50  $\mu$ L/pozo de cada dilución, el ensayo se realizó por cuadruplicado. El DMSO se utilizó como control negativo y 5-FU (Fluorouracilo - fármaco quimioterapéutico) como control positivo se evaluó individualmente la citotoxicidad de forma similar a los extractos, las microplacas se incubaron durante 72 h en atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C”.

“Transcurrido 72 h se adicionaron 20  $\mu$ L MTT (sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolio) (Sigma® -Aldrich, St Louis, USA). Estas microplacas fueron llevadas por 4 h en atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C y luego se decantó el medio, se adicionaron

200  $\mu$ L/pozo de DMSO y se leyó la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas de ELISA (Dynatech®MR5000) a longitud de onda de 560 nm y 630 nm como referencia”.

“Para determinar el porcentaje de células muertas se determinó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas de controles tratados, así como también las no tratados. Para hallar el valor de IC<sub>50</sub> se graficaron los valores de concentración de los extractos contra el porcentaje de viabilidad”.

### **Análisis por MTT**

“Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Esta reacción es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), la coloración nos permitió determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. El método MTT has sido utilizado por muchas investigaciones para medir supervivencia y proliferación celular”.

“Se mide la cantidad de células vivas que es proporcional a la cantidad de formazán producido”.<sup>42</sup>

### **Procesamiento de datos**

Para la evaluación estadística de los datos obtenidos y posterior prueba de la hipótesis se utilizó el programa Minitab 16.

Debido a que los datos presentaron una distribución normal se realizó el análisis de varianza, y al resultar significativo se aplicó estadística paramétrica donde se aplicó el Diseño Completamente Aleatorio (DCA), con 3 repeticiones,

con un nivel de significancia ( $p < 0,05$ ), para la extracción, con el programa Minitab 16.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Resultados**

Los resultados del estudio “Evaluación in vitro de la citotoxicidad de extractos fenólicos de pétalos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus* L. en líneas celulares cancerígenas de mama” según los objetivos planteados se detalla en el análisis descriptivo correlacional de las variables líneas abajo.

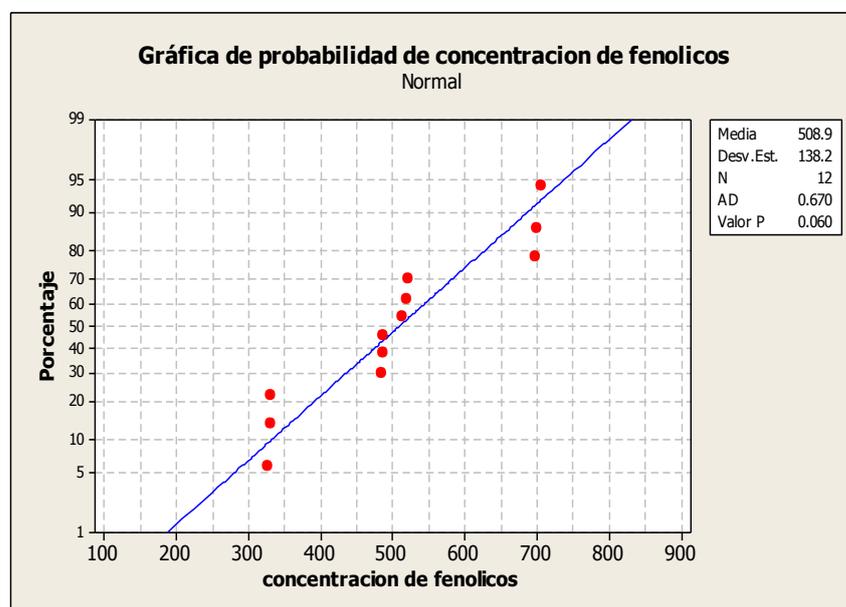
En la tabla 3 se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos según el solvente.

**Tabla 3.** Contenido de compuestos fenólicos de los extractos según el solvente

Solvente	Contenido de compuestos fenólicos (mg de AG/mL) de extracto
Etanol 99%	486,58±1,08
Etanol:agua (80:20)	329,38±2,86
Metanol 99%	517,77±3,89
Metanol:agua (80:20)	701,81±3,90

Fuente: Elaboración propia

Se realizó la prueba de normalidad para determinar si los datos obtenidos siguen una distribución normal utilizando Shapiro Wilks, que se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Análisis de normalidad para los datos obtenidos de contenido de compuestos fenólicos para los extractos obtenidos con diferentes solventes.

El valor de  $p$  es mayor que 0,05 ( $p > 0,05$ ), por lo que se acepta la hipótesis nula que dice que los datos para compuestos fenólicos siguen una distribución normal.

Al seguir los datos una distribución normal se realizó el análisis de varianza mostrado en la tabla 4.

**Tabla 4.** Análisis de varianza para el contenido de compuestos fenólicos

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Solvente	3	916.424	305.475	2153.81	0.000
Error	8	1.135	0.142		
Total	11	917.559			

Del análisis de varianza se obtuvo que el valor de “ $p$ ” es menor que 0,05 por lo que se dice que la variable en estudio que es solvente muestra diferencia estadística entre los diferentes solventes utilizados para el contenido de compuestos fenólicos.

Por lo que se realizó la prueba de comparación de medias utilizando el método de Tuckey, que se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Comparación de medias de los tratamientos el contenido de compuestos fenólicos, utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

solvente	N	Media	Agrupación
4	3	75.263	A
3	3	65.305	B
1	3	58.460	C
2	3	51.614	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

De la tabla 5 se deduce que existe diferencia significativa para los tratamientos siendo el solvente 4 que corresponde al metanol al 80% (metanol: agua) el que extrae compuestos fenólicos en mayor cantidad.

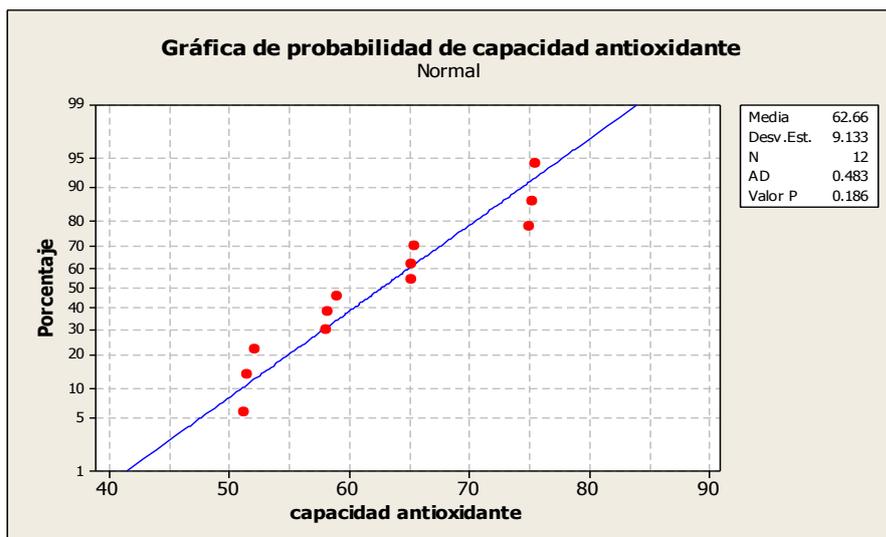
### **Determinación de capacidad antioxidante**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con diferentes solventes.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante de los extractos con diferentes solventes

Solvente	% de inhibición
Etanol 99%	58.46±0,51
Etanol:agua (80:20)	51.61±0,49
Metanol 99%	65.31±0,13
Metanol : agua (80:20)	75.26±0,23

Se realizó la prueba de normalidad para determinar si los datos obtenido para la capacidad antioxidante de los extractos en estudio siguen una distribución normal utilizando Shapiro Wilks, que se muestra en la figura 3



**Figura 3.** Análisis de normalidad para los datos obtenidos de capacidad antioxidante para los extractos obtenidos con diferentes solventes.

El valor de p es mayor que 0,05 ( $p > 0,05$ ), por lo que se acepta la hipótesis nula que dice que los datos para capacidad antioxidante siguen una distribución normal.

Al seguir los datos una distribución normal se realizó el análisis de varianza mostrado en la tabla 7.

**Tabla 7.** Análisis de varianza para la capacidad antioxidante

Fuente	GL	SC	CM	F	P
solvente	3	916.424	305.475	2153.81	0.000
Error	8	1.135	0.142		
Total	11	917.559			

Del análisis de varianza se obtuvo que el valor de “p” es menor que 0,05 por lo que se dice que la variable en estudio que es tipo de solvente muestra diferencia estadística entre los solventes utilizados para la capacidad antioxidante. Por lo que se realizó la prueba de comparación de medias utilizando Tuckey, que se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación de medias de los tratamientos para la capacidad antioxidante, utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%,

solvente	N	Media	Agrupación
4	3	75.263	A
3	3	65.305	B
1	3	58.460	C
2	3	51.614	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

De la tabla 8 se deduce que existe diferencia significativa para los tratamientos siendo el solvente 4 que corresponde al metanol al 80% (metanol: agua) el que presenta una mayor capacidad antioxidante comparado con los demás tratamientos.

### **Identificación de compuestos fenólicos**

Luego de determinar el solvente con mayor contenido de compuestos fenólicos se realizó la identificación por cromatografía líquida de alta presión, que se muestran en la siguiente tabla.

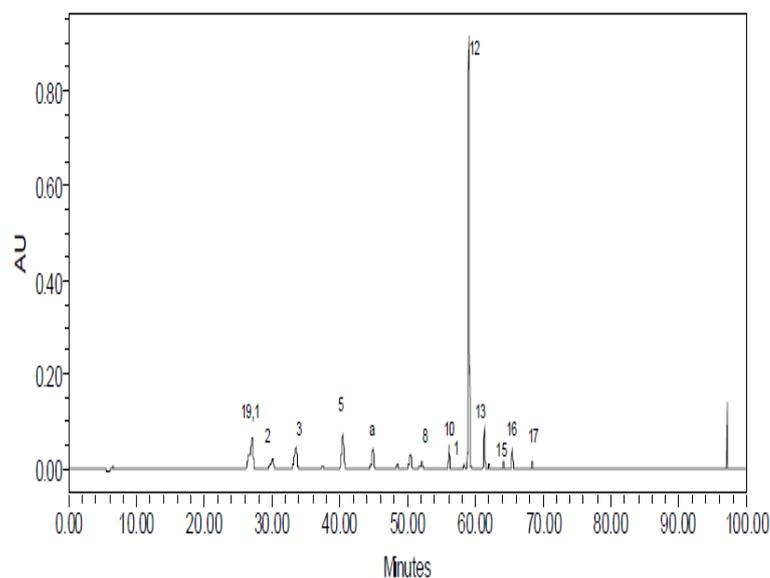
**Tabla 9.** Identificación de los compuestos fenólicos detectados en los cromatogramas de pétalos anaranjados de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*) por HPLC-DAD.

<b>Pico</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Concentración (mg/g)</b>	<b>Fenólico asignado</b>
<b>19</b>	26,70	0,41	Derivado de ácido hidroxicinámico <sup>a</sup>
<b>1</b>	27,05	1,13	Derivado de ácido hidroxicinámico <sup>a</sup>
<b>2</b>	30,08	0,99	Derivado de ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>
<b>3</b>	33,54	1,32	Derivado de ácido hidroxicinámico <sup>b</sup>
<b>5</b>	40,45	3,57	Ácido clorogénico
	44,89		Antocianina (a)
<b>8</b>	52,12	0,85	Derivado de flavonol <sup>c</sup>
<b>10</b>	56,09	2,41	Derivado de flavonol <sup>c</sup>
<b>11</b>	58,33	0,59	Rutina
<b>12</b>	59,03	28,90	Derivado de flavonol <sup>c</sup>
<b>13</b>	61,32	2,82	Derivado de flavonol <sup>c</sup>
<b>15</b>	64,14	0,78	Derivado de flavonol <sup>c</sup>
<b>16</b>	65,44	1,48	Derivado de flavonol <sup>c</sup>
<b>17</b>	68,44	0,58	Derivado de flavonol <sup>c</sup>

**Nota:** <sup>a</sup> Cuantificado como ácido cafeico. <sup>b</sup> Cuantificado como ácido p-cumárico. <sup>c</sup> Cuantificado como rutina.

Se observó que los compuestos fenólicos identificados fueron: ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico, rutina.

Los espectros cromatográficos se muestran en la figura 4.



**Figura 4.** Perfil cromatográfico de la flor de mastuerzo anaranjada a 320 nm

### **Citotoxicidad de los extractos fenólicos de flores anaranjadas sobre la viabilidad de las células MCF-7**

El ensayo de citotoxicidad con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), que se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales de células viables que transforman el MTT en cristales azules conocidos como formazán.

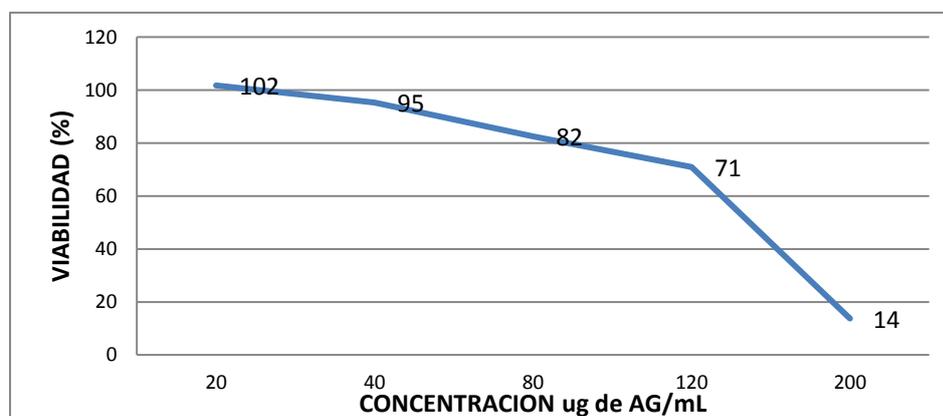
En tabla 10 se muestra los porcentajes de viabilidad a diferentes concentraciones de fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo.

**Tabla 10.** Porcentajes de viabilidad de las células MCF-7 con las diferentes concentraciones del extracto fenólico

Concentración (ug de AG/mL)	Viabilidad (%) Repetición 1	Viabilidad (%) Repetición 2	Viabilidad (%) Repetición 3	Viabilidad (%) Repetición 4
20	102	102	102	102
40	95	95	95	95
80	82	82	83	83
120	70	72	69	72
200	14	14	14	14
Control negativo	100	100	100	100

La viabilidad se midió en función al control negativo sin extracto, tomado como 100%.

Se observa que hubo una menor viabilidad celular a una concentración de 200 ug de AG/mL)



**Figura 5.** Efecto de la concentración de los extractos fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo en la viabilidad celular de MCF-7

En la figura 5 se muestra el efecto de los extractos fenólicos de las flores anaranjadas de mastuerzo, donde se observa que a medida que se incrementa la concentración del extracto la viabilidad disminuye.

Para determinar si existe diferencias estadísticas se realizó el análisis de varianza que se muestra en la tabla 11.

**Tabla 11.** Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad celular respecto a la concentración de extractos fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
concentración	4	19704.65	4926.16	10913.65	0.000
Error	15	6.77	0.45		
Total	19	19711.42			

Del análisis de varianza se obtuvo que el valor de “p” es menor que 0,05 por lo que se dice que la variable en estudio que es la concentración de compuestos fenólicos muestra diferencia estadística entre las diferentes concentraciones en la viabilidad celular. Por lo que se realizó la prueba de comparación de medias utilizando Tuckey, que se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12.** Comparación de medias de las concentraciones de compuestos fenólicos, utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

concentración	N	Media	Agrupación
20	4	101.736	A
40	4	95.257	B
80	4	82.444	C
120	4	70.916	D
200	4	13.741	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

De la tabla 12 se deduce que existe diferencia significativa para las diferentes concentraciones de compuestos fenólicos de flores de mastuerzo anaranjadas.

### **Citotoxicidad de 5- FU sobre la viabilidad de las células MCF-7**

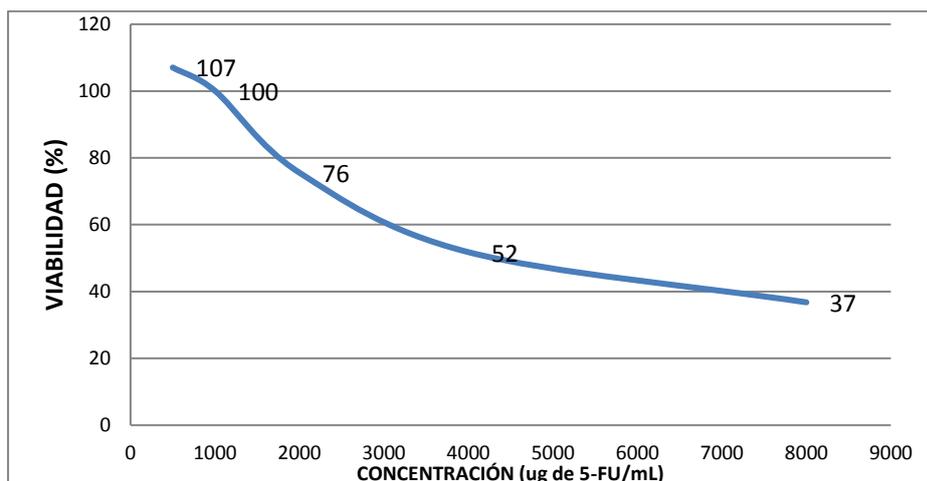
Se evaluó también la citotoxicidad del 5 – FU como un control positivo a diferentes concentraciones, que se muestra en la tabla 13.

**Tabla 13.** Porcentajes de viabilidad de las células MCF-7 con las diferentes concentraciones de 5 - FU

<b>Concentración (ug/mL)</b>	<b>Viabilidad (%) Repetición 1</b>	<b>Viabilidad (%) Repetición 2</b>	<b>Viabilidad (%) Repetición 3</b>	<b>Viabilidad (%) Repetición 4</b>
500	102	102	102	102
1000	95	95	95	95
2000	82	82	83	83
4000	70	72	69	72
8000	14	14	14	14
Control negativo	100	100	100	100

La viabilidad se midió en función al control negativo sin extracto, tomado como 100%.

Se observa en la tabla 13 que hubo menor viabilidad a una concentración de 8000 ug de 5-FU/mL



**Figura 6.** Efecto de la concentración 5 – FU en la viabilidad celular de MCF-7

En la figura 6 se muestra la variación del efecto de la concentración de 5 – FU en la viabilidad celular de MCF-7. Se observó a medida que se incrementa la concentración de químico la viabilidad celular es menor.

Para determinar si existe diferencia estadística se realizó el análisis de varianza que se muestra en la tabla 14.

**Tabla 14.** Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad celular respecto a la concentración 5-FU

Fuente	GL	SC	CM	F	P	
Concentración	2	4	14615.35	3653.84	31379.51	0.000
Error	15	1.75	0.12			
Total	19	14617.10				

Del análisis de varianza se obtuvo un valor de “p” menor que 0,05 por lo que se dice que la variable en estudio que es la concentración de 5-UF muestra diferencia estadística entre las diferentes concentraciones en la viabilidad celular. Por lo que se realizó la prueba de comparación de media utilizando Tuckey, que se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15.** Comparación de medias de las concentraciones de 5-UF, utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%,

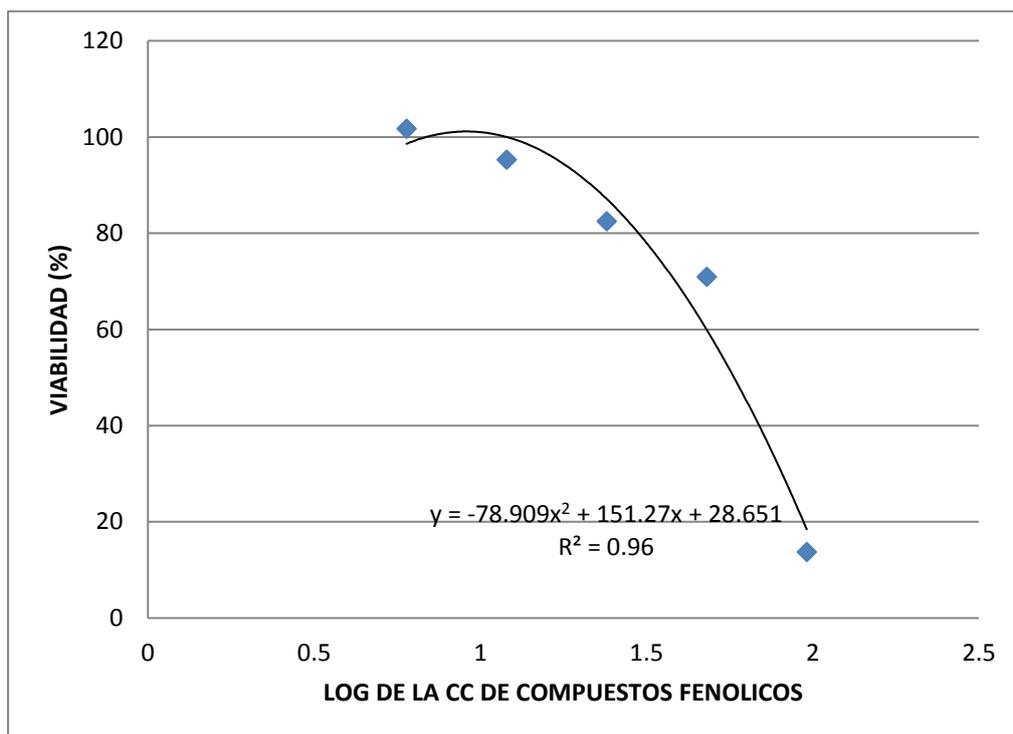
Concentración	2	N	Media Agrupación
500	4	107.038	A
1000	4	100.063	B
2000	4	75.558	C
4000	4	51.776	D
8000	4	36.758	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

De la tabla 15 se deduce que existe diferencia altamente significativa para las diferentes concentraciones de 5-FU.

### **Determinación del valor de IC<sub>50</sub>**

Los valores de porcentaje de viabilidad fueron procesados en EXEL, datos a los cuales se realizó una regresión de los datos para ajustarlos a una curva sigmoïdal para determinar la concentración media inhibitoria de crecimiento IC<sub>50</sub>



**Figura 7.** Línea de tendencia para la determinación del  $IC_{50}$

A partir de la ecuación se halla el valor de  $\text{Log } IC_{50}$  cuyo resultado es 1,76.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se halla el antilog de 1,76, cuyo resultado es 57,54  $\mu\text{g}$  de AG/mL.

Los resultados muestran que a medida que se incrementa la concentración de extracto fenólico existe menor viabilidad celular.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

#### **5.1 De la extracción de los compuestos fenólicos**

La mayor concentración de compuestos fenólicos se obtuvo con metanol al 80%; solución hidroalcohólica, se realizó el análisis estadístico respectivo determinándose que existe diferencia estadística significativa del solvente metanol: agua respecto a los demás tratamientos. Se justifica este resultado debido a que el metanol es considerado un solvente prótico es decir “que tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno y muy buen solvente de sustancias hidrofílicas. El metanol y el agua tienen propiedades semejantes debido a que ambos poseen grupos hidroxilo que pueden formar puente de hidrógeno”<sup>42</sup>.

Por lo que el metanol forma puente de hidrógeno con el agua y por lo tanto es miscible (soluble) en este solvente. Además, el metanol es muy buen solvente de sustancias polares. De modo que los polifenoles al presentar en su estructura grupos hidroxilo (OH) unidos directamente a un anillo aromático presentan propiedades semejantes a los alcoholes, y por lo tanto su disponibilidad para unirse con enlaces o puentes de hidrógeno e hidroxilo.

Existe referencia de otros trabajos de investigación en la cual estudiaron también el efecto de diferentes solventes en la extracción de compuestos fenólicos, como Scherer y Godoy<sup>41</sup> en la comparación de extracción de compuestos fenólicos de *Xanthium strumarium* encontró resultados similares al encontrado en el presente trabajo, donde determina al metanol como el solvente con una mayor concentración de compuestos fenólicos totales.

Amensour et al.<sup>43</sup>, al extraer los compuestos fenólicos y determinó la capacidad antioxidante de *Myrtus* evaluó diversos solventes para la extracción concluyendo que el metanol es el que tenía una mayor concentración de compuestos fenólicos.

Del mismo modo Aksov y colaboradores<sup>44</sup> en la extracción de fenólicos totales de *Thermopsis turcica* evidenciaron que el metanol es el mejor solvente para la extracción de compuestos fenólicos totales.

“Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante que incluye a los fenoles ácidos y flavonoides. Se identificó que los fenoles ácidos inhiben la actividad de agentes mutágenos,

estimulando la actividad de la enzima fenolsulfotransferasa implicada en la destoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos y que además poseen actividad bactericida, razón por la cual se realizó la capacidad antioxidante de los extractos. Al realizar el análisis estadístico muestra que existe diferencia estadística significativa del solvente metanol: agua respecto a los demás solventes, esto se puede correlacionar con el contenido de compuestos fenólicos”.

Del análisis de capacidad antioxidante de los extractos se puede evidenciar que al incrementarse la concentración de compuestos fenólicos también se incrementa la capacidad antioxidante, siendo mayor en el extracto metanólico.

Un antioxidante es un compuesto químico que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, tiene la propiedad de retardar la oxidación de dicho sustrato. Conocidos también porque protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en los procesos que pueden causar una oxidación excesiva<sup>45</sup>.

En el organismo “existen sistemas biológicamente activos conocidos como antioxidantes cuya acción es proteger y contribuir al equilibrio fisiológico de este modo garantizando la vida. Existen estudios epidemiológicos, experimentales y clínicos que demostraron que los antioxidantes proveen una eficacia biológica en la prevención y en la disminución de los efectos de aquellas enfermedades que son producidas por estrés oxidativo<sup>46</sup>. Los antioxidantes deberían estar presentes en el organismo

en concentraciones suficientes que permita prevenir la acumulación de elementos prooxidantes”.

La acción del antioxidante es tal que al “reaccionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil que no es tóxico. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida a sus propiedades redox, las cuales juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres y en la descomposición de peróxidos. La relación entre el contenido de fenólicos y la actividad antioxidante de las hierbas medicinales tuvo una correlación lineal positiva; el resultado fue el mismo para las hierbas conocidas en el ambiente culinario y muchas hierbas medicinales estudiadas”.<sup>47</sup>

Zheng y Wang<sup>46</sup> en su estudio demostró que a mayor contenido de compuestos fenólicos mayor es la actividad antioxidante.

Al realizar la identificación de los compuestos fenólicos se identificó ácido cafeico, ácido p-cumárico, rutina y ácido clorogénico.

Existen trabajos relacionados a cada uno de estos componentes, tales como Kanimozhi y Prasad<sup>47</sup>, que mencionan que el ácido cafeico se encuentra naturalmente en el café, las frutas, las verduras y el aceite de oliva y exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas. Se ha informado que el ácido cafeico posee propiedades antioxidantes en las células normales y propiedades pro-oxidantes en las células cancerosas. Este daño oxidativo del ADN mediado por prooxidantes y su señalización induce la muerte celular por cáncer apoptótico.

El tratamiento con ácido cafeico ha mejorado los niveles de especies reactivas del oxígeno y el potencial alterado de la membrana mitocondrial en las células cancerosas HeLa y ME-180. El aumento de los cambios morfológicos apoptóticos en células tratadas con CA también se ha observado en células Hela y ME-180. Concluye que el ácido cafeico posee un efecto anticancerígeno a través de su propiedad pro-oxidante.

El ácido p-cumárico y ácido clorogénico que también lo encontramos en tomates, zanahorias, piñas, fresas, pimientos verdes, evita la unión del ácido nítrico a las aminas para formar nitrosaminas que son cancerígenas. Elimina el ácido nítrico del organismo. Vinet, Araos, Gentina, Knox y Guzman<sup>48</sup>, en su publicación del estudio del ácido p-cumarico menciona que el ácido p-cumárico es un metabolito vegetal ubicuo con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. En el estudio se evaluó los efectos preventivos de p-CA sobre el deterioro dependiente del endotelio producido por la glucosa alta (HG) (D-glucosa 25 mM) en la aorta torácica de rata aislada.

Ganeshpurkar y Saluja <sup>49</sup>, en su estudio del potencial farmacológico de rutina menciona que La comunidad científica contemporánea ha reconocido actualmente que los flavonoides son una clase única de moléculas terapéuticas debido a sus diversas propiedades. De estos, la rutina, también conocido como vitamina P o rutósido, ha sido explorado para una serie de efectos farmacológicos. Las hojas de té, las manzanas y muchas más poseen rutina como uno de los componentes activos. En la actualidad la rutina ha sido observado por su efecto nutracéutico con propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, hipocolesterolemica.

## **De la citotoxicidad de los extractos fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo**

En los resultados se observó que a medida que se incrementa la concentración de compuesto fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo y del químico 5-FU la toxicidad aumenta. Verificándose también que la citotoxicidad de los extractos fenólicos es mayor que el químico utilizado comercialmente.

Se determinó que la dosis compuestos fenólicos necesaria para reducir in vitro el 50 % de células cancerígenas de mama IC50 fue de 57,54 ug / mL.

Existen diversos trabajos publicados en bases de datos internacionales referido al efecto que tienen los compuestos fenólicos en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas.

Xu <sup>50</sup> en su estudio de los compuestos fenólicos de hongos encontró un IC50 de 0,1 mg/mL después de 48 horas de exposición, en líneas celulares de cáncer de mama y otros.

Sumathy <sup>51</sup> al estudiar las actividades citotóxicas y pro-apoptóticas del extracto de hoja de *Croton bonplandianus* Baill. contra la línea celular de cáncer de pulmón A549, encontró un valor de IC50 de 15,68 ug/mL.

Maznah et al.<sup>52</sup> estudió las propiedades anticancerígenas y contenido fenólico de extractos preparados secuencialmente de diferentes partes de plantas medicinales Indígenas de Malasia, encontró un valor de IC50 de 8,51 ug/mL en cáncer de colon.

Yi <sup>53</sup> en su estudio de actividad anticancer de uvas y arándanos en células cancerígenas de hígado encontró un valor de IC50 de 0,5 a 3 ug/mL.

Como podemos observar el valor de IC50 varía de una materia prima a otra esto debido especialmente a su composición en compuestos fenólicos, en el presente trabajo se identificaron ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico y rutina.

También se atribuye la capacidad de inhibición de crecimiento celular a la actividad antioxidante determinado en el presente trabajo y presenta un valor de 75 uM de trolox equivalente/100 mL de extracto. Se sabe además que numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos en el cuerpo humano pueden producir radicales libres centrados en oxígeno y otras especies de oxígeno reactivo como subproductos. La sobreproducción de tales radicales libres puede causar daño oxidativo a las biomoléculas (por ejemplo, lípidos, proteínas, ADN), lo que eventualmente conduce a muchas enfermedades crónicas, tales como aterosclerosis, cáncer, diabetes, envejecimiento y otras enfermedades degenerativas en humanos.<sup>49</sup> Los estudios epidemiológicos han demostrado que muchos de estos compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos poseen actividades antiinflamatorias, antiateroscleróticas, antitumorales, antimutagénicas, anticancerígenas, antibacterianas o antivirales en mayor o menor medida <sup>54,55</sup> . La ingesta de antioxidantes naturales se ha asociado con riesgos reducidos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y otras enfermedades asociadas con el envejecimiento. <sup>56</sup>

Se tiene reportes que una amplia variedad de compuestos bioactivos, especialmente compuestos fenólicos, poseen propiedades biológicas importantes tales como actividades anticancerígenas, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias. Los posibles efectos biológicos de diversos componentes de frutas y verduras sugirieron un mecanismo plausible para efectos protectores, como la reducción del daño oxidativo del ADN o el aumento de la actividad de enzimas capaces de desintoxicar carcinógenos <sup>57,58</sup>

Los ácidos fenólicos son componentes extraídos de las plantas que se encuentran en una amplia gama de alimentos vegetales comúnmente consumidos, como frutas, verduras, cereales, legumbres y bebidas. Las principales funciones de los ácidos fenólicos en las plantas son la pigmentación, el crecimiento, la reproducción y la resistencia a los patógenos.  
59,60

## CONCLUSIONES

1. El solvente metanol al 80% tiene un mejor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos.
2. Los compuestos fenólicos identificados fueron ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico y rutina, en los extractos fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo.
3. Los extractos fenólicos de flores anaranjadas de mastuerzo muestran efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 a diversas concentraciones.
4. Se determinó que la dosis compuestos fenólicos necesaria para reducir in vitro el 50 % de células cancerígenas de mama IC50 fue de 57,54 ug / mL.

## **RECOMENDACIONES**

1. Realizar la separación de los diferentes compuestos fenólicos y realizar las pruebas de citotoxicidad.
2. Se recomienda continuar con el estudio en sistemas in vivo.
3. Determinar la citotoxicidad de otros materiales vegetales de la zona.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú. Vol. 26. 2017.  
Disponible en  
<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2017/21.pdf>.
2. Sociedad Americana Contra El Cáncer. Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia. 2016. Disponible en  
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>
3. Gibbs, J.B. Mechanism –based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*. 2000. 287:1969-72.
4. Hosseini A, Ghorbani A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna J Phytomed*, 2015; 5 (2): 84-97.
5. Nema R, Khare S, Jain P, Pradhan A, Gupta A, Singh D. Natural Products Potential and Scope for Modern Cancer Research. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4, 1270-1277.
6. Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. *Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 721402, 12 pages.

7. Cragg, G.G., Boyd, M.R., Cardellina II, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M. & McCloud, T.G. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US. *Ciba Found Symp.* 1994; 185:178-90
8. Singh G, Passari A, Leo V, Mishra V, Subbarayan S, Singh B, Kumar B, Kumar S. Gupta V, Lalhlenmawia H, Nachimuth S. Evaluation of Phenolic Content Variability along with Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Potential of Selected Traditional Medicinal Plants from India. *Front Plant Sci.* 2016; 7: 407.
9. Asebey, E.: Andes Pharmaceuticals, Inc.: un nuevo modelo para la prospección de la diversidad biológica, en J.M. Feinsilver (ed.), *Biodiversidad, biotecnología y desarrollo sostenible en salud y agricultura: conexiones emergentes*, Publicación científica, N° 560, Washington, D.C, Organización Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). 1996.
10. Boutennoun H., Boussouf L., Rawashdeh A., Al-Qaoud H., Abdelhafez S., Kebieche M., et. al. In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian *Achillea odorata* leaves. 2017; 10, 403–409
11. Pires T, ,Dias M, Barros L, Calhelha R, Alves M, Oliveira B, et al. Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Reseach International.* 2018; Volume 105 (3): 580-588.
12. Kuete V, Efferth T. African Flora Has the Potential to Fight Multidrug Resistance of Cancer. Hindawi Publishing Corporation. 2015. Vol.15. 24

13. Cordero C, Ancizar F, Gutierrez A. Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2002. Volumen 4, Número 1, p. 100-106
14. Diaz A., Rodriguez H. y Scull R. Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. *Rev Cubana Farm [online]*. 2011, vol.45, n.1
15. Da J, and Mumper R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 2010. 15, 7313-7352
16. Arroyo J.; Prashad M.; Vásquez Y.; Li E.; Tomás G. • Actividad citotóxica in Vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria Lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 2005. 22(4)
17. De la Garza J., El cáncer. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2014.México
18. Artigas-Pallarés J., Guitart M., Gabau-Vila E. Bases genéticas de los trastornos del neurodesarrollo. *Rev Neurol*. 2013; 56 (Supl 1): S23-S34
19. Lebeña A. Cáncer, inflamación y depresión: alteraciones conductuales, inmunitarias y neuroquímicas producidas por el desarrollo de melanoma b16 en ratones macho. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad del país Vasco. España , 2017

20. Brandan N., Aguirre Ma., Todaro J., Stoyanoff T., Heitrich M. y García D. Genética del Cancer. Protooncogenes y genes supresores de tumores. 2014. Disponible en: <https://obgin.net/wp-content/uploads/2016/12/Oncogenes-y-Genes-Supresores-de-Tumores.pdf>
21. Croce C. Oncogenes y cancer . N Engl J Med 2008.
22. García R., Ayala P., Perdomo S. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana 2012 Vol 10 nro. 1
23. Boik J. Natural compounds in cancer therapy. Edit. Chairman, Prostate cancer research education foundation 2001 USA
24. Langdon S. Cancer Cell Culture Methods and Protocols. Humana Press Inc. New Jersey USA. 2004
25. Pacualini J. Breast cancer, Prognosis, Treatment, and Prevention. 2008. Healthcare. 2da. Ed. USA. 2008
26. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Registro de cáncer de lima metropolitana. Jefatura institucional - dirección de control de cáncer- departamento de epidemiología y estadística del cáncer. 2016. Vol. 5
27. Sandoval P., Las fronteras del cáncer en Lima Metropolitana. El comercio 15/07/2016
28. Vermerris W, Nicholson R,. Phenolic compound biochemistry. Springer. Netherlands. 2006 87. 564-635
29. Marcus, A. De zarcillos y enredaderas. 2008. Ediciones de la bruja.

30. Espinoza C., Quispe M., Cairampoma J. El mastuerzo. Editorial gráfica y servicios generales. Huancayo, Perú. 2017.
31. Sanchez B. y Reyes C. Metodología y Diseño de la Investigación Científica. Edit. Visión Universitaria. Lima. 2009
32. Zeng Z., Hu X., McClements J., Luo S., Liu Ch., Gong E. and Huang K. Hydrothermal stability of phenolic extracts of brown rice. Food Chemistry. 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.180>
33. Chen J., Sun, H.N., Wang, Y., Wang, S.S., Tao, X.Y., & Sun, A. Stability of apple polyphenols as a function of temperature and pH. International Journal of Food Properties, 2014 . 17(8), 1742-1749.
34. Supo J. Seminarios de Investigación Científica. Seminarios de investigación.com. Disponible en:  
  
<http://seminariosdeinvestigacion.com/sinopsis>
35. Ghimeray, A.K., Sharma, P., Phoutaxay, P., Salitxay, T., Woo, S.H., Park, S.U., & Park, C.H. Far infrared irradiation alters total polyphenol, total flavonoid, antioxidant property and quercetin production in tartary buckwheat sprout powder. Journal of Cereal Science, 2014. 59(2), 167-172
36. Gong, E.S., Luo, S.J., Li, T., Liu, C.M., Zhang, G.W., Chen, J., Zeng, Z.C., & Liu, R.H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of processed brown rice products. Food Chemistry, 2017. 232, 67-78.
37. García, C. Estudio cuantitativo de las plantas medicinales en la reserva de la biosfera “Los volcanes” y la bioactividad de un extracto medicinal, tesis para

optar el título profesional de Bióloga, 2011. Facultad de estudios superiores Zaragoza Universidad nacional autónoma de México.

38. Vuong Q., Sadeqzadeh E., Hirun S, Goldsmith C., Zammitt N., Bowyer M., Sakoff J. , Thorne R., Weidenhofer J. and Scarlett C. Phenolic Compounds, Antioxidant and Anti-Cancer Properties of the Australian Maroon Bush *Scaevola spinescens* (Goodeniaceae) . *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* 2014. 25:28
39. Amol S., Somesh B., Javid I., Partha R. and Debabrata S. Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. *Plant Cell Tiss Organ Cult* . 2017. June.
40. Thaiponga K., Boonprakoba U., Crosbyb K., Cisneros-Zevallo L., Hawkins D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*. 2006. 19 :669–675.
41. Chaudhary S., Subraya K., Sreedhara K., Manjunath M., Anand R., Dnyanoba N. and Haneefa M. Evaluation of antioxidant and anticancer activity of extract and fractions of *Nardostachys jatamansi* DC in breast carcinoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015. 15:50
42. Scherer R. y Godoy H. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. *Capítulo 6:Rev. bras. plantas med.* 2014. Vol 16 Nro. 1
43. Amensour E., Abrini J., Perez-Alvarez J. y Fernandez-López J. Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts *Actividad*

- antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de myrtus. *CyTA – Journal of Food* . 2010. Vol. 8, No. 2, 95–101
44. Aksoy L., Kolay E., Ağılönü Y., Aslan Z and Kargıoğlu M. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi J Biol Sci.*2013. 20(3): 235–239
  45. Posada M., Pineda-Salinas V. y Agudelo-Ochoa F. Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas 2003. Disponible en [http://chocolatecorona.com.co/docs/libro\\_antioxidntes.pdf](http://chocolatecorona.com.co/docs/libro_antioxidntes.pdf).
  46. Zheng W. y Wang S. Antioxidant activity and phenolic compound in selected herbs . *Agricultural and food chemistry* 2001 49 (11) :5165-5170
  47. Kanimoszhi G. y Prasad N. *Coffee in Health and Disease Prevention. Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells.* 2015. Elsevier USA.
  48. Vinet R., Araos P., Genitna JC., Knox M. and Guzman L. p-Coumaric acid reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2014.13 (3): 232 – 237
  49. Ganeshpurkar A. y Saluja A. .The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2017. 25, 149–164

50. Xu T. Anti-cancer effects of phenolic – rich extracts of button mushrooms (*Agaricus bisporus*). Thesis for doctor. The Pennsylvania State University. EEUU. 2015
51. Sumathy A., Bhavana J, and Kalaivani MK. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. against lung cancer cell line A549. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2016. Vol. 54, 379-385
52. Maznah I. Gururaj B., Shahid I.and Hadiza A. Anticancer Properties and Phenolic Contents of Sequentially Prepared Extracts from Different Parts of Selected Medicinal Plants Indigenous to Malaysia. *Molecules*. 2012. 17, 5745-5756
53. Yi W. Evaluation of anticancer activities of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes. 2005. Thesis for doctor. Georgia University. EEUU.
54. Poulson, H.E., Prieme, H., Loft, S.,. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention* 1998. 7 (1), 9–16.
55. Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*. 2000. 36 (10), 1235–1247.

56. Sala, A., Recio, M.D., Giner, R.M., Manez, S., Tournier, H., Schinella, G., Rios, J.L., Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2002. 54 (3), 365–371.
57. Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X.Z., Liu, R.H., Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002. 50 (25), 7449–7454.
58. Brown EM, Gill CIR, McDougall GJ, Stewart D Mechanisms underlying the anti-proliferative effects of berry components in vitro models of colon cancer. *CPB* 2012. 13: 200-209.
59. Senawong T, Khaopha S, Misuna S, Komaikul J, Senawong G, et al. Phenolic acid composition and anticancer activity against human cancer cell lines of the commercially available fermentation products of *Houttuynia cordata*. *Science Asia*. 2014. 40: 420.
60. Farah A, Donangelo CM Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2006. 18: 23-36.

# **ANEXOS**







Anexo 2. Curva estándar de ácido gálico a 755 nm.

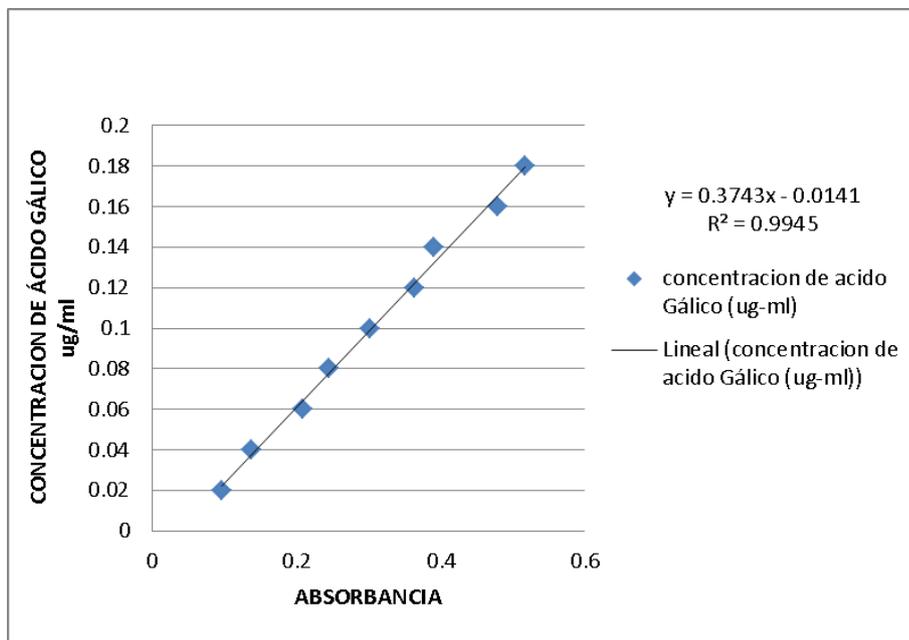


Figura : Curva estándar de ácido gálico a 755 nm

Obteniendo la siguiente ecuación:

$$y = 0.3743 x - 0.0141 \quad R^2 = 0.9887$$

Dónde:

Y: La densidad óptica o absorbancia leída de la muestra

X: El valor de fenoles totales expresados en equivalente de ug de AG/mL de extracto metanólico