Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Compuestos bioactivos de Tiquilia paronychioides A.T. Richardson "flor de arena" como agentes quimiopreventivos sobre carcinoma hepatocelular *in vivo* y actividad antitumoral *in vitro* en células tumorales

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Felix Eduardo CASTILLO MORALES

ASESOR

Dr. Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Castillo F. Compuestos bioactivos de Tiquilia paronychioides A.T. Richardson "flor de arena" como agentes quimiopreventivos sobre carcinoma hepatocelular *in vivo* y actividad antitumoral *in vitro* en células tumorales [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Felix Eduardo Castillo Morales
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73028782
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0007-0443-3195
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dr. Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25455526
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8012-967X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10223170
Miembro Del Jurado 1	
Nombres y apellidos	Dr. Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44789288
Miembro Del Jurado 2	
Nombres y apellidos	Dr. Davis Alberto Mejia Pinedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41490146
Datos de investigación	

Línea de investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico
Grupo de investigación	Recursos Natuales
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA). Concurso E073-2024-01- "Tesis de Pregrado y Postgrado en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica". N°PE501089694-2024.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio; (Instituto de investigación en Ciencias farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM) Jr. Puno 1002, Jardín Botánico- Lima 1- Perú. Longitud: 12.0558007 Latitud: 77.0257352,17
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024 - 2026
URL de disciplinas OCDE	Química orgánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Compuestos bioactivos de Tiquilia paronychioides A.T. Richardson "flor de arena" como agentes quimiopreventivos sobre carcinoma hepatocelular *in vivo* y actividad antitumoral *in vitro* en células tumorales"

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

FELIX EDUARDO CASTILLO MORALES

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

DIECINUEVE (19) APROBADO CON MAXIMO HONORES

de conformidad con el Art. 14.° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 23 de octubre de 2026.

Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Presidenta

Dr. Oscar Herrera Calderón
Miembro

Dr. Davis Alberto Mejia Pinedo
Miembro

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Américo Jorge Castro Luna en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal R.D. N° 000009-2025-D-FFB/UNMSM y ratificado por el DICTAMEN N° 060-FFB-EPFB-2026 de la tesis cuyo título es **"Compuestos bioactivos de *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson "flor de arena" como agentes quimiopreventivos sobre carcinoma hepatocelular *in vivo* y actividad antitumoral *in vitro* en células tumorales"**, presentado por el **bachiller Felix Eduardo Castillo Morales**, para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, **CERTIFICO** que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **11 % de similitud**, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Químico Farmacéutico.

Lima, 21 de octubre de 2026

Firma del asesor: 

Nombres y apellidos del asesor: Américo Jorge Castro Luna

DNI: 254555526

La vigencia del presente certificado corresponde a un periodo de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

Este trabajo no solo marca el final de un ciclo, sino la manifestación de mi compromiso con la ciencia y la docencia, convirtiéndose en el pilar sobre el cual erijo mi trayectoria profesional.

Asimismo, refleja el esfuerzo y la dedicación invertidos en este camino, el cual no habría podido recorrer solo; por ello, expreso mi más profundo reconocimiento a quienes me acompañaron en cada paso.

A mi padre, Felix Castillo, y a mi madre, Nelly Morales, por inculcarme los principios esenciales para alcanzar este momento y por su respaldo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi hermana, Erika Castillo, por ser un ejemplo a seguir y por motivarme constantemente a superarme.

Al Dr. Américo Castro y a la Dra. Norma Ramos, por trascender el ámbito académico para enseñarme, con su ejemplo, el valor de la calidad humana por encima de la excelencia profesional.

A Sofía Huacho, mi apoyo incondicional en cada etapa de este camino, tanto en el plano personal como en el profesional.

A mis familiares y amigos más cercanos, por su aliento diario, su alegría sincera por mis logros y por ser una fuente constante de motivación.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Américo Castro, por brindarme la confianza y motivación para llevar este proyecto adelante, así como por su invaluable orientación, transmisión de conocimiento y calidad humana.

A la Dra. Norma Ramos, por su apoyo constante y sus acertados consejos, los cuales fueron de gran ayuda a lo largo de todo este proceso.

A los investigadores en formación del Grupo de Investigación Recursos Naturales, por su asistencia técnica, disposición y colaboración durante las distintas etapas de la investigación. Su compromiso incondicional y su vocación por la investigación demuestran su calidad humana y anticipan el brillante futuro profesional que les espera.

A la Dra. Carayhua y a la Dra. Balbín, por su valiosa colaboración en los procesos críticos de análisis de resultados.

Al Dr. Vaisberg, por su colaboración en la disponibilidad y manejo de las líneas celulares utilizadas en los ensayos experimentales.

Al Dr. Campos, al Mg. Orellana y al Mg. Taquiri, por su valioso apoyo y disposición durante la etapa de recolección de la muestra vegetal, contribuyendo de manera significativa al desarrollo de esta investigación.

Asimismo, expreso mi gratitud a las entidades correspondientes, dado que este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) en el marco del Concurso E073-2024-01- “Tesis de Pregrado y Postgrado en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica” – Contrato N°PE501089694-2024.

ÍNDICE

DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTO iv
ÍNDICE v
LISTA DE FIGURAS viii
LISTA DE TABLAS xi
LISTA DE ANEXOS xiii
ABREVIATURAS xv
RESUMEN xvi
ABSTRACT xvii
I. INTRODUCCIÓN 1
I.1. Planteamiento del problema: 1
I.1.1. Situación problemática 1
I.1.2. Planteamiento del problema 3
I.2. Objetivos 3
I.2.1. Objetivo general 3
I.2.2. Objetivos específicos 3
I.3. Importancia y alcance de la investigación 4
I.4. Limitaciones de la investigación 5
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 6
II.1. Marco teórico 6
II.1.1. *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” 6
II.1.2. Compuestos bioactivos con potencial antitumoral 9
II.1.3. Estrés oxidativo y actividad antioxidante 18
II.1.4. Cáncer y quimioprevención 30
II.2. Antecedentes del estudio 34
II.3. Bases teóricas 37
II.3.1. Ensayos químicos *in vitro* para actividad antioxidante 37
II.3.2. Modelos celulares *in vitro* para evaluación antitumoral 41
II.3.3. Modelos biológicos *in vivo* para carcinoma hepatocelular 46
II.4. Glosario de términos 51
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 53
III.1. Hipótesis 53
III.2. Variables 53

III.2.1. Variable independiente 53
III.2.2. Variable dependiente 53
III.3. Operacionalización de variables 54
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 55
IV.1. Área de estudio 55
IV.2. Tipo y diseño de investigación 55
IV.3. Población y muestra 55
IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información 56
IV.4.1. Recolecta e identificación taxonómica 56
IV.4.2. Procesamiento de la muestra 56
IV.4.3. Obtención del extracto hidroalcohólico 56
IV.4.4. Tamizaje fitoquímico 56
IV.4.5. Determinación de la composición química por HPLC 57
IV.4.6. Determinación de polifenoles 58
IV.4.7. Determinación de flavonoides 58
IV.4.8. Determinación de la actividad antioxidante método de secuestramiento del radical libre DPPH• 59
IV.4.9. Determinación de actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+ 60
IV.4.10. Determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro FRAP 61
IV.4.11. Evaluación del potencial quimiopreventivo *in vivo* 62
IV.4.12. Evaluación del efecto citotóxico *in vitro* 64
IV.5. Análisis estadístico 65
V. RESULTADOS 66
V.1. Obtención del extracto hidroalcohólico 66
V.2. Tamizaje fitoquímico 66
V.3. Determinación de la composición química por HPLC 68
V.4. Determinación de polifenoles 70
V.5. Determinación de flavonoides 71
V.6. Determinación de la actividad antioxidante método de secuestramiento del radical libre DPPH• 71
V.7. Determinación de actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+ 73
V.8. Determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro FRAP 74

V.9. Evaluación del efecto citotóxico in vitro 75
V.10. Evaluación del potencial quimiopreventivo in vivo 78
VI. DISCUSIÓN 95
VII. CONCLUSIONES 113
VIII. RECOMENDACIONES 114
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 115
X. ANEXOS 141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía *in situ* de la inflorescencia de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”, Ica-Perú (Fuente propia). 7

Figura 2. Fotografía *in situ* de la inflorescencia de la *Tiquilia dichotoma* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”, Ica-Perú (Fuente propia)..... 7

Figura 3. Distribución geográfica de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” en el Perú (16). 8

Figura 4. Clasificación de los polifenoles según su estructura química (26). .. 11

Figura 5. Clasificación de los flavonoides según su estructura química (23). . 12

Figura 6. Clasificación de los terpenoides según su estructura química (26).. 13

Figura 7. Clasificación de los alcaloides según su estructura química (26). ... 13

Figura 8. Patogénesis de la enfermedad isquémica coronaria y la implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (33). 19

Figura 9. Implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca (33). 20

Figura 10. Implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la fisiopatología del daño renal (33). 21

Figura 11. Representación gráfica del estrés oxidativo producto de un desbalance entre antioxidantes y radicales libres (36). 25

Figura 12. Mecanismos de neutralización de los flavonoides como antioxidantes no enzimáticos. **A** Eliminación ROS; **B** Activación de enzimas antioxidantes; **C** Actividad quelante de metales; **D** Aumento de los niveles de radicales α-tocoferilo; **E** Inhibición de la NAPDH oxidasa; **F** Eliminación de NO•; **G** Aumento de los niveles de ácido úrico; **H** Aumento de la actividad antioxidantes de antioxidantes de bajo peso molecular (23). 27

Figura 13. Mecanismos de neutralización de radicales libres de antioxidantes enzimáticos. ROS, especies reactivas de oxígeno; GPX, sistema glutatión peroxidasas; SOD, superóxido dismutasa; MPO, mieloperoxidasa; PRX, peroxiredoxinas (33). 29

Figura 14. Comparación entre una división celular normal (a) y una división celular maligna (b) con la participación de genes supresores de tumores y proto-oncogenes (41). 31

Figura 15. Diagrama de diversos procesos de la carcinogénesis y su posible inhibición con compuestos bioactivos de especies vegetales (49). 34

Figura 16. Esquema de algunos métodos para la determinación de la actividad antioxidante: DPPH•, ABTS•+, FRAP y ORAC (71). 40

Figura 17. Fundamento del del ensayo MTT para viabilidad celular. **A** Esquema de la reacción de reducción del MTT a formazán; **B** Espectros de absorción óptica de MTT y formazán (83). 44

Figura 18. Estructura química de la sulforodamina B (SRB) (86). 45

Figura 19. Vías de activación metabólica de algunas nitrosaminas para la formación de aductos de ADN. **A** α-hidroxilación de la Dimetilnitrosamina (DMN); **B** α y β -hidroxilación de la Dietilnitrosamina (DEN) (91). 47

Figura 20. Cromatograma del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” (0–20 min)..... 69

Figura 21. Cromatograma del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” (20–40 min)..... 69

Figura 22. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente al radical DPPH•. 72

Figura 23. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente al catión radical ABTS•+..... 74

Figura 24. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante el poder reductor férrico.. 75

Figura 25. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente a líneas celulares. 77

Figura 26. Niveles séricos de GOT y GPT en los grupos experimentales. *p<0,05 vs G1. 79

Figura 27. Niveles séricos de proteínas totales, albuminas y globulinas en los grupos experimentales. 80

Figura 28. Nivel sérico de FA en los grupos experimentales. 81

Figura 29. Nivel sérico de GGT en los grupos experimentales. 82

Figura 30. Niveles séricos de Bilirrubina total, directa e indirecta en los grupos experimentales..... 83

Figura 31. Actividad enzimática de SOD y CAT en los grupos experimentales. *p<0,05 vs G1. 84

Figura 32. Capacidad antioxidante total (TAC) en los grupos experimentales. 84

Figura 33. Niveles del Índice hepático en los grupos experimentales. 85

Figura 34. Evolución de la ganancia de peso corporal (%) en los grupos experimentales..... 86

Figura 35. Ganancia de peso corporal (%) al finalizar el experimento en los grupos experimentales. 86

Figura 36. Puntaje total de daño hepático del Score histopatológico en los grupos experimentales. *p<0,001 vs G1; **p<0,001 vs G2; [a]p<0,01 vs G1; [b]p<0,05 vs G2. 88

Figura 37. Lesiones histopatológicas observadas en los grupos experimentales **A.** Células normales **B.** Necrosis y degeneración balonante **C.** Células displásicas **D.** Nódulo regenerativo. 89

Figura 38. Mapa de calor de la correlación entre los parámetros bioquímicos. *p<0,05; **p<0,05. 92

Figura 39. Perfil integrado de parámetros bioquímicos significativos como indicador de hepatoprotección en los grupos experimentales. 93

Figura 40. Comparación del área del perfil integrado de parámetros significativos entre los grupos experimentales. 94

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1. Compuestos bioactivos vegetales: origen, función y clasificación química. 15

Tabla N° 2. Tipos de radicales libres, su origen y sus efectos en sistemas biológicos. 23

Tabla N° 3. Comparación entre los antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos. 30

Tabla N° 4. Operacionalización de variables de la investigación. 54

Tabla N° 5. Ensayo de cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. 58

Tabla N° 6. Ensayo de cuantificación de flavonoides mediante la formación del complejo aluminio-flavonoide. 59

Tabla N° 7. Ensayo de determinación de la actividad antioxidante método de secuestramiento del radical libre DPPH•. 60

Tabla N° 8. Ensayo de determinación de actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+. 61

Tabla N° 9. Ensayo de determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP). 62

Tabla N° 10. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 66

Tabla N° 11. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 66

Tabla N° 12. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 68

Tabla N° 13. Identificación y cuantificación de compuestos mediante HPLC del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 70

Tabla N° 14. Cuantificación de polifenoles del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 71

Tabla N° 15. Cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 71

Tabla N° 16. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente al radical libre de DPPH•. 72

Tabla N° 17. Actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente al catión radical ABTS•+. 73

Tabla N° 18. Actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante el poder reductor férrico. 75

Tabla N° 19. Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente a líneas celulares. 76

Tabla N° 20. Resumen de la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente a líneas celulares. 78

Tabla N° 21. Parámetros bioquímicos de enzimas, componentes séricos e indicadores de daño hepático en los grupos experimentales. 91

Tabla N° 22. Curva estándar del Ácido gálico para cuantificación de polifenoles. 156

Tabla N° 23. Curva estándar de la Quercetina para cuantificación de flavonoides. 159

Tabla N° 24. Curva estándar del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH•. 162

Tabla N° 25. Curva estándar del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del catión radical ABTS•+. 165

Tabla N° 26. Curva estándar del Ácido ascórbico para determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP). 168

Tabla N° 27. Curva estándar del 5FU para determinación de la actividad citotóxica frente líneas celulares. 170

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Herborizado de la especie vegetal *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” (8). 141

Anexo 2. Fotografía de la recolecta de la *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” en estado silvestre. 142

Anexo 3. Certificado de Clasificación taxonómica de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”. 143

Anexo 4. Hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” secas y molidas. 144

Anexo 5. Extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”. 145

Anexo 6. Certificado de aprobación del Comité de ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM. 146

Anexo 7. Formato de Score histopatológico de Daño hepático. 147

Anexo 8. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” 148

Anexo 9. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”. 149

Anexo 10. Curva de calibración de Ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC. 150

Anexo 11. Curva de calibración de Ácido clorogénico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC. 151

Anexo 12. Curva de calibración de Ácido cafeico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC. 152

Anexo 13. Curva de calibración de Ácido rosmarínico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC. 153

Anexo 14. Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC. 154

Anexo 15. Reacción colorimétrica para cuantificación de polifenoles del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 155

Anexo 16. Datos espectrofotométricos del estándar Ácido Gálico. 156

Anexo 17. Gráfica de dispersión del Ácido gálico para cuantificación de polifenoles. 157

Anexo 18. Reacción colorimétrica para cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 158

Anexo 19. Datos espectrofotométricos del estándar de Quercetina. 159

Anexo 20. Gráfica de dispersión de la Quercetina para cuantificación de flavonoides. 160

Anexo 21. Reacción colorimétrica para determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH• del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 161

Anexo 22. Datos espectrofotométricos del estándar Trolox® para el método del radical libre DPPH•. 162

Anexo 23. Gráfica de dispersión del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH•. 163

Anexo 24. Reacción colorimétrica para determinación de la actividad antioxidante por el método del catión radical ABTS•+ del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. ..164

Anexo 25. Datos espectrofotométricos del Trolox® para el método del catión radical ABTS•+. 165

Anexo 26. Gráfica de dispersión del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del catión radical ABTS•+. 166

Anexo 27. Preparación de batería de reacción para determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP) del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. ..167

Anexo 28. Datos espectrofotométricos del Ácido ascórbico para el método de reducción de hierro (FRAP). 168

Anexo 29. Gráfica de dispersión del Ácido ascórbico para determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP). 169

Anexo 30. Datos espectrofotométricos del 5FU para el método de citotoxicidad. 170

Anexo 31. Gráfica de dispersión del 5FU para determinación de la actividad citotóxica frente a líneas celulares. 171

Anexo 32. Reacción colorimétrica para determinación de la actividad citotóxica frente a células tumorales humanas del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. 172

ABREVIATURAS

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
TAC	Capacidad antioxidante total
HCC	Carcinoma hepatocelular
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
DE	Desviación estándar
CV	Coeficiente de variación
HPLC-DAD	Cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado con arreglo de diodos
R.T.	Tiempo de retención
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ABTS•+	2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
FRAP	Poder antioxidante reductor del hierro
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox
AAEAC	Equivalentes de ácido ascórbico
SRB	Sulforrodamina B
DEN	Dietilnitrosamina

RESUMEN

Tiquilia paronychioides (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” es una planta medicinal utilizada tradicionalmente en los centros occidentales del Perú y caracterizada por la presencia de diversos compuestos bioactivos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de polifenoles y flavonoides, la actividad antioxidante y los efectos quimiopreventivo y citotóxico del extracto hidroalcohólico frente al carcinoma hepatocelular. La composición química se determinó mediante HPLC-DAD; los polifenoles mediante Folin-Ciocalteu; los flavonoides mediante formación de complejos con tricloruro de aluminio; la actividad antioxidante mediante DPPH•, ABTS•+ y FRAP; el efecto quimiopreventivo mediante inducción de carcinoma hepatocelular con dietilnitrosamina en ratas *Rattus*; y el efecto citotóxico mediante sulforodamina B. El análisis cromatográfico identificó ácido clorogénico (0,785 mg/g de extracto), ácido gálico (0,385 mg/g), ácido rosmarínico (0,322 mg/g), quercetina (0,256 mg/g) y ácido cafeico (0,044 mg/g). El contenido de polifenoles fue de 1173,53 mg EAG/g de extracto y el de flavonoides de 16,17 mg EQ/g. La actividad antioxidante alcanzó 41,63 mg Trolox/g de extracto para DPPH•; 108,74 mg Trolox/g para ABTS•+ y 60,04 mg AA/g para FRAP. No se detectó citotoxicidad a concentraciones inferiores a 250 µg/mL en las líneas celulares evaluadas. En el modelo *in vivo*, la dosis de 300 mg/kg mostró una disminución significativa de los signos preneoplásicos. Los resultados evidencian un perfil fitoquímico y antioxidante relevante y respaldan el potencial quimiopreventivo del extracto de *T. paronychioides*.

Palabras clave: *Boraginaceae; Tiquilia, HPLC; Antioxidante; Quimiopreventivo.*

ABSTRACT

Tiquilia paronychioides A.T. Richardson, known as “flor de arena,” is a medicinal plant traditionally used in central and western Peru and characterized by the presence of various bioactive compounds. The objective of this study was to evaluate the polyphenol and flavonoid content, antioxidant activity, and chemopreventive and cytotoxic effects of the hydroalcoholic extract against hepatocellular carcinoma. The chemical composition was determined by HPLC-DAD; polyphenols were measured using the Folin-Ciocalteu method; flavonoids by complex formation with aluminum trichloride; antioxidant activity by DPPH•, ABTS•+, and FRAP assays; the chemopreventive effect by inducing hepatocellular carcinoma with diethylnitrosamine in *Rattus* rats; and the cytotoxic effect by sulforhodamine B. Chromatographic analysis identified chlorogenic acid (0.785 mg/g of extract), gallic acid (0.385 mg/g), rosmarinic acid (0.322 mg/g), quercetin (0.256 mg/g), and caffeic acid (0.044 mg/g). The polyphenol content was 1,173.53 mg EAG/g of extract, and the flavonoid content was 16.17 mg EQ/g. Antioxidant activity was 41.63 mg Trolox/g of extract for DPPH•; 108.74 mg Trolox/g for ABTS•+; and 60.04 mg AA/g for FRAP. No cytotoxicity was detected at concentrations below 250 µg/mL in the cell lines evaluated. In the *in vivo* model, the 300 mg/kg dose showed a significant reduction in preneoplastic signs. The results demonstrate a significant phytochemical and antioxidant profile and support the chemopreventive potential of *T. paronychioides extract*.

Keywords: *Boraginaceae, Tiquilia, HPLC, Antioxidant, Chemopreventive.*

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Planteamiento del problema:

I.1.1. Situación problemática

El cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad en el Perú, donde aproximadamente el 20 % de las defunciones se relacionan con esta enfermedad. Entre las neoplasias más frecuentes destacan el cáncer de estómago, pulmón, próstata y colon. Según estimaciones de GLOBOCAN 2020, la incidencia nacional alcanzó cerca de 173,8 casos nuevos por cada 100 000 habitantes (1; 2).

Dentro de este panorama, el carcinoma hepatocelular (CHC) adquiere especial relevancia. En el Perú, representa el tercer cáncer digestivo más común y presenta una elevada tasa de mortalidad, estimada en 17,7 por 100 000 habitantes (2; 3). A diferencia de lo reportado en la mayoría de los países, donde el CHC se manifiesta principalmente en adultos mayores, en el Perú se ha descrito una distribución bimodal de la enfermedad. Este patrón incluye no solo a pacientes de edad avanzada, sino también a un grupo considerable de jóvenes con una media de 25,5 años al momento del diagnóstico. Este comportamiento epidemiológico atípico sugiere la presencia de factores etiológicos propios de la población peruana, posiblemente vinculados a determinantes genéticos, ambientales o exposiciones tempranas a agentes carcinogénicos (4).

Asimismo, el país presenta uno de los porcentajes más altos de CHC en hígados no cirróticos en Sudamérica, alcanzando el 31 % de los casos, cifra superior a la de Ecuador (28 %) y Chile (26 %). Estos datos respaldan la hipótesis de mecanismos de carcinogénesis diferenciales y posiblemente endémicos (5). El impacto en salud pública es considerable; el Hospital Nacional Arzobispo Loayza reportó aproximadamente 9 600 casos anuales de enfermedades hepáticas crónicas y ha realizado más de 6 000 elastografías transitorias desde 2013, lo que refleja la creciente necesidad de

diagnóstico temprano de cirrosis, quinta causa de muerte en el país (6; 7).

Entre los factores de riesgo más relevantes destacan las infecciones virales, en particular la hepatitis B, que afecta a más de 257 millones de personas a nivel mundial. A ello se suman determinantes como la desnutrición, el consumo de alcohol y drogas, la exposición a xenobióticos y las enfermedades metabólicas, todos ellos vinculados al desarrollo de cirrosis y CHC (8; 9).

En este contexto, la medicina tradicional y el uso de especies vegetales nativas emergen como alternativas complementarias en la prevención de patologías hepáticas. Diversos compuestos bioactivos, como el ácido cafeico, ácido rosmarínico, quercetina y ácido ursólico, han demostrado efectos antioxidantes y hepatoprotectores. La Silimarina, derivada de *Silybum marianum*, constituye un ejemplo validado, lo que refuerza la importancia de identificar nuevas especies con potencial terapéutico (8,9).

Particularmente, la especie peruana *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson, conocida como “flor de arena”, resulta de interés. Aunque existen estudios etnobotánicos que documentan su uso tradicional, la evidencia científica *in vivo* e *in vitro* sobre sus compuestos bioactivos y su acción específica frente al CHC es aún escasa. La mayoría de las investigaciones se han centrado en otras plantas hepatoprotectoras, dejando un vacío de conocimiento sobre el potencial farmacológico de esta especie (10; 11).

Finalmente, si bien el papel de los compuestos antioxidantes en la quimioprevención del cáncer es ampliamente reconocido, aún se carece de estudios preclínicos que validen su eficacia y mecanismos de acción en modelos experimentales. Esta limitación justifica la necesidad de investigaciones que integren el análisis fitoquímico, la evaluación de la actividad antioxidante y la validación biológica en modelos animales, con el fin de explorar el potencial quimiopreventivo y terapéutico de recursos naturales frente al carcinoma hepatocelular (12).

El objetivo principal es evaluar el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” y el contenido de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y efecto quimiopreventivo y citotóxico contra células cancerígenas

I.1.2. Planteamiento del problema

¿Tienen un potencial quimiopreventivo y terapéutico contra el carcinoma hepatocelular los compuestos bioactivos de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”?

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Evaluar el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” y el contenido de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y efecto quimiopreventivo y citotóxico contra células cancerígenas.

I.2.2. Objetivos específicos

1) Determinar la composición química del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” mediante un análisis por HPLC.
2) Determinar el contenido de compuestos bioactivos *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”, mediante el método de Folin-Ciocalteu y formación de complejos de flavonoides con tricloruro de aluminio respectivamente.
3) Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” mediante los métodos DPPH•, ABTS•+, FRAP.
4) Determinar el efecto quimiopreventivo *in vivo* del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” mediante la inducción de carcinoma hepatocelular a ratas *Rattus* con dietilnitrosamina.

5) Determinar el efecto citotóxico *in vitro* extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” en células cancerígenas humanas mediante el método de sulforodamina B.

I.3. Importancia y alcance de la investigación

El CHC constituye una de las principales complicaciones derivadas de enfermedades hepáticas crónicas, lo que resalta la necesidad de estrategias orientadas no solo a su tratamiento, sino también a su prevención. En el contexto peruano, donde factores como la dieta, el consumo de alcohol, la exposición a xenobióticos y prácticas poco saludables inciden negativamente en la salud hepática, surge la necesidad de explorar alternativas seguras y accesibles para la población. En este escenario, el empleo de plantas nativas en forma de infusiones u otros preparados tradicionales se perfila como una opción prometedora para reforzar la prevención de enfermedades hepáticas.

En este marco, la investigación de especies autóctonas adquiere especial relevancia. *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson, conocida popularmente como “flor de arena” y perteneciente a la familia Boraginaceae, ha sido utilizada tradicionalmente en la medicina popular y contiene metabolitos secundarios de interés farmacológico, como ácido cafeico, ácido rosmarínico, flavonoides como la quercetina y triterpenoides como el ácido ursólico. Estos compuestos han demostrado propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras, lo que justifica la necesidad de estudios experimentales que permitan validar científicamente su potencial quimiopreventivo y terapéutico.

Este trabajo busca generar un aporte innovador mediante la caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico de “flor de arena” y la evaluación de su actividad antioxidante, así como de su efecto quimiopreventivo frente al carcinoma hepatocelular en modelos experimentales. A largo plazo, se pretende considerar esta especie como una fuente natural de compuestos bioactivos con potencial aplicación farmacéutica.

Desde el punto de vista metodológico, el estudio se desarrollará con protocolos experimentales estandarizados y métodos analíticos modernos, lo que garantizará la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados. Finalmente, en el plano social, la validación científica del uso de “flor de arena” no solo contribuirá al reconocimiento del valor terapéutico de la biodiversidad peruana, sino que también fortalecerá la integración del conocimiento tradicional con la investigación científica, promoviendo un sistema de salud más inclusivo, sostenible y accesible para las comunidades.

I.4. Limitaciones de la investigación

El presente estudio tiene ciertas limitaciones tanto en las pruebas *in vitro* como en las pruebas *in vivo*, sin embargo, los resultados obtenidos son un gran avance en lo que respecta a la especie *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” debido a su escaza investigación. En primer lugar, una importante limitación del estudio sería en la determinación de la composición química mediante HPLC, ya que se usaron estándares de referencia propios de la familia Boraginaceae (Quercetina, Ácido rosmarínico, Ácido cafeico, etc), por lo tanto, si bien estos compuestos polifenólicos se encuentran en la especie *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”, estos no son la totalidad de los compuestos bioactivos que pueda contener esta especie y los resultados se expresaron en pesos equivalentes a los estándares usados. Añadido a esto, una limitación en el modelo *in vivo* podría ser el tiempo de vida y sexo de los individuos, si bien la dietilnitrosamina es el agente carcinógeno más similar respecto a la fisiopatología en el carcinoma hepatocelular en humanos, el tiempo del estudio (4 meses aprox.) y el sexo de los individuos (machos) puede ocasionar sesgos como la aparición de cáncer espontaneo o la predominancia de la enfermedad en un sexo en específico, respectivamente. Por último, es importante resaltar la limitación del estudio en no comprobar la actividad antitumoral en células de cáncer de hígado humanas, si bien las pruebas *in vivo* realizadas en ratas arrojaron resultados prometedores, el uso de líneas celulares humanas de carcinoma hepatocelular hubiera podido

reforzar aún más la hipótesis del estudio, la difícil técnica de mantenimiento de la línea HepG2 debido a su factor vírico (el virus de la hepatitis es el factor etiológico del carcinoma hepatocelular en esta línea celular) impidió que se pudiera realizar la actividad antitumoral del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson "flor de arena", sin embargo, se pudo comprobar dicha actividad para las líneas 3T3, H460, DU145, MCF-7, M-14 y HT-29.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson "flor de arena"

- **Taxonomía y morfología botánica**

La especie fanerógama *Tiquilia paronychioides* forma parte de la familia Boraginaceae. Originalmente se clasificó como *Coldenia paronychioides* Phil., pero Richardson la trasladó al género Tiquilia en 1977, en el marco de una revisión de especies xerófitas de Sudamérica (13). Es un subarbusto postrado que alcanza una longitud de 30–60 cm, con tallos de color marrón y recubiertos con finos tricomas adpresos. Las hojas son de tamaño reducido (3–6 mm de longitud), opuestas, de tonalidad gris-verde, pubescentes y de forma oblonga-lanceolada (13; 14). Las flores, con una corola de color blanco o lilácea, aparecen en solitario en las axilas de la planta; su fruto es una cápsula que se desglosa en cuatro núcleos negros y granulados, la descripción botánica de la especie vegetal se puede visualizar en la figura 1 (Ver Anexo 1). Así mismo, otra especie del género Tiquilia que comparte muchas similitudes en la morfología con la *Tiquilia paronychioides* es la *Tiquilia dichotoma*, la cual presenta como distintivo un crecimiento perenne y corola de color lilácea, la descripción botánica de la especie vegetal se puede visualizar en la figura 2 (13).



Figura 1. Fotografía *in situ* de la inflorescencia de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”, Ica-Perú (Fuente propia).



Figura 2. Fotografía *in situ* de la inflorescencia de la *Tiquilia dichotoma* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”, Ica-Perú (Fuente propia).

- **Distribución geográfica**

Esta especie es nativa del oeste de Sudamérica y puede ser encontrada desde Ecuador hasta el norte de Chile, incluyendo regiones áridas del Perú como La Libertad, Lambayeque, Lima, Ica y

Tacna (6; 7). Se desarrolla en pedregosos o arenosos entre 30 y 500 msnm, usualmente en climas cálido-secos con temperaturas promedio de 15 a 30 °C. Frecuentemente se asocia con otras especies xerófitas, como cactáceas y gramíneas silvestres, en la figura 3 se puede visualizar la distribución de la especie vegetal (15).

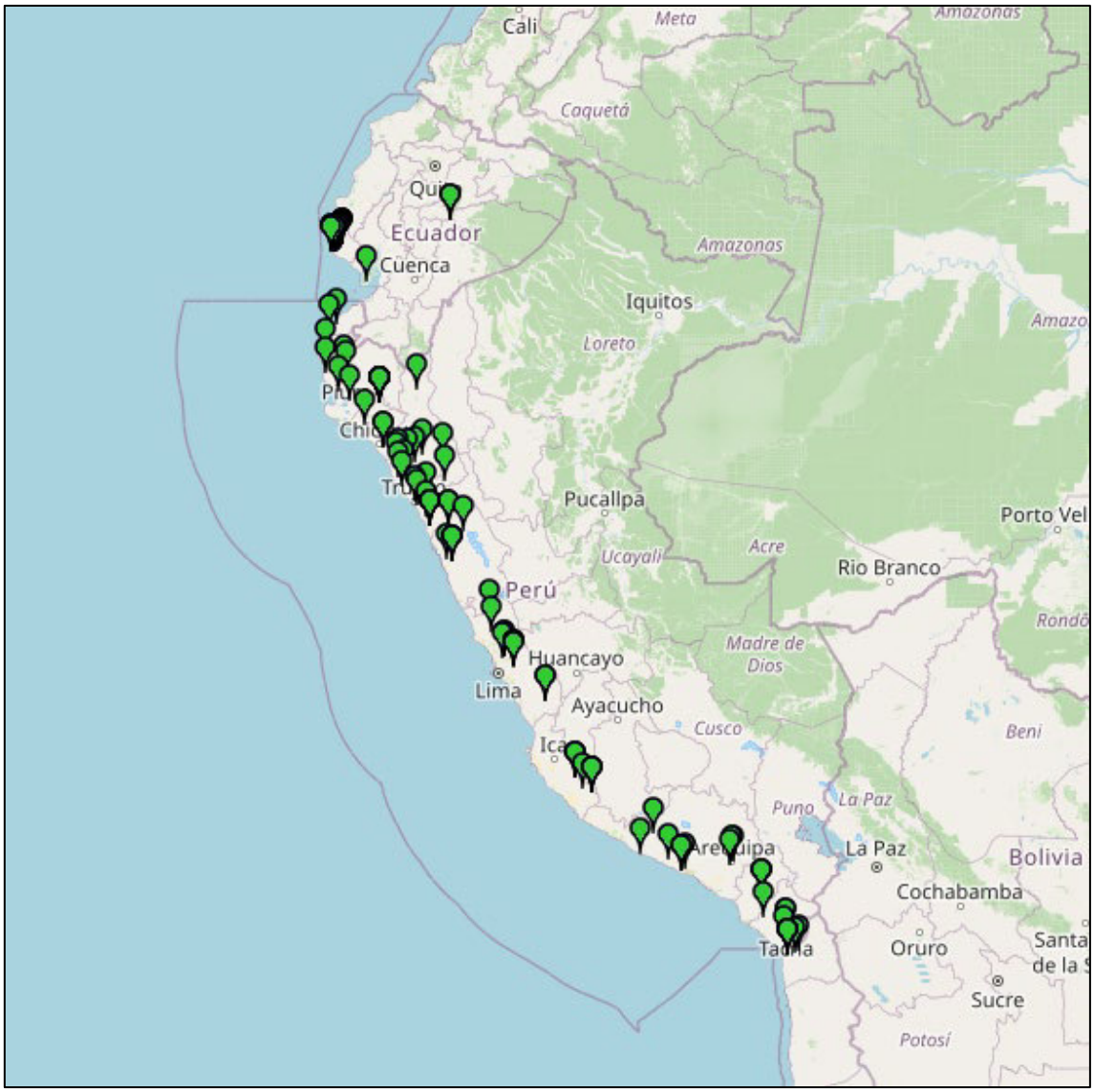


Figura 3. Distribución geográfica de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson "flor de arena" en el Perú (16).

- **Usos tradicionales en medicina popular**

En el Perú, *Tiquilia paronychioides* es conocida como "flor de arena", "paja de lagartija" o "hierba blanca" y es ampliamente utilizada por comunidades rurales de la costa norte y sur como planta medicinal (14; 16). Tradicionalmente, se emplean infusiones o decocciones de

la planta seca para tratar dolencias renales, hepáticas, prostáticas y del tracto urinario. Además, es valorada por su potencial antiinflamatorio, hepatoprotector, sedante y, en algunos casos, antitumoral (14; 17). En ciertas localidades, se usa como “depurativo de la sangre” o para aliviar síntomas de la bronquitis y el asma (17).

- **Composición química**

Los estudios fitoquímicos preliminares han identificado la presencia de compuestos fenólicos (como flavonoides y ácidos fenólicos), triterpenos, esteroles y alcaloides en extractos acuosos y hidroalcohólicos de la planta (15; 18). Destacan compuestos como el ácido rosmarínico, rutina y kaempferol, reconocidos por su actividad antioxidante y citotóxica frente a líneas celulares tumorales en otras especies vegetales (14; 18). La alta concentración de flavonoides podría explicar su uso tradicional como antiinflamatorio y antitumoral.

II.1.2. Compuestos bioactivos con potencial antitumoral

- **Definición**

Los compuestos bioactivos con potencial antitumoral son sustancias naturales, principalmente de origen vegetal, que poseen la capacidad de modular procesos biológicos relacionados con el crecimiento y la proliferación celular, así como de inhibir mecanismos asociados con la carcinogénesis, como la angiogénesis, la invasión o la metástasis (19; 20). Estos compuestos, pueden ser flavonoides, curcuminoides, resveratrol, quercetina, epigalocatequina galato (EGCG), apigenina, piperina, alcaloides, taninos, esteroides, terpenoides, saponinas y muchos otros más (19-21).

- **Clasificación de los metabolitos secundarios**

Los compuestos bioactivos de origen vegetal, también conocidos como metabolitos secundarios o especializados, constituyen una amplia y diversa gama de sustancias químicas que, aunque no están directamente implicadas en los procesos primarios de crecimiento y desarrollo de las plantas, cumplen funciones esenciales en su adaptación e interacción con el entorno. Su clasificación es crucial

para entender no solo su diversidad estructural, sino también su potencial terapéutico (22; 13).

Desde un enfoque estructural y biosintético, estos compuestos se agrupan en varias clases principales: fenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides y glucosinolatos. Los fenoles comprenden una de las familias más abundantes, e incluyen ácidos fenólicos, taninos y stilbenos, caracterizados por la presencia de uno o más grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos, su clasificación se puede observar en la figura 4. Los flavonoides, a su vez, son una subclase de compuestos fenólicos que se subdividen en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y antocianinas, con funciones que van desde la pigmentación floral hasta la defensa antioxidante y antimicrobiana, su clasificación se puede observar en la figura 5 (23-25).

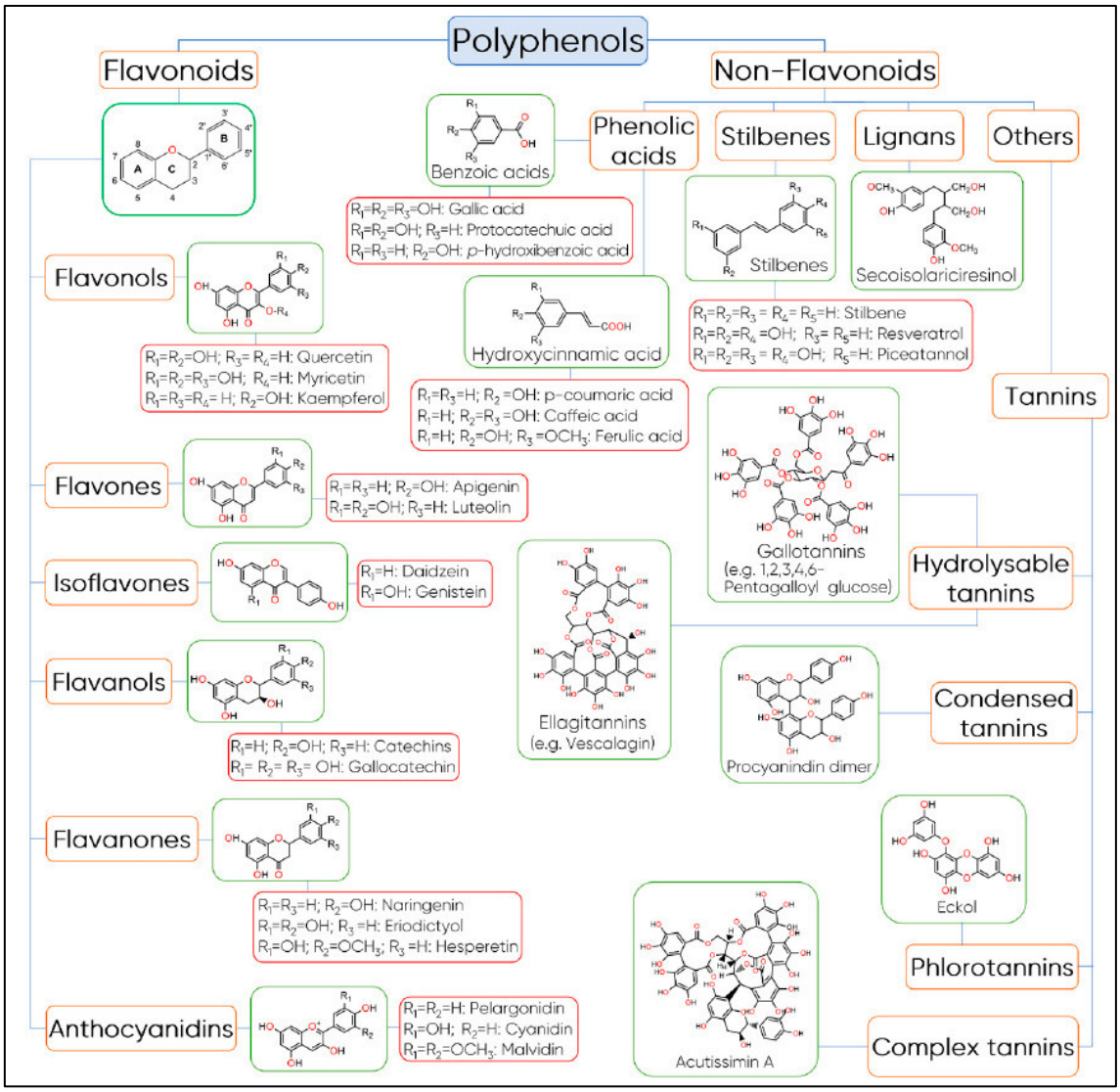


Figura 4. Clasificación de los polifenoles según su estructura química (26).

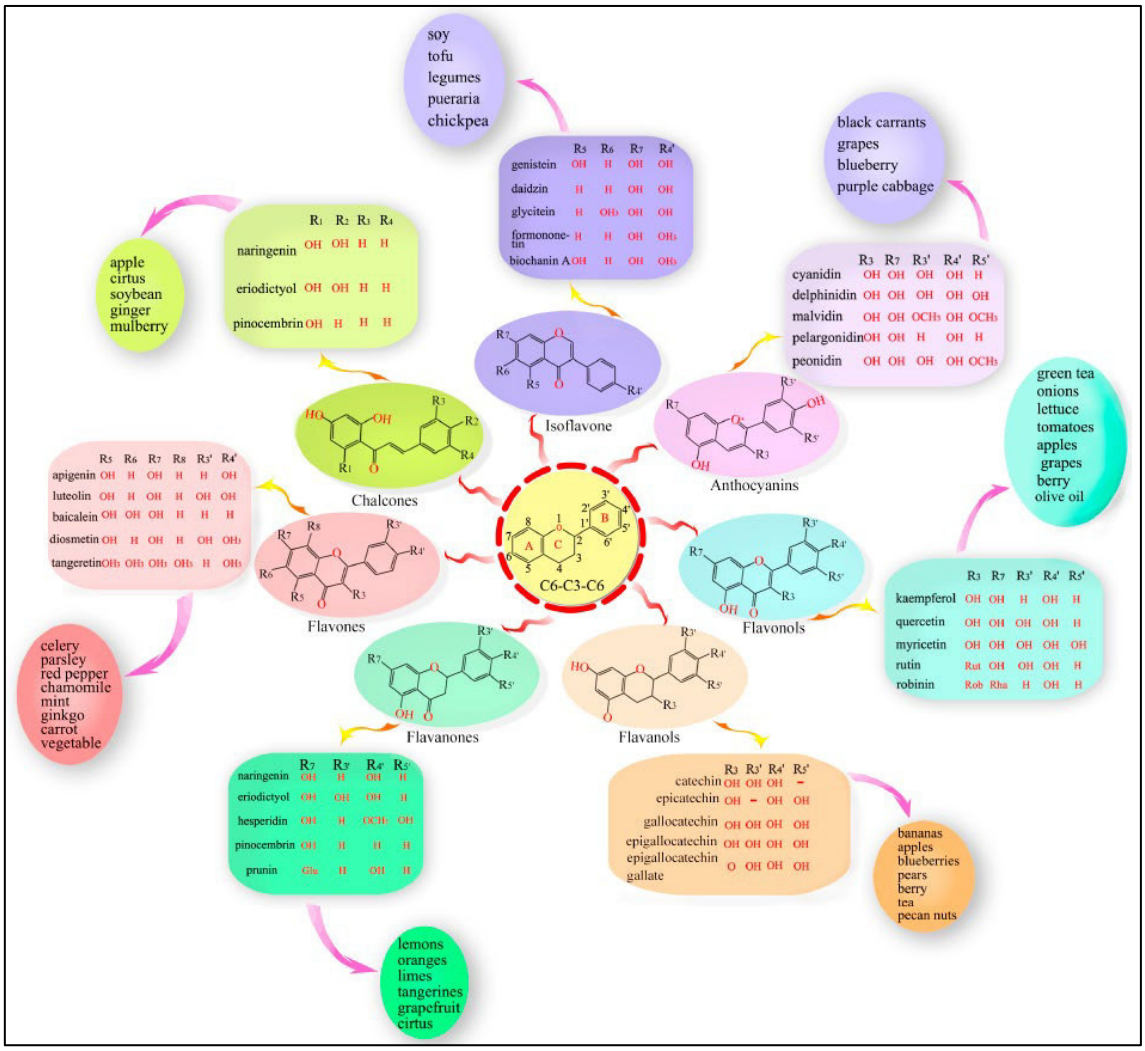


Figura 5. Clasificación de los flavonoides según su estructura química (23).

Los terpenoides, derivados del isopreno, se clasifican según el número de unidades de isopreno en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos, su clasificación se puede observar en la figura 6. Estos compuestos son responsables del aroma y sabor de muchas plantas, y actúan como defensas naturales contra patógenos, además de tener aplicaciones farmacológicas y nutracéuticas reconocidas (24; 26). Los alcaloides, por otro lado, son compuestos nitrogenados de estructura heterocíclica, conocidos por sus potentes efectos farmacológicos, incluyendo acciones analgésicas, psicoactivas o citotóxicas, su clasificación se puede observar en la figura 7 (25; 26).

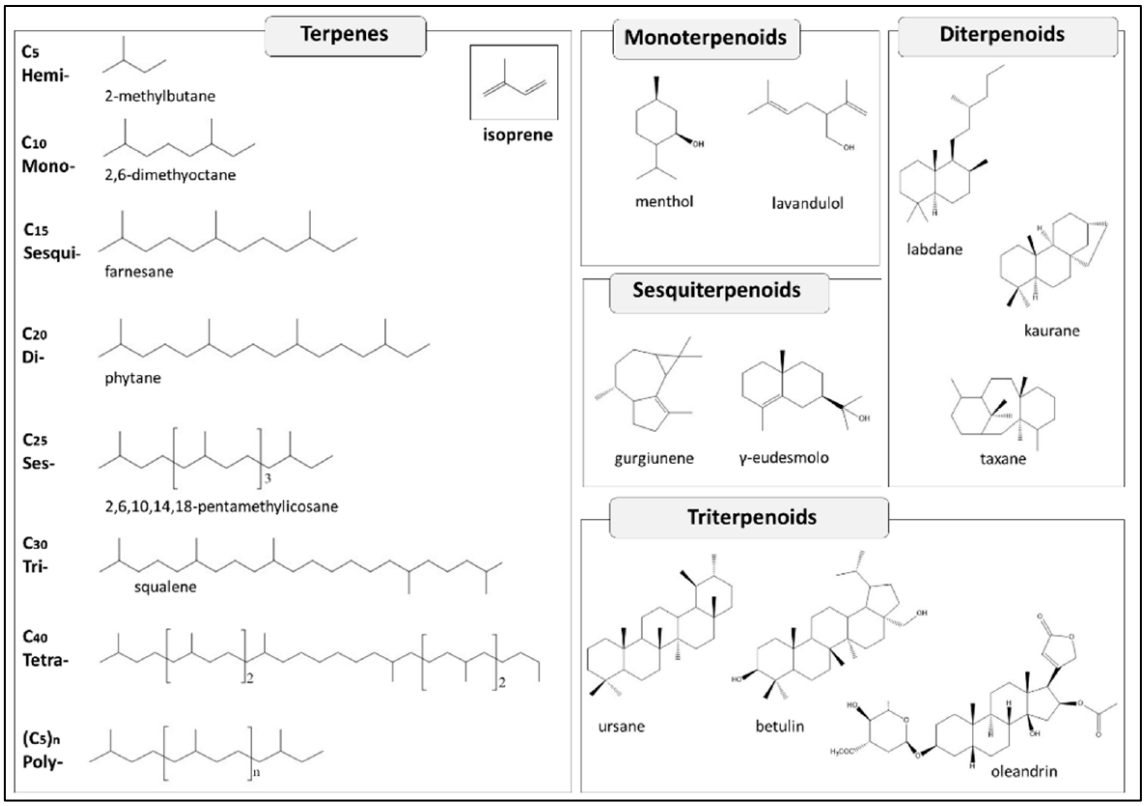


Figura 6. Clasificación de los terpenoides según su estructura química (26).

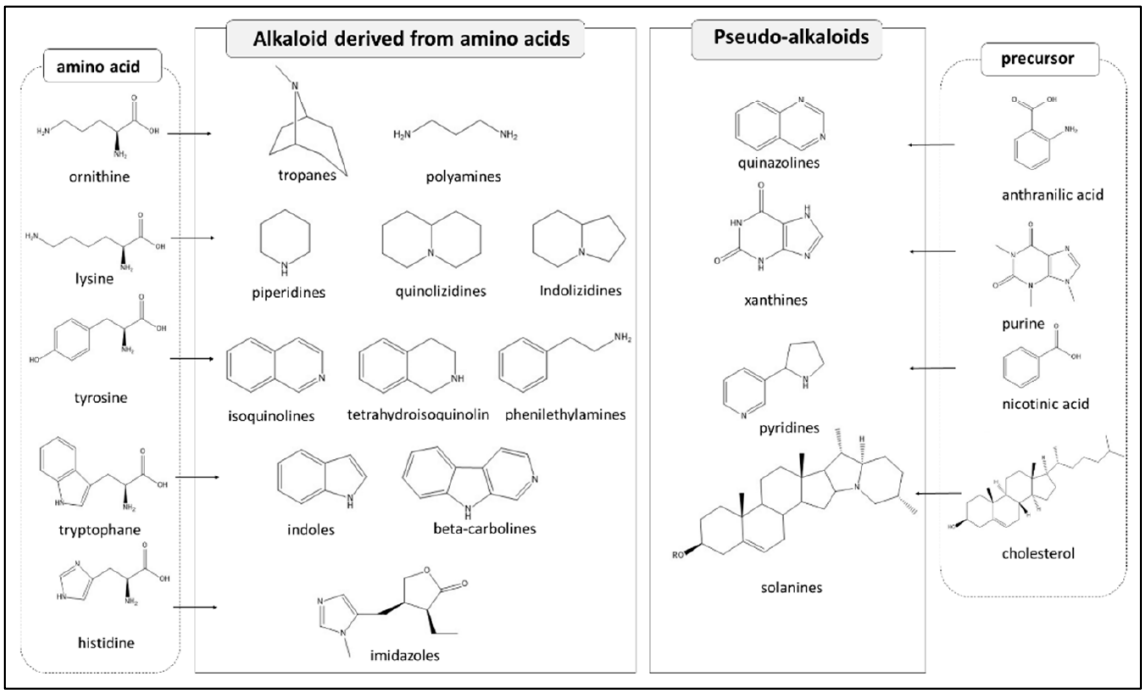


Figura 7. Clasificación de los alcaloides según su estructura química (26).

- **Mecanismos de acción antitumoral**

Actúan mediante múltiples mecanismos de modulación de vías de señalización molecular (19; 21), tales como la regulación de

microRNAs, la inducción de apoptosis y autofagia (27), la inhibición de vías de señalización pro-oncogénicas (como NF-κB, PI3K/Akt, TGF-β, mTOR, MAPK/ERK y MAPK) (19; 27), y la modulación de la respuesta epigenética, incluyendo cambios en la metilación del ADN, en la expresión de genes relacionados con la resistencia a fármacos, la inhibición de la angiogénesis y la reducción de la inflamación y la metástasis (19; 21), además, su capacidad antioxidante contribuye a su potencial terapéutico (27). La importancia de estos compuestos radica en su potencial para ser utilizados en estrategias de quimioprevención y en el desarrollo de terapias complementarias o alternativas en el tratamiento del cáncer (20; 21). Aunque estos compuestos muestran efectos prometedores *in vitro* y en modelos preclínicos, su aplicación clínica enfrenta desafíos relacionados con su baja biodisponibilidad y metabolismo rápido (21; 27).

- **Mecanismos de acción antioxidante**

Los metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en plantas y otros organismos, poseen una notable capacidad antioxidante atribuida a sus estructuras químicas que les permiten interactuar con diversas especies reactivas. Estos compuestos actúan mediante múltiples mecanismos que pueden clasificarse en acciones primarias y secundarias. Entre los mecanismos primarios destaca la donación directa de electrones o hidrógenos, lo que permite neutralizar radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), transformándolos en compuestos menos reactivos. Esta propiedad es especialmente notable en los flavonoides y fenoles, cuya estabilidad estructural facilita la formación de radicales fenólicos resonantes y estabilizados (28-31). Además, algunos metabolitos ejercen su acción capturando radicales lipídicos en membranas celulares, previniendo así la peroxidación lipídica, un proceso que compromete la integridad de las membranas biológicas (29).

A nivel intracelular, también modulan la actividad de enzimas antioxidantes endógenas, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa, ya sea mediante la activación directa

o por la regulación de factores de transcripción como Nrf2, lo que conduce a la expresión de genes implicados en la defensa antioxidante (28-30). En paralelo, muchos metabolitos secundarios inhiben la actividad de enzimas prooxidantes, como la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, disminuyendo la generación de ROS endógenas (30; 31).

Otro mecanismo relevante es la quelación de metales de transición (como el hierro y el cobre), los cuales catalizan reacciones de tipo Fenton que generan radicales hidroxilo altamente dañinos. Al formar complejos con estos metales, los metabolitos impiden su participación en dichas reacciones, reduciendo la carga oxidativa en el entorno celular (30; 31). Asimismo, algunos compuestos actúan absorbiendo radiación ultravioleta, particularmente los flavonoides, protegiendo las células del daño fotoinducido y disminuyendo la formación de ROS derivadas de la radiación (31). Finalmente, ciertos metabolitos también regeneran antioxidantes endógenos como las vitaminas C y E, restaurando su capacidad funcional y reforzando el sistema antioxidante global del organismo (31).

Estos mecanismos no se manifiestan de forma aislada, sino que interactúan sinérgicamente, lo que convierte a los metabolitos secundarios en actores clave para mantener la homeostasis redox, contrarrestar el estrés oxidativo y prevenir el daño celular asociado al desarrollo de múltiples enfermedades, incluyendo el cáncer (28–31). A continuación, en la tabla N°1 se puede observar los metabolitos secundarios más importantes y conocidos presentes en las especies vegetales.

Tabla N° 1. Compuestos bioactivos vegetales: origen, función y clasificación química.

Compuesto bioactivo	Tipo de metabolito	Origen vegetal	Actividad biológica
Cianidina	Antocianina (flavonoide)	*Malus pumila*, *Vaccinium spp.*,	Antioxidante, anticancerígeno, antidiabético,

		Sambucus nigra, *Punica granatum*	neuroprotector, antiinflamatorio, cardioprotector (22).
Delfinidina	Antocianina (flavonoide)	*Clitoria ternatea*, *Hibiscus sabdariffa*, *Solanum melongena*	Anticancerígeno, antiinflamatorio (22).
Rosinidina	Antocianina (flavonoide)	*Catharanthus roseus*, *Primula rosea*	Antidiabético, neuroprotector (22).
Pelargonidina	Antocianina (flavonoide)	*Sambucus nigra*, *Solanum tuberosum*, *Raphanus sativus*	Anticancerígeno, neuroprotector (22).
Malvidina	Antocianina (flavonoide)	*Vaccinium spp.*, *Vitis vinifera*, *Nelumbo nucifera*	Anticancerígeno, antiulceroso (22).
Peonidina	Antocianina (flavonoide)	*Vaccinium spp.*, *Daucus carota*	Neuroprotector (22).
Petunidina	Antocianina (flavonoide)	*Vaccinium macrocarpon*, *Solanum tuberosum*	Antiosteoporosis (22).
Isoliquiritigenina	Chalcona (flavonoide)	*Glycyrrhiza glabra*, *Genista tinctoria*, *Cissus polyantha*	Antitumoral, antiinflamatorio (modula Nrf2 y NF-κB) (22).
Floretina	Dihidrochalcona (flavonoide)	*Malus domestica*, *Pyrus spp.*	Antifúngico, hepatoprotector, neuroprotector, antidiabético (22).
Buteína	Flavonoide	Diversas especies vegetales	Antitumoral (p53 mutado), antiulceroso (22).

Apigenina	Flavona (flavonoide)	*Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*	Antiviral, inmunomodulador, pro-apoptótico (23).
Kaempferol	Flavonol (flavonoide)	*Camellia sinensis*, *Vitis vinifera*, *Allium cepa*, *Brassica oleracea*	Antiviral, antiproliferativo (arresto del ciclo celular) (23).
Luteolina	Flavona (flavonoide)	Diversas especies vegetales	Antiviral, pro-apoptótico (vía ROS) (23).
Genisteína	Isoflavona (flavonoide)	*Glycine max*, *Vicia faba*	Antitumoral en cáncer de mama, induce apoptosis ROS-dependiente (23).
Naringenina	Flavanona (flavonoide)	*Citrus spp.*	Antioxidante, antiproliferativo (23).
Baicaleína	Flavona (flavonoide)	*Scutellaria baicalensis*	Antiviral (H5N1) (23).
Galato de epigalocatequina	Catequina (flavonoide)	*Camellia sinensis*	Antiviral, antibacteriano, antifúngico (22).
Glabridina	Isoflavanoide (flavonoide)	*Glycyrrhiza glabra*	Antifúngico (inhibe síntesis de pared celular) (23).
Limoneno	Monoterpeno (terpenoide)	Epicarpio de *Citrus spp.*	Antimicrobiano, conservante alimentario (24).
α-pineno	Monoterpeno (terpenoide)	*Pinus spp.*, *Cedrus spp.*	Antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antitumoral (24).
3-Careno	Monoterpeno (terpenoide)	*Salvia rosmarinus*, *Citrus spp.*, *Ocimum*	Antimicrobiano, conservante (24).

		basilicum, *Cannabis sativa*	
Hederagenina	Glicósido triterpénico (saponina)	*Allium sativum*, *Quillaja saponaria*, *Chenopodium quinoa*, *Avena sativa*, etc.	Hipolipemiante, antidiabética, antitumoral (24).
Quercetina	Flavona (Flavonoide)	Vitis vinifera, *Solanum lycopersicon*, *Pistacia eurycarpa*	Antiinflamatorio, antiviral, antimutagénico (24).
Naringina	Flavonona (Flavonoide)	*Citrus spp.*	Antioxidante, neuroprotector, antibacteriano (24).
Peonidina	Antocianidinas (flavonoide)	*Prunus spp.*	Antioxidante, protector celular frente a oxidantes (24).
Daidzeína	Isoflavonoide (flavonoide)	*Glycine max*, *Vicia faba*	Antibacteriano, antimutagénico, fitoestrógeno (24).

II.1.3. Estrés oxidativo y actividad antioxidante

- **Concepto y fisiopatología del estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se define como un estado fisiopatológico resultante del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del organismo para neutralizarlas mediante sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos (32; 33). Estas especies, generadas normalmente en procesos como la respiración mitocondrial, pueden alcanzar niveles tóxicos debido a disfunciones internas o exposición a factores externos como contaminantes, radiación o estrés metabólico, provocando daños oxidativos en lípidos, proteínas y ADN (34; 35). Inicialmente concebido como un proceso meramente patológico,

estudios recientes han revelado que las ROS también participan en funciones fisiológicas como la señalización celular, proliferación y diferenciación, evidenciando así un papel dual del estrés oxidativo dependiendo de su intensidad y duración (32; 33). Cuando este equilibrio redox se altera de forma crónica o intensa, se activan rutas de señalización que desencadenan apoptosis, inflamación o proliferación anormal, contribuyendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y diabetes (34; 35). En este contexto, la mitocondria desempeña un rol central no solo como principal fuente de ROS, sino también como regulador de su acumulación, lo cual subraya la importancia de preservar la homeostasis redox como estrategia preventiva frente a múltiples patologías (35). Al producirse un estrés oxidativo, las ROS pueden afectar la fisiología de distintos sistemas del cuerpo humano, como lo muestras las figuras 8; 9 y 10.

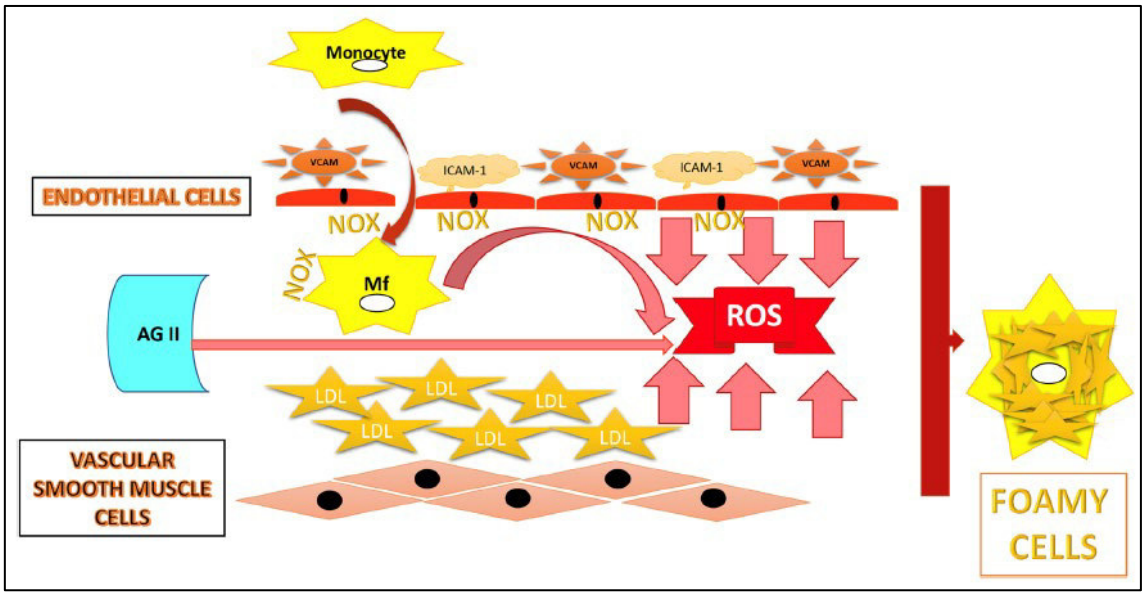


Figura 8. Patogénesis de la enfermedad isquémica coronaria y la implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (33).

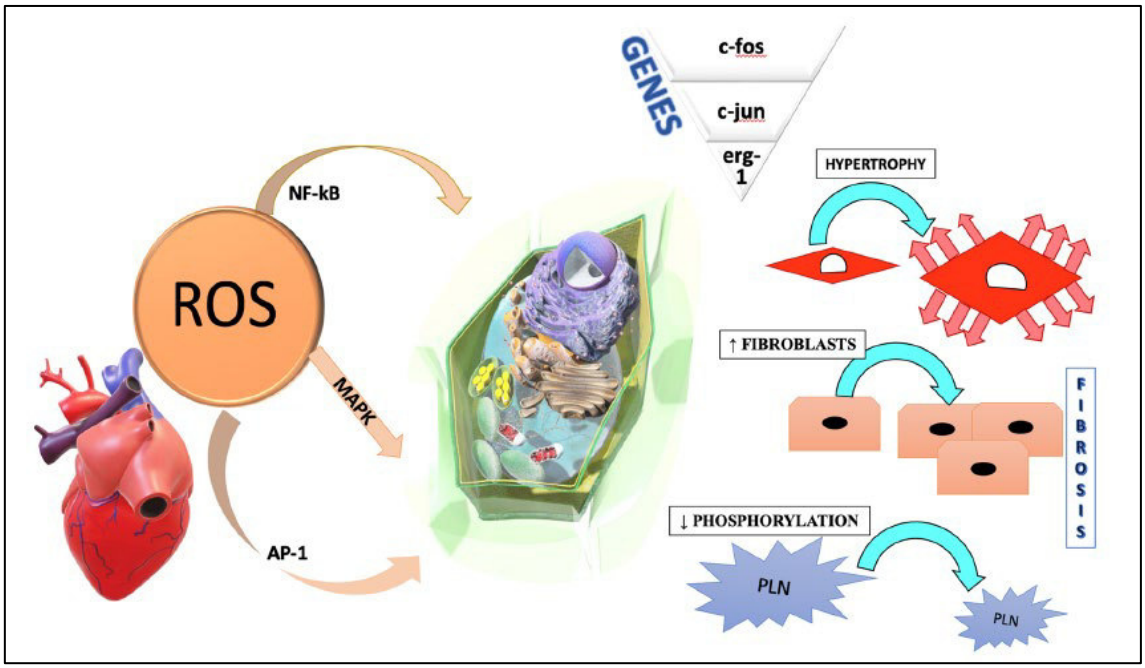


Figura 9. Implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca (33).

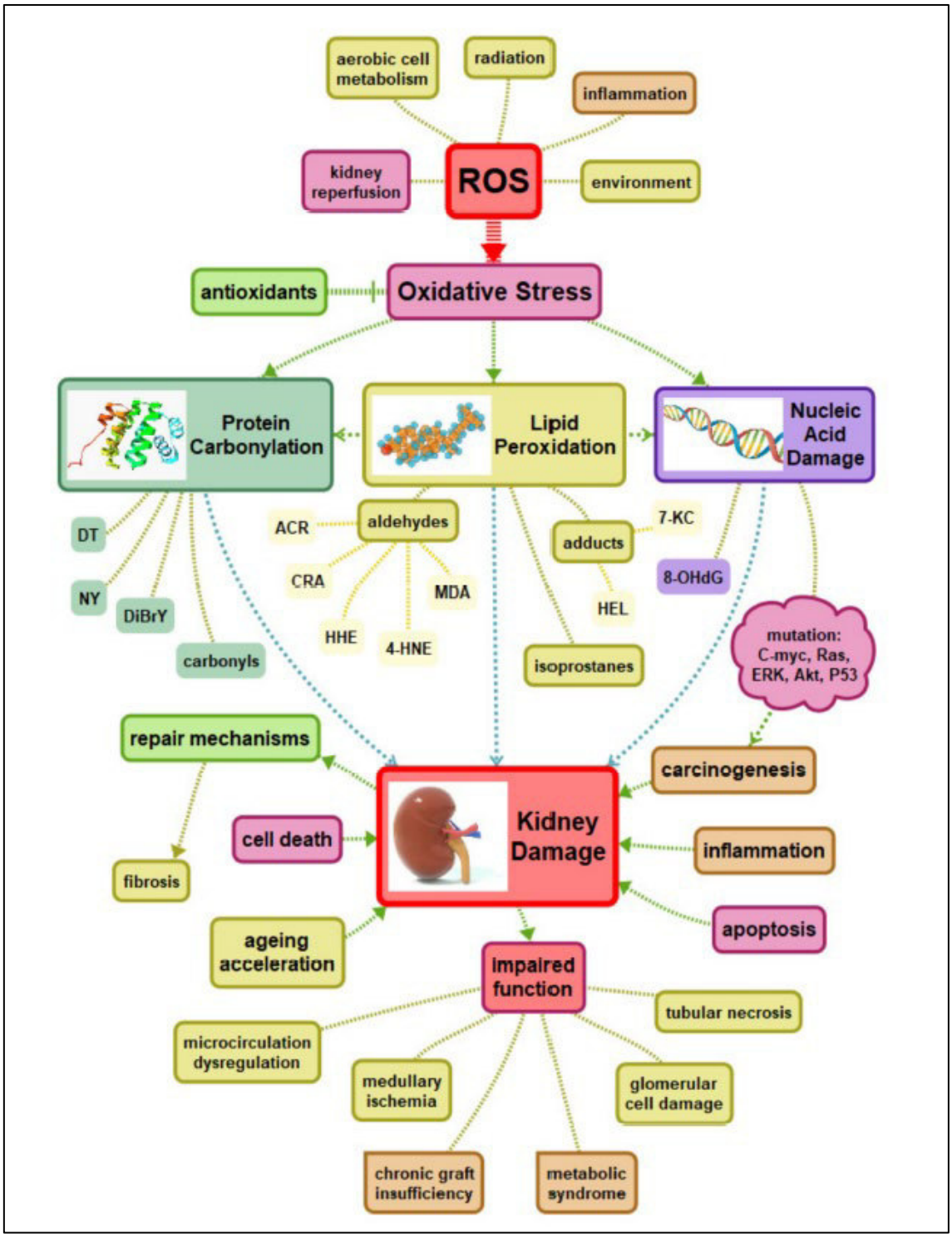


Figura 10. Implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la fisiopatología del daño renal (33).

- **Tipos de radicales libres**

Los radicales libres son átomos o moléculas que presentan uno o más electrones no pareados en su capa externa, lo que los convierte en especies químicas altamente reactivas e inestables. Estos

radicales pueden generarse endógenamente como subproductos del metabolismo celular, especialmente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o por factores exógenos como la radiación, la contaminación ambiental o el humo del tabaco (32; 33). Entre los más relevantes se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (•OH), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO•) y los radicales lipídicos como el peroxil (ROO•), los cuales cumplen funciones tanto fisiológicas como patológicas dependiendo de su concentración y contexto (33; 35).

El anión superóxido es uno de los primeros radicales generados en la mitocondria y, si no es desactivado, puede originar radicales más reactivos como el radical hidroxilo a través de reacciones de Fenton en presencia de metales de transición como hierro o cobre (34; 35). El radical hidroxilo, en particular, es considerado uno de los más dañinos por su capacidad de atacar rápida y directamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, generando mutaciones, disfunción proteica y peroxidación lipídica (32; 34). Por su parte, el óxido nítrico cumple funciones reguladoras en procesos como la vasodilatación y la neurotransmisión; sin embargo, en exceso puede reaccionar con el superóxido formando peroxinitrito ($ONOO^-$), una especie altamente citotóxica (33; 35). Asimismo, los radicales lipídicos se originan durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares y son responsables de la propagación del daño oxidativo en procesos como la peroxidación lipídica (35).

Aunque estas especies reactivas cumplen roles fisiológicos importantes en la señalización celular, la respuesta inmunitaria y el control del tono vascular, su acumulación excesiva, en ausencia de una respuesta antioxidante eficiente, desencadena un estado de estrés oxidativo que altera la estructura y función de componentes celulares, favoreciendo la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas, los diversos tipos de radicales libres se pueden observar en la tabla N°2 (32–35).

Tabla N° 2. Tipos de radicales libres, su origen y sus efectos en sistemas biológicos.

Radical libre	Formula Química	Origen principal	Efectos
Anión superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Respiración mitocondrial y NADPH oxidasa.	Precursos de otras ROS más dañinas (32-35).
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Enzima SOD y oxidación de peroxisomas.	Forma •OH con Fe^{+2} (Reacción de Fenton) (32-34).
Radical hidroxilo	•OH	Reacción de Fenton y radiación ionizante.	Daño oxidativo a lípidos, ADN y proteínas (33-35).
Óxido nítrico	NO•	Células endoteliales y macrófagos.	Forma $ONOO^-$ en exceso (33-35).
Peroxinitrito	$ONOO^-$	Reacción de NO• con $O_2^{\bullet -}$.	Daño oxidativo a mitocondrias, lípidos y ADN (34; 35).
Radical peroxil	ROO•	Peroxidación y autooxidación lipídica.	Daño oxidativo a estructuras lipídicas (35).
Radical hidroperoxilo	HO_2•	Intermediario del $O_2^{\bullet -}$ en ambiente ácido.	Precursos de •OH (34).

- **Concepto de la actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se define como la capacidad de ciertos compuestos, ya sean endógenos o exógenos, para neutralizar radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), evitando así el daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis redox del organismo, ver figura 11 (32). Desde una perspectiva funcional, esta actividad se clasifica en endógena y exógena según su origen. La actividad antioxidante endógena está conformada por mecanismos intrínsecos del cuerpo humano, incluyendo enzimas clave como la superóxido dismutasa (SOD),

catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), que actúan en distintas fases para convertir ROS en moléculas menos reactivas, como agua y oxígeno. Además, antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), el urato, la melatonina y proteínas de unión a metales como la ferritina y la ceruloplasmina, contribuyen a la eliminación o neutralización de ROS, evitando la propagación del daño celular (33; 34).

Por otro lado, la actividad antioxidante exógena proviene de compuestos que deben ser incorporados al organismo a través de la dieta o suplementos. Estos incluyen vitaminas antioxidantes como la vitamina C (ácido ascórbico) y E (tocoferoles), así como carotenoides, polifenoles, flavonoides y otros fitoquímicos presentes en alimentos como frutas, verduras, cereales integrales, té verde, aceites vegetales y plantas medicinales. Estos compuestos actúan directamente como captadores de radicales libres o moduladores de la expresión génica relacionada con la defensa antioxidante (35). Ambos sistemas antioxidantes, endógeno y exógeno, actúan de manera complementaria, reduciendo la carga oxidativa del organismo y desempeñando un papel esencial en la prevención de patologías crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y el envejecimiento prematuro (32-35).

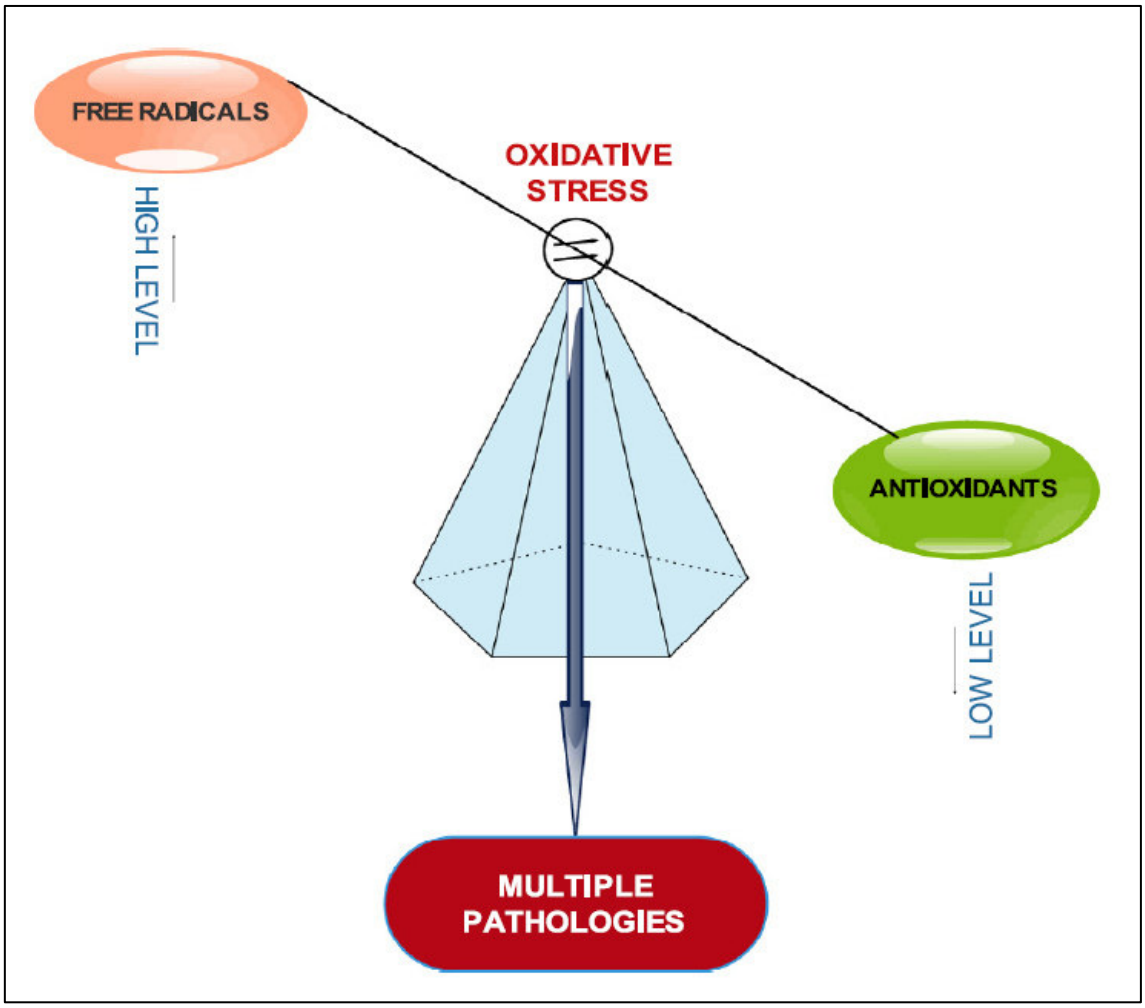


Figura 11. Representación gráfica del estrés oxidativo producto de un desbalance entre antioxidantes y radicales libres (36).

- **Neutralización de radicales libres mediante antioxidantes no enzimáticos**

La neutralización de radicales libres mediante antioxidantes no enzimáticos representa una estrategia esencial del organismo para limitar el daño oxidativo inducido por especies reactivas como el radical hidroxilo (•OH), el superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el oxígeno singlete. Estos antioxidantes, tanto endógenos como exógenos, actúan principalmente donando electrones o hidrógenos a los radicales libres, estabilizándolos y previniendo así reacciones en cadena que deterioran componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (36).

Entre los antioxidantes no enzimáticos endógenos se incluyen compuestos como el glutatión (GSH), urato, melatonina, bilirrubina y

poliaminas, que desempeñan funciones claves en la defensa redox intracelular y extracelular. Su acción antioxidante no solo se limita a la neutralización directa de radicales, sino que también participan en la reparación estructural de biomoléculas oxidadas y en la eliminación de productos de oxidación, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis celular (37).

Por su parte, los antioxidantes no enzimáticos exógenos, como las vitaminas C y E, los carotenoides y los polifenoles, son obtenidos a través de la dieta y cumplen un rol complementario. La vitamina C, soluble en agua, actúa eficazmente en medios acuosos neutralizando ROS, mientras que la vitamina E, lipofílica, protege las membranas celulares contra la peroxidación lipídica. Los carotenoides y compuestos fenólicos, además de ejercer funciones antioxidantes directas, modulan procesos celulares como la apoptosis y las respuestas inmunológicas, y algunos incluso absorben energía del oxígeno singlete, evitando así la formación de ROS secundarios (38).

En conjunto, la acción de estos compuestos no enzimáticos constituye una línea de defensa crítica frente al estrés oxidativo, tanto por su capacidad para interrumpir reacciones en cadena como por su versatilidad en diversos compartimentos celulares. Esta función es particularmente relevante en la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con el desequilibrio redox, como el cáncer, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas, ver figura 12 (36–38).

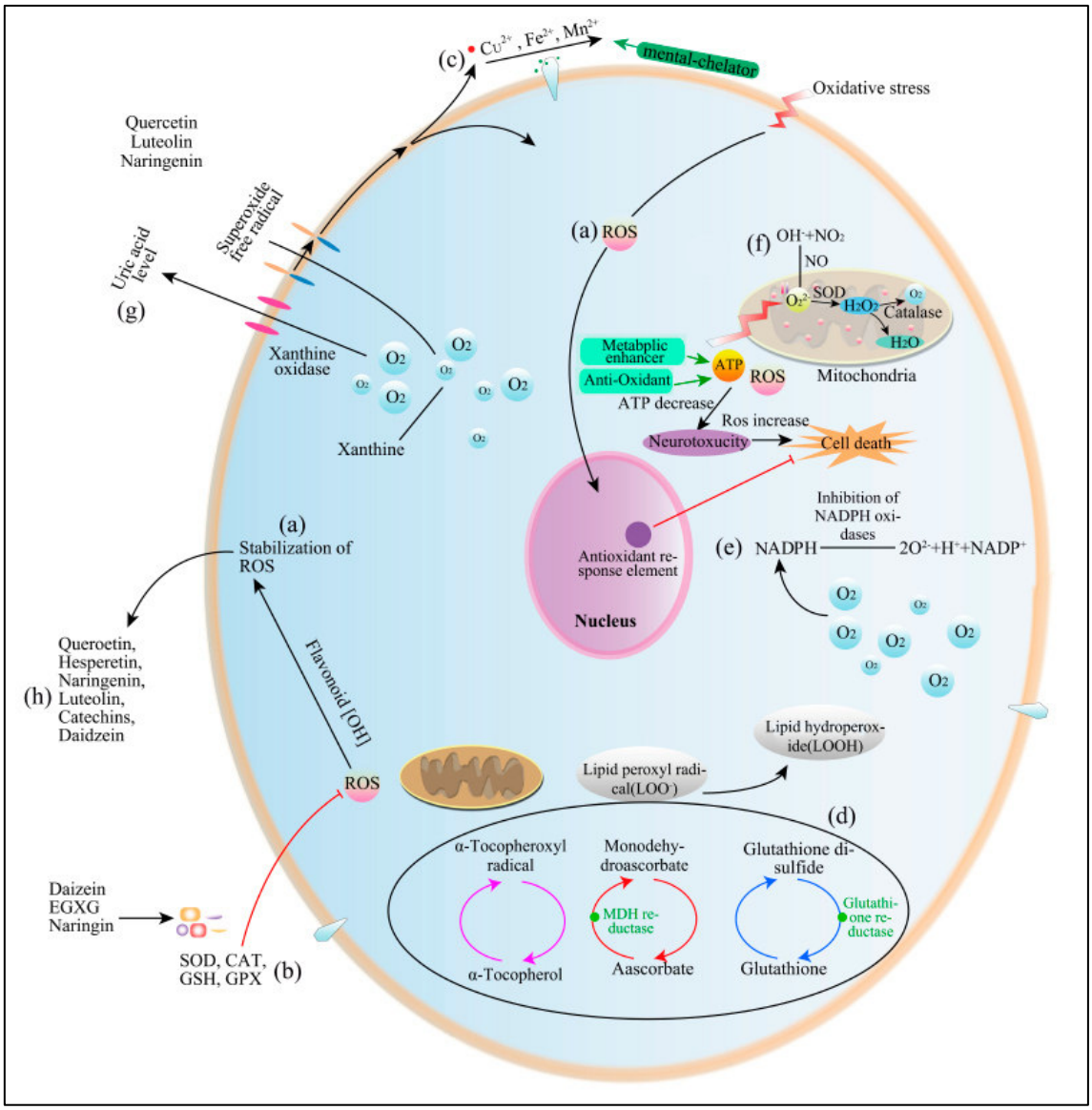


Figura 12. Mecanismos de neutralización de los flavonoides como antioxidantes no enzimáticos. **A** Eliminación ROS; **B** Activación de enzimas antioxidantes; **C** Actividad quelante de metales; **D** Aumento de los niveles de radicales α-tocoferilo; **E** Inhibición de la NAPDH oxidasa; **F** Eliminación de NO•; **G** Aumento de los niveles de ácido úrico; **H** Aumento de la actividad antioxidantes de antioxidantes de bajo peso molecular (23).

- **Neutralización de radicales libres mediante antioxidantes enzimáticos**

La neutralización de radicales libres mediante antioxidantes enzimáticos constituye una defensa biológica primaria y altamente eficiente frente al estrés oxidativo celular. Este sistema está integrado por un conjunto de enzimas que catalizan la conversión de

especies reactivas de oxígeno (ROS) en compuestos menos dañinos, con el fin de proteger las biomoléculas esenciales del organismo como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (36). Entre las enzimas más relevantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), las cuales actúan de forma secuencial y coordinada para eliminar las ROS de manera eficiente (37).

La superóxido dismutasa es la primera línea de defensa antioxidante y se encarga de catalizar la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). A su vez, la catalasa transforma rápidamente el H_2O_2 generado en agua y oxígeno, previniendo la formación del radical hidroxilo (•OH) mediante la reacción de Fenton, que es altamente tóxica para las células. Complementariamente, la glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos a compuestos inofensivos, utilizando glutatión reducido (GSH) como cofactor, lo que impide la peroxidación lipídica y estabiliza las membranas celulares (36; 37).

Estos antioxidantes enzimáticos no solo participan en la neutralización de radicales libres, sino que también son capaces de modular su actividad en respuesta al aumento de ROS, incrementando su expresión y capacidad catalítica como parte de la adaptación celular al daño oxidativo. Este sistema es especialmente importante en condiciones patológicas como la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, en las que el desequilibrio redox favorece el daño tisular crónico (38).

En conjunto, la acción de la SOD, CAT y GPx constituye una red de defensa intracelular altamente integrada que mantiene el equilibrio redox y preserva la integridad estructural y funcional de los tejidos frente al estrés oxidativo, siendo un componente esencial en la prevención de procesos degenerativos y en el envejecimiento prematuro, ver figura 13 (36–38).

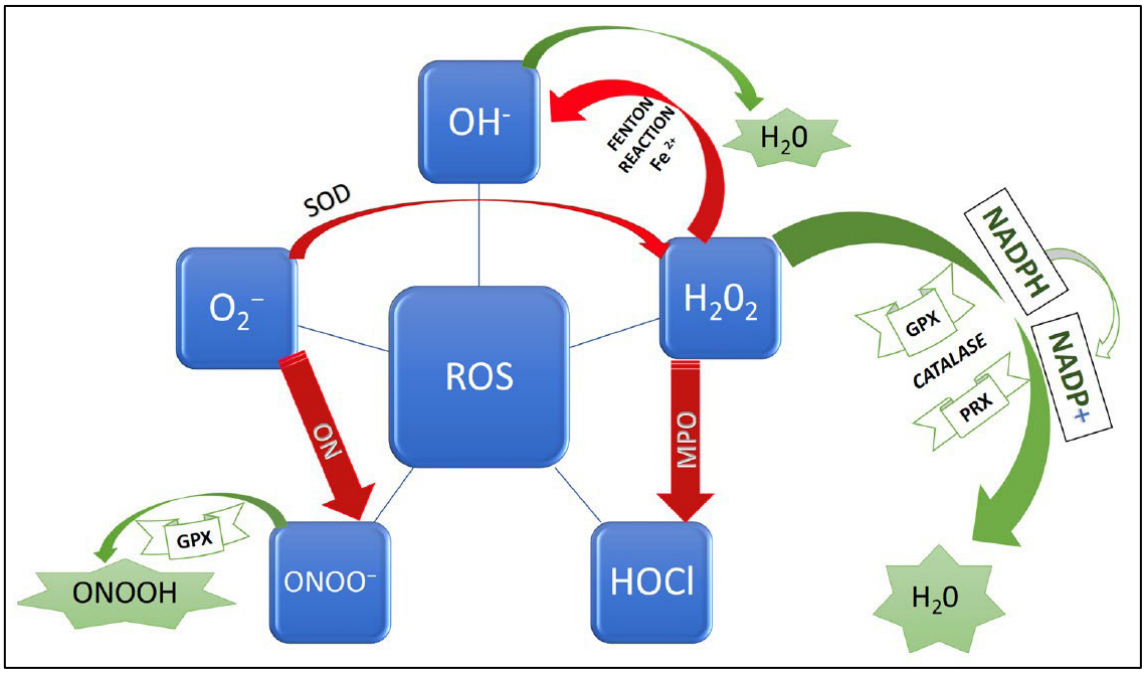


Figura 13. Mecanismos de neutralización de radicales libres de antioxidantes enzimáticos. ROS, especies reactivas de oxígeno; GPX, sistema glutatión peroxidasas; SOD, superóxido dismutasa; MPO, mieloperoxidasa; PRX, peroxiredoxinas (33).

Dicho todo esto, el cuerpo humano presenta un sistema muy complejo para poder lograr un correcto equilibro entre los antioxidantes (ya sean endógenos, exógenos, enzimáticos o no enzimáticos) y los radicales libres, donde cualquiera desproporcionalidad por alguna de las dos partes puede generar un estrés oxidativo, desencadenando así una reacción en cadena que pueda dar origen a alguna patología, en la tabla N°3 se puede observar una comparativa final entre los diversos antioxidantes que están presentes en el cuerpo humano.

Tabla N° 3. Comparación entre los antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

	Antioxidantes	
	No enzimáticos	**Enzimáticos**
Naturaleza	Moleculas pequeñas, naturales o adquiridas.	Proteínas con actividad enzimática producidas.
Ejemplos	Polifenoles, flavonoides, vitamina C, glutatión, melatonina, bilirrubina.	Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx).
Mecanismo	Donan e^- / H^+ para estabilizar radicales libres.	Catalizan reacciones de neutralización de ROS.
Localización	Medio intra y extracelular (sangre, membrana, etc).	Medio intracelular (citosol, mitocondria, peroxisoma, etc).
Importancia	Protección complementaria y prevención de daño celular.	Primer línea de defensa contra ROS y en patologías.

II.1.4. Cáncer y quimioprevención

- **Concepto y fisiopatología del cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales con capacidad de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos distantes a través de metástasis (39). Su desarrollo es un proceso multietápico en el que las células normales acumulan mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas bajo la influencia de factores genéticos predisponentes y carcinógenos ambientales (40). En el nivel molecular, la carcinogénesis se explica por la activación de oncogenes, que promueven la proliferación celular, y la inactivación de genes supresores de tumores como p53 o RB, cuya función es detener el ciclo celular o inducir apoptosis en células dañadas (41). Este desequilibrio favorece un crecimiento celular autónomo, la evasión de la muerte celular programada y la inducción de angiogénesis aberrante, que provee nutrientes a las células tumorales (39). Adicionalmente, las células malignas adquieren propiedades invasivas que les permiten atravesar vasos sanguíneos y linfáticos, propagándose a distancia y originando metástasis,

principal causa de mortalidad en pacientes oncológicos (40). Estos mecanismos fisiopatológicos explican la heterogeneidad de las neoplasias malignas, así como la complejidad de su diagnóstico y tratamiento, ver figura 14 (41).

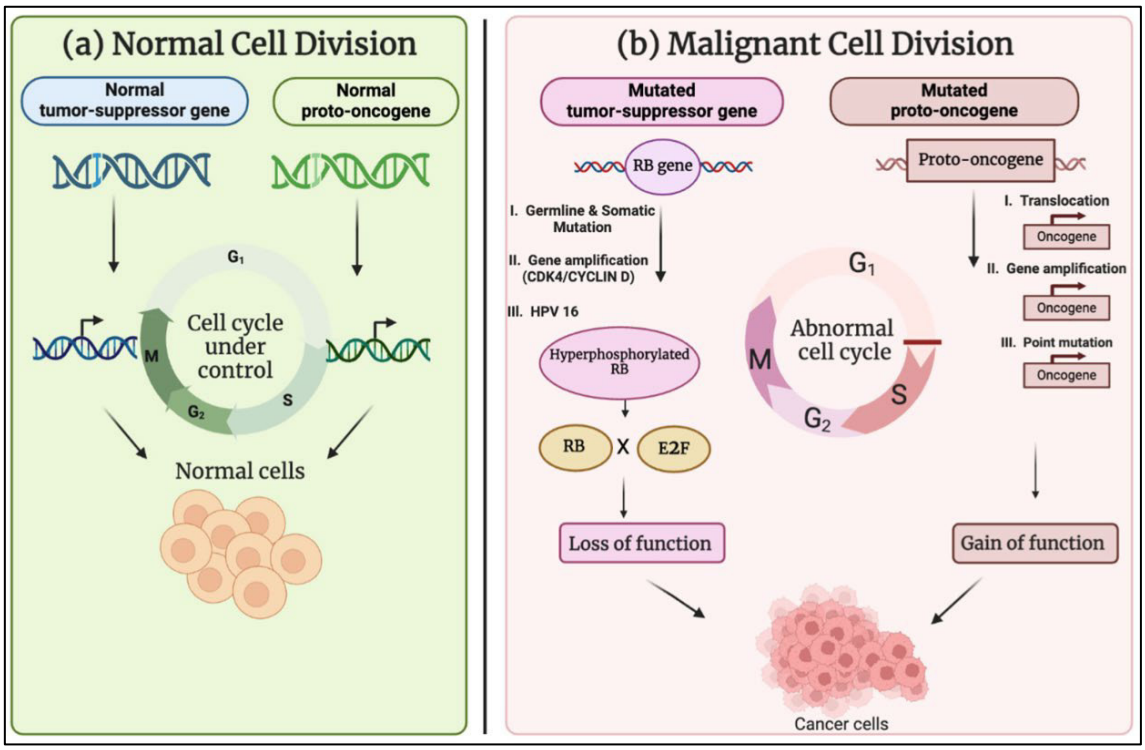


Figura 14. Comparación entre una división celular normal (a) y una división celular maligna (b) con la participación de genes supresores de tumores y proto-oncogenes (41).

- **Tipos de cáncer (hepático, pulmonar, de mama, próstata, colon, melanoma)**

El cáncer comprende un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular descontrolada, la capacidad invasiva y la aptitud para generar metástasis; cada tipo tiene características etiopatogénicas y moleculares particulares que determinan su comportamiento clínico y terapéutico. El carcinoma hepatocelular suele desarrollarse sobre hígados con daño crónico (cirrosis, hepatitis virales, esteatohepatitis), y su fisiopatología incluye inflamación crónica, estrés oxidativo, alteraciones epigenéticas y activación de vías como PI3K/AKT y MAPK que favorecen la supervivencia y angiogénesis tumoral (42). El cáncer de pulmón

(dividido en cáncer de células no pequeñas y células pequeñas) está fuertemente asociado al tabaquismo y a mutaciones activadoras en genes como EGFR o KRAS, con consecuente activación de rutas proliferativas y evasión de la apoptosis (43). El cáncer de mama es heterogéneo; su fisiopatología integra factores hormonales, predisposición genética (como el oncogén BRCA), y alteraciones en receptores hormonales o de crecimiento (como el HER2) que condicionan subtipos clínicos, moleculares y respuestas a terapia (44). El carcinoma de próstata es típicamente dependiente de andrógenos y se caracteriza por alteraciones en la señalización del receptor de andrógenos, así como por cambios genómicos (como el gen PTEN) que promueven proliferación y progresión hacia enfermedad resistente a la castración (45). El melanoma deriva de melanocitos y está estrechamente ligado a daño por radiación ultravioleta y a mutaciones activadoras (como el oncogén BRAF y gen NRAS) que hiperactivan la vía MAPK; su elevada carga mutacional explica en parte su agresividad y respuesta a inmunoterapia (46). Finalmente, el adenocarcinoma colorrectal evoluciona típicamente de adenoma a carcinoma, con alteraciones en genes APC, KRAS y p53 y con contribución importante de la inestabilidad genómica y del microambiente intestinal (inflamación, microbioma), lo cual condiciona la progresión y la heterogeneidad clínica (47).

- **Quimioprevención**

La quimioprevención se define como el uso de agentes, naturales o sintéticos, destinados a prevenir, retrasar o revertir la carcinogénesis mediante la interrupción de las fases de iniciación, promoción o progresión de lesiones preneoplásicas (48). Entre las estrategias aplicadas figuran agentes ¨bloqueadores¨, que reducen la activación de procarcinógenos y limitan el daño al ADN, y agentes ¨supresores¨, que inhiben vías de señalización implicadas en la supervivencia y proliferación de células iniciadas; muchos de estos compuestos proceden de fitoquímicos dietarios como polifenoles, isotiocianatos y carotenoides (49). Los mecanismos moleculares identificados

incluyen actividad antioxidante y antiinflamatoria, modulación de rutas redox (por ejemplo, activación de Nrf2), regulación epigenética, inhibición de señales pro-proliferativas (p. ej. PI3K/AKT, MAPK) y potenciación de la vigilancia inmune, lo que explica su capacidad para actuar en distintas etapas de la carcinogénesis (50; 51). No obstante, la traducción clínica de agentes quimiopreventivos naturales enfrenta retos relevantes: baja biodisponibilidad de muchos fitoquímicos, heterogeneidad de las poblaciones diana, definición de criterios y desenlaces adecuados para prevención a largo plazo, y la necesidad de ensayos aleatorizados, suficientemente potentes y seguros que demuestren eficacia real (49; 52). En consecuencia, la investigación actual prioriza la optimización farmacocinética de compuestos prometedores, el estudio mecanístico riguroso y la identificación de subgrupos de alto riesgo en los que la quimioprevención ofrezca un balance beneficio-riesgo favorable (49; 50).

- **Quimioprevención en plantas medicinales**

La quimioprevención mediante plantas medicinales se fundamenta en el uso de fitoquímicos (como los polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, monoterpenos, triterpenos, alcaloides, compuestos sulfurados, carotenoides, etc) que actúan sobre múltiples dianas moleculares para prevenir o retrasar la carcinogénesis (49). Estos compuestos ejercen mecanismos complementarios y frecuentemente sinérgicos: como la actividad antioxidante y antiinflamatoria que reduce el daño inicial al ADN; la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular en células iniciadas; la inhibición de la angiogénesis y de los procesos de invasión y metástasis; la modulación epigenética (metilación del ADN, modificaciones de histonas); o la potenciación de la vigilancia inmune, todo lo cual contribuye a limitar la promoción y progresión tumoral (53). Un mecanismo central descrito para numerosos fitoquímicos es la activación del eje Keap1–Nrf2–ARE, que incrementa la expresión de enzimas detoxificadoras y de respuesta antioxidante endógena; no obstante, su regulación debe ser precisa,

pues una activación persistente podría resultar adversa en determinados contextos tumorales (54). Además, los fitoquímicos interfieren con rutas pro-proliferativas y pro-inflamatorias (entre ellas PI3K/AKT, MAPK, Wnt y NF-κB) favoreciendo una acción multitarget favorable para la quimioprevención, ver figura 15 (49; 55).

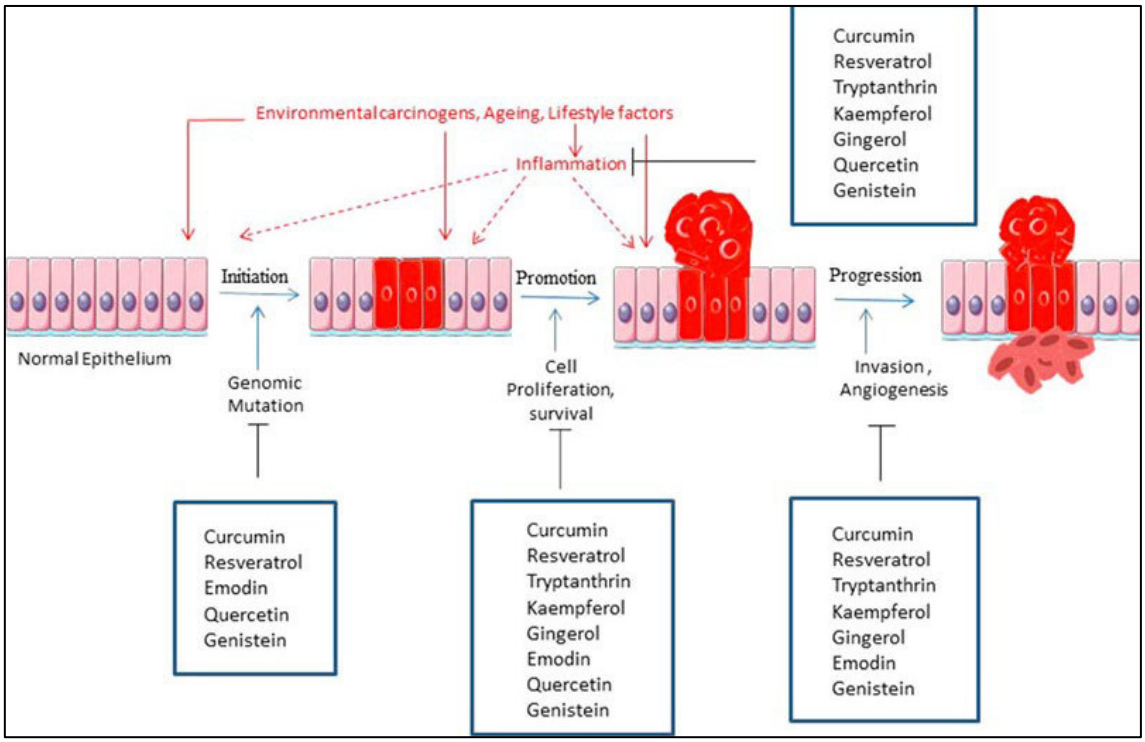


Figura 15. Diagrama de diversos procesos de la carcinogénesis y su posible inhibición con compuestos bioactivos de especies vegetales (49).

II.2. Antecedentes del estudio

Según Mendoza, Et al. (2020), estudiaron la actividad antioxidante, analgésica y hepatotoxicidad del extracto etanólico de *Tiquilia paronychioides*, conocida como "flor de arena". Se utilizó el método DPPH• para evaluar la actividad antioxidante, el método de placa caliente para la actividad analgésica y se examinó la hepatotoxicidad en ratones albinos Balb/C53/CNPB. Los resultados mostraron un CI_{50} de 4,31 mg/mL para la actividad antioxidante, una dosis de 750 mg/kg que produjo un 51,69% de actividad analgésica, y un DL_{50} de al menos 2000 mg/kg. Los autores concluyeron que el extracto presenta baja actividad antioxidante y analgésica, requiriendo dosis altas para efectos analgésicos, pero sin riesgo de hepatotoxicidad (56).

Según Berlowski, Et al. (2013), compararon las propiedades antioxidantes de diez infusiones de plantas peruanas y determinaron su relación con el contenido fenólico. Se utilizó el método DPPH•, ABTS•+ y FRAP para evaluar la actividad antioxidante y el de Folin-Ciocalteu para polifenoles. Entre las especies vegetales utilizadas estuvo la *Tiquilia paronychioides* "flor de arena". Los resultaron registraron un TEAC de 0,9 mmol/100mL para DPPH•; 0,3 mmol/100mL para ABTS•+ y para FRAP 0,6 mmol/100mL mientras que el contenido de polifenoles fue de 75 mg/100mL equivalente a Ácido Gálico. En conclusión, registraron que existe una correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles, además de mencionar que la "flor de arena" presentó una regular actividad antioxidante donde predomino los compuestos hidrofílicos y una regular cantidad de polifenoles (57).

Según Alejandrina, Et al. (2021), estudiaron la relación de la auto hidrólisis de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson con la concentración de quercetina extraída. El método de extracción consistió en una maceración acuosa (1:12 p/v) a 20 rpm y 25 °C, se realizaron 7 ensayos por triplicado donde el factor de variación fue el tiempo (2; 5; 8; 24; 48; 96 y 168 horas), para la cuantificación de quercetina utilizaron un equipo de HPLC-DAD. Concluyeron que la máxima concentración de quercetina extraída del extracto fue a las 48 horas (0,035 mg quercetina/g muestra), además, se pudo evidenciar la presencia de Ácido romarínico, rutina y kaempferol (58).

Según Pareja, Et al. (2018), determinaron el efecto analgésico del extracto hidroalcohólico de la *Tiquilia paronychoides* "flor de arena". Utilizaron el método *in vivo* de inmersión de la cola en agua a 55 °C y usaron como estándar al diclofenaco, además de emplear los intervalos de tiempo en la administración de cada tratamiento a los 30; 60 y 90 minutos. Concluyeron en que a los 60 minuto el extracto de *Tiquilia paronychoides* ejerce una acción analgésica máxima en 7,88 segundos (59).

Según Tacanga, Et al. (2019), evaluaron la actividad anti-Candida albicans *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena". Utilizaron el método de difusión de discos en agar, usando como estándar al fluconazol (25 ug/disco), solución salina

como blanco y dos concentraciones distintas del extracto de *Tiquilia paronychioides* (10% y 20%). Reportaron un halo de inhibición de diámetro 10,6 mm para el extracto al 10% y 22,1 mm para el extracto al 20%, respecto al estándar este presento un halo de inhibición de 28,3 mm de diámetro. Concluyeron que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” tiene una actividad antifúngica especialmente sobre la cepa *Candida albicans* (60).

Según Trujillo, Et al. (2018), evaluaron el efecto diurético de la infusión de las hojas de *Tiquilia paronychioide* “flor de arena” en *Rattus rattus* var. albinus. Emplearon el método de Lipschitz para inducir a diuresis a ratas con 25 mL agua/kg de peso, la infusión fue dosificada en 100 mg/kg y 200 mg/kg, el estándar empleado fue la furosemida 10 mg/kg. Concluyeron que a una dosis de 200 mg/kg de infusión de *Tiquilia paronychioide* “flor de arena” genera más diuresis que la dosis de 100 mg/kg, sin embargo, estos dos resultados estadísticamente no son significativos en comparación con el estándar (61).

Según Mohamed, Et al. (2024), analizaron el perfil fitoquímico, la actividad antioxidante y el efecto cicatrizante de la *Echium amoenum*, de la familia Boraginaceae. Determinaron la composición química mediante un análisis por Cromatografía Líquida de Alta eficiencia (HPLC), la actividad antioxidante se realizó de manera *in vitro* y el efecto cicatrizante se realizó en un modelo *in vivo* de 40 ratas Wistar divididas en 5 grupos utilizando como estándar a la sulfadiazina de plata. La determinación del perfil fitoquímico se realizó a través del análisis de la shikonina, un derivado de la naftoquinona, se encontró la presencia de este compuesto, además, el efecto cicatrizante mostró resultados significativos en los grupos experimentales (62).

Según Hanane, Et al. (2019), recopilaron información sobre los componentes químicos, actividad antioxidante y efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer humano del extracto de la *Heliotropium bacciferum*, de la familia Boraginaceae. Reportaron el aislamiento y caracterización de al menos 16 metabolitos secundarios de los extractos de la parte aérea de la planta, compuestos como el esterol, norisoprenoides, lactonas de terpeno y compuestos fenólicos, mientras que la actividad antioxidante fue

significativa en el extracto metanólico por el método DPPH y ABTS, finalmente el extracto clorofórmico logró inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon relacionado estrechamente con las lactonas terpénicas antiproliferativas (63).

Según Oztamar, Et al. (2023), estudiaron el perfil fitoquímico de las partes aéreas de la *Heliotropium procumbens* Mill., de la familia Boraginaceae. Para ello, determinaron la composición química mediante un análisis por UHPLC-HRMS, el contenido de fenoles y flavonoides mediante los métodos de fosfomolibdeno y quelantes de metales respectivamente, las propiedades antioxidantes fueron a través de DPPH, ABTS y FRAP y las actividades enzimáticas fueron sobre la acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, α-amilasa, α-glucosidasa y tirosinasa *in vitro*. Determinaron la presencia de luteolina, ácidos litospérmico y ácido rosmarínico, su actividad antioxidante fue estadísticamente significativa y la posibilidad de servir como fuente de actividades biológicas (64).

Marrelli, Et al. (2023), determinaron los efectos antioxidantes y desnaturalizantes del extracto de la *Buglossoides purpurocaerulea* (L.) IM Johns, de la familia Boraginaceae. Analizaron la parte del fruto mediante una maceración metanólica y su composición química se realizó mediante una Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) y HPTLC, se cuantifico el contenido de fenoles, flavonoides, la actividad antioxidante por el método DPPH, blanqueamiento del β-caroteno y efecto desnaturalizante sobre albúmina de suero bovino. Los compuestos mayoritarios encontrados fueron los ácidos linoleicos, α-linolénico y ácido rosmarínico, su actividad antioxidante fue estadísticamente significativa y fue eficaz para prevenir la desnaturalización inducida por calor a la albumina de suero bovino (65).

II.3. Bases teóricas

II.3.1. Ensayos químicos *in vitro* para actividad antioxidante

- **Descripción de ensayos antioxidantes**

La descripción de los ensayos antioxidantes *in vitro* comprende un conjunto de métodos químicos diseñados para evaluar la capacidad

de los compuestos bioactivos de neutralizar radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante mecanismos de transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno. Estos ensayos permiten determinar de forma controlada, reproducible y comparativa la eficacia antioxidante de extractos vegetales, metabolitos secundarios y compuestos sintéticos, proporcionando una primera aproximación del potencial protector de las moléculas frente al daño oxidativo relacionado con el envejecimiento, el cáncer y diversas enfermedades crónicas (66; 67). La selección del tipo de ensayo depende de factores como la naturaleza química del radical evaluado, la polaridad de los compuestos y el objetivo del estudio, por lo que se recomienda aplicar diferentes métodos complementarios para obtener un perfil antioxidante más completo y fiable (68). Aunque los ensayos *in vitro* no reproducen completamente las condiciones fisiológicas del organismo, representan herramientas rápidas y de gran valor comparativo, que sirven como etapa preliminar para estudios *in vivo* y clínicos destinados a validar la relevancia biológica de los compuestos antioxidantes (69).

- **Ensayos de actividad antioxidante *in vitro*.**

Entre los métodos más utilizados destacan los ensayos de capacidad de atrapamiento de radicales estables como DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), que miden la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de los antioxidantes hacia los radicales (66). Asimismo, los ensayos de capacidad reductora como FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) evalúan la habilidad de los antioxidantes para reducir iones metálicos, reflejando su potencial redox (67). Otro enfoque importante es el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), que cuantifica la inhibición de la oxidación mediada por radicales peroxilo, simulando condiciones más cercanas a sistemas biológicos (68).

El método DPPH se fundamenta en la reducción del radical libre DPPH•, caracterizado por su color violeta intenso. Los compuestos antioxidantes donan electrones o átomos de hidrógeno al DPPH•, transformándolo en una forma no radical de color amarillento. La disminución de la absorbancia, medida generalmente a 517 nm, es directamente proporcional a la capacidad de captación de radicales del compuesto analizado (70).

Por otro lado, el método ABTS se basa en la reducción del radical catiónico ABTS•+, generado por la oxidación del ABTS mediante persulfato de potasio. La decoloración del radical verde-azulado se mide a 734 nm, reflejando la eficiencia del antioxidante. Este método posee la ventaja de ser aplicable tanto en medios acuosos como orgánicos, permitiendo evaluar compuestos hidrofílicos y lipofílicos (70).

El ensayo FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) en un medio ácido. La formación del complejo Fe^{2+}-TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) genera una coloración azul cuya absorbancia, medida a 593 nm, es proporcional al poder reductor de la muestra. Este método se considera rápido y reproducible, aunque su sensibilidad es mayor frente a antioxidantes hidrosolubles (70). El fundamento de la reacción de algunos métodos antioxidantes *in vitro* se puede observar en la figura 16.

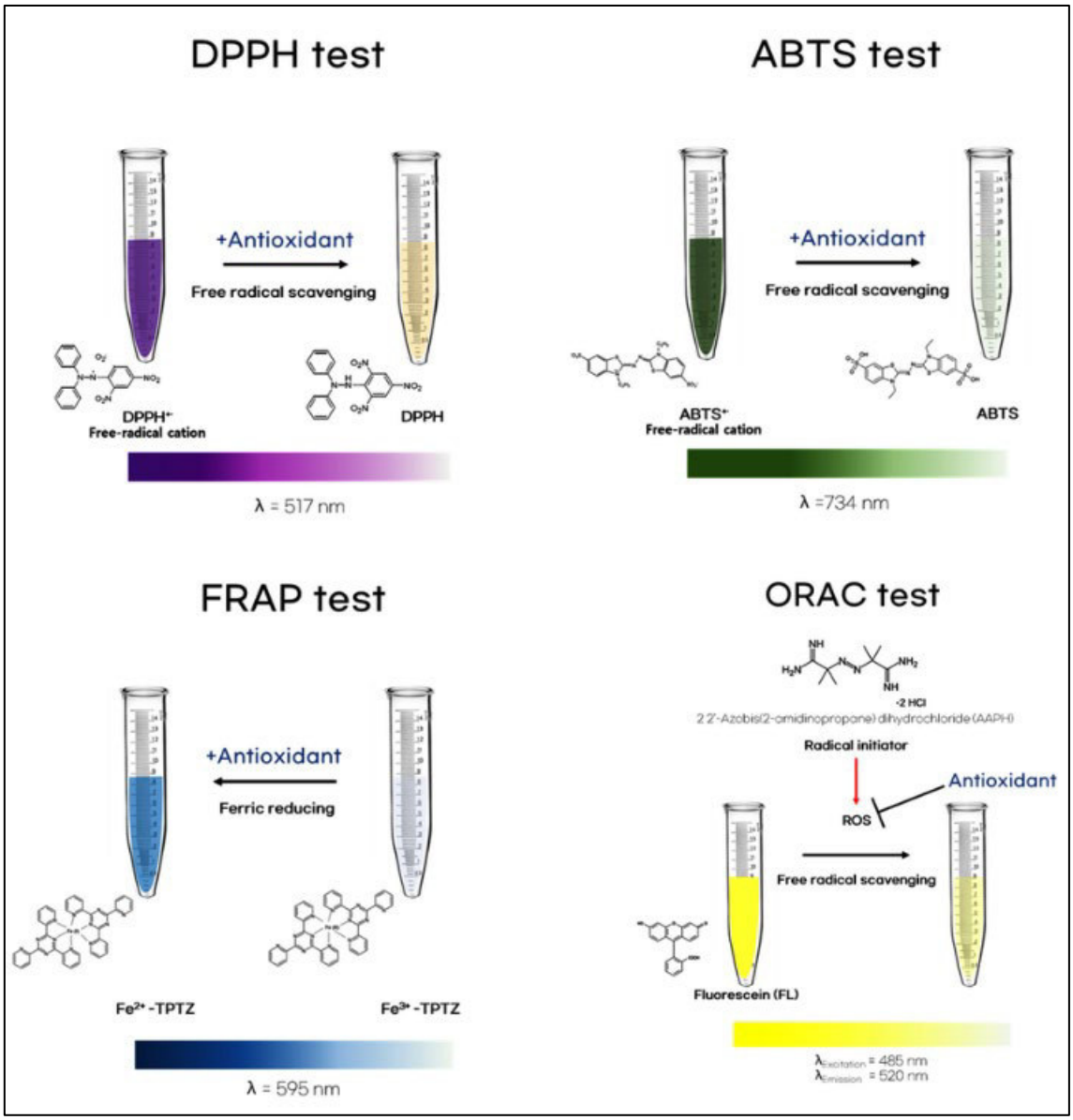


Figura 16. Esquema de algunos métodos para la determinación de la actividad antioxidante: DPPH•, ABTS•+, FRAP y ORAC (71).

El método de peróxido de hidrógeno H_2O_2 se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes para reducir o eliminar el H_2O_2, una especie reactiva que, aunque no es un radical libre, puede generar radicales hidroxilo altamente tóxicos en presencia de metales de transición. En este ensayo, la concentración de H_2O_2 residual se determina espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 210 nm, correspondiente a la longitud de onda donde el H_2O_2 presenta su máxima absorción. La disminución de la absorbancia tras la adición del extracto antioxidante indica la capacidad de la muestra

para descomponer o neutralizar el H_2O_2, reflejando su potencial antioxidante (72).

El método de superóxido dismutasa (SOD) se basa en la autooxidación del pirogalol, un compuesto fenólico que, en condiciones alcalinas, genera aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) de manera espontánea. En ausencia de SOD, el pirogalol se oxida rápidamente, aumentando la absorbancia del medio. La presencia de la enzima inhibe parcialmente este proceso, catalizando la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La actividad de la SOD se determina cuantificando la inhibición de la velocidad de autooxidación del pirogalol, midiendo espectrofotométricamente la absorbancia a 420 nm. Así, una menor tasa de aumento de absorbancia refleja una mayor actividad enzimática de la muestra (72).

II.3.2. Modelos celulares *in vitro* para evaluación antitumoral

- **Descripción de líneas celulares (3T3, H460, DU145, MCF-7 y HT-29)**

Una línea celular es un cultivo celular permanentemente establecido que va a proliferar de modo indefinido mientras tenga medio fresco y espacio (73). Las líneas difieren de las cepas celulares en que se han inmortalizado. Las líneas celulares son ampliamente usadas para investigación en laboratorio, y particularmente como un modelo *in vitro* en la investigación del cáncer (74).

Las líneas celulares usadas son American Type Culture Collection (ATCC), es decir pertenece a la Colección Americana de Cultivos Tipo, la misma que es conocida como una organización global sin fines de lucro que es conserva de biorecursos y brinda materiales biológicos a organizaciones de investigación (75).

La línea celular NIH-3T3 corresponde a fibroblastos embrionarios murinos derivados de embriones de ratón suizo de 17–19 días de gestación. En condiciones de cultivo presentan morfología fusiforme, crecimiento adherente y organización en monocapa característica de fibroblastos, conservando propiedades de células no tumorales del

tejido conectivo. Aunque no representan un modelo de cáncer específico, son ampliamente utilizadas como sistema de referencia para evaluar citotoxicidad sobre células normales, estudios de transformación oncogénica y análisis del microambiente tumoral en co-cultivos con células cancerígenas (76).

La línea NCI-H460 es un modelo humano de carcinoma pulmonar de células grandes, subtipo de cáncer de pulmón no microcítico, derivado del líquido pleural de un paciente con enfermedad avanzada. Estas células presentan morfología epitelial adherente y expresan marcadores propios de origen epitelial. Se caracterizan por su elevada capacidad tumorigénica en modelos *in vivo*, lo que las convierte en una herramienta relevante para la evaluación preclínica de agentes quimioterapéuticos y terapias dirigidas contra cáncer pulmonar (77).

DU145 es una línea celular humana establecida a partir de una metástasis cerebral de adenocarcinoma prostático. Morfológicamente exhibe características epiteliales y se distingue por su independencia de andrógenos, al carecer de expresión funcional del receptor androgénico y de antígeno prostático específico (PSA). Representa un modelo de cáncer de próstata metastásico resistente a hormonas, siendo ampliamente empleada en estudios de mecanismos moleculares de progresión tumoral y en la evaluación de compuestos antitumorales dirigidos a enfermedad avanzada (78).

La línea MCF-7 corresponde a un adenocarcinoma mamario humano derivado de derrame pleural metastásico. Presenta morfología epitelial glandular, crecimiento adherente y expresión de receptores hormonales, particularmente receptor de estrógeno, clasificándose dentro del subtipo luminal A. Debido a estas características, constituye uno de los modelos más utilizados para la investigación de cáncer de mama hormono-dependiente y para la evaluación de terapias endocrinas y citotóxicas (79).

La línea M-14 es un modelo humano de melanoma maligno metastásico, derivado de una lesión cutánea secundaria. Se caracteriza por presentar fenotipo amelanótico y portar mutaciones

relevantes como BRAF V600E, asociadas a proliferación celular descontrolada. Su utilización es frecuente en estudios dirigidos al desarrollo y evaluación de inhibidores de vías de señalización implicadas en melanoma avanzado (80).

Finalmente, HT-29 es una línea celular humana de adenocarcinoma colorrectal establecida a partir de tumor primario de colon. Presenta morfología epitelial diferenciada, crecimiento adherente y capacidad de formar estructuras glandulares en cultivo. Este modelo es ampliamente empleado en la investigación de cáncer colorrectal para la evaluación de compuestos citotóxicos, estudios de diferenciación celular y análisis de mecanismos moleculares asociados a la progresión tumoral (81).

- **Ensayos de actividad antitumoral *in vitro* (MTT y SRB)**

La evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* constituye una etapa fundamental en la investigación preclínica de compuestos bioactivos, permitiendo determinar su efecto citotóxico o antiproliferativo sobre líneas celulares tumorales bajo condiciones controladas. Entre los métodos colorimétricos más empleados destacan el ensayo de reducción del tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y el ensayo de sulforhodamina B (SRB), ambos ampliamente validados para la cuantificación indirecta de viabilidad celular y proliferación tumoral (82; 83).

El ensayo MTT se fundamenta en la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio MTT, de color amarillo, a cristales insolubles de formazán de color púrpura, ver figura 17. Esta reacción es mediada principalmente por enzimas oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H localizadas en mitocondrias, aunque también pueden participar otras enzimas citosólicas. La cantidad de formazán producido es proporcional a la actividad metabólica celular y, por ende, al número de células viables presentes en el cultivo. Desde el punto de vista experimental, las células tratadas con el compuesto en estudio se incuban con la solución de MTT durante 2–4 horas; posteriormente, los cristales formados se solubilizan mediante disolventes orgánicos como

dimetilsulfóxido (DMSO), y la absorbancia se determina espectrofotométricamente entre 540 y 570 nm. La disminución de la absorbancia respecto al control indica efecto citotóxico o antiproliferativo (83; 84).

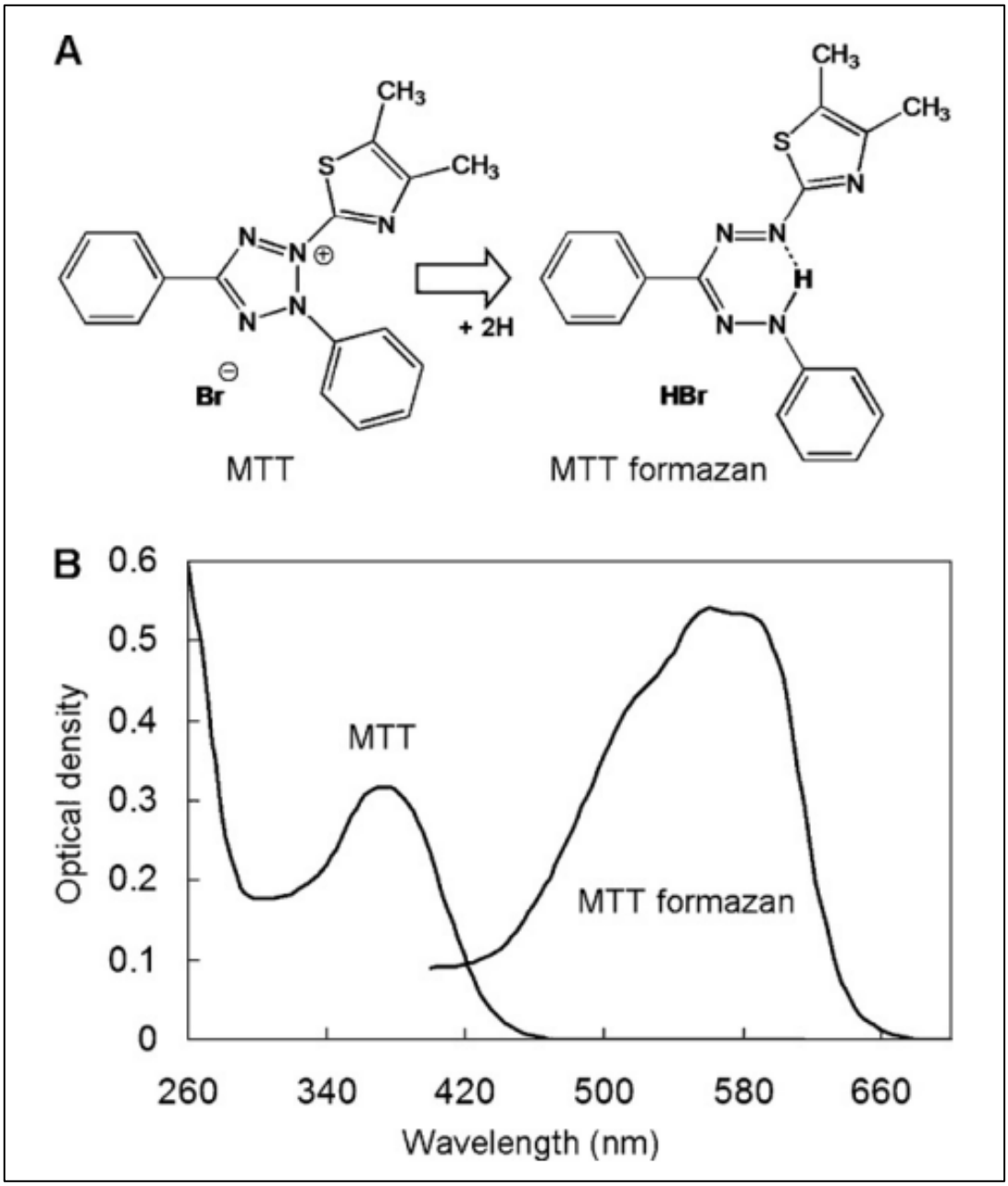


Figura 17. Fundamento del del ensayo MTT para viabilidad celular. **A** Esquema de la reacción de reducción del MTT a formazán; **B** Espectros de absorción óptica de MTT y formazán (83).

Por su parte, el ensayo SRB se basa en la capacidad del colorante sulforodamina B para unirse electrostáticamente a los residuos

básicos de las proteínas celulares bajo condiciones ácidas debido a su estructura química, ver figura 18. Tras el tratamiento con el agente antitumoral, las células se fijan con ácido tricloroacético, lo que precipita y preserva la masa proteica total. Posteriormente, el colorante SRB se une a las proteínas celulares fijadas; el exceso se elimina mediante lavados con ácido acético, y el colorante ligado se solubiliza en medio básico para su cuantificación espectrofotométrica, generalmente a una longitud de onda cercana a 510 nm. A diferencia del MTT, este método no depende directamente de la actividad metabólica, sino de la biomasa celular total, proporcionando una estimación más directa del número de células adherentes viables tras el tratamiento (82; 85).

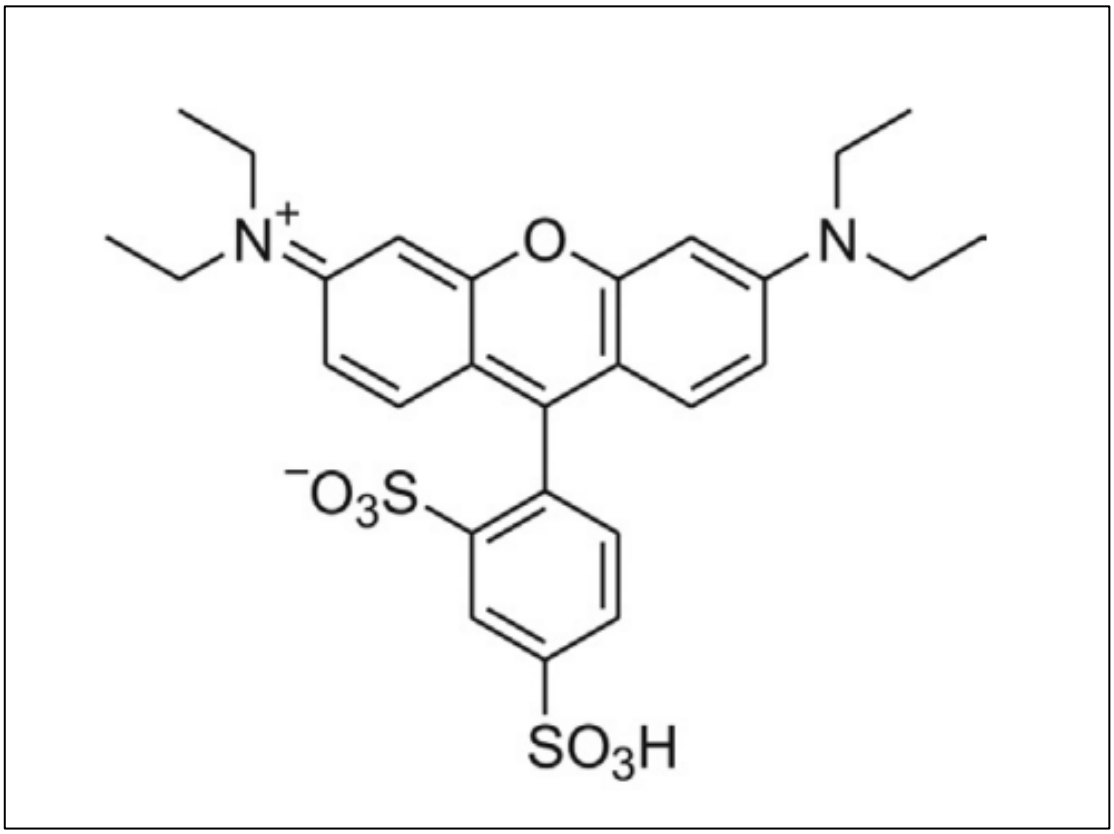


Figura 18. Estructura química de la sulforodamina B (SRB) (86).

Desde una perspectiva comparativa, ambos métodos presentan alta reproducibilidad y son adecuados para estudios de cribado de compuestos antitumorales. El ensayo MTT refleja la integridad metabólica celular y es sensible a alteraciones mitocondriales tempranas; sin embargo, puede verse influenciado por sustancias

que modifiquen el metabolismo celular sin inducir muerte celular directa. En contraste, el ensayo SRB ofrece mayor estabilidad en la señal, amplia linealidad con la densidad celular y menor interferencia metabólica, lo que lo hace particularmente útil en estudios de proliferación prolongada y en líneas celulares adherentes (82; 83; 85). La elección entre ambos métodos depende del objetivo experimental, del tipo de compuesto evaluado y de las características de la línea celular empleada.

Adicionalmente, existen ensayos alternativos basados en principios similares, como las sales tetrazolio XTT y WST-1, que generan productos de formazán solubles en el medio de cultivo, eliminando la necesidad de una etapa de solubilización y facilitando ensayos de alto rendimiento. Asimismo, el método de exclusión con azul de Tripán permite diferenciar células viables de no viables mediante la evaluación de la integridad de la membrana plasmática por microscopia óptica (84; 87). En conjunto, estos métodos constituyen herramientas esenciales en la evaluación preliminar de la actividad antitumoral de extractos y compuestos bioactivos en modelos celulares *in vitro*.

II.3.3. Modelos biológicos *in vivo* para carcinoma hepatocelular

- **Inducción química de carcinoma hepatocelular (DEN, CCL4, y otros)**

La inducción química del carcinoma hepatocelular (CHC) en modelos animales constituye una estrategia ampliamente empleada para reproducir las etapas de iniciación, promoción y progresión tumoral observadas en la hepatocarcinogénesis humana. Entre los carcinógenos más utilizados destacan la dietilnitrosamina (DEN) y el tetracloruro de carbono (CCl_4), los cuales actúan mediante mecanismos bioquímicos distintos pero complementarios, permitiendo modelar tanto el daño genotóxico directo como el microambiente inflamatorio y fibrótico asociado al desarrollo de CHC (88; 89).

La dietilnitrosamina (DEN) es una nitrosamina hepatocarcinógena que requiere activación metabólica hepática a través del sistema enzimático citocromo P450, particularmente CYP2E1. Durante este proceso, la DEN se bioactiva generando metabolitos electrofílicos reactivos capaces de formar aductos con el ADN, principalmente O^6-etilguanina, lo que induce mutaciones puntuales, inestabilidad genómica y activación de oncogenes o inactivación de genes supresores tumorales, ver figura 19. Este daño genotóxico inicia el proceso carcinogénico, promoviendo la proliferación clonal de hepatocitos transformados. En modelos experimentales, la administración de DEN en roedores reproduce alteraciones histopatológicas progresivas que incluyen necrosis hepatocelular, displasia, formación de nódulos regenerativos y eventual desarrollo de carcinoma hepatocelular (88; 90).

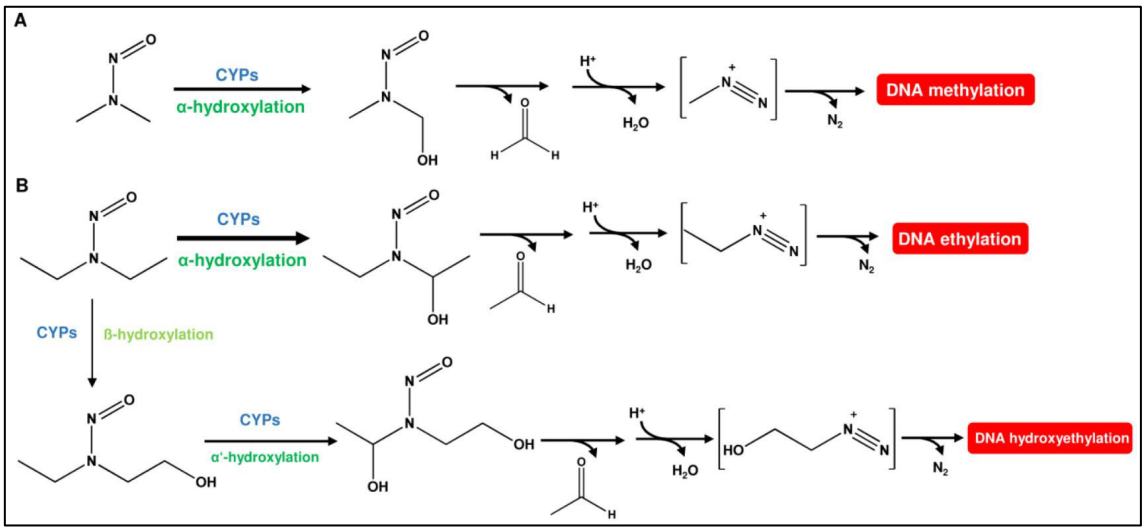


Figura 19. Vías de activación metabólica de algunas nitrosaminas para la formación de aductos de ADN. **A** α-hidroxilación de la Dimetilnitrosamina (DMN); **B** α y β -hidroxilación de la Dietilnitrosamina (DEN) (91).

Por su parte, el tetracloruro de carbono (CCl_4) actúa principalmente como agente hepatotóxico promotor. Su biotransformación hepática por CYP2E1 genera radicales libres altamente reactivos, como el radical triclorometilo ($\bullet CCl_3$) y el radical triclorometilperoxilo ($\bullet OOCCl_3$), los cuales desencadenan peroxidación lipídica de membranas celulares, alteración mitocondrial y necrosis

centrolobulillar. Este daño oxidativo sostenido induce inflamación crónica, activación de células estrelladas hepáticas y desarrollo de fibrosis, creando un microambiente procarcinogénico que favorece la promoción y progresión tumoral cuando se combina con un iniciador genotóxico como la DEN (89; 92).

En muchos modelos experimentales, la combinación secuencial de DEN como iniciador y CCl_4 como promotor acelera significativamente la aparición de lesiones preneoplásicas y tumores hepáticos, ya que integra el componente mutagénico inicial con un entorno de estrés oxidativo e inflamación crónica, condiciones clave en la fisiopatología del CHC humano asociado a cirrosis (88; 89). Esta sinergia permite reducir el tiempo de desarrollo tumoral y aumentar la reproducibilidad del modelo.

Adicionalmente, pueden emplearse otros inductores o promotores junto a los carcinógenos primarios para acelerar la hepatocarcinogénesis. Entre ellos destacan los agentes que incrementan el estrés oxidativo, como dietas ricas en grasas (modelo de esteatohepatitis no alcohólica), fenobarbital como promotor tumoral no genotóxico que estimula proliferación hepatocelular, y compuestos que inducen inflamación crónica (93; 94). El fundamento químico común de estos promotores radica en potenciar la proliferación celular compensatoria frente al daño hepático, aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y favorecer la acumulación de mutaciones en hepatocitos previamente iniciados por agentes genotóxicos (93; 94).

En conjunto, los modelos de inducción química mediante DEN y CCl_4 reproducen de manera integral los eventos moleculares de la hepatocarcinogénesis (estrés oxidativo, inflamación, fibrosis y mutagénesis) constituyendo herramientas experimentales esenciales para la evaluación de estrategias quimiopreventivas y terapéuticas en carcinoma hepatocelular.

- **Indicadores semiológicos, histológicos y bioquímicos del carcinoma hepatocelular**

Los indicadores semiológicos del carcinoma hepatocelular (CHC) pueden ser inespecíficos en sus etapas iniciales, lo que dificulta su detección temprana tanto en el ámbito clínico como en modelos experimentales. En fases tempranas, los pacientes pueden permanecer asintomáticos o presentar manifestaciones generales como astenia, fatiga o pérdida de peso. Conforme la enfermedad progresa, es frecuente la aparición de dolor o sensación de plenitud en el hipocondrio derecho, distensión abdominal secundaria a ascitis y hepatomegalia palpable durante la exploración física. En estadios avanzados pueden observarse signos asociados a insuficiencia hepática, tales como ictericia, hemorragia digestiva secundaria a hipertensión portal y encefalopatía hepática. Asimismo, algunos pacientes desarrollan síndromes paraneoplásicos, como hipoglucemia o eritrocitosis, que reflejan alteraciones metabólicas inducidas por el tumor y que pueden contribuir al reconocimiento clínico de la enfermedad (95; 96).

Los indicadores bioquímicos constituyen herramientas fundamentales para la evaluación del daño hepático y la detección de procesos neoplásicos. Entre los parámetros de laboratorio más utilizados se encuentran las transaminasas séricas, particularmente alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), cuyos niveles elevados reflejan daño hepatocelular. De igual manera, el incremento de enzimas colestásicas como la fosfatasa alcalina y la gamma-glutamil transferasa (GGT) puede indicar alteraciones en el flujo biliar o infiltración tumoral hepática. Otros parámetros, como la disminución de albúmina sérica y la prolongación del tiempo de protrombina, evidencian un deterioro de la función sintética del hígado y se asocian con estadios más avanzados de enfermedad (97). En relación con los marcadores tumorales, la alfa-fetoproteína (AFP) continúa siendo el biomarcador sérico más ampliamente empleado para la detección y seguimiento del CHC; sin embargo, su sensibilidad diagnóstica es limitada cuando se utiliza de forma

aislada. Por ello, en los últimos años se ha propuesto el uso combinado de biomarcadores como AFP-L3 y la des-gamma-carboxiprotrombina (PIVKA-II), los cuales han demostrado mejorar la capacidad diagnóstica en pacientes con sospecha de carcinoma hepatocelular (98; 99). Asimismo, se han identificado biomarcadores emergentes, entre los que destacan la proteína de Golgi 73 (GP73), perfiles de microARN circulantes y otros marcadores moleculares que podrían complementar los métodos diagnósticos tradicionales y mejorar la detección temprana de esta neoplasia (99; 100).

Por otra parte, los indicadores histológicos representan el criterio confirmatorio para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular en modelos experimentales. Desde el punto de vista microscópico, el CHC se caracteriza por alteraciones arquitectónicas del parénquima hepático, tales como pérdida de la organización lobulillar normal, formación de trabéculas celulares engrosadas, patrones pseudoglandulares o sólidos, y presencia de nódulos neoplásicos bien o moderadamente diferenciados. A nivel celular, los hepatocitos tumorales presentan pleomorfismo celular y nuclear, hipercromasia, nucleolos prominentes, aumento de la relación núcleo/citoplasma y elevada actividad mitótica, reflejando un alto índice proliferativo. También pueden observarse invasión vascular, necrosis tumoral, acumulación de lípidos o glucógeno intracelular y cambios displásicos previos, los cuales forman parte del espectro progresivo de la hepatocarcinogénesis. Asimismo, se han descrito diferentes subtipos histológicos de CHC, como el subtipo macrotrabecular masivo, el subtipo esteatohepatítico y variantes celulares claras o fibrolamelares, los cuales presentan características morfológicas y moleculares particulares que influyen en el comportamiento biológico del tumor (101; 102). La evaluación histopatológica se complementa frecuentemente con marcadores inmunohistoquímicos como Ki-67, glicoproteína-3 (GPC3), glutamina sintetasa y proteína de choque térmico HSP70, los cuales permiten diferenciar lesiones preneoplásicas de tumores malignos establecidos y caracterizar el grado de proliferación tumoral (103-105).

II.4. Glosario de términos

- **Perfil fitoquímico:** Se trata de identificar, mediante técnicas y métodos de laboratorio, los compuestos bioactivos característicos de las plantas, en particular sus metabolitos secundarios, los cuales se obtienen mediante diversas técnicas de extracción. Estos compuestos son exclusivos de una especie, género o familia específica (106).

- **Compuestos bioactivos:** Son metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente en el reino de las plantas; se consideran compuestos no nutritivos, pero esenciales para el bienestar de la salud humana. Se derivan de precursores que se generan a través de las rutas metabólicas de cada especie vegetal (107).

- **Actividad antioxidante:** Es la capacidad de neutralizar especies reactivas mediante formación de enlaces hidrogeno, propiedades quelantes, reducción de iones metálicos, efecto de disolventes cinéticos, activación de enzimas antioxidantes o con transferencias de electrones inhibiendo el proceso de oxidación (108; 109).

- **Carcinoma hepatocelular:** Es una forma de cáncer que se desarrolla a partir de las células del hígado (hepatocitos). Se distingue por el crecimiento incontrolado de estas células, lo que incluye diversas mutaciones y alteraciones en los cromosomas, que pueden afectar genes implicados en el ciclo celular y vías de señalización (110).

- **Agente carcinógeno:** Es un factor del entorno que tiene la capacidad de causar la aparición de cáncer en los organismos vivos. Son capaces de alterar el ADN celular, lo que resulta en la creación de células malignas y en la proliferación de tumores. Pueden clasificarse en químicos, físicos, biológicos o relacionados con el estilo de vida (111).

- **Efecto quimiopreventivo:** Es la aplicación de agentes capaces de inhibir, revertir o retardar la formación del cáncer. Numerosos mecanismos en las vías de señalización intracelular pueden explicar

la acción de estas sustancias, poniendo énfasis en dianas comunes con fitoquímicos con propiedades quimiopreventivas (112).

- **Lesión preneoplásica:** Es una alteración morfológica que precede al desarrollo de una neoplasia maligna. Se caracteriza por cambios estructurales, proliferativos y genéticos en las células. En el hígado se manifiesta como focos de hepatocitos alterados o nódulos displásicos asociados a estrés oxidativo (113).

- **Índice hepático:** Es un indicador que se emplea para analizar la condición del hígado en función del peso corporal de un animal de laboratorio. Comúnmente se presenta en forma de porcentaje y ayuda a identificar si el hígado ha aumentado (hepatomegalia) o, por el contrario, ha disminuido (cirrosis) de tamaño (114).

- **Actividad antitumoral:** Es la capacidad de inhibir de manera efectiva la proliferación celular, regular el ciclo celular e interferir en diversas vías de señalización asociadas con la tumorogénesis. Asimismo, algunos de estos compuestos pueden promover los mecanismos de reparación del ADN mediante la expresión genética (115).

- **Índice selectivo citotóxico:** Es un indicador que mide la capacidad de un agente para atacar de manera específica a células malignas, evitando causar algún daño en células sanas. Se emplea para analizar el grado de selectividad de un tratamiento contra el cáncer y es un componente fundamental en la creación de terapias oncológicas (116).

- **Concentración inhibitoria media:** Se define como la concentración necesaria de un analito o muestra problema para poder alcanzar la inhibición del 50% de una función biológica o bioquímica específica bajo condiciones experimentales controladas. Se representa bajo el término de CI_{50} (117).

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” presenta compuestos bioactivos y actividad antioxidante *in vitro* y efecto quimiopreventivo *in vivo* contra carcinoma hepatocelular y citotóxico *in vitro* contra células cancerígenas.

III.2. Variables

III.2.1. Variable independiente

Extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”

III.2.2. Variable dependiente

- Variable dependiente 1: Compuestos bioactivos.
- Variable dependiente 2: Actividad antioxidante.
- Variable dependiente 3: Efecto quimiopreventivo.
- Variable dependiente 4: Efecto citotóxico.

III.3. Operacionalización de variables

Tabla N° 4. *Operacionalización de variables de la investigación.*

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
V. independiente: Extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson "flor de arena"	Solución obtenida a partir de la extracción de compuestos bioactivos de plantas utilizando una mezcla de agua y alcohol, generalmente en proporciones que favorecen la solubilidad de diversos metabolitos secundarios (118).	Extracto enriquecido de metabolitos secundarios extraídos por el método de decocción de *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson "flor de arena" en agua destilada y alcohol 1:1 (1:40 g/mL).	Tamizaje fitoquímico (Prueba de Cloruro férrico; Shinoda;Gelatina; Borntrager; Liebermann-Bouchardat; Dragendorff; Wagner; Bertrand; Mayer; Baljet; Índice afrosimétrico; Vainillina / H2SO4 y Salkowsky)	Asignando artificios según la intensidad de la reacción de cambio de coloración y/o formación de precipitados	Negativa (-) Leve (+) Moderada (++) Intensa (+++)
V. dependientes: Compuestos bioactivos	Los polifenoles son metabolitos secundarios que se caracterizan por tener múltiples grupos fenólicos en su estructura química. Los flavonoides, una subclase de los polifenoles, poseen una alta actividad biológica (119).	Cuantificar la cantidad de polifenoles y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson "flor de arena" mediante el método de Folin-Ciocalteu y formación de complejos con el tricloruro de aluminio respectivamente.	Método de Folin-Ciocalteu Método colorimétrico con cloruro de aluminio	Miligramos de ácido gálico equivalentes a un gramo de extracto. Miligramos de quercetina equivalentes a un gramo de extracto.	mg EAG/g extracto mg EQ/g extracto
Actividad antioxidante	Capacidad de ciertas sustancias para prevenir o retardar el daño celular causado por los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) (108).	Cuantificar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson "flor de arena" mediante el método de captación del radical libre DPPH•, radical catiónico ABTS•+ y FRAP.	Método de captación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. (DPPH•) Método de captación del radical libre acido 2,2'-azinobis (3-etilbezotiazolin)-6-sulfonico (ABTS•+) Método de la capacidad del poder reductor férrico (FRAP)	Concentración de extracto suficiente para inhibir el 50% de radicales libres (CI_{50}). Miligramos de Trolox equivalentes a un gramo de extracto. Miligramos de Ácido ascórbico a un gramo de extracto.	µg/mL mg Trolox/g extracto mg AA/g extracto
Efecto quimiopreventivo sobre carcinoma hepatocelular.	Capacidad de ciertos metabolitos secundarios para prevenir o inhibir la formación y progresión del cáncer. Se encuentran antioxidantes como los polifenoles, vitaminas y ciertos fármacos (120).	Capacidad del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson "flor de arena" en prevenir o retrasar la aparición de células carcinogénicas de origen hepático en ratas *Rattus* como resultado de la exposición a dietilnitrosamina.	Evaluación de marcadores enzimáticos del perfil hepático en sangre después del tratamiento. Examen histopatológico de tejido hepático con tinción de hematoxilina & eosina, evaluación de la integridad y aparición de células cancerígenas. Índice hepático.	GPT, GOT, Fosfatasa alcalina y GGT. Evaluación del grado de las lesiones hepáticas después del tratamiento mediante un estudio histopatológico. Grado relativo de daño del hígado en función al peso del hígado y el peso corporal.	U/L 0 - 4 %
Efecto citotóxico	Capacidad de ciertos metabolitos secundarios para inducir la muerte celular en células malignas. Se busca eliminar células tumorales sin causar un daño excesivo a las células sanas (121).	Capacidad del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* A.T. Richardson "flor de arena" de inhibir el crecimiento de células de diversos tipos de carcinoma en un modelo de línea celular.	Evaluación de la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico sobre diversas células cancerígenas mediante el uso de línea celular.	Concentración de extracto suficiente para inhibir el 50% del crecimiento de células cancerosas (CI_{50}).	µg/mL

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

El trabajo de investigación fue realizado en el Instituto de investigación en Ciencias farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” con coordenadas de 12°03'22,4" S y 77°01'24,3" W (Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM). La muestra vegetal fue colectada del distrito de Ocucaje, Ica con las coordenadas de 14°10'37,8" S y 75°34'57,2" W.

IV.2. Tipo y diseño de investigación

Es una investigación de tipo básica con enfoque cuantitativo y diseño experimental puro con un alcance explicativo.

La investigación es básica y de enfoque cuantitativo, ya que genera conocimiento científico fundamentado en la medición numérica de las variables estudiadas. Corresponde a un diseño experimental, dado que manipula la variable independiente bajo condiciones controladas. En consecuencia, presenta un alcance explicativo, ya que busca comprobar la relación de causa-efecto existente entre la variable independiente y las variables dependientes mediante el análisis estadístico correspondiente.

IV.3. Población y muestra

Hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” obtenidas del distrito de Ocucaje, provincia de Ica, departamento del mismo nombre. La muestra fue de 3 Kg de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” que cumplan los criterios de inclusión.

a) Criterio de inclusión:

- Hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” procedente del distrito de Ocucaje, provincia de Ica, departamento del mismo nombre. debidamente seleccionado.

b) Criterio de exclusión:

- Hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” procedente de otro distrito, provincia o departamento.

- Hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” contaminado con material inorgánico u orgánico.

IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

IV.4.1.Recolecta e identificación taxonómica

Los tallos, hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* se recolectaron manualmente en el periodo de febrero del 2025 (estación de verano) en el distrito de Ocucaje, ubicado en la provincia de Ica, departamento del mismo nombre a 334 msnm (Ver Anexo 2). Posteriormente, se realizó la clasificación botánica en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Ver Anexo 3).

IV.4.2. Procesamiento de la muestra

Se procedió a secar las muestras a 43°C por 48 horas. Las hojas y flores se separaron manualmente de los tallos para su posterior procesamiento. Luego, se disminuyó su tamaño de partícula mediante un molino (Ver Anexo 4). Todo este proceso fue realizado en el Laboratorio de Síntesis y Semisíntesis Orgánica del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales ¨Juan de Dios Guevara¨ de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM.

IV.4.3. Obtención del extracto hidroalcohólico

Para la obtención del extracto hidroalcohólico, se usó la muestra de hojas y flores pulverizadas de *Tiquilia paronychioides* y solución hidroalcohólica al 50% en proporción 1:40 g/mL (122). Se hizo una extracción por ebullición durante 10 minutos (Ver Anexo 5). Posterior a ello, se concentró en rotavapor y rápidamente se liofilizó. Finalmente, el extracto hidroalcohólico fue almacenado a 4°C hasta su uso (123).

IV.4.4. Tamizaje fitoquímico

Se realizó un estudio fitoquímico mediante los ensayos de coloración y precipitación siguiendo el método descrito por Lock de Ugaz (124).

Añadido a esto, se realizó un ensayo de solubilidad del extracto con diversos solventes de distinta polaridad (118).

IV.4.5. Determinación de la composición química por HPLC

Para el análisis cromatográfico, se realizó una hidrolisis ácida parcial de los componentes presentes en el extracto. Se preparó una concentración de 10 mg/mL de extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" con metanol al 75 %; HCl 1,2 M. La solución fue sometida a sonicación a 60 °C durante 60 min, utilizando un baño de ultrasonido. Se emplearon como sustancias de referencia ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido rosmarínico y quercetina, las soluciones patrón fueron preparadas individualmente (125).

El análisis se realizó mediante un cromatógrafo líquido de alto rendimiento SHIMADZU, con detector de matriz de diodos SPD-M30A (HPLC-DAD). Se empleó una columna cromatográfica C18 de 250 × 3,9 mm y 4 µm, equipada con una columna de guarda C18 de 10 × 3,9 mm y 4 µm. La fase móvil estuvo constituida por dos solventes: fase A, ácido acético al 0,5 % en metanol, y fase B, ácido acético al 0,5 % en agua. La separación cromatográfica se efectuó manteniendo un flujo de 1,0 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL mediante una gradiente de elución de: 0%–10% B (0–0,01 min); 10%–20% B (0,01–5 min); 20%–30% B (5–15 min); 30%–50% B (15–25 min); 50%–65% B (25–30 min); 65%–75% B (30–40 min); 75%–90% B (40–50 min) y 90%–10% B (50–55 min) (126).

Para la detección de los analitos se evaluaron los espectros de absorción UV registrados por el DAD a 280 nm, con un tiempo de corrida cromatográfica de 40 min. La identificación de los compuestos se estableció mediante la comparación de sus tiempos de retención con los obtenidos para las respectivas soluciones patrón. La cuantificación de los analitos identificados se llevó a cabo mediante curvas de calibración individuales, elaboradas a partir de las correspondientes soluciones patrón (127).

IV.4.6. Determinación de polifenoles

Se realizó el método de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico). Se diluyó una muestra de 0,2 ± 0,001 g de extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” en 5 mL de metanol al 70%. Se solubilizo en baño maría a 70 °C. Se agitó por 10 minutos en vórtex para asegurar la máxima solubilidad. Luego se procedió a centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se enrasó a 10 mL con metanol al 70% frio. Después, se colocó 4 mL de este volumen en una fiola de 100 mL y se enrasó con agua destilada. Para la medición, se añadieron 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 0,2N a 100 µL de extracto, se agitó por 5 minutos y se agregó 400 µL de carbonato de sodio 7,5% (tabla N°5). Finalmente se procedió a leer la absorbancia a 765 ηm. en un espectrofotómetro génesys 10s UV vis, thermo scientific. El estándar utilizado fue el Ácido gálico (a concentraciones de 5 a 50 µg/mL) y los polifenoles totales se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g extracto) (128).

Tabla N° 5. Ensayo de cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.

	Tubo blanco	**Tubo estándar**	**Tubo muestra problema**
Agua destilada	100 µL	-	-
Ácido gálico	-	100 µL	-
Extracto	-	-	100 µL
Reactivo Folin-Ciocalteu 0,2N	500 µL	500 µL	500 µL
Mezclar y reposar por 5 minutos.			
Na_2CO_3 7,5%	400 µL	400 µL	400 µL
Mezclar y reposar por 60 minutos en oscuridad y leer a 765 ηm.			

IV.4.7.Determinación de flavonoides

Se utilizó el método de formación de complejos de flavonoides con tricloruro de aluminio. Se preparó una concentración de extracto

hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” al 1 mg/mL diluido en metanol. Para la medición se agregaron 50 µL de nitrito de sodio 5% a 400 µL de extracto. Se agitó por 5 minutos y se añadió 50 µL de tricloruro de aluminio 2,5%. Posteriormente, se agitó por 6 minutos y se añadió 700 µL de hidróxido de sodio 1M (tabla N°6). Finalmente, se midió la absorbancia a 500 ηm en un espectrofotómetro génesys 10s UV vis, thermo scientific. El estándar que se usó fue la Quercetina (a concentraciones entre 5 y 50 µg/mL). El contenido de flavonoides se expresó en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g extracto) (129).

Tabla N° 6. Ensayo de cuantificación de flavonoides mediante la formación del complejo aluminio-flavonoide.

	Tubo blanco	Tubo estándar	Tubo muestra problema
Solvente	400 µL	-	-
Quercetina	-	400 µL	-
Extracto	-	-	400 µL
$NaNO_2$ 5%	50 µL	50 µL	50 µL
	Mezclar y reposar por 5 minutos.		
$AlCl_3$ 2,5%	50 µL	50 µL	50 µL
	Mezclar y reposar por 6 minutos.		
NaOH 1M	700 µL	700 µL	700 µL
Mezclar y reposar por 10 minutos en oscuridad y leer a 500 ηm.			

IV.4.8. Determinación de la actividad antioxidante método de secuestramiento del radical libre DPPH•

Se preparó una solución stock 0,4 mg/mL de reactivo DPPH en metanol y se almacenó a 4 °C hasta su uso. El extracto se disolvió en una mezcla hidroalcohólica al 50%. Se agregaron 800 µL de solución de trabajo DPPH con 400 µL de muestra a distintas concentraciones. Se mezclo y dejó reposar por 30 minutos en plena oscuridad (tabla N°7). Finalmente se leyeron las absorbancias a 517 nm en un espectrofotómetro génesys 10s

UV vis, thermo scientific. Se usó como estándar al Trolox® a concentraciones de 1,2 a 10 µg/mL. Los resultados se expresarán en CI_{50} (Porcentaje de inhibición de radicales libres) y en mg Trolox/g extracto como TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox) (130).

Tabla N° 7. Ensayo de determinación de la actividad antioxidante método de secuestramiento del radical libre DPPH•.

	Tubo blanco	Tubo control	Tubo estándar	Tubo muestra problema
Metanol	800 µL	-	-	-
Trolox®	-	-	400 µL	-
Extracto	-	-	-	400 µL
Solvente	400 µL	400 µL	-	-
Reactivo DPPH•	-	800 µL	800 µL	800 µL
Mezclar y reposar por 30 minutos en oscuridad y leer a 517 ηm.				

IV.4.9. Determinación de actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+

En primer lugar, se preparó una solución stock de reactivo ABTS 7 mM con agua destilada. Luego, se añadió 2,45 mM de persulfato potásico, se dejó en reposo a temperatura ambiente en oscuridad. Después, se diluyo la solución stock hasta obtener una absorbancia de 0,700 ± 0,020 aproximadamente a 734 ηm. Se añadieron 980 µL de solución ABTS a 20 µL de extracto y se incubó a temperatura ambiente por 7 minutos (tabla N°8). Finalmente, se midieron las absorbancias a 734 ηm en un espectrofotómetro génesys 10s UV vis, thermo scientific. Los resultados se expresaron en CI_{50} (Porcentaje de inhibición de radicales libres) y en mg Trolox/g extracto como TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox) (131).

Tabla N° 8. Ensayo de determinación de actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+.

	Tubo blanco	Tubo control	Tubo estándar	Tubo muestra problema
Agua destilada	980 µL	-	-	-
Trolox®	-	-	20 µL	-
Extracto	-	-	-	20 µL
Solvente	20 µL	20 µL	-	-
Reactivo ABTS•+	-	980 µL	980 µL	980 µL
Mezclar y reposar por 7 minutos en oscuridad y leer a 734 ηm.				

IV.4.10. Determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro FRAP

En primer lugar, se preparó el reactivo FRAP, formando una mezcla de los reactivos buffer acetato 300 mM a pH= 3,6; 2,4,6-Tri (2piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico 20 mM en metanol (100:1:1). Luego, se diluyó una solución de extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” a 600 µg/mL y, a partir de esta, se preparó concentraciones de 20 a 60 µg/mL de extracto. Se agregaron 950 µL de reactivo FRAP a 50 µL de extracto y se dejó reposar por 15 minutos con una previa agitación (tabla N°9). Se midió la absorbancia a 593 ηm en un espectrofotómetro génesys 10s UV vis, thermo scientific. El estándar usado fue Ácido ascórbico en concentraciones de 5 a 25 µmol/L. Finalmente los resultados fueron expresados en la capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico (AAEAC) en mg AA/g extracto (132).

Tabla N° 9. Ensayo de determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP).

	Tubo blanco	Tubo estándar	Tubo muestra problema
Solvente	50 µL	-	-
Ácido ascórbico	-	50 µL	-
Extracto	-	-	50 µL
Reactivo FRAP	950 µL	950 µL	950 µL
Mezclar y reposar por 15 minutos en oscuridad y leer a 593 ηm.			

IV.4.11. Evaluación del potencial quimiopreventivo *in vivo*

Esta investigación cuenta con la evaluación y aprobación del Comité de ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM mediante el certificado N° 0011-CE-UDI-FFB-2025 (Ver Anexo 6). Se utilizaron 50 ratas *Rattus norvegicus* cepas Holtzmann machos de entre 21 y 25 días de vida con un aproximado de 200 gr de peso, estas fueron adquiridas en el bioterio del centro de producción de la Universidad Agraria la Molina (UNALM). La organización experimental sigue un diseño aleatorizado con 6 grupos experimentales con 10 individuos en el grupo 2 como previsión ante la alta mortalidad y 8 individuos en los demás grupos.

El manejo de las ratas se llevó a cabo siguiendo las pautas establecidas en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio". Como procedimiento observacional programado, se sacrificó un animal por grupo a mitad del estudio para evaluar la progresión histopatológica intermedia. Respecto a las bajas por la severidad del modelo oncogénico, se aplicaron puntos finales humanitarios para evitar el sufrimiento innecesario. Específicamente, se procedió al sacrificio inmediato de los animales con una pérdida de peso corporal progresiva superior al 20% respecto a su valor basal, asociada a signos de compromiso sistémico severo como letargia y postración.

Las ratas tuvieron un periodo de aclimatación de al menos 7 días en jaulas confeccionadas en aluminio, en un ambiente controlado (22-25 °C y 70 %HR) y un ciclo de 12 horas de luz seguido de 12 horas de oscuridad.

Durante todo el experimento se les proporciono una dieta normocalórica y normoproteica con alimento balanceado del centro de producción de la UNALM, así como agua disponible *ad libitum* (133).

Antes de cada tratamiento, se hizo registro semanal del peso de cada individuo. El estudio *in vivo* se extendió por un periodo de 10 semanas. Una vez que los animales completaron su aclimatación, se dio inicio la inducción de carcinoma hepatocelular mediante la administración de dietilnitrosamina (DEN) a una dosis de 200 mg/kg (diluido en solución de suero fisiológico y administrado por vía I.P.) tres veces cada 15 días (134). Adicionalmente, los otros grupos recibieron, junto con la DEN, dosis de extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" (diluido en solución de suero fisiológico y administrado por vía OG.) de 100 mg/kg, 300 mg/kg y 600 mg/kg y al último grupo dosis de Silimarina de 100 mg/kg. Es importante destacar que los sacrificios se realizaron mediante una sobredosis de pentobarbital administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 200 mg/kg aproximadamente. Los animales fueron asignados aleatoriamente de la siguiente manera:

- **Grupo Control:** Animales que recibieron únicamente el vehículo de la DEN y el vehículo del extracto hidroalcohólico.
- **Grupo con DEN:** Animales que fueron tratados con DEN junto con el vehículo del extracto hidroalcohólico.
- **Grupo con DEN y extracto hidroalcohólico a 100 mg/kg:** Animales que recibieron DEN junto con extracto hidroalcohólico en la dosis de 100 mg/kg.
- **Grupo con DEN y extracto hidroalcohólico a 300 mg/kg:** Animales sometidos a la administración de DEN junto con extracto hidroalcohólico en la dosis de 300 mg/kg.
- **Grupo con DEN y extracto hidroalcohólico a 600 mg/kg:** Animales que recibieron DEN junto con extracto hidroalcohólico en la dosis de 600 mg/kg.
- **Grupo con DEN y Silimarina a 100 mg/kg:**
  Animales que recibieron DEN junto con Silimarina en la dosis de 100 mg/kg.

Se obtuvo sangre mediante punción cardíaca, antes de sacrificio, en tubos diseñados para muestras sanguíneas. Posteriormente, se procedió a extraer y pesar el hígado, que fue conservado en formalina al 10% para su análisis histopatológico.

Para determinar el perfil hepático, se midieron los parámetros bioquímicos de Alanina aminotransferasa (GPT), Aspartato aminotransferasa (GOT), Fosfatasa alcalina (FA), ɣ-glutamil transpeptidasa (GGT), Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Capacidad total antioxidante (TAC), Proteínas totales, Albúmina, Globulina, Bilirrubina total, Bilirrubina directa y Bilirrubina indirecta. En cuanto al examen histopatológico, se realizaron cortes de entre 3 y 5 micrómetros de grosor, utilizando la tinción de hematoxilina y eosina, se utilizó un Score histopatológico para cuantificar el daño recibido a cada individuo (Ver Anexo 7). Por último, para calcular el índice hepático, se registró el peso final del hígado y se dividió por el peso final del individuo, multiplicando el resultado por 100 (135-137).

IV.4.12. Evaluación del efecto citotóxico *in vitro*

La actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico se evaluó mediante el método de Monks et al. (138) comparando cinco líneas celulares cancerígenas (H460, DU145, MCF-7, M-14 y HT-29) con una de control (3T3). Las células se inocularon en placas de 96 pocillos y se incubaron por 24 horas a 37 °C con 5% de CO_2. Luego, se aplicaron cuatro concentraciones del extracto (250; 62,5; 15,6 y 3,9 µg/mL) y se incubaron por 48 horas.

Transcurrido el tiempo se detuvo la incubación y se dejó reposar la placa por 5 minutos, posterior a ello se realizó la fijación de células con ácido tricloroacético. Luego, se tiño los pocillos con sulforodamina B por 15 minutos y se enjuago con ácido acético al 1%, finalmente se dejó secar. Se adicionó Tris base 10mM a cada pocillo y se procedió a leer en un lector de microplacas. Los resultados se presentaron en porcentaje de crecimiento de células cancerosas (%G) y se calculó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de las células cancerosas (CI_{50}) o también llamado como actividad antitumoral (139).

IV.5. Análisis estadístico

Las metodologías *in vitro* se llevaron a cabo por triplicado y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el software IBM SPSS Statistics versión 26. Los datos de absorbancia se expresaron como media ± desviación estándar (DE), y se calculó el coeficiente de variación (CV) como indicador de precisión (140).

Para los ensayos *in vivo*, los resultados bioquímicos, antioxidantes e histopatológicos se expresaron como media ± DE para cada grupo experimental. Previamente al análisis inferencial, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En aquellos casos donde se verificó una distribución normal ($p > 0,05$), se aplicó el análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de la prueba post hoc HSD de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos. En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de comparaciones por pares mediante la prueba Bonferroni.

Asimismo, se realizó un análisis de asociación entre variables mediante una matriz de correlación de Spearman, con el fin de identificar relaciones monotónicas entre los parámetros bioquímicos, antioxidantes e indicadores de daño hepático (141).

Se construyó un gráfico de radar (radar plot) utilizando variables representativas del daño hepático, función hepática y estado antioxidante (GPT, GGT, SOD, IH y SH). Se construyó un gráfico de radar utilizando las variables normalizadas a un valor base de 1,0 respecto al G2. Para homogeneizar la dirección biológica en el gráfico, los biomarcadores de injuria (GPT, GGT, IH y SH) se transformaron mediante el cociente inverso, mientras que el biomarcador antioxidante (SOD) se normalizó de forma directa. Posteriormente, se obtuvo la media del área por grupo experimental y se compararon las diferencias mediante ANOVA y HSD de Tukey.

Finalmente, se elaboraron gráficos de barras del área del radar plot para visualizar comparativamente el efecto hepatoprotector global. En todos los análisis, se consideró un nivel mínimo de significancia estadística de $p < 0,05$ (142).

V. RESULTADOS

V.1. Obtención del extracto hidroalcohólico

En la tabla N°10 se observa el rendimiento de las hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” (%p/p).

Tabla N° 10. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

Parte de la planta usada	Muestra vegetal seco (g)	Extracto hidroalcohólico (g)	Rendimiento (%p/p)
Hojas y Flores	25,22	1,45	5,75

Se logró obtener una cantidad regular de extracto hidroalcohólico (1,45 g) con un rendimiento del 5,75 %p/p.

V.2. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del ensayo para determinar la presencia de metabolitos secundarios de interés en el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” se pueden observar en la tabla N°11 (Ver Anexo 8).

Tabla N° 11. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

Reacción	Metabolito secundario	Resultado
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	(+++)
Shinoda / $AlCl_3$	Flavonoides	(++)
Gelatina	Taninos	(+)
Borntrager	Naftoquinonas, Antroquinonas, Antronas	(+)
Liebermann-Bouchardat	Triterpenoides	(++)
Dragendorff	Alcaloides	(-)
Wagner	Alcaloides	(-)
Bertrand	Alcaloides	(-)

Mayer	Alcaloides	(-)
Baljet	Heterósidos cardiotónicos y sesquiterpenlatonas	(+)
Índice afrosimétrico	Saponinas	(++)
Vainillina / H_2SO_4	Glicósidos	(++)
Salkowsky	Terpenoides	(+)

Leyenda: Evidencia alta (+++), evidencia media (++), evidencia baja (+), sin evidencia (-).

Los resultados evidenciaron una alta presencia de compuestos fenólicos detectados mediante la reacción con cloruro férrico (+++). Asimismo, se observó presencia moderada de flavonoides, triterpenoides, saponinas y glicósidos (++), evidenciados mediante las reacciones de Shinoda/Cl_3Al, Liebermann-Bouchardat, índice afrosimétrico y vainillina/ácido sulfúrico, respectivamente.

Por otro lado, se identificó una leve presencia de taninos, quinonas (naftoquinonas, antraquinonas y antronas), heterósidos cardiotónicos o sesquiterpenlactonas y terpenoides (+), mediante las reacciones de gelatina, Borntrager, Baljet y Salkowski. En contraste, no se detectó presencia de alcaloides, ya que las reacciones de Dragendorff, Wagner, Bertrand y Mayer resultaron negativas (−). En conjunto, estos resultados sugieren que el extracto presenta un predominio de metabolitos fenólicos y flavonoides, compuestos comúnmente asociados a actividades antioxidantes y biológicas en extractos vegetales.

En la tabla N°12 se observa la solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente a solventes de distinta polaridad (Ver Anexo 9).

Tabla N° 12. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

Solvente	Resultado
Éter etílico	(-)
n-hexano	(-)
Cloroformo	(-)
Acetato de etilo	(-)
Acetona	(-)
Dimetilsulfoxido	(-)
Metanol	(-)
Etanol	(+)
Etanol / Agua (1:1)	(+++)
Agua	(++)

Leyenda: Muy soluble (+++), poco soluble (++), ligeramente soluble (+), insoluble (-).

Según el ensayo de solubilidad, el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” es muy soluble (+++) frente a una solución de Etanol / Agua (1:1) y prácticamente insoluble (-) ante solventes muy apolares (Éter etílico) o medianamente polares (metanol, acetona, etc), esto puede explicarse debido al tipo de solventes utilizados en la obtención del extracto y su afinidad con los metabolitos secundarios presentes en dicho extracto.

V.3. Determinación de la composición química por HPLC

El análisis cromatográfico del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” permitió obtener el perfil cromatográfico de los compuestos presentes en la muestra. Los cromatogramas correspondientes a los primeros 40 min de análisis se presentan en las Figuras 20 y 21, donde se observan los principales picos cromatográficos registrados a 280 nm.

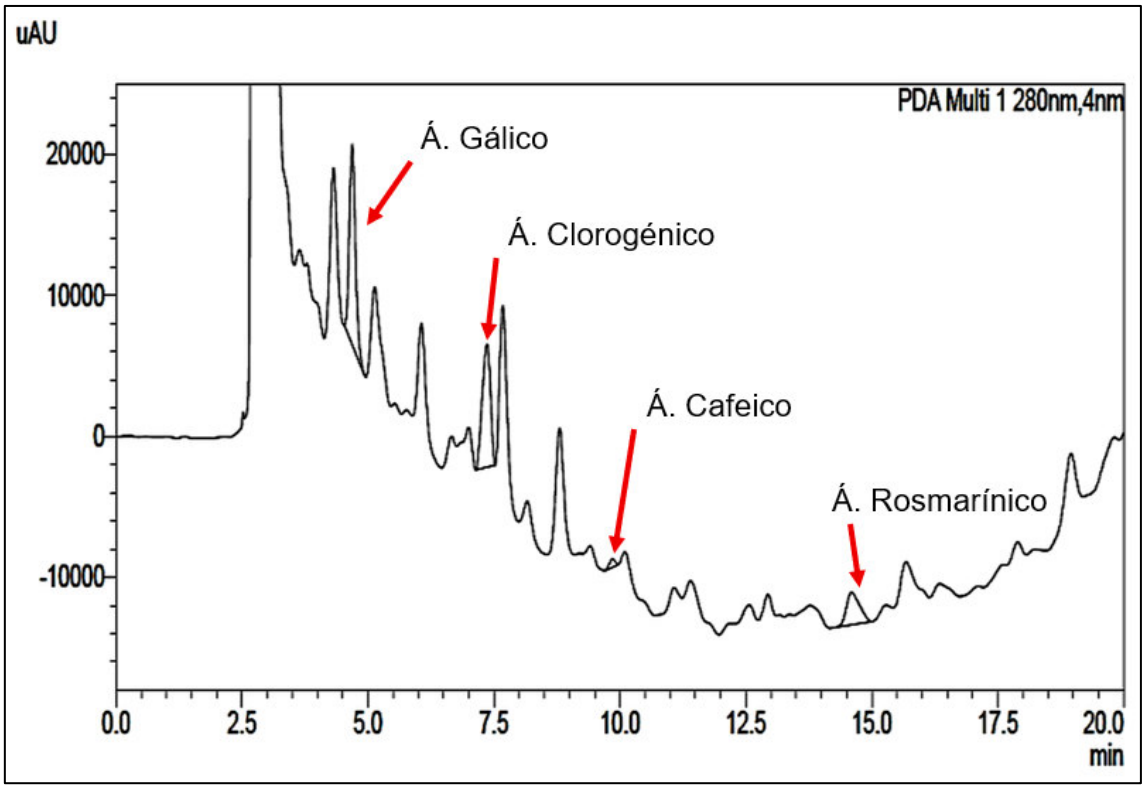


Figura 20. Cromatograma del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” (0–20 min).

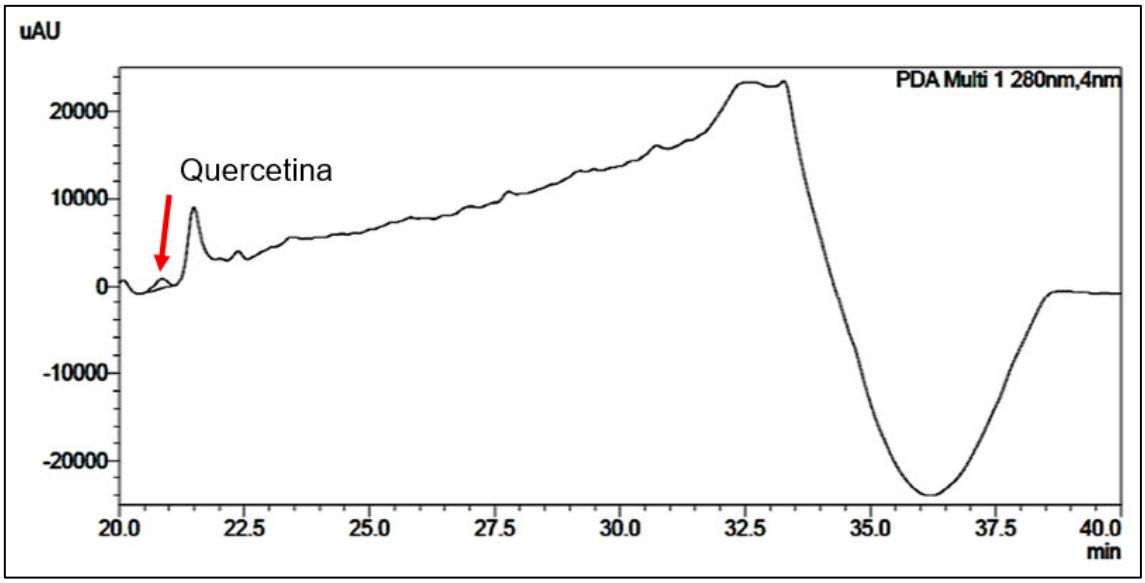


Figura 21. Cromatograma del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” (20–40 min).

A partir del perfil cromatográfico obtenido, se procedió a la identificación de los compuestos de interés mediante la comparación de sus tiempos de retención (T.R.) y espectros UV con los correspondientes a las soluciones

patrón. La cuantificación se realizó a partir de las respectivas curvas de calibración (Ver Anexo 10-14), cuyos resultados se presentan en la tabla N°13.

Tabla N° 13. Identificación y cuantificación de compuestos mediante HPLC del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena".

N° Pico	T.R. (min)	Área	Altura	Concentración (mg/g extracto)	Nombre
1	4,691	102395	12469	0,385 ± 0,038	Ácido gálico
2	7,355	100730	8948	0,785 ± 0,007	Ácido clorogénico
3	9,851	3147	390	0,044 ± 0,003	Ácido cafeico
4	14,599	44351	2399	0,322 ± 0,013	Ácido rosmarínico
5	20,807	5795	433	0,256 ± 0,088	Quercetina

Los resultados mostraron la presencia de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido rosmarínico y quercetina en el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena". Entre los compuestos identificados, el ácido clorogénico presentó la mayor concentración, con 0,785 ± 0,007 mg/g de extracto, seguido del ácido gálico (0,385 ± 0,038 mg/g), ácido rosmarínico (0,322 ± 0,013 mg/g), quercetina (0,256 ± 0,088 mg/g) y ácido cafeico (0,044 ± 0,003 mg/g).

V.4. Determinación de polifenoles

Se determinó la cantidad equivalente de polifenoles que contiene el extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" (Ver Anexo 15). Se realizó la curva estándar de cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu con ácido gálico (Ver Anexo 16), obteniéndose una gráfica de dispersión de puntos lineal ($r>0,99$) (Ver Anexo 17). Se obtuvo 1173,53 ± 25,12 mg EAG/g extracto, en la tabla N°14 se pueden observar los datos de la cantidad de compuestos fenólicos determinados.

Tabla N° 14. Cuantificación de polifenoles del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

Absorbancias (UA)	mg EAG/g	Promedio	DE (±)	Coef. V. (%)
0,208	1207,04	1173,53	25,12	2,14
0,198	1146,11			
0,202	1170,49			
0,202	1170,49			

V.5. Determinación de flavonoides

Se determinó la cantidad equivalente de flavonoides que contiene el extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” (Ver Anexo 18). Se realizó la curva estándar de cuantificación de flavonoides (Ver Anexo 19) mediante la formación del complejo aluminio-flavonoide con quercetina, obteniéndose una gráfica de dispersión de puntos lineal (r>0,99) (Ver Anexo 20). Se obtuvo 16,17 ± 1,02 mg EQ/g extracto, en la tabla N°15 se pueden observar los datos de la cantidad de flavonoides determinados.

Tabla N° 15. Cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

Absorbancias (UA)	mg EQ/g	Promedio	DE (±)	Coef. V. (%)
0,053	15,58			
0,060	17,35	16,17	1,02	6,32
0,053	15,58			

V.6. Determinación de la actividad antioxidante método de secuestramiento del radical libre DPPH•

Se determinó la actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” por el método de secuestramiento del radical libre DPPH• (Ver Anexo 21). Respecto a la curva estándar con Trolox® para la determinación de la actividad antioxidante, se obtuvo una gráfica de dispersión de puntos lineal (r>0,99)

(Ver Anexo 22-23). El resultado final fue de 41,63 ± 0,17 mg Trolox/g extracto, en la tabla N°16 se pueden observar los datos espectrofotométricos de la actividad antioxidante y en la figura 22 se puede apreciar la gráfica de dispersión del extracto a distintas concentraciones.

Tabla N° 16. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" frente al radical libre de DPPH•.

Extracto (µg/mL)	Promedio Abs. (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)	Inhibición (%)	CI_{50} (µg/mL)
0	0,4203	0,0005	0,11	0,00	61,26
20	0,3450	0,0008	0,24	17,92	
32	0,2963	0,0005	0,16	29,50	
44	0,2673	0,0005	0,18	36,40	
60	0,2080	0,0008	0,39	50,52	
80	0,1573	0,0005	0,30	62,57	
TEAC = 41,63 mg Trolox/g extracto					

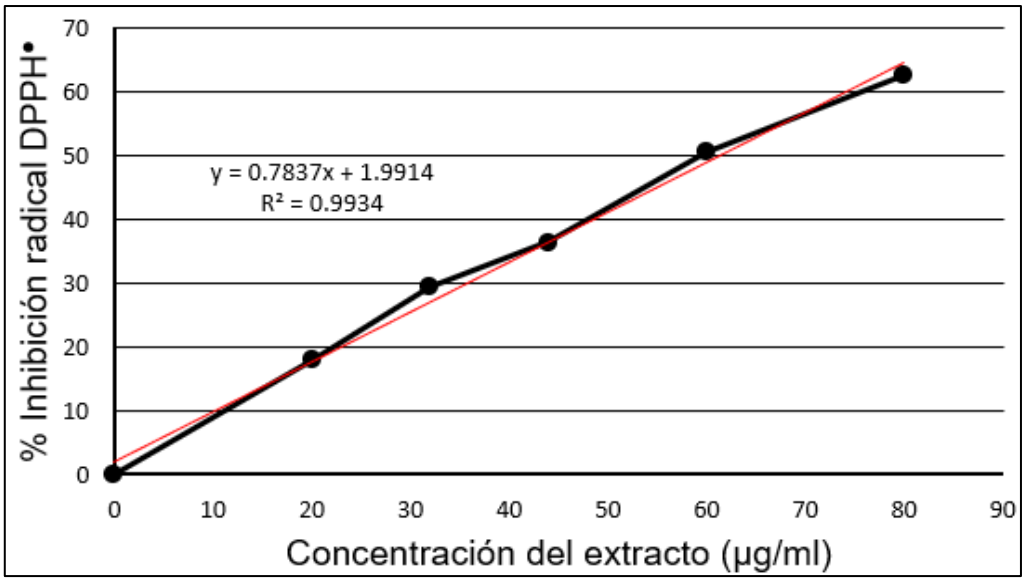


Figura 22. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" frente al radical DPPH•.

V.7. Determinación de actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+

Se determinó la actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+ (Ver Anexo 24). Respecto a la curva estándar con Trolox® para la determinación de actividad antioxidante, se obtuvo una gráfica de dispersión de puntos lineal (r>0,99) (Ver Anexo 25-26). El resultado final fue de 108,74 ± 4,33 mg Trolox/g extracto, en la tabla N°17 se pueden observar los datos espectrofotométricos de la actividad antioxidante y en la figura 23 se puede apreciar la gráfica de dispersión del extracto.

Tabla N° 17. Actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente al catión radical ABTS•+.

Extracto (µg/mL)	**Promedio Abs. (UA)**	**DE (±)**	**Coef. V. (%)**	**Inhibición (%)**	**CI_{50} (µg/mL)**
0	0,6207	0,0042	0,67	0,00	41,94
10	0,5327	0,0057	1,07	14,18	
24	0,4343	0,0046	1,06	30,02	
40	0,3140	0,0026	0,84	49,41	
50	0,2567	0,0375	14,62	58,65	
60	0,1873	0,0035	1,87	69,82	
TEAC = 108,74 mg Trolox/g extracto					

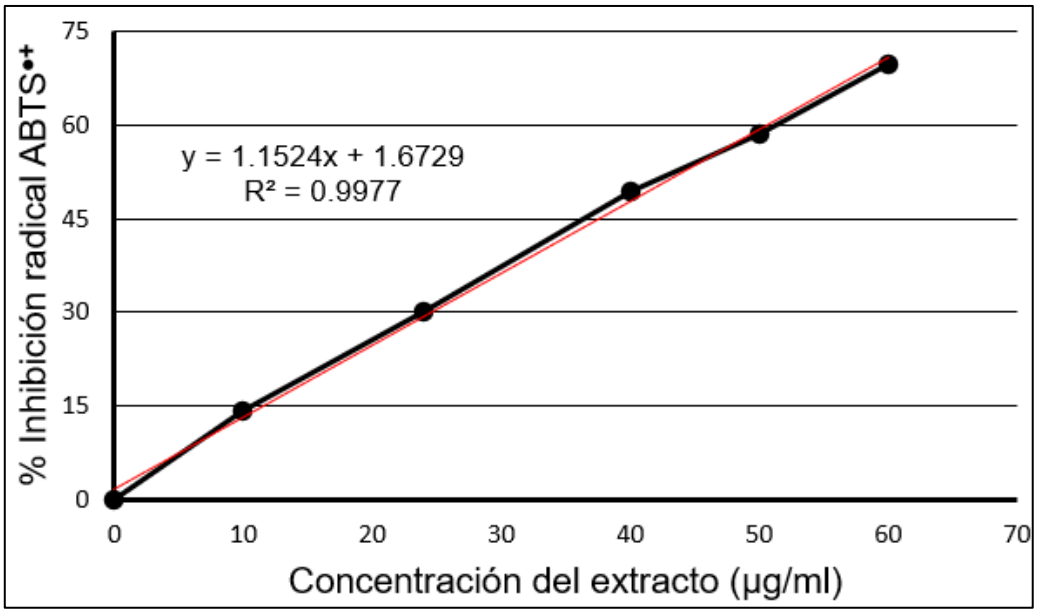


Figura 23. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente al catión radical ABTS•+.

V.8. Determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro FRAP

Se determino la actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” por el método de reducción de hierro (FRAP) (Ver Anexo 27). Respecto a la curva estándar de Ácido ascórbico, se obtuvo una gráfica de dispersión de puntos lineal (r>0,99) (Ver Anexo 28-29). El resultado final fue de 60,04 ± 1,99 mg AA/g extracto, en la tabla N°18 se pueden observar los datos espectrofotométricos de la actividad antioxidante y en la figura 24 se puede apreciar la gráfica de dispersión del extracto a distintas concentraciones.

Tabla N° 18. Actividad antioxidante del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante el poder reductor férrico.

Extracto (µg/mL)	Promedio Absorbancia (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)
20	0,1335	0,0014	1,06
30	0,1960	0,0049	2,51
40	0,2610	0,0118	4,51
48	0,2915	0,0079	2,70
60	0,3580	0,0005	0,13
AAEAC = 60,04 mg Ácido ascórbico/g extracto			

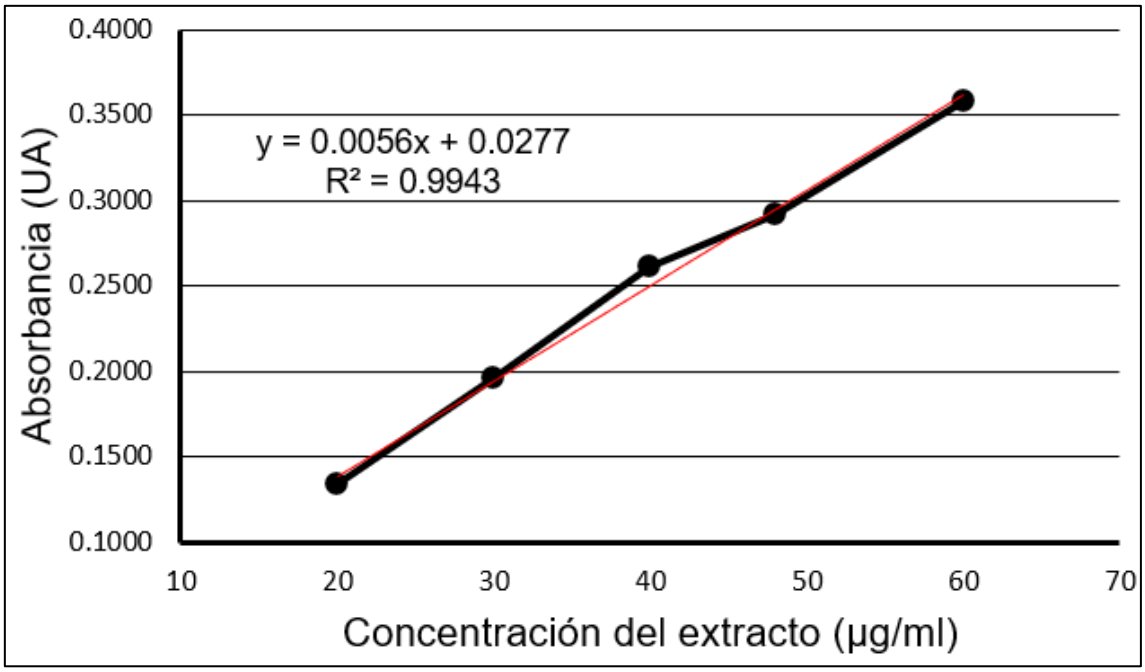


Figura 24. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante el poder reductor férrico.

V.9. Evaluación del efecto citotóxico *in vitro*

Se realizó la curva estándar de determinación de la actividad citotóxica frente a células tumorales humanas (H460, Du145, MCF-7, M14 y HT29) con 5-Fluorouracilo (5FU), obteniéndose una gráfica de dispersión de puntos para cada línea celular trabajada (Ver Anexos 30-31), además, se

realizó el mismo ensayo para una línea celular no tumoral (3T3) para tener noción de la toxicidad del extracto. En el caso de todas las líneas celulares tumorales y no tumorales, el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" no presento una actividad citotóxica (Ver Anexo 32), registrándose un CI_{50} > 250 µg/mL de extracto. En la tabla 19 se pueden observar los datos espectrofotométricos de la actividad citotóxica y en la figura 25 se puede apreciar la gráfica de dispersión del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" a distintas concentraciones.

Tabla N° 19. Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* "flor de arena" frente a líneas celulares.

Línea celular	Extracto (µg/mL)	Promedio Abs. (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)	Crecimiento (%)	CI_{50} (µg/mL)
3T3	3,91	0,5078	0,0173	3,40	120,04	>250
	15,63	0,4793	0,0157	3,28	111,10	
	62,50	0,4545	0,0116	2,54	103,34	
	250,00	0,4053	0,0109	2,70	87,93	
H460	3,91	1,3816	0,0225	1,63	99,82	>250
	15,63	1,4567	0,0574	3,94	106,08	
	62,50	1,4404	0,0421	2,92	104,72	
	250,00	1,3800	0,0284	2,06	99,69	
Du145	3,91	0,6960	0,0160	2,30	100,81	>250
	15,63	0,7188	0,0215	3,00	105,27	
	62,50	0,7056	0,0122	1,72	102,69	
	250,00	0,6600	0,0177	2,69	93,77	
MCF-7	3,91	0,6631	0,0168	2,54	95,61	>250
	15,63	0,6900	0,0363	5,26	101,31	
	62,50	0,7201	0,0038	0,53	107,70	
	250,00	0,6626	0,0227	3,43	95,49	
M14	3,91	0,6113	0,0184	3,02	101,15	>250
	15,63	0,6151	0,0178	2,90	101,99	
	62,50	0,6154	0,0104	1,69	102,06	
	250,00	0,5771	0,0137	2,37	93,59	
HT29	3,91	1,1767	0,0323	2,74	97,84	>250
	15,63	1,2355	0,0211	2,71	103,61	
	62,50	1,2557	0,0303	2,41	105,59	
	250,00	1,2019	0,0109	0,91	100,31	

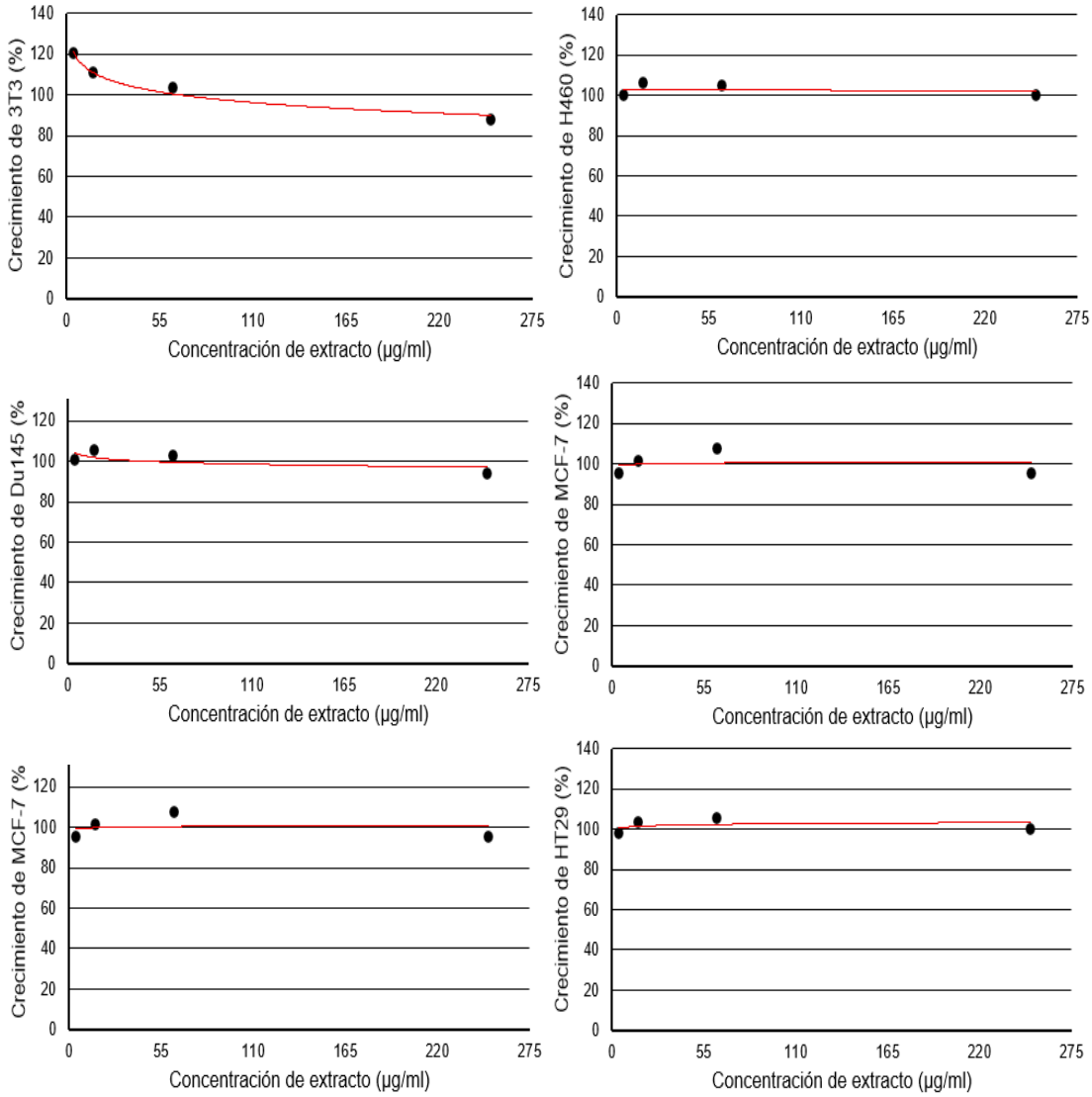


Figura 25. Gráfica de dispersión del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente a líneas celulares.

La tabla 20 presenta el resumen de la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” evaluada frente a diferentes líneas celulares mediante la determinación de la CI_{50} (µg/mL). Los resultados muestran que el extracto presentó valores de CI_{50} mayores a 250 µg/mL en todas las líneas celulares evaluadas mientras que el 5FU utilizado como control positivo mostró alta actividad citotóxica, con valores de CI_{50} considerablemente menores, que oscilaron entre 0,29 y 5,82 µg/mL dependiendo de la línea celular evaluada.

Tabla N° 20. Resumen de la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” frente a líneas celulares.

Línea celular	CI_{50} (µg/mL)	
	Extracto	**5FU**
3T3	> 250,00	0,29
H460	> 250,00	0,40
Du145	> 250,00	1,98
MCF-7	> 250,00	0,85
M14	> 250,00	5,82
HT29	> 250,00	1,18

V.10. Evaluación del potencial quimiopreventivo *in vivo*

Respecto al ensayo *in vivo* para determinar el efecto quimiopreventivo del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”, se obtuvieron los siguientes resultados. Las figuras muestran los parámetros bioquímicos relacionados con la función hepatocelular, función sintética hepática y función colestásica evaluados en los diferentes grupos experimentales. En relación con la función hepatocelular, las transaminasas GOT y GPT presentaron variaciones entre los grupos, observándose los valores más altos de GOT en G5 (56,7 U/L) y los más bajos en G6 (28,0 U/L), mientras que GPT mostró valores relativamente menores, con un máximo en G1 (26,9 U/L) y un mínimo en G6 (18,0 U/L), ver figura 26.

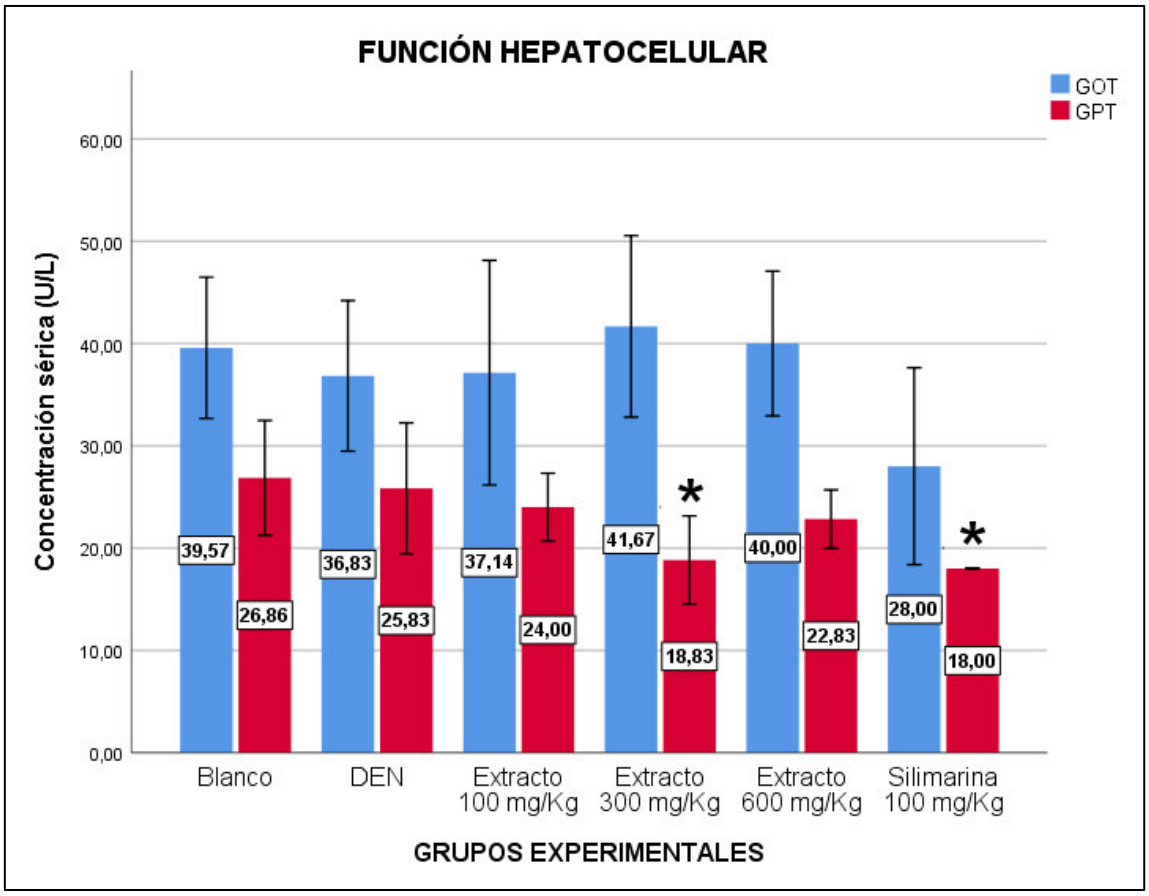


Figura 26. Niveles séricos de GOT y GPT en los grupos experimentales. *p<0,05 vs G1.

Respecto a la función sintética hepática, las concentraciones séricas de proteínas totales, albúminas y globulinas se mantuvieron dentro de rangos relativamente similares entre los grupos experimentales. Las proteínas totales oscilaron entre 5,81 y 7,30 g/dL, mientras que las albúminas variaron entre 3,37 y 4,34 g/dL, y las globulinas entre 2,44 y 3,05 g/dL, evidenciando ligeras fluctuaciones, ver figura 27.

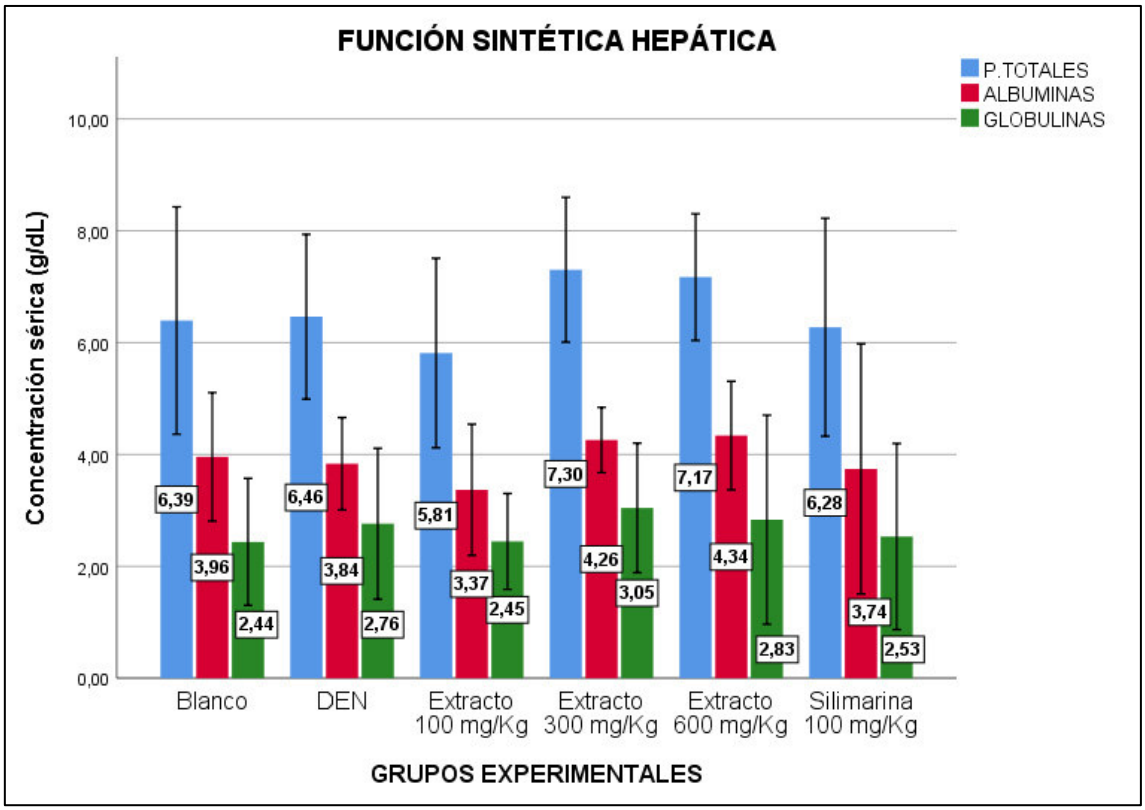


Figura 27. Niveles séricos de proteínas totales, albuminas y globulinas en los grupos experimentales.

Añadido a esto, en la función colestásica hepática, evaluada mediante la actividad de FA, se observó una variación entre los grupos, con el valor más elevado en G3 (375,74 U/L) y el más bajo en G6 (260,89 U/L). En conjunto, los resultados muestran diferencias moderadas en los parámetros bioquímicos hepáticos entre los grupos experimentales, ver figura 28.

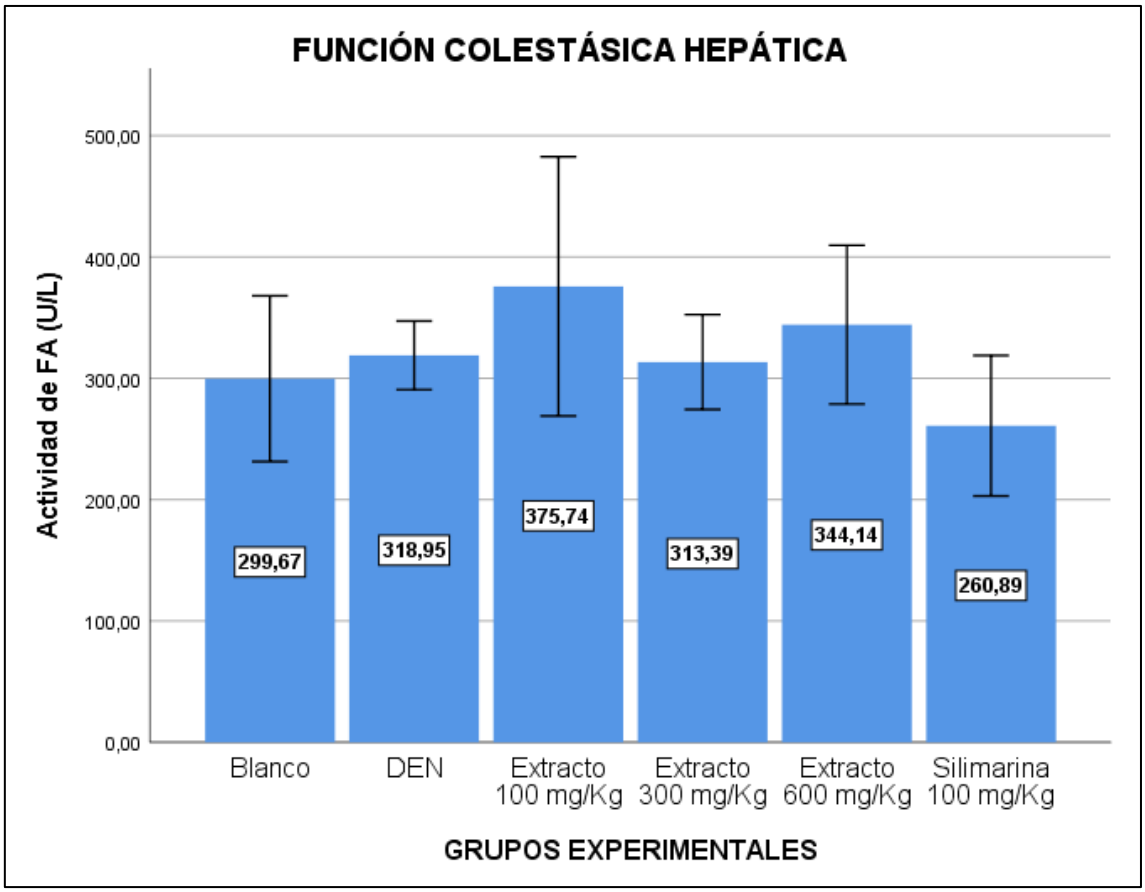


Figura 28. Nivel sérico de FA en los grupos experimentales.

Respecto a la actividad sérica de GGT, el G2 presentó una actividad de 2,60 U/L, mientras que G1 registró 9,24 U/L. Entre los grupos tratados con el extracto, el grupo G3 mostró la mayor actividad (9,90 U/L), mientras que G4 y G5 presentaron valores menores (4,23 y 2,97 U/L, respectivamente). El G6 evidenció la menor actividad de GGT (1,53 U/L), ver figura 29.

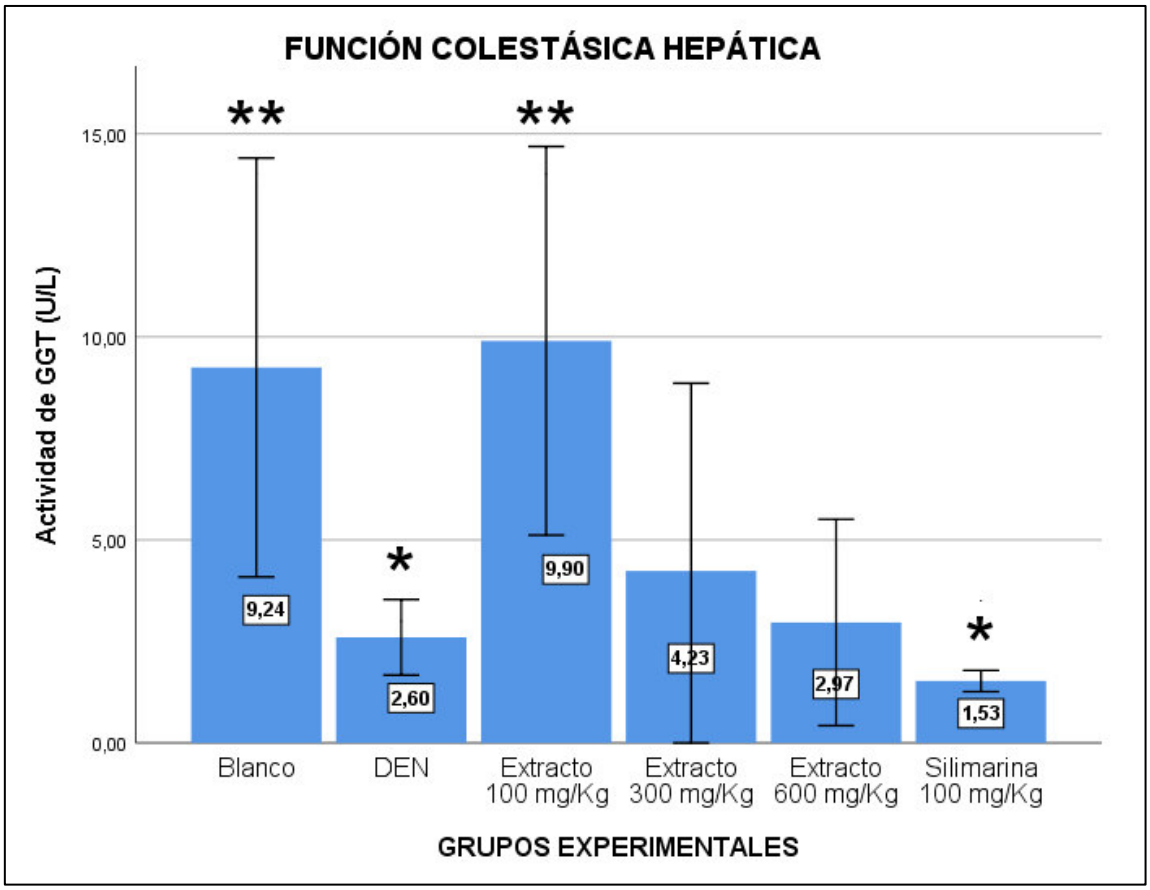


Figura 29. Nivel sérico de GGT en los grupos experimentales.

*p<0,05 vs G1; **p<0,05 vs G2.

En relación con la función excretora hepática, evaluada mediante las concentraciones séricas de bilirrubina total, directa e indirecta, se observaron valores relativamente similares entre los grupos experimentales. El G2 presentó el mayor valor de bilirrubina total (0,52 mg/dL) en comparación con el G1 (G1; 0,42 mg/dL). Los grupos tratados con el extracto (G3–G5) y el grupo estándar (G6) mostraron valores intermedios, oscilando entre 0,45 y 0,51 mg/dL. De manera similar, la bilirrubina directa varió entre 0,10 y 0,16 mg/dL, mientras que la bilirrubina indirecta se mantuvo entre 0,30 y 0,36 mg/dL en los distintos grupos, ver figura 30.

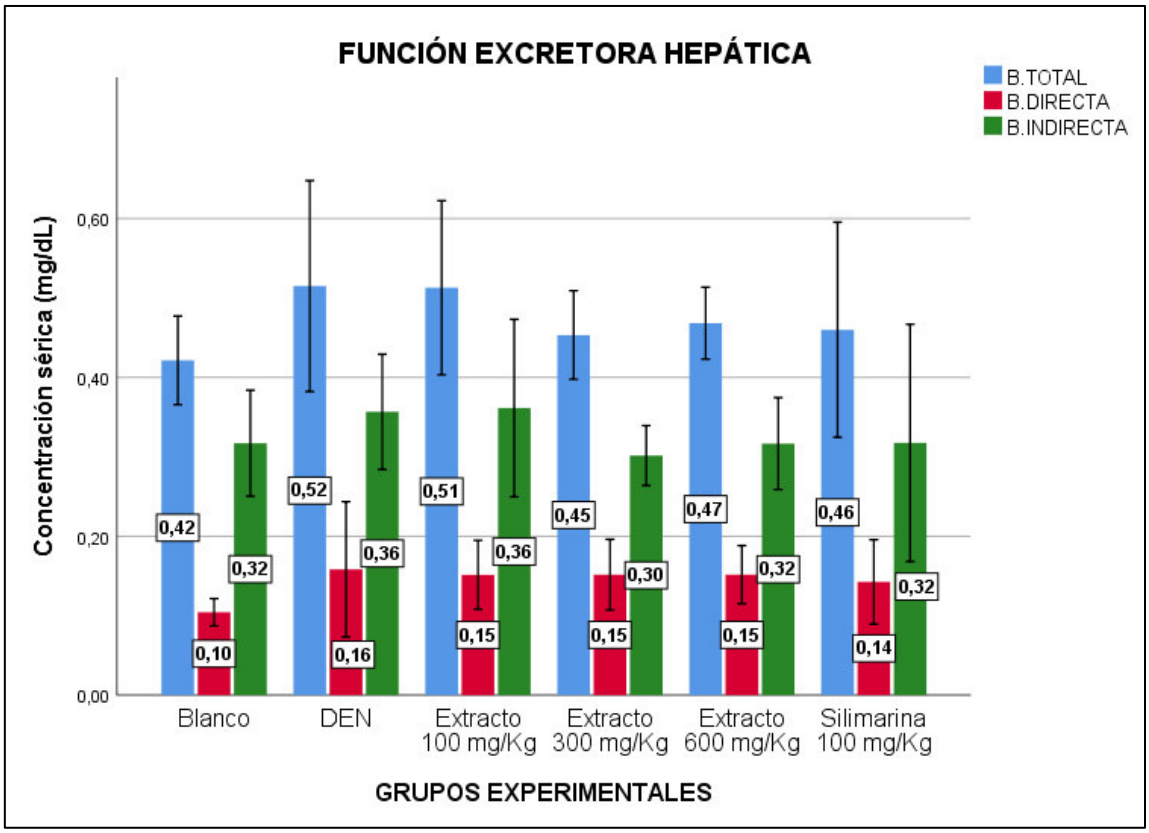


Figura 30. Niveles séricos de Bilirrubina total, directa e indirecta en los grupos experimentales.

Respecto a la función antioxidante sistémica, el G1 presentó valores basales de SOD y CAT, mientras que el G2 mostró una ligera disminución de CAT. En contraste, los grupos tratados con el extracto evidenciaron un incremento en la actividad de SOD, siendo más notable en G3 y G4. Sin embargo, la actividad de CAT no mostró variaciones marcadas entre los grupos, manteniéndose relativamente estable. Por otro lado, el ensayo TAC fue mayor en el G1, disminuyó en el G2 y presentó una recuperación parcial en los grupos tratados con el extracto, especialmente en G4, aunque sin alcanzar los niveles del control. El G6 mostró valores intermedios en ambos parámetros, ver figura 31 y 32.

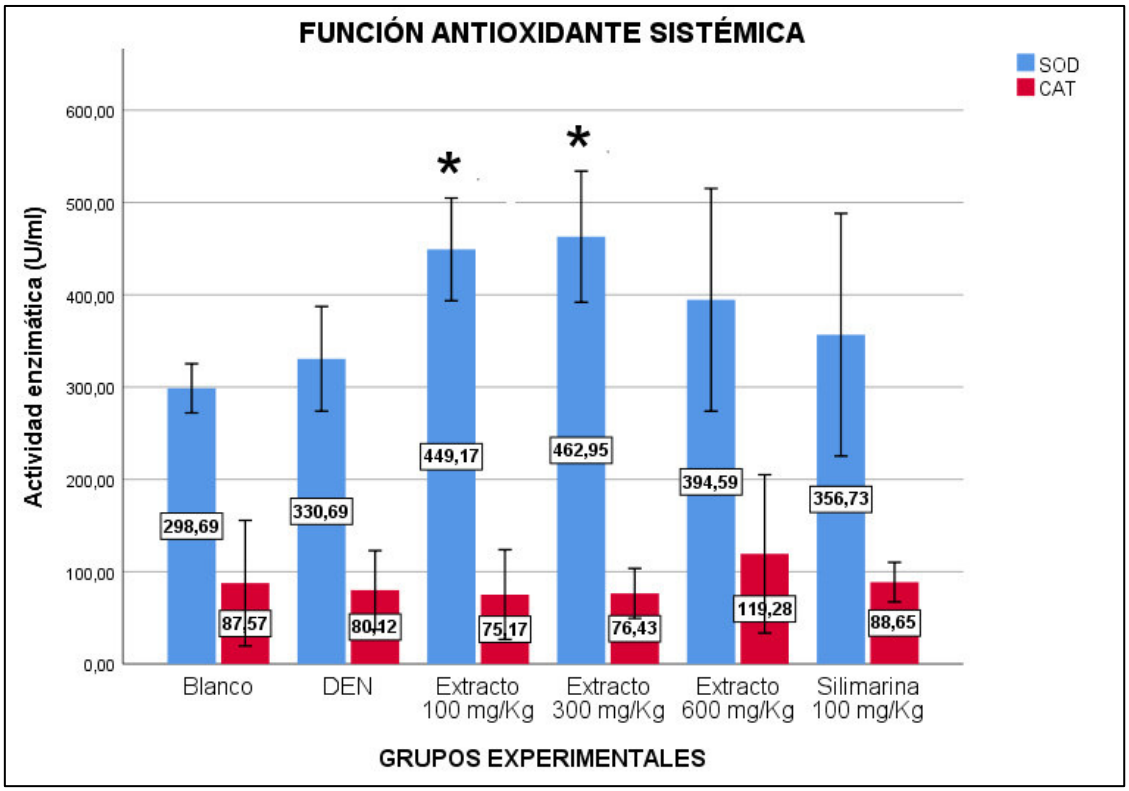


Figura 31. Actividad enzimática de SOD y CAT en los grupos experimentales. *p<0,05 vs G1.

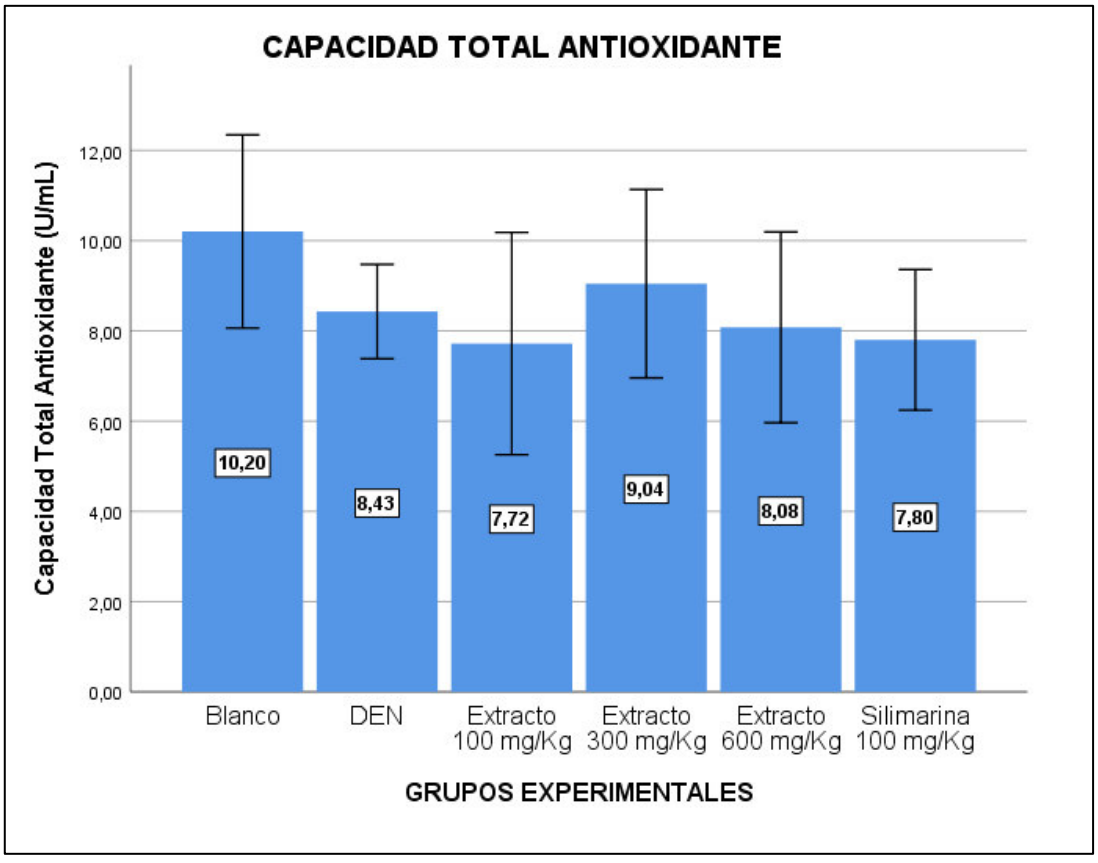


Figura 32. Capacidad antioxidante total (TAC) en los grupos experimentales.

El índice hepático mostró variaciones moderadas entre los grupos experimentales. El G1 presentó el valor más bajo (3,10 %), mientras que el G3 registró el valor más alto (3,70 %). Los demás grupos (G2, G4, G5 y G6) mostraron valores intermedios entre 3,24 % y 3,49 %, sin diferencias marcadas entre ellos, ver figura 33.

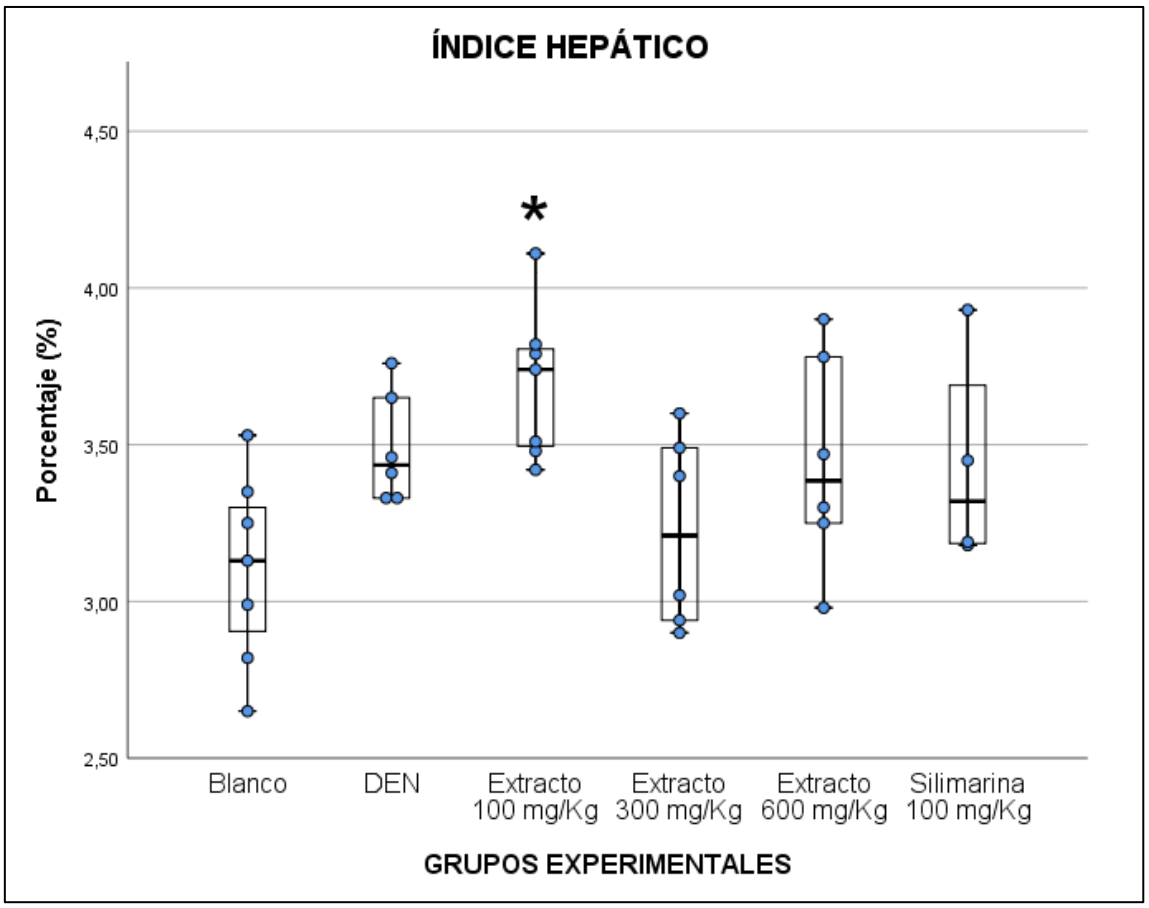


Figura 33. Niveles del Índice hepático en los grupos experimentales.
*p<0,05 vs G1.

Añadido a esto, el seguimiento de la ganancia de peso a lo largo del experimento evidenció un incremento progresivo en todos los grupos, destacando el G6 y el G2, que alcanzaron los mayores porcentajes hacia las últimas semanas. En contraste, el G1 y el G4 presentaron menores incrementos relativos de peso corporal. Asimismo, se observó una disminución transitoria en la ganancia de peso alrededor de la semana 6 en el grupo control y todos los grupos experimentales, tras la cual se retoma una tendencia ascendente hasta el final del estudio, ver figura 34 y 35.

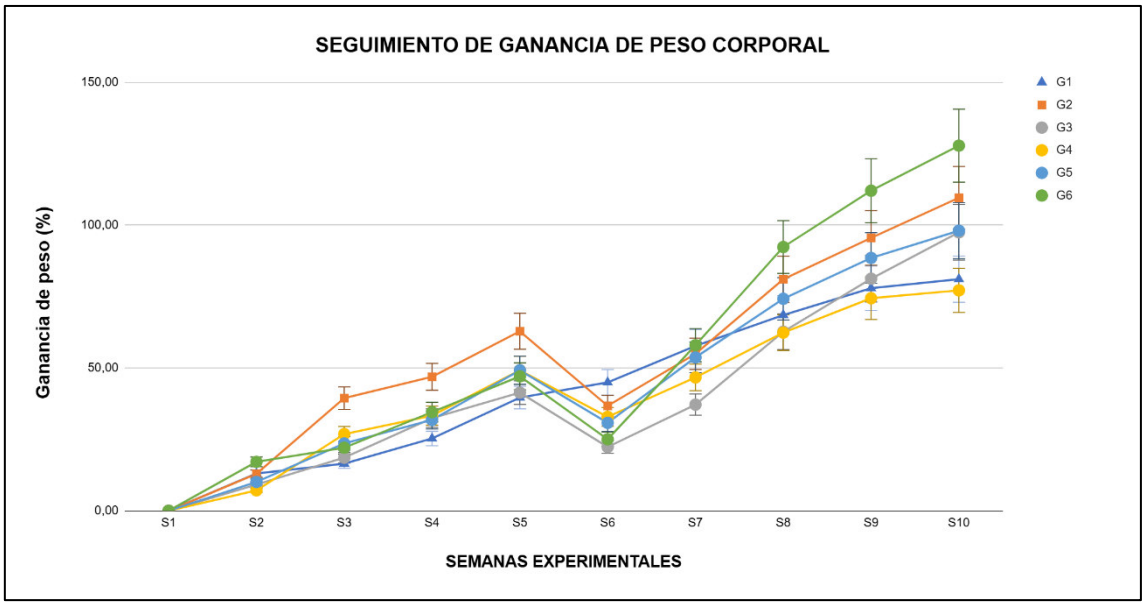


Figura 34. Evolución de la ganancia de peso corporal (%) en los grupos experimentales.

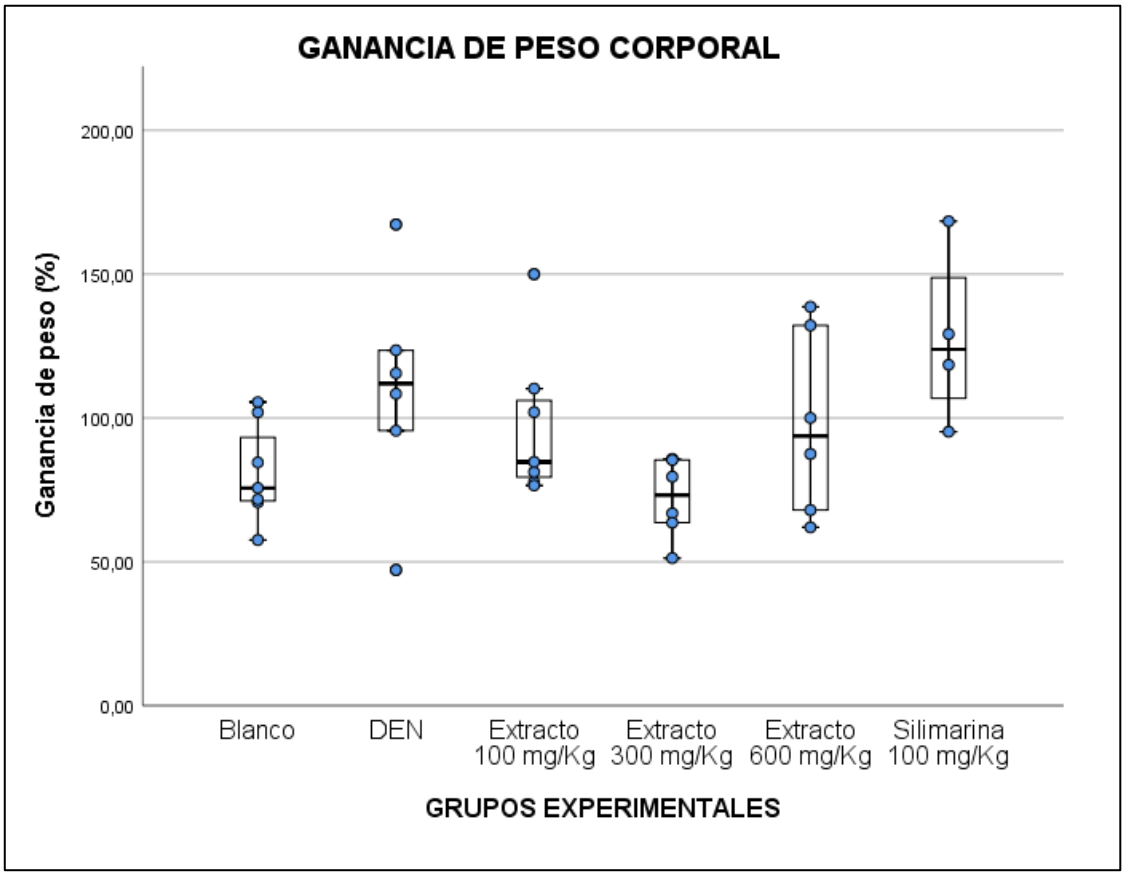


Figura 35. Ganancia de peso corporal (%) al finalizar el experimento en los grupos experimentales.

El score histopatológico hepático permitió evaluar el grado de daño tisular en los diferentes grupos experimentales. El G1 presentó el menor grado de daño hepático, con un score promedio de 0,29; evidenciando una arquitectura hepática conservada y ausencia de alteraciones histológicas relevantes. En contraste, el G2 mostró el mayor score de daño hepático (11,17), indicando un marcado compromiso histopatológico caracterizado por la presencia de lesiones hepáticas más severas.

En los grupos tratados con el extracto vegetal se observó una reducción del daño hepático en comparación con el G2. El G3 presentó un score promedio de 7,71, evidenciando una disminución parcial del daño. Por su parte, el G4 mostró un score promedio de 2,29; representando la menor severidad de daño hepático entre los grupos tratados con el extracto. El G5 registró un score promedio de 6,00; indicando un grado moderado de lesión hepática.

Finalmente, el G6 presentó un score promedio de 3,00; mostrando una reducción notable del daño hepático respecto al grupo control DEN, ver figura 36.

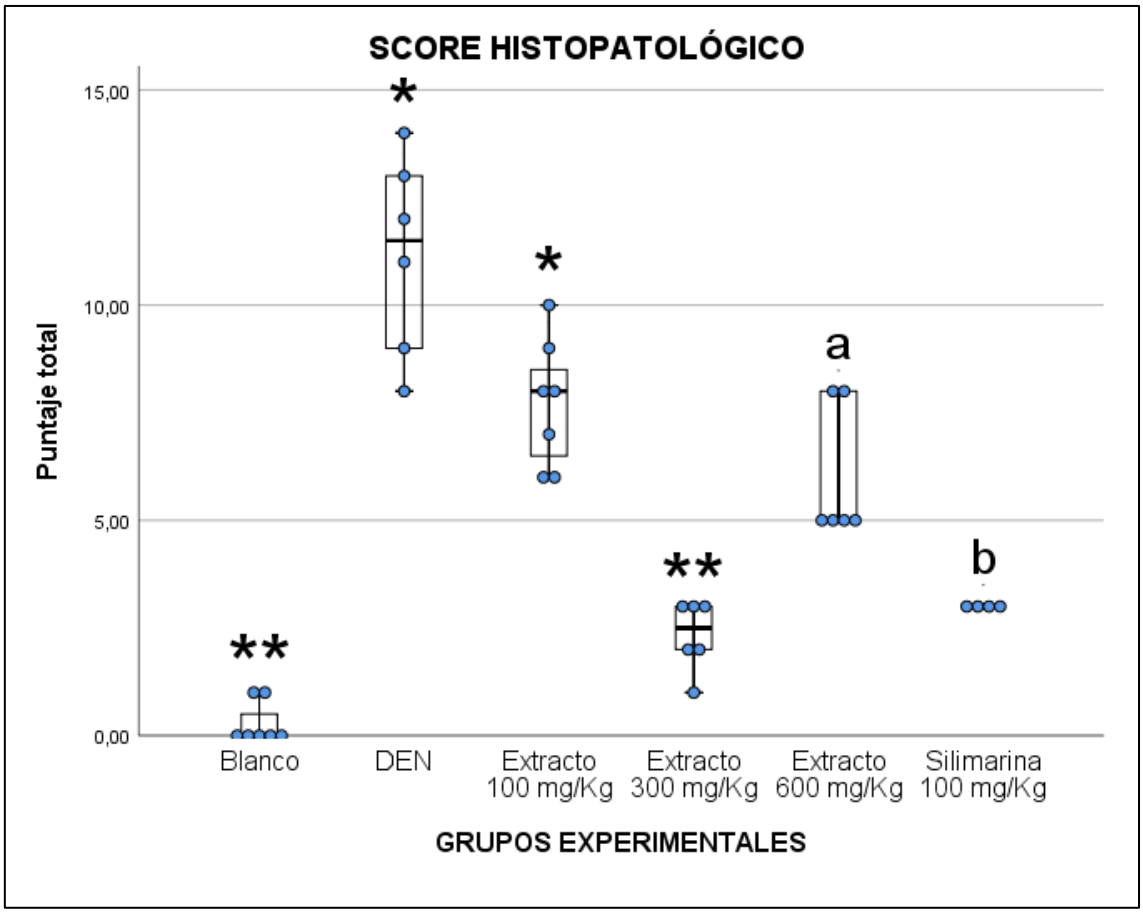


Figura 36. Puntaje total de daño hepático del Score histopatológico en los grupos experimentales. *p<0,001 vs G1; **p<0,001 vs G2; [a]p<0,01 vs G1; [b]p<0,05 vs G2.

Respecto a los hallazgos histopatológicos, el G1 presentó una arquitectura hepática conservada, sin evidencia de alteraciones estructurales ni lesiones histológicas significativas.

En contraste, el G2 mostró lesiones hepáticas severas, caracterizadas principalmente por la presencia predominante de focos displásicos, observándose en la mayoría de los casos displasia multifocal y, en menor proporción, displasia difusa. Asimismo, se evidenciaron múltiples nódulos regenerativos, esteatosis microvesicular (con algunos casos de esteatosis macrovesicular), y una marcada proliferación de conductillos biliares. En menor proporción, también se identificaron focos de necrosis hepatocelular e infiltrado inflamatorio.

En los grupos tratados con el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (G3, G4 y G5) se observaron alteraciones histológicas de menor severidad en comparación con el grupo control DEN. Entre los hallazgos más frecuentes se encontraron infiltrados multifocales de células polimorfonucleares, pequeños focos de degeneración balonante, células displásicas aisladas y esteatosis microvesicular en menor proporción. Al comparar las tres dosis evaluadas, el grupo G4 presentó el menor grado de daño histopatológico según el score establecido, mientras que los grupos G3 y G5 mostraron niveles de daño histológico relativamente similares entre sí.

Por su parte, el G6 evidenció una disminución considerable de las lesiones inducidas por la DEN, observándose principalmente degeneración balonante perilobular leve, así como pequeños focos de esteatosis microvesicular y proliferación de conductillos biliares, ver figura 37.

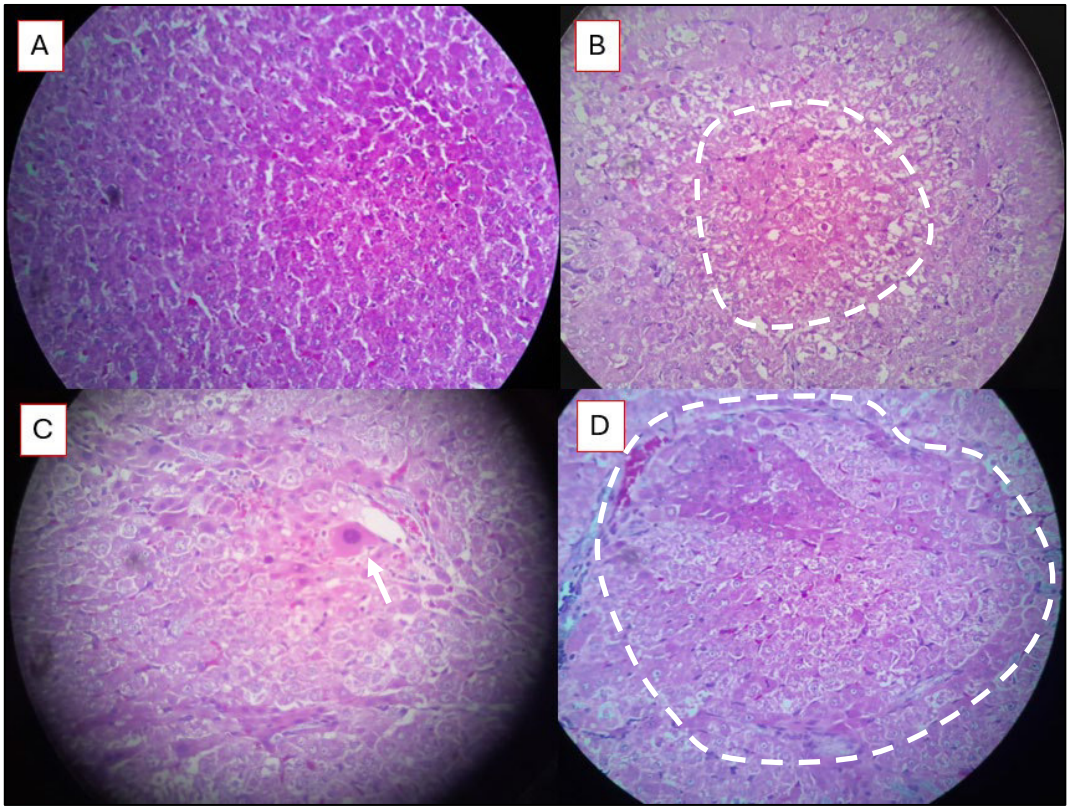


Figura 37. Lesiones histopatológicas observadas en los grupos experimentales **A.** Células normales **B.** Necrosis y degeneración balonante **C.** Células displásicas **D.** Nódulo regenerativo.

En la tabla 21 se presentan los valores de los parámetros bioquímicos séricos de enzimas, compuestos sanguíneos e indicadores de daño hepático evaluados en los diferentes grupos experimentales. Asimismo, se incluye el porcentaje de pérdida muestral no atribuible a eutanasia experimental. Se observa que la mayoría de los parámetros no mostraron diferencias significativas entre grupos, con excepción de GPT, GGT, SOD, IH y SH; los cuales evidencian alteraciones asociadas al modelo experimental.

En general, se evidencia una variación intergrupal en los biomarcadores analizados, lo cual refleja la respuesta diferencial frente a la inducción del modelo *in vivo* y los tratamientos administrados. Destaca que las alteraciones observadas en enzimas y componentes séricos no siguen un patrón uniforme, lo que sugiere una interacción compleja entre el daño hepático y los mecanismos de defensa. Cabe mencionar, que como procedimiento observacional se sacrificó a un animal de cada grupo para evaluar el nivel de progresión que presentaba cada grupo experimental. Asimismo, el porcentaje de mortalidad fue mayor en el grupo G6 (37,50%), seguido de G2 (30,00%) y G5 (12,50%), mientras que los grupos G1, G3 y G4 no presentaron pérdidas adicionales, lo que podría indicar un mayor grado de compromiso fisiológico en los grupos con mayor reducción poblacional.

Tabla N° 21. Parámetros bioquímicos de enzimas, componentes séricos e indicadores de daño hepático en los grupos experimentales.

Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Parámetro	n=7	n=6	n=7	n=6	n=6	n=4
Concentración sérica de enzimas						
GOT (U/L)	39,57 ± 6,9	36,83 ± 7,36	37,14 ± 10,98	41,67 ± 8,87	40,00 ± 7,07	28,00 ± 9,63
GPT (U/L)	26,86 ± 5,61	25,83 ± 6,4	24,00 ± 3,32	18,83 ± 4,31*	22,83 ± 2,86	18,00 ± 0,00*
FA (U/L)	299,67 ± 68,29	318,95 ± 28,27	375,74 ± 106,8	313,39 ± 39,1	344,14 ± 65,43	260,89 ± 57,92
GGT (U/L)	9,24 ± 5,16**	2,60 ± 0,93*	9,90 ± 4,78**	4,23 ± 4,63	2,97 ± 2,54	1,53 ± 0,26*
SOD (U/mL)	298,69 ± 26,63	330,69 ± 56,7	449,17 ± 55,68*	462,95 ± 71,04*	394,59 ± 120,61	356,73 ± 131,43
CAT (U/mL)	87,57 ± 68,07	80,12 ± 42,74	75,17 ± 48,63	76,43 ± 27,02	119,28 ± 85,76	88,65 ± 21,39
TAC (U/mL)	10,20 ± 2,14	8,43 ± 1,05	7,72 ± 2,46	9,05 ± 2,09	8,08 ± 2,11	7,80 ± 1,56
Concentración sérica de componentes sanguíneos						
PT (g/dL)	6,39 ± 1,02	6,46 ± 0,74	5,81 ± 0,85	7,30 ± 0,65	7,17 ± 0,57	6,28 ± 0,97
ALB (g/dL)	3,96 ± 0,57	3,84 ± 0,41	3,37 ± 0,59	4,26 ± 0,29	4,34 ± 0,49	3,74 ± 1,12
GLB (g/dL)	2,44 ± 0,57	2,76 ± 0,67	2,45 ± 0,43	3,05 ± 0,58	2,83 ± 0,93	2,53 ± 0,83
BT (mg/dL)	0,42 ± 0,06	0,52 ± 0,13	0,51 ± 0,11	0,45 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,46 ± 0,14
BD (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,16 ± 0,09	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,05
BI (mg/dL)	0,32 ± 0,07	0,36 ± 0,07	0,36 ± 0,11	0,30 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,15
Indicadores de daño hepático						
IH (%)	3,10 ± 0,31	3,49 ± 0,18	3,70 ± 0,24*	3,23 ± 0,31	3,45 ± 0,35	3,44 ± 0,35
SH (Pts)	0,29 ± 0,49[c]	11,17 ± 2,32[b]	7,71 ± 1,50[b]	2,33 ± 0,82[c]	6,00 ± 1,55[a]	3,00 ± 0,00**
GP (%)	81,09 ± 17,43	109,58 ± 39,11	97,48 ± 26,45	72,09 ± 13,82	98,05 ± 32,04	127,82 ± 30,54
Mortalidad (%)	0,00 (0/8)	30,00 (3/10)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	12,50 (1/8)	37,50 (3/8)
Exclusión procedimental (%)	12,50 (1/8)	10,00 (1/10)	12,50 (1/8)	12,50 (1/8)	12,50 (1/8)	12,50 (1/8)

*p<0,05 vs G1; **p<0,05 vs G2; [a]p<0,01 vs G1; [b]p<0,001 vs G1; [c]p<0,001 vs G2.

Asimismo, se realizó una matriz de correlación de Spearman entre los parámetros enzimáticos, componentes séricos e indicadores de daño hepático evaluados. Se observaron correlaciones significativas tanto positivas como negativas entre diversas variables, destacando asociaciones entre las fracciones de bilirrubina, proteínas séricas y marcadores antioxidantes. Asimismo, el índice hepático y el score histopatológico presentaron correlaciones positivas entre sí y con otros parámetros relacionados al daño hepático, evidenciando la interrelación entre las alteraciones bioquímicas, el estrés oxidativo y el compromiso estructural hepático, ver figura 38.

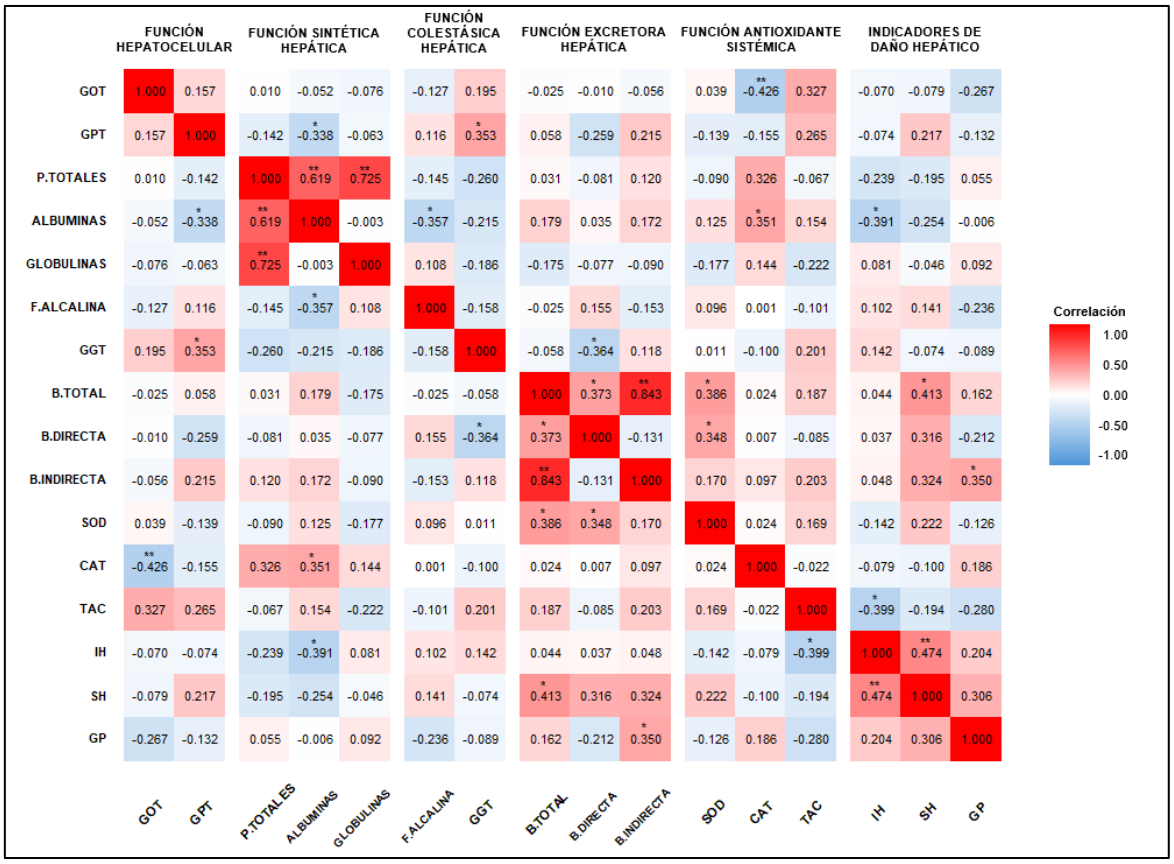


Figura 38. Mapa de calor de la correlación entre los parámetros bioquímicos. *p<0,05; **p<0,001.

Añadido a esto, la representación tipo radar de los parámetros bioquímicos e índices de daño hepático que presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, incluyendo GPT, GGT, SOD, IH y SH, mostró que los grupos experimentales presentan perfiles diferenciados en función de los parámetros evaluados.

En particular, el G6 evidencia valores elevados en enzimas hepáticas como GGT y GPT, mientras que el grupo G4 muestra una mayor contribución en el score histopatológico. Por su parte, los grupos G3 y G5 presentan valores intermedios en la mayoría de los ejes, ver figura 39.

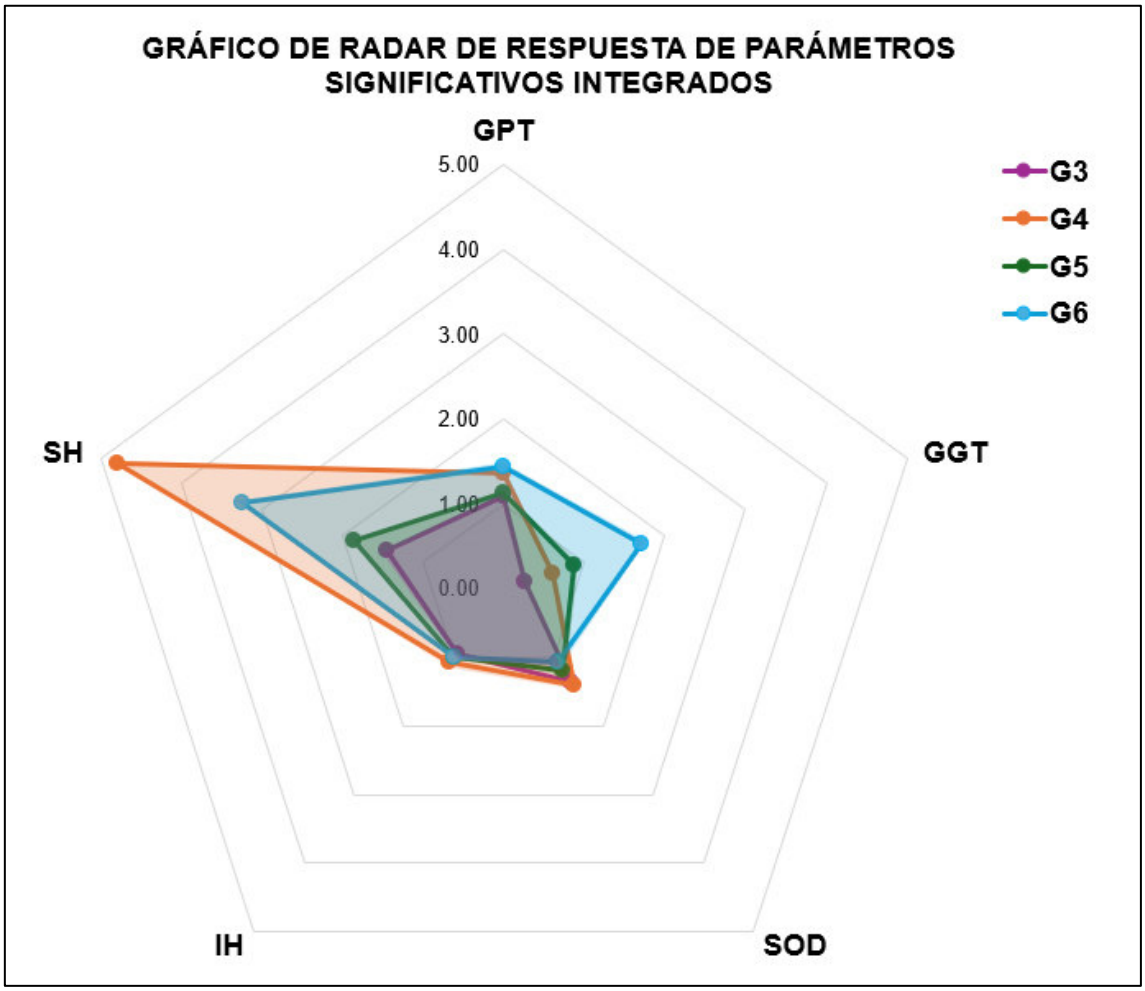


Figura 39. Perfil integrado de parámetros bioquímicos significativos como indicador de hepatoprotección en los grupos experimentales.

Finalmente, la comparación del área integrada del perfil de parámetros bioquímicos significativos obtenidos a partir del gráfico radar mostraron los grupos experimentales que presentan un mayor efecto hepatoprotector. Se observa que el grupo blanco presenta el mayor valor de área, por el contrario, el grupo tratado con DEN muestra una marcada disminución del área.

En cuanto a los grupos tratados, se aprecia una recuperación parcial del área integrada, siendo el G4 el que presenta el mayor valor entre los

tratamientos, los grupos G3 y G5, así como el G6, también muestran incrementos en el área respecto al grupo DEN, aunque en menor magnitud, ver figura 40.

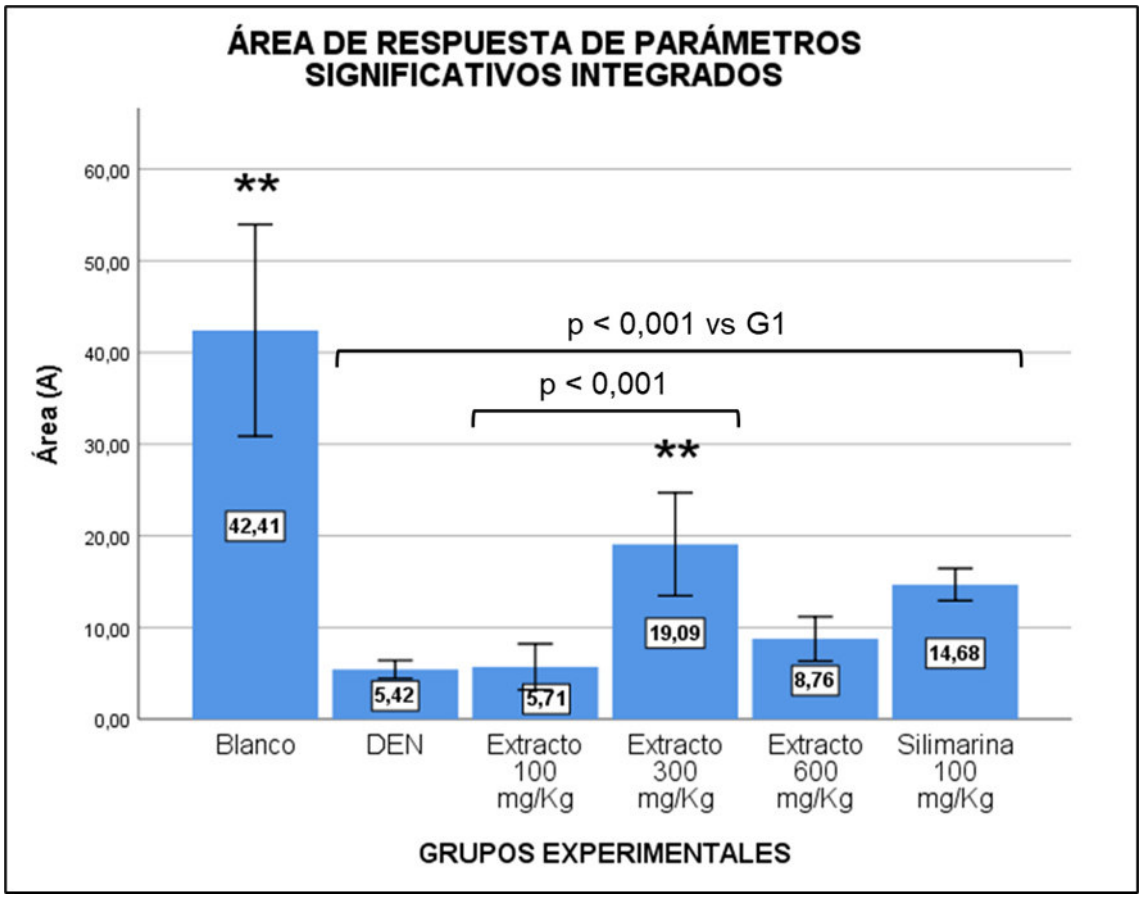


Figura 40. Comparación del área del perfil integrado de parámetros significativos entre los grupos experimentales.

**p<0,05 vs G2.

VI. DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio sientan las bases para futuras líneas de investigación sobre *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”. La exploración científica de la flora nativa, mediante la caracterización de sus principios bioactivos *in vitro* y la validación *in vivo* de sus propiedades farmacológicas, permite respaldar su aplicación tradicional. De este modo, la información generada sobre esta especie fomenta e impulsa la valoración científica del potencial terapéutico de las plantas medicinales peruanas.

En la presente investigación se determinó cualitativamente la presencia de diversos grupos de metabolitos secundarios. Los resultados del tamizaje fitoquímico evidenciaron una reacción de alta intensidad para compuestos fenólicos (+++), seguida de flavonoides (++) y saponinas (++), mientras que los triterpenoides presentaron una reacción moderada (++). Asimismo, se obtuvieron reacciones positivas de menor intensidad para taninos, antraquinonas, naftoquinonas, heterósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, glicósidos y terpenoides con núcleo esteroide (+). En contraste, no se evidenció la presencia de alcaloides mediante las pruebas de Dragendorff, Wagner, Bertrand y Mayer. En conjunto, estos resultados muestran que el extracto presenta un perfil fitoquímico diversificado, con predominio cualitativo de los grupos fenólicos y flavonoides, lo cual resulta concordante con la posterior determinación del contenido total de polifenoles realizada en la presente investigación.

La elevada presencia cualitativa de compuestos fenólicos y flavonoides resulta particularmente relevante debido a que estos grupos comprenden metabolitos capaces de participar en procesos de transferencia electrónica y neutralización de especies reactivas, además de presentar mecanismos de acción relacionados con la modulación de diferentes vías celulares. Diversos estudios han relacionado los flavonoides con efectos antioxidantes y quimiopreventivos mediante mecanismos que incluyen la modulación de vías como MAPK, PI3K/Akt y NF-κB, así como la inducción de apoptosis (143; 144). De igual manera, se ha descrito que

determinados flavonoides pueden interferir con procesos relacionados con el ciclo celular, la angiogénesis y la resistencia a agentes quimioterapéuticos (145). Sin embargo, estos antecedentes corresponden a propiedades descritas para determinados metabolitos o grupos fitoquímicos.

La presencia de estos grupos de metabolitos también puede interpretarse desde una perspectiva etnofarmacológica. Los resultados obtenidos son compatibles con los usos tradicionales atribuidos a *Tiquilia paronychioides* como planta depurativa, diurética y antiinflamatoria, considerando que los compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas han sido asociados con actividades antioxidantes y antiinflamatorias en diferentes estudios (146).

Desde el punto de vista botánico y quimiotaxonómico, el perfil obtenido resulta compatible con la composición química descrita para especies de la familia Boraginaceae, caracterizadas por la presencia de diversos grupos de metabolitos, entre ellos ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas y naftoquinonas, dentro de las cuales destaca la shikonina en determinados representantes de la familia (147). No obstante, uno de los resultados particulares del presente estudio fue la ausencia cualitativa de alcaloides en el extracto analizado. En relación con los alcaloides pirrolizidínicos descritos en algunas especies de Boraginaceae, se ha señalado su asociación con efectos hepatotóxicos (148); por ello, la ausencia de alcaloides debería ser corroborada mediante métodos analíticos específicos.

En conjunto, el tamizaje fitoquímico permitió establecer que el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” presenta una diversidad de metabolitos secundarios, con predominio de compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas. Este perfil proporciona una base inicial para interpretar los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante y los modelos biológicos contemplados en la investigación.

En la presente investigación al determinar la composición química del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el análisis cromatográfico, la muestra del extracto hidroalcohólico fue sometida previamente a una hidrólisis ácida parcial (1,2 M de HCl en baño de ultrasonido a 60 °C durante 60 minutos) con el fin de liberar los compuestos polifenólicos a su forma libre y facilitar su coincidencia en tiempo de retención y espectro UV con los patrones estándar. La lectura cromatográfica registrada a 280 nm permitió identificar y cuantificar cinco compuestos polifenólicos principales. Entre ellos, el ácido clorogénico presentó la mayor concentración con 0,785 ± 0,007 mg/g de extracto, seguido en orden decreciente por el ácido gálico (0,385 ± 0,038 mg/g), el ácido rosmarínico (0,322 ± 0,013 mg/g), la quercetina (0,256 ± 0,088 mg/g) y el ácido cafeico (0,044 ± 0,003 mg/g de extracto), ver tabla N°13.

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura existente para *Tiquilia paronychioides*, en donde se ha documentado la presencia de marcadores fenólicos clave como el ácido rosmarínico, la rutina, la quercetina (junto a sus formas glucosiladas como la quercetina-3-O-glucósido) y derivados flavonólicos del kaempferol (149). Asimismo, los hallazgos se alinean con el perfil quimiotaxonómico característico de la familia Boraginaceae (150). La evidencia científica señala que la acumulación de ácidos hidroxicinámicos (ácidos cafeico, clorogénico y rosmarínico) e hidroxibenzoicos (ácido gálico), en combinación con flavonoles (quercetina, rutina e isoquercetina), constituye un patrón químico distintivo en esta familia (146; 150; 151). Esta composición ha sido confirmada en diversos géneros de la familia; en *Borago officinalis*, mediante HPLC y LC-MS, se separaron e identificaron compuestos como el ácido rosmarínico y el ácido cafeico (152); en *Rindera graeca*, el análisis cromatográfico por HPLC-ESI-TOF-MS reveló la presencia simultánea de ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido rosmarínico y flavonoides como rutina (153); y en especies de *Alkanna* (*A. orientalis*, *A. tinctoria*, *A. kotschyana*), se ha verificado la presencia constante de ácido cafeico, ácido rosmarínico y glucósidos de quercetina y kaempferol (151).

La cuantificación evidencia que el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” posee la capacidad de síntesis y acumulación de metabolitos secundarios polifenólicos importantes, destacando el ácido clorogénico como el constituyente mayoritario. La presencia de estos cinco compuestos proporciona un fundamento fitoquímico sólido para sustentar las actividades biológicas de la planta. En la familia Boraginaceae, los ácidos fenólicos (rosmarínico, clorogénico, cafeico y gálico) y los flavonoides (quercetina) son ampliamente reconocidos por su potente actividad antioxidante, mediada por la neutralización de especies reactivas de oxígeno, así como por sus efectos antiinflamatorios, citotóxicos y quimiopreventivos. Por otra parte, la hidrólisis ácida parcial desempeñó un rol crucial en la preparación de la muestra; al retirar los enlaces glucosídicos de los flavonoides y los enlaces éster de los complejos polifenólicos del extracto total, se logró la liberación de agliconas libres y de monómeros de ácidos fenólicos, permitiendo su separación cromatográfica y su cuantificación precisa frente a los estándares puros.

Se recomienda realizar análisis complementarios de caracterización mediante sistemas acoplados a espectrometría de masas (LC-MS) sobre extractos no hidrolizados. Esto permitirá dilucidar el perfil nativo de la especie e identificar las formas glucosiladas o esterificadas intactas en las que se encuentran originalmente la quercetina y otros flavonoides (149). Además, se sugiere investigar la contribución individual y el posible efecto sinérgico de cada uno de los cinco compuestos identificados, particularmente del ácido clorogénico por ser el mayoritario, en los ensayos *in vitro* e *in vivo* contemplados en la presente investigación.

Por otra parte, al determinar el contenido de compuestos bioactivos *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”, mediante el método de Folin-Ciocalteu y formación de complejos de flavonoides con tricloruro de aluminio respectivamente, los resultados evidenciaron un contenido de 1173,53 ± 25,12 mg EAG/g de extracto, lo que demuestra una elevada concentración de compuestos fenólicos en el extracto. Este valor fue considerablemente superior al

reportado por Berlowski et al. (57) para una infusión acuosa de la misma especie, quienes registraron 75,7 mg GAE/100 mL. Asimismo, el contenido determinado en el presente estudio fue superior al descrito para otras especies de la familia Boraginaceae. En *Echium amoenum* se han reportado contenidos fenólicos de 296,2 ± 14,3 y 257,9 ± 11,3 mg EAG/g en extractos acuoso y metanólico, respectivamente (154), mientras que en un extracto etanólico de *Borago officinalis* se registró un contenido de 94,09 ± 1,72 mg EAG/g (155). En conjunto, estos antecedentes permiten contextualizar el elevado contenido de polifenoles encontrado en *Tiquilia paronychioides*.

Las diferencias observadas entre los estudios pueden estar relacionadas con las características del material vegetal empleado, así como con el solvente, método de extracción y condiciones experimentales utilizados. Kaczorová et al. (156) señalan que la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos depende, entre otros factores, de la relación entre la polaridad del solvente y la naturaleza química de los compuestos de interés. Los polifenoles presentan una polaridad intermedia asociada a la presencia de grupos hidroxilo unidos a estructuras aromáticas (157). En este sentido, el empleo de un sistema hidroalcohólico constituido por etanol al 50 % puede favorecer la recuperación de compuestos fenólicos de diferente polaridad, al proporcionar un medio de extracción intermedio. Por tanto, las diferencias frente a los estudios realizados exclusivamente con agua, metanol o etanol deben interpretarse considerando que las condiciones de extracción no fueron equivalentes.

El elevado contenido de polifenoles obtenido también puede relacionarse con la composición fitoquímica previamente descrita para *Tiquilia paronychioides*. Zavala Urtecho et al. (158) identificaron kaempferol y rutina en extractos metanólicos mediante HPLC, mientras que Saldaña et al. (159) reportaron ácido rosmarínico, ácido cafeico y quercetina en esta especie. La presencia de estos metabolitos permite sustentar que el valor obtenido por Folin-Ciocalteu representa la contribución conjunta de diversos compuestos fenólicos presentes en el extracto, y no la concentración individual de un único metabolito. Además, la capacidad

reductora de estos compuestos está relacionada con la presencia de grupos hidroxilo capaces de participar en procesos de transferencia electrónica (160). En particular, flavonoides como la quercetina y la rutina poseen múltiples grupos hidroxilo y sistemas de conjugación que favorecen la estabilización de especies radicalarias (161; 162). De manera similar, los ácidos fenólicos identificados en la especie contribuyen al carácter reductor global del extracto.

Desde el punto de vista biológico, la elevada concentración de polifenoles resulta relevante debido a que estos compuestos han sido asociados con mecanismos relacionados con la protección frente al estrés oxidativo y la carcinogénesis. Su capacidad antioxidante puede involucrar la donación de electrones y la estabilización de especies reactivas, contribuyendo a limitar procesos de daño oxidativo relacionados con la iniciación y progresión tumoral (163).

En conjunto, los resultados evidencian que el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* presenta un elevado contenido de polifenoles, superior al reportado en los antecedentes considerados para la misma especie y para otras especies de Boraginaceae.

Por otro lado, la cuantificación de flavonoides totales para el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” reportó un valor de 16,17 ± 1,02 mg EQ/g de extracto. Estos resultados concuerdan con la presencia previa de flavonoides confirmada en fracciones acuosas, metanólicas, etanólicas e hidroalcohólicas de *Tiquilia paronychioides* (164; 56), y resultan comparables a los niveles reportados para otros miembros de la familia Boraginaceae. Por ejemplo, se sitúa en un rango cercano a *Onosma bulbotrichum*, la cual presentó concentraciones de 11,5 ± 0,85 mg EQ/g en extracto acuoso y 13,3 ± 0,54 mg EQ/g en extracto etanólico (165). De igual manera, Dousti y Nabipor reportaron para *Onosma chlorotricum* valores de 23,2 ± 0,41 mg EQ/g en metanol; 19,3 ± 0,6 mg EQ/g en n-hexano y 17,16 ± 0,16 mg EQ/g en agua (166). Por otro lado, aunque especies de la misma familia como *Nonea caspica* registran concentraciones considerablemente más

elevadas; 121,17 ± 3,8 mg EQ/g en agua y 252,6 ± 1,8 mg EQ/g en etanol, cabe precisar que dichos valores se consideran excepcionales dentro del grupo taxonómico (165). Asimismo, dentro de la familia Boraginaceae es común el hallazgo de flavonoides específicos como quercetina, isoquercetina y rutinósidos (146); tales como la quercetina-3-O-rutinósido en *Halacsya sendtneri* (167), vitexina e isovitexina en *Rindera graeca* (153), o cianidina 3-glucósido y delfinidina 3-glucósido en *Nonea caspica* y *Anchusa arvensis* (165).

La variabilidad de estos metabolitos depende de los solventes empleados, los métodos de extracción y las características propias de cada especie (168). En el plano farmacológico, los flavonoides confieren a estas especies un elevado potencial bioactivo debido a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, cardioprotectoras, antimicrobianas y fotoprotectoras, de gran interés para las industrias farmacéutica y cosmética (146; 169). Desde el punto de vista metodológico, la formación de un complejo con el tricloruro de aluminio por parte de extractos alcohólicos responde a que este ensayo colorimétrico muestra una elevada afinidad por estructuras con abundantes grupos hidroxilo libres (170). Específicamente, la adición de nitrito de sodio al medio incrementa la especificidad de la reacción frente a flavonoides determinados como la rutina, la luteolina y las catequinas (170).

Con el fin de optimizar el rendimiento de extracción de estos fitoquímicos en *Tiquilia paronychioides*, se recomienda ajustar las condiciones del proceso mediante la implementación de un diseño experimental. También podría ser la implementación de métodos biotecnológicos como la autohidrolisis controlada, este procedimiento aprovecha la acción de enzimas endógenas (como las β-glucosidasas) para liberar agliconas y elevar la concentración de flavonoides en el extracto, tal como fue demostrado por Llaure y Ganoza, quienes lograron un incremento progresivo en la concentración de quercetina al aumentar el tiempo de autohidrólisis hasta un límite de 60 horas (58). Estos resultados, junto con la identificación previa de ácidos fenólicos y flavonoides en la especie,

proporciona un fundamento fitoquímico para continuar evaluando su comportamiento antioxidante y su posible relación con los efectos quimiopreventivos estudiados en la presente investigación.

Al determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante los métodos DPPH•, ABTS•+, FRAP, los resultados mostraron que el extracto presentó una actividad antioxidante mediante el método DPPH• con un valor de CI_{50} de 61,26 µg/mL y un valor de TEAC de 41,63 mg de Trolox / g de extracto. En comparación, el estándar de referencia antioxidante Trolox® presentó un valor de CI_{50} de 2,55 µg/mL.

Al contrastar estos resultados con estudios previos en la misma especie, Mendoza Ramírez et al. reportaron para el extracto etanólico de hojas, tallos y flores de *Tiquilia paronychioides* un CI_{50} de 4,31 mg/mL (56). El menor valor de CI_{50} obtenido en la presente investigación refleja una superior eficacia antioxidante, lo que sugiere una mayor concentración o una mejor conservación de los principios bioactivos en la muestra analizada. Por su parte, Berlowski et al. evaluaron diez infusiones de plantas peruanas y ubicaron a *Tiquilia paronychioides* entre las tres especies con mayor capacidad antioxidante, reportando un valor TEAC de 0,9 mmol/100 mL para DPPH• (57). Asimismo, al comparar estos hallazgos con otros miembros de la familia Boraginaceae, se observan algunas similitudes, Hannae et al. reportaron para el extracto de *Heliotropium bacciferum* un CI_{50} de 70,912 µg/mL (63), valor bastante cercano al obtenido en esta tesis. De forma análoga, Otamar et al. determinaron un TEAC de 46,88 ± 0,64 mg de Trolox / g de extracto metanólico de partes aéreas de *Heliotropium procumbens* Mill. (64), confirmando que *Tiquilia paronychioides* presenta un comportamiento antioxidante alineado al de otros taxones pertenecientes a la misma familia botánica.

La actividad captadora de radicales del ensayo DPPH• se fundamenta en la neutralización del radical libre por parte de agentes reductores, proceso ejercido principalmente por compuestos fenólicos a través de dos

mecanismos de reacción, la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y la transferencia de un solo electrón seguida de la transferencia de protones (SET-PT) (171). De acuerdo con reportes del Instituto de Investigación de Plantas Medicinales de Poznan, *Tiquilia paronychioides* contiene una diversidad de metabolitos bioactivos como el ácido rosmarínico, el ácido cafeico, la quercetina y la rutina (159). La presencia de estos compuestos no solo justifica el potencial antioxidante demostrado frente al DPPH•, sino que también sugiere la existencia de efectos biológicos complementarios de interés farmacéutico, tales como propiedades quimiopreventivas mediadas por la modulación de vías de señalización celular, la inducción de apoptosis y la detención del ciclo celular (172).

Las variaciones cuantitativas observadas entre distintos estudios se deben a factores operacionales del proceso de extracción, tales como la parte vegetal utilizada, las condiciones térmicas, la temperatura, el tamaño de partícula, el tiempo de extracción, la presión y la relación entre la muestra y solvente (173). En particular, el empleo de mezclas hidroalcohólicas (etanol:agua) incrementa significativamente la polaridad del medio, favoreciendo la rotura de enlaces de hidrógeno y facilitando una extracción más eficiente de los compuestos fenólicos (174).

Respecto al método ABTS•+, el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mostró un valor de CI_{50} de 4,94 µg/mL y un valor TEAC de 108,74 mg de Trolox / g de extracto.

Aunque la información disponible en la literatura científica sobre *Tiquilia paronychioides* evaluada mediante este ensayo es limitada, los hallazgos son consistentes con lo reportado por Berlowski et al. (57), quienes determinaron valores TEAC superiores a 0,25 mmol Trolox / 100 mL, clasificando a esta especie como una buena fuente de compuestos antioxidantes. Al comparar estos resultados con otras especies perteneciente a la familia Boraginaceae, se observan variaciones cuantitativas según el género, Ganos et al. (151) reportaron para especies del género *Alkanna* valores TEAC superiores, de 192,41; 366,88 y 250,61

mg de Trolox / g de extracto, respectivamente. Por otro lado, en *Rindera graeca* se reportó una inhibición del 52% del radical ABTS•+ a una concentración de 50 µg/mL (153), nivel de actividad que resulta comparable al comportamiento observado en el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de Tiquilia paronychioides “flor de arena”, sugiriendo un patrón antioxidante coherente dentro de la familia.

El ensayo ABTS•+ constituye un método complementario fundamental para la evaluación antioxidante, dado que permite medir la actividad tanto de compuestos hidrofílicos como lipofílicos, proporcionando una caracterización más amplia e integral del perfil antioxidante de la muestra (175). La alta capacidad de depuración observada en *Tiquilia paronychioides* se debe a la sinergia de sus constituyentes fenólicos y flavonoides capaces de ceder electrones o átomos de hidrógeno para neutralizar la especie radicalaria. Asimismo, las divergencias encontradas al contrastar con otros estudios y especies de la misma familia se atribuyen principalmente a diferencias en la composición química del extracto, las metodologías de extracción empleadas y las condiciones experimentales del ensayo, factores que condicionan la comparación cuantitativa directa entre investigaciones.

La determinación de la capacidad reductora de los iones férricos (Fe^{+3}) del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” mediante el ensayo del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) reportó un valor de 60,04 mg AA/g de extracto.

Esta notable capacidad reductora concuerda con las investigaciones previas sobre la composición química de *Tiquilia paronychioides*, en las cuales se ha detectado la presencia de polifenoles y flavonoides. Dentro de este perfil fitoquímico, destaca de forma relevante el reporte de flavonoides específicos como la quercetina y la rutina (159), compuestos reconocidos por su alta efectividad en la donación de electrones a especies metálicas.

El ensayo FRAP se fundamenta en la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} bajo condiciones ácidas de reacción (pH 3,6), donde cada compuesto antioxidante, según su naturaleza química, puede donar estequiométricamente uno o más electrones para reducir una o más moléculas del complejo Fe^{3+}-TPTZ (132). Está marcada actividad en *Tiquilia paronychioides* se atribuye a la presencia de flavonoides (cuya concentración cuantificada en el extracto fue de 16,17 ± 1,02 mg EQ/g), los cuales actúan reduciendo múltiples moléculas de Fe^{+3}-TPTZ simultáneamente debido a su configuración estructural (176). En particular, la presencia de la estructura tipo catecol en el anillo B y un grupo 3-OH unido a un doble enlace en el anillo C permite a estos flavonoides ceder fácilmente dos electrones, generando derivados de tipo quinona altamente estables que potencian de forma significativa el poder reductor *in vitro* (176).

Se recomienda complementar esta determinación mediante ensayos de capacidad quelante de metales (como la quelación de hierro y cobre) para evaluar si el extracto de *Tiquilia paronychioides*, además de reducir los iones férricos, es capaz de secuestrar metales de transición prooxidantes, bloqueando así la reacción de Fenton y previniendo la formación de radicales hidroxilo.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante los ensayos DPPH•, ABTS•+ y FRAP evidencian que el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” presenta una actividad antioxidante comprobada, la cual puede atribuirse principalmente a su elevado contenido de compuestos fenólicos y, en menor medida, a la presencia de flavonoides.

Para profundizar en la caracterización de la bioactividad de *Tiquilia paronychioides*, se recomienda realizar un fraccionamiento guiado por bioensayo utilizando solventes de polaridad creciente sobre el extracto total. Esto permitirá identificar y aislar de manera específica qué fracción (hidrofílica o lipofílica) concentra la mayor actividad depuradora frente a los métodos DPPH•, ABTS•+ y FRAP.

Asimismo, determinados compuestos polifenólicos presentes en *Tiquilia paronychioides* han mostrado mecanismos celulares de interés. La quercetina puede inducir apoptosis mediante la modulación de la vía PI3K/Akt y la activación de caspasas (177), mientras que el kaempferol se ha relacionado con la activación de vías de señalización como MAPK y con la modulación de Hemo Oxigenasa-1, mecanismos vinculados con la respuesta celular frente al estrés oxidativo y la muerte celular programada (178). No obstante, estos mecanismos corresponden a efectos descritos para los compuestos individuales y no permiten atribuir directamente al extracto de *Tiquilia paronychioides* los mismos efectos sin su comprobación experimental.

La presente investigación permitió determinar el efecto citotóxico *in vitro* extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” en células cancerígenas humanas mediante el método de sulforodamina B, se demostró que el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” presentó una concentración de inhibición del crecimiento celular CI_{50} superior a 250,00 µg/mL, CI_{50} > 250,00 µg/mL en la totalidad de las líneas celulares evaluadas. Esta ausencia de inhibición del 50% del crecimiento celular se registró tanto en las líneas tumorales humanas H460 (cáncer de pulmón), Du145 (carcinoma de próstata), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), M14 (melanoma amelanótico) y HT29 (adenocarcinoma de colon) como en la línea celular no tumoral de control 3T3 (fibroblastos normales de ratón). En todas estas líneas, el porcentaje de crecimiento celular a la dosis máxima de 250 µg/mL permaneció elevado, registrando valores de 87,93% en 3T3, 93,77% en Du145, 93,77% en MCF-75 y 93,59% en M14. En contraposición, el fármaco quimioterapéutico de control positivo, 5-fluorouracilo (5-FU), demostró una potente actividad antiproliferativa y citotóxica sobre las mismas líneas celulares, alcanzando valores de CI_{50} sustancialmente menores situados entre 0,29 µg/mL y 5,82 µg/mL

Al contrastar estos hallazgos con los criterios estandarizados del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI), se establece que un extracto vegetal crudo es considerado activo o citotóxico contra células

tumorales cuando presenta una CI_{50} ≤ 30 µg/mL (179). Asimismo, en escalas de bioactividad aplicadas a flora medicinal peruana, valores de CI_{50} > 250 µg/mL o CI_{50} > 1000 µg/mL clasifican a una muestra como carente de citotoxicidad directa (180). Mientras que especies como *Curcuma longa* (CI_{50} entre 20,67 y 98,14 µg/mL) o *Zingiber officinale* (CI_{50} de 87,15 µg/mL) exhiben una notable toxicidad *in vitro* (180). El extracto de *Tiquilia paronychioides* se categoriza como no citotóxico bajo las condiciones de ensayo aplicadas. Estos datos concuerdan plenamente con las evaluaciones de toxicidad *in vivo* en ratones Balb/c realizadas por Mendoza (2020), en las cuales el extracto etanólico de "flor de arena" no produjo mortalidad ni signos de toxicidad aguda oral DL_{50} > 2000 mg/kg) (56). De igual manera, coinciden con los informes técnicos del Instituto de Medicina Tradicional (IMET-EsSalud), donde se concluyó que *Tiquilia paronychioides* no presenta toxicidad aguda cutánea y muestra inactividad en pruebas de letalidad con *Artemia salina*, así como con lo señalado por Contreras et al. (2022) respecto a la baja citotoxicidad y amplio margen de seguridad que caracteriza a ciertas plantas medicinales peruanas (181).

La interpretación de los datos revela dos aspectos de gran relevancia científica. Primero, el hecho de que la línea no tumoral de fibroblastos de ratón 3T3 mantenga una viabilidad celular de 87,93% a 250 µg/mL (CI_{50} > 250,00 µg/mL) confirma la alta biocompatibilidad e inocuidad del extracto sobre tejidos sanos, una propiedad indispensable para fitofármacos o agentes terapéuticos de uso prolongado (181). Segundo, aunque el extracto hidroalcohólico crudo no produce una muerte celular citotóxica o lítica directa sobre las células tumorales *in vitro* a las dosis probadas, esto no invalida su potencial anticancerígeno. La literatura fitoquímica demuestra que los polifenoles y flavonoides presentes en mezclas complejas no siempre actúan mediante citotoxicidad inespecífica como los citostáticos sintéticos (5-FU), sino que ejercen su acción principal mediante mecanismos quimiopreventivos, de modulación antioxidante y neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) (182). Los compuestos fenólicos protegen a las células normales de la

mutagénesis y el daño oxidativo provocado por carcinógenos en la fase de iniciación, regulando la respuesta inflamatoria antes que destruyendo de forma violenta el tejido.

Desde el punto de vista de selectividad, el índice de selectividad (IS), definido como la relación entre el CI_{50} en células no tumorales (3T3) y tumorales, no pudo determinarse de manera concluyente para el extracto, dado que los valores de CI_{50} fueron superiores a 250 µg/mL en todos los casos. No obstante, este comportamiento sugiere una baja o nula selectividad citotóxica en el rango evaluado. Por el contrario, los valores de IS del 5-FU fueron menores a 1 en todas las líneas celulares, lo que indica una alta citotoxicidad sobre células normales y, por tanto, un margen terapéutico limitado, asociado a efectos adversos en tejidos sanos (179; 183).

En consecuencia, el potencial de *Tiquilia paronychioides* respondería a un perfil quimiopreventivo y citoprotector, evaluado en el modelo *in vivo* con inducción de hepatocarcinoma por dietilnitrosamina, y no a una citotoxicidad directa sobre células tumorales consolidadas. A partir de los resultados e interpretaciones expuestas, se plantean evaluar mecanismos moleculares de acción antiproliferativa no lítica, tales como el análisis de detención del ciclo celular en fases G_2/M o S, ensayos de apoptosis mediante marcadores moleculares.

que el extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* no presenta actividad citotóxica significativa en el rango de concentración estudiado, pero posee características que lo posicionan como un candidato potencial para estrategias de quimioprevención. Su perfil fitoquímico, junto con su baja toxicidad celular y su capacidad para modular procesos biológicos relevantes, respaldan su posible aplicación en la prevención del desarrollo tumoral más que en su tratamiento directo.

Finalmente, en cuanto a la determinación del efecto quimiopreventivo *in vivo* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” mediante el modelo

de inducción de carcinoma hepatocelular (CHC) en ratas *Rattus* utilizando dietilnitrosamina (DEN), los resultados obtenidos en la evaluación del daño tisular revelaron que el grupo de inducción tumoral (G2, DEN) presentó una severa desorganización de la arquitectura hepática caracterizada por displasia multifocal y difusa, abundantes nódulos regenerativos, esteatosis microvesicular y macrovesicular, marcada proliferación de conductillos biliares, necrosis e infiltrado inflamatorio polimorfonuclear, alcanzando el mayor puntaje de daño histopatológico (11,17 ± 2,32). La administración del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” logró mitigar significativamente estas alteraciones histopatológicas, destacando de forma sobresaliente el grupo tratado con la dosis intermedia de 300 mg/kg (G4), el cual exhibió un score de daño hepático de solo 2,33 ± 0,82 (p < 0,001 vs G2), representando el menor grado de severidad entre todos los grupos evaluados e induciendo una preservación del parénquima superior incluso a la observada con el fármaco estándar Silimarina a 100 mg/kg (3,00 ± 0,00 en G6). En cuanto a los parámetros bioquímicos, el extracto a 300 mg/kg (G4) indujo una reducción estadísticamente significativa en los niveles séricos de la transaminasa GPT (18,83 ± 4,31 U/L, p < 0,05 vs G1), mientras que en el perfil antioxidante sistémico, las dosis de 100 mg/kg (G3) y 300 mg/kg (G4) incrementaron de manera significativa la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (449,17 ± 56,12 U/mL y 462,95 ± 70,58 U/mL, respectivamente, p < 0,05 vs G1), observándose además variaciones moderadas en fosfatasa alcalina (FA), GGT, bilirrubinas e índice hepático.

La marcada atenuación de la hepatocarcinogénesis inducida por DEN y la restauración de la integridad tisular mediante el uso de fitoquímicos polifenólicos concuerdan con la literatura previa (184; 185). Específicamente, estudios *in vivo* de hepatoprotección y quimioprevención frente a DEN empleando extractos de *Costus comosus* (184), *Nigella sativa* (185), *Annona senegalensis* (186), *Commiphora molmol* (187), proantocianidinas de semilla de uva (188), miel de abeja (189), nanopartículas de *Arthrospira platensis* (190), polisacáridos de

Morus nigra (191), *Nasturtium officinale* (192) y ácido chebulínico (193) demostraron que la administración de matrices ricas en flavonoides y compuestos fenólicos previene la formación de focos de alteración celular, reduce la frecuencia de nódulos displásicos (lesión preneoplásica) y disminuye los niveles de enzimas marcadoras de daño hepático (como GPT, GOT, FA y GGT) en modelos murinos. Asimismo, el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes endógenas como SOD y la preservación del estatus redox observados en el grupo G4 concuerdan con las observaciones de Venkateswararao et al. (184), Shahin et al. (185), Sherif et al. (188), Ghamry (190), Feng et al. (192) y Fu & Jiang (193), quienes sostienen que la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un mecanismo clave para contener el daño a macromoléculas durante la bioactivación de la DEN. Por otro lado, la observación de que la dosis intermedia (300 mg/kg) ejerció una protección tisular superior a la dosis máxima (600 mg/kg) contrasta con el reporte de Sivakumar & Devi (194), quienes al evaluar la pulpa de *Cucumis melo* var. *agrestis* en ratas expuestas a DEN no hallaron una respuesta quimiopreventiva e histoprotectora significativa a pesar de una moderada actividad antioxidante. Adicionalmente, el efecto citoprotector observado se alinea con investigaciones en otros modelos de hepatotoxicidad inducida por paracetamol (*Mentha canadensis*) (195), tioacetamida (*Teucrium oliverianum* y otros agentes fitoterapéuticos) (196; 197), paclitaxel (*Silybum marianum*) (198) o tumores sólidos (*Vitis vinifera*) (199), así como con estrategias combinadas de Sorafenib y Theranekron (200), donde la preservación de la membrana hepatocitaria limita la progresión tumoral y la inflamación tisular.

En el aspecto bioquímico, la DEN es un potente hepatocarcinógeno genotóxico que requiere bioactivación microsomal por parte del citocromo CYP2E1 para generar radicales alquilantes y especies reactivas de oxígeno, los cuales inducen peroxidación lipídica, ruptura de membranas celulares, necrosis y un estado de inflamación crónica que promueve la proliferación de hepatocitos hiperplásicos y displásicos (184; 186). La alta capacidad del extracto de *Tiquilia paronychioides* para atenuar este

proceso, demostrada por la marcada reducción del puntaje histopatológico y la supresión de focos displásicos en el grupo G4, sugiere que sus metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) actúan interceptando oportunamente las ROS generadas y estimulando de forma compensatoria la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esto previene la permeabilización de la membrana citoplasmática del hepatocito, reduciendo la filtración sérica de GPT y bloqueando las señales de progresión celular hacia nódulos preneoplásicos (190). La menor respuesta histoprotectora observada con la dosis más alta de 600 mg/kg (Score de 6,00 en G5) respecto a la de 300 mg/kg sugiere la presencia de un fenómeno de hormesis o curva en U invertida, en el cual concentraciones excesivamente altas de flavonoides pueden desencadenar leves efectos prooxidantes residuales o saturación metabólica *in vivo*, definiendo a los 300 mg/kg como la ventana de dosis efectiva óptima para la especie.

El análisis de la mortalidad mostró cómo respondieron los animales a cada tratamiento en cuanto a efectividad y seguridad. El grupo que recibió DEN (G2) tuvo un 30,00% de mortalidad, reflejó la agresividad del modelo de farmacológico, el cual causa un daño grave en el tejido y debilita la integridad de los individuos. Por el contrario, los tratamientos de 100 y 300 mg/kg de extracto (G3 y G4) mantuvieron una supervivencia del 100%, al igual que el grupo blanco (G1).

En el grupo que recibió 600 mg/kg de extracto (G5), que recibió la dosis más alta, la mortalidad subió al 12,50%. Esto indica un posible efecto dependiente de la dosis, donde una cantidad excesiva de compuestos pudo saturar el hígado que ya estaba dañado, generando un estrés metabólico adicional en lugar de protegerlo.

El hallazgo más llamativo fue en el grupo estándar tratado con Silimarina (G6), que presentó la mayor mortalidad del estudio con un 37,50%. Aunque la Silimarina es un hepatoprotector muy utilizado, la literatura científica señala que su comportamiento cambia drásticamente en un tejido hepático que no está óptimo al 100% o bajo un daño severo. En

tejidos con daño hepático previo o tumores en desarrollo, las dosis altas de Silimarina pueden sobrecargar los sistemas de desintoxicación celular y alterar las enzimas metabólicas (como el citocromo P450). Además, se ha documentado que en modelos animales con alta toxicidad, las dosis de Silimarina pierden su capacidad protectora y se ve afectada su farmacocinética (201; 202). En esta investigación, dicha sobrecarga en un órgano debilitado, sumada a problemas propios de la toxicidad, aceleró la pérdida extrema de peso y se tuvo que aplicar el punto final humanitario antes de que el fármaco pudiera ejercer su beneficio en los individuos.

Se recomienda evaluar un rango más estrecho de dosis intermedias (por ejemplo, entre 200 y 400 mg/kg) para precisar la dosis mínima efectiva y profundizar en las vías de señalización analizando biomarcadores de proliferación celular, muerte celular apoptótica, mediadores inflamatorios y marcadores tumorales específicos (alfa-fetoproteína, etc) en tejido hepático para consolidar el potencial producto natural de uso en salud de la "flor de arena" en la prevención del carcinoma hepatocelular.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” presentó un perfil fitoquímico caracterizado principalmente por la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y triterpenoides. Asimismo, mediante HPLC-DAD se identificaron ácido cafeico, quercetina, ácido rosmarínico, ácido gálico y ácido clorogénico, siendo este último el compuesto de mayor concentración.
- El extracto hidroalcohólico presentó un elevado contenido de polifenoles totales, con un valor de 1173,53 mg EAG/g de extracto, y un contenido de flavonoides de 16,17 mg EQ/g. Estos resultados evidencian la riqueza del extracto en compuestos fenólicos y flavonoides, en concordancia con el perfil fitoquímico cualitativo.
- El extracto hidroalcohólico presentó actividad antioxidante *in vitro*, teniendo valores de 41,63 mg Trolox/g de extracto mediante DPPH•; 108,74 mg Trolox/g mediante ABTS•+ y 60,04 mg AA/g mediante FRAP. Esto evidencia su capacidad antioxidante mediante diferentes mecanismos de reacción y son concordantes con su elevado contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.
- El extracto hidroalcohólico no presentó citotoxicidad significativa a concentraciones inferiores a 250 µg/mL en las líneas celulares tumorales evaluadas. No se evidenció un efecto citotóxico directo bajo las condiciones experimentales empleadas, lo que permite diferenciar este comportamiento de los efectos observados en el modelo quimiopreventivo *in vivo*.
- En el modelo experimental de hepatocarcinogénesis inducida por DEN, el tratamiento con el extracto a 300 mg/kg presentó una disminución significativa de los signos preneoplásicos evaluados. Esto evidencia un efecto quimiopreventivo bajo las condiciones experimentales empleadas y constituye un hallazgo relevante para continuar investigando la relación entre su composición fitoquímica, actividad antioxidante y respuesta frente al proceso de hepatocarcinogénesis.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda profundizar en la caracterización química del extracto hidroalcohólico de *Tiquilia paronychioides* mediante técnicas analíticas avanzadas como LC-MS o RMN, con el fin de identificar y cuantificar un mayor número de compuestos bioactivos responsables de las actividades observadas.
- Se recomienda cuantificar individualmente los principales compuestos fenólicos y flavonoides identificados, a fin de determinar su contribución al contenido total del extracto y facilitar su estandarización fitoquímica.
- Se recomienda complementar los ensayos químicos *in vitro* con modelos celulares que permitan evaluar la capacidad antioxidante del extracto en condiciones biológicas y explorar su relación con el contenido de compuestos fenólicos.
- Se recomienda ampliar el rango de concentraciones y evaluar líneas celulares no tumorales para determinar la selectividad citotóxica del extracto, así como explorar otros mecanismos de acción distintos de la inhibición directa de la viabilidad celular.
- Se recomienda profundizar la evaluación de la dosis de 300 mg/kg mediante estudios complementarios que permitan confirmar su efecto sobre las lesiones preneoplásicas, establecer una relación dosis-respuesta y caracterizar mejor los posibles mecanismos involucrados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory: Cancer Today—Peru fact sheet. Lyon (FR): IARC; 2022.
2. Contreras-Mancilla J, Cerapio JP, Ruiz E, Fernández R, Casavilca-Zambrano S, Machicado C, et al. Hepatocellular carcinoma in Peru: A molecular description of an unconventional clinical presentation. Rev Gastroenterol Méx (Engl Ed) [Internet]. 2024;89(2):194–204. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmxen.2023.04.009
3. Torres-Roman JS, De La Cruz-Ku G, Alvarez CS, Ybaseta-Medina J, Ruiz EF, Martinez-Herrera JF, et al. Liver cancer mortality rates in Peru: Trend analysis from 2003 to 2017. Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2025;26(2):435–41. Disponible en: http://dx.doi.org/10.31557/APJCP.2025.26.2.435
4. Bertani S, Pineau P, Loli S, Moura J, Zimic M, Deharo E, et al. An atypical age-specific pattern of hepatocellular carcinoma in Peru: a threat for Andean populations. PLoS One [Internet]. 2013;8(6):e67756. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067756
5. Farah M, Anugwom C, Ferrer JD, Baca EL, Mattos AZ, Possebon JPP, et al. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in South America: A report from the South American liver research network. Ann Hepatol [Internet]. 2023;28(2):100876. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100876
6. MINSA. Más de 9600 pacientes con enfermedades hepáticas crónicas se atienden al año en el Hospital Loayza [Internet]. Gob.pe. 2023 [cited 2024 Nov 15]. Disponible en: https://www.gob.pe/institucion/hospitalloayza/noticias/751677-mas-de-9600-pacientes-con-enfermedades-hepaticas-cronicas-se-atienden-al-ano-en-el-hospital-loayza
7. BOLETÍN EPIDEMIOLÓCICO DEL PERÚ 2019 [Internet]. Lima; 2019 [cited 2024 Sep 20]. Disponible en: http://chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/25.pdf
8. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna Y González-Rubio M, et al.

Hepatoprotective effect of silymarin. World J Hepatol [Internet]. 2014;6(3):144–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144

9. Elufioye TO, Habtemariam S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. Biomed Pharmacother [Internet]. 2019 [cited 2024 Nov 13];112(108600):108600. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218346444
10. Attia AM, Rezaee-Zavareh MS, Hwang SY, Kim N, Adetyan H, Yalda T, et al. Novel biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma. Diagnostics (Basel) [Internet]. 2024;14(20):2278. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics14202278
11. Singh AK, Singh SV, Kumar R, Kumar S, Senapati S, Pandey AK. Current therapeutic modalities and chemopreventive role of natural products in liver cancer: Progress and promise. World J Hepatol [Internet]. 2023;15(1):1–18. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v15.i1.1
12. Tripathi R, Yadav A, Biharee A, Gupta JK, Singh B, Pathak P, et al. Therapeutic potential and molecular mechanisms of natural flavonoids in liver cancer. Pharmacological Research - Natural Products [Internet]. 2025;8(100288):100288. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.prenap.2025.100288
13. Richardson AT. A taxonomic revision of the genus Tiquilia (Boraginaceae). Brittonia [Internet]. 1977 [citado 1 de junio de 2025];29(3):366–74. Disponible en: https://doi.org/10.2307/2806364
14. Moore MJ, Jansen RK. Molecular evidence for the age, origin, and evolutionary history of the American desert plant genus Tiquilia (Boraginaceae). Mol Phylogenet Evol [Internet]. 2006;39(3):668–87. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.01.020
15. Chen TV, Boonma T, Hieu NT, Lam DNX, Hien NTT. Exploring the Botany, Traditional Uses, Phytochemical Profile, and Pharmacological Effects of Coldenia procumbens L., Boraginaceae. J Med Food. 2024;27(1):1-15. Disponible en: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1934578X241287130
16. Tiquilia paronychioides (Phil.) A.T. Richardson [Internet]. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [cited 2025 Jun 9]. Disponible en: https://www.tropicos.org/name/4000204

17. Jin J, Boersch M, Nagarajan A, Davey AK, Zunk M. Antioxidant Properties and Reported Ethnomedicinal Use of the Genus Echium (Boraginaceae). Antioxidants (Basel). 2020;9(8):722. Disponible en: https://www.mdpi.com/2076-3921/9/8/722
18. Dresler S, Szymczak G, Wójcik M. Comparison of Some Secondary Metabolite Content in Seventeen Species of the Boraginaceae Family. Pharm Biol. 2017;55(1):691-5. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1265986
19. Maleki Dana P, Sadoughi F, Asemi Z, Yousefi B. The role of polyphenols in overcoming cancer drug resistance: a comprehensive review. Cell Mol Biol Lett [Internet]. 2022;27(1):1. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s11658-021-00301-9
20. Situmorang PC, Ilyas S, Nugraha SE, Syahputra RA, Nik Abd Rahman NMA. Prospects of compounds of herbal plants as anticancer agents: a comprehensive review from molecular pathways. Front Pharmacol [Internet]. 2024;15:1387866. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1387866
21. Auti A, Tathode M, Marino MM, Vitiello A, Ballini A, Miele F, et al. Nature's weapons: Bioactive compounds as anti-cancer agents. AIMS Public Health [Internet]. 2024;11(3):747–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3934/publichealth.2024038
22. Frenț O-D, Stefan L, Morgovan CM, Duteanu N, Dejeu IL, Marian E, et al. A systematic review: Quercetin-secondary metabolite of the flavonol class, with multiple health benefits and low bioavailability. Int J Mol Sci [Internet]. 2024;25(22). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms252212091
23. Chen S, Wang X, Cheng Y, Gao H, Chen X. A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. Molecules [Internet]. 2023;28(13):4982. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules28134982
24. Elshafie HS, Camele I, Mohamed AA. A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. Int J Mol Sci [Internet]. 2023;24(4):3266. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms24043266

25. Câmara JS, Albuquerque BR, Aguiar J, Corrêa RCG, Gonçalves JL, Granato D, et al. Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. Foods [Internet]. 2020;10(1):37. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/foods10010037
26. Chiocchio I, Mandrone M, Tomasi P, Marincich L, Poli F. Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. Molecules [Internet]. 2021;26(2):495. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules26020495
27. Mir SA, Dar A, Hamid L, Nisar N, Malik JA, Ali T, et al. Flavonoids as promising molecules in the cancer therapy: An insight. Curr Res Pharmacol Drug Discov [Internet]. 2024;6(100167):100167. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.crphar.2023.100167
28. Hunyadi A. The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites: HUNYADI. Med Res Rev [Internet]. 2019;39(6):2505–33. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/med.21592
29. Uuh-Narvaez JJ, Segura-Campos MR, Sytar O. Antioxidant potential and known secondary metabolites of rare or underutilized plants of Yucatan region. Future Pharmacology [Internet]. 2023;3(4):664–85. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/futurepharmacol3040042
30. Moussa Z, M.A. Judeh Z, A. Ahmed S. Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. In: Free Radical Medicine and Biology. IntechOpen; 2020.
31. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2010;3(4):228–37. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858
32. Voltan R, Secchiero P, Casciano F, Milani D, Zauli G, Tisato V. Redox signaling and oxidative stress: Cross talk with TNF-related apoptosis inducing ligand activity. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2016;81(Pt B):364–74. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.019
33. Rotariu D, Babes EE, Tit DM, Moisi M, Bustea C, Stoicescu M, et al. Oxidative stress - Complex pathological issues concerning the hallmark of

cardiovascular and metabolic disorders. Biomed Pharmacother [Internet]. 2022;152(113238):113238. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113238

34. Tejchman K, Kotfis K, Sieńko J. Biomarkers and mechanisms of oxidative stress-last 20 years of research with an emphasis on kidney damage and renal transplantation. Int J Mol Sci [Internet]. 2021;22(15):8010. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms22158010
35. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. Eur J Med Chem [Internet]. 2021;209(112891):112891. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891
36. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alex J Med [Internet]. 2018;54(4):287–93. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001
37. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Adv Med Sci [Internet]. 2018;63(1):68–78. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005
38. Mallik S, Paria B, Firdous SM, Ghazzawy HS, Alqahtani NK, He Y, et al. The positive implication of natural antioxidants on oxidative stress-mediated diabetes mellitus complications. J Genet Eng Biotechnol [Internet]. 2024;22(4):100424. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2024.100424
39. World Health Organization. Cáncer: datos y cifras [Internet]. Ginebra: OMS; 2022 [citado 2025 sep 2]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer
40. Plewa P, Kiełbowski K, Mentel O, Figiel K, Bakinowska E, Becht R, et al. Bacteria and carcinogenesis and the management of cancer: A narrative review. Pathogens [Internet]. 2025;14(5). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pathogens14050509

41. Singh SR, Bhaskar R, Ghosh S, Yarlagadda B, Singh KK, Verma P, et al. Exploring the genetic orchestra of cancer: The interplay between oncogenes and tumor-suppressor genes. Cancers (Basel) [Internet]. 2025;17(7):1082. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers17071082
42. Da BL, Suchman KI, Lau L, Rabiee A, He AR, Shetty K, et al. Pathogenesis to management of hepatocellular carcinoma. Genes Cancer [Internet]. 2022;13:72–87. Disponible en: http://dx.doi.org/10.18632/genesandcancer.226
43. Mithoowani H, Febbraro M. Non-small-cell lung cancer in 2022: A review for general practitioners in oncology. Curr Oncol [Internet]. 2022;29(3):1828–39. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/curroncol29030150
44. Carvalho E, Canberk S, Schmitt F, Vale N. Molecular subtypes and mechanisms of breast cancer: Precision medicine approaches for targeted therapies. Cancers (Basel) [Internet]. 2025;17(7):1102. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers17071102
45. Tzelepi V. Prostate cancer: Pathophysiology, pathology and therapy. Cancers (Basel) [Internet]. 2022;15(1):281. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers15010281
46. Gosman LM, Țăpoi D-A, Costache M. Cutaneous melanoma: A review of multifactorial pathogenesis, immunohistochemistry, and emerging biomarkers for early detection and management. Int J Mol Sci [Internet]. 2023;24(21):15881. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms242115881
47. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal cancer: A review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. Cancers (Basel) [Internet]. 2022;14(7):1732. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers14071732
48. National Cancer Institute. Definition of chemoprevention [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute; c2024 [cited 2025 Sep 09]. Disponible en: https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/chemoprevention

49. Shankar M, Swetha M, Keerthana CK, Rayginia TP, Anto RJ. Cancer chemoprevention: A strategic approach using phytochemicals. Front Pharmacol [Internet]. 2021;12:809308. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.809308
50. Blanco Carcache PJ, Clinton SK, Kinghorn AD. Discovery of natural products for cancer prevention. Cancer J [Internet]. 2024;30(5):313–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1097/PPO.0000000000000745
51. Lepore Signorile M, Grossi V, Fasano C, Simone C. Colorectal cancer chemoprevention: A dream coming true? Int J Mol Sci [Internet]. 2023;24(8). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087597
52. Russo GL, Spagnuolo C, Russo M. Reassessing the role of phytochemicals in cancer chemoprevention. Biochem Pharmacol [Internet]. 2024;228(116165):116165. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116165
53. George BP, Chandran R, Abrahamse H. Role of phytochemicals in cancer chemoprevention: Insights. Antioxidants (Basel) [Internet]. 2021;10(9):1455. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/antiox10091455
54. He W-J, Lv C-H, Chen Z, Shi M, Zeng C-X, Hou D-X, et al. The regulatory effect of phytochemicals on chronic diseases by targeting Nrf2-ARE signaling pathway. Antioxidants (Basel) [Internet]. 2023;12(2):236. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/antiox12020236
55. Haque A, Brazeau D, Amin AR. Perspectives on natural compounds in chemoprevention and treatment of cancer: an update with new promising compounds. Eur J Cancer [Internet]. 2021;149:165–83. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2021.03.009
56. Mendoza J. Evaluación de la actividad antioxidante, analgésica y toxicidad aguda del extracto etanólico de la especie Tiquilia paronychiodes (Flor de Arena) [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Ica: Universidad Nacional San Luis de Gonzaga; 2020. Disponible en: https://repositorio.unica.edu.pe/items/bd62028a-3eae-4ea3-9cba-0f74ab73f445
57. Berłowski A, Zawada K, Wawer I, Paradowska K. Antioxidant properties of medicinal plants from Peru. Food Nutr Sci [Internet]. 2013 [cited 2025

Apr 5];4(8A):71–7. Disponible en: https://doi.org/10.4236/fns.2013.48A009

58. Ganoza-Yupanqui ML. Auto-hydrolysis of Tiquilia paronychioides (Phil.) A.T. Richardson and its relation to quercetin concentration. Med Plant Commun [Internet]. 2021 [cited 2024 Sep 6];4(3–4):76–81. Disponible en: https://www.mpc.ms-editions.cl/index.php/mpc/article/view/60
59. Pareja IK, Zevallos LE. Efecto analgésico de Tiquilia paronychioides "Flor de Arena" [Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica]. Chimbote: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2020. Disponible en: https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/18883
60. Tacanga JM, Leal CA. Actividad antimicótica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de Tiquilia paronychioides (Flor de arena) sobre Candida albicans [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Chimbote: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2019. Disponible en: https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/11039
61. Trujillo MA, Leal CA. Efecto diurético del infuso de hojas de Tiquilia Paronychoides (flor de arena) en Rattus rattus var. Albinus [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Chimbote: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2018. Disponible en: https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/5862
62. Abd Haghighi MJ, Azadbakht M, Habibi E, Vahedi L, Hosseinimehr SJ. Phytochemical profile, antioxidant, and wound healing activities of Echium amoenum (Boraginaceae). Nat Prod Res [Internet]. 2024;1–7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2024.2384079
63. Aïssaoui H, Mencherini T, Esposito T, De Tommasi N, Gazzerro P, Benayache S, et al. Heliotropium bacciferum Forssk. (Boraginaceae) extracts: chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effect in human cancer cell lines. Nat Prod Res [Internet]. 2018;33(12):1813–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1437433
64. Ozntamar-Pouloglou K-M, Cheilari A, Zengin G, Graikou K, Ganos C, Karikas G-A, et al. Heliotropium procubens Mill: Taxonomic significance and characterization of phenolic compounds via UHPLC-HRMS- *in vitro*

antioxidant and enzyme inhibitory activities. Molecules [Internet]. 2023;28(3). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031008

65. Marrelli M, Amodeo V, Puntillo D, Statti G, Conforti F. *In vitro* antioxidant and anti-denaturation effects of Buglossoides purpurocaerulea (L.) I. M. Johnst. fruit extract. Natural Product Research [Internet]. 2023;37(6):1012–5. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2022.2096607
66. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. J Agric Food Chem [Internet]. 2016;64(5):997–1027. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739
67. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem [Internet]. 2005;53(6):1841–56. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1021/jf030723c
68. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J [Internet]. 2013;21(2):143–52. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002
69. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. J Agric Food Chem [Internet]. 2009;57(5):1768–74. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1021/jf803011r
70. Flores-Chávez B, Hernández-León S, Guzmán-Elizalde AL, Espitia-López J, Garza-López PM. Methods for determination of antioxidant capacity of traditional and emergent crops of interest in Mexico: An overview. Sci Agropecu [Internet]. 2024;15(4):593–615. Disponible en: http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2024.044
71. Jeong S, Jung J-H, Jung K-W, Ryu S, Lim S. From microbes to molecules: a review of microbial-driven antioxidant peptide generation. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2023;40(1):29. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s11274-023-03826-7

72. Suárez S. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del Allium sativum var. Huaralino (ajo) en modelos *in vitro* [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/2ffe8955-5f59-41f0-b19e-c870c74c8eee
73. Ulrich AB, Pour PM. Cell Lines A2 - Brenner, Sydney. In: Miller JH, editor. Encyclopedia of Genetics. New York: Academic Press; 2001. p. 310-1.
74. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MRJ, Speirs V. Breast cancer cell lines: friend or foe? Breast Cancer Research. 2003;5(2):89.
75. Acker A. How cells became records: Standardization and infrastructure in tissue culture. Archival Science. 2015;15(1):1-24.
76. Leibiger C, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Glei M, Trifonov V, Liehr T. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. J Histochem Cytochem [Internet]. 2013;61(4):306–12. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1369/0022155413476868
77. Ballestreri É, Simon D, de Souza AP, Grott CS, Nabinger DD, Dihl RR, et al. Resistance mechanism to cisplatin in NCI-H460 non-small cell lung cancer cell line: investigating apoptosis, autophagy, and cytogenetic damage. Cancer Drug Resistance [Internet]. 2018;1(1):72–81. Disponible en: http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2017.02
78. Saranyutanon S, Deshmukh SK, Dasgupta S, Pai S, Singh S, Singh AP. Cellular and molecular progression of prostate cancer: Models for basic and preclinical research. Cancers (Basel) [Internet]. 2020;12(9):2651. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092651
79. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res [Internet]. 2011;13(4):215. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/bcr2889
80. Korch C, Hall EM, Dirks WG, Ewing M, Faries M, Varella-Garcia M, et al. Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line: M14 and MDA-MB-435 cell lines. Int J Cancer [Internet]. 2018;142(3):561–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31067

81. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I. HT29 cell line. In: The Impact of Food Bioactives on Health. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 113–24.
82. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nat Protoc [Internet]. 2006;1(3):1112–6. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179
83. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem [Internet]. 2012;114(8):785–96. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006
84. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. Methods Mol Biol [Internet]. 1998;79:179–83. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-448-8:179
85. Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. Bio Protoc [Internet]. 2016;6(21). Disponible en: http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.1984
86. Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H. Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. En: Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Elsevier; 2017. p. 271–97.
87. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol [Internet]. 2001;Appendix 3(1):Appendix 3B. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21
88. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. Int J Exp Pathol [Internet]. 2009;90(4):367–86. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00656.x
89. Clawson GA. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pathol Immunopathol Res [Internet]. 1989;8(2):104–12. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1159/000157141
90. George J, Tsuchishima M, Tsutsumi M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. Cell Death Dis [Internet]. 2019;10(1):18. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-1272-8

91. Fahrer J, Christmann M. DNA alkylation damage by nitrosamines and relevant DNA repair pathways. Int J Mol Sci [Internet]. 2023;24(5):4684. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms24054684
92. Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. Int J Mol Sci [Internet]. 2015;16(11):26087–124. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms161125942
93. Karagozian R, Derdák Z, Baffy G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. Metabolism [Internet]. 2014;63(5):607–17. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.01.011
94. Yang YM, Kim SY, Seki E. Inflammation and liver cancer: Molecular mechanisms and therapeutic targets. Semin Liver Dis [Internet]. 2019;39(1):26–42. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1676806
95. Pathomjaruwat T, Matchim Y, Armer JM. Symptoms and symptom clusters in patients with hepatocellular carcinoma and commonly used instruments: An integrated review. Int J Nurs Sci [Internet]. 2024;11(1):66–75. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijnss.2023.09.009
96. Asafo-Agyei KO, Samant H. Hepatocellular carcinoma. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
97. Bittaye SO, Kambi A, Tekanyi MAI, Tamba S, Sanneh L, Sisawo MM, et al. Clinical manifestation, staging and prognosis of hepatocellular carcinoma in Gambian patients. BMC Gastroenterol [Internet]. 2023;23(1):321. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12876-023-02952-8
98. Ren T, Hou X, Zhang X, Chen D, Li J, Zhu Y, et al. Validation of combined AFP, AFP-L3, and PIVKA II for diagnosis and monitoring of hepatocellular carcinoma in Chinese patients. Heliyon [Internet]. 2023;9(11):e21906. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21906
99. Luo L, Wang X, Peng X, Zhong R, Xuan X, Lin H, et al. Analysis of the optimal patterns of serum alpha fetoprotein (AFP), AFP-L3% and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) detection in the diagnosis of liver cancers. PeerJ [Internet]. 2025;13(e19712):e19712. Disponible en: http://dx.doi.org/10.7717/peerj.19712

100. Rui H, Yueqin N, Wei W, Bangtao L, Li X. Combining AFP, PIVKA-II, and GP73 has diagnostic utility for hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma and is consistent with liver pathology results. Sci Rep [Internet]. 2025;15(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-025-92067-9

101. Choi JH, Thung SN. Advances in histological and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Biomedicines [Internet]. 2023;11(9):2582. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11092582

102. Li X, Yao Q, Liu C, Wang J, Zhang H, Li S, et al. Macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma: What should we know? J Hepatocell Carcinoma [Internet]. 2022;9:379–87. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2147/JHC.S364742

103. Torbenson MS. Morphologic subtypes of hepatocellular carcinoma. Gastroenterol Clin North Am [Internet]. 2017;46(2):365–91. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2017.01.009

104. Shin SH, Park JY, Hwang C, Lee HJ, Shin DH, Kim JY, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma: Their clinical and prognostic significance. Ann Diagn Pathol [Internet]. 2023;64(152134):152134. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2023.152134

105. Ding Z, Wang L, Sun J, Zheng L, Tang Y, Tang H. Hepatocellular carcinoma: pathogenesis, molecular mechanisms, and treatment advances. Front Oncol [Internet]. 2025;15:1526206. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2025.1526206

106. Castillo Olvera G, Zavala Cuevas D, Carrillo Inungaray ML. ANÁLISIS FITOQUÍMICO: UNA HERRAMIENTA PARA DEVELAR EL POTENCIAL BIOLÓCICO Y FARMACOLÓCICO DE LAS PLANTAS. Tlatemoani: Revista Académica de Investigación [Internet]. 2017 [cited 2025 May 2];8(24):71–86. Disponible en: https://ideas.repec.org/a/erv/tlatem/y2017i248.htmL

107. Patil BS, Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Vikram A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. J Agric Food Chem [Internet]. 2009;57(18):8142–60. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1021/jf9000132

108. Victoria TL. Polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante, anticolagenasa, y antielastasa *in vitro* del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de Krapfia weberbaueri (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022, 120 p. [cited 2025 May 3]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/14c68cfe-01d2-4367-88c8-a09571eb5ddf

109. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? Plant Physiol Biochem. 1 de noviembre de 2019;144:135-43. [cited 2025 May 3]. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.09.039.

110. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. Nat Rev Dis Primers [Internet]. 2021;7(1):6. [cited 2025 May 3]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3

111. IARC. Who.int. [Internet]. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1–138; 21 March 2025 [cited 2025 May 3]. Disponible en: https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/

112. Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer [Internet]. 2003;3(10):768–80. [cited 2025 May 3]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrc1189

113. Reig M, Forner A, Ávila MA, Ayuso C, Mínguez B, Varela M, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. Med Clin (Barc) [Internet]. 2021;156(9):463.e1-463.e30. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2020.09.022

114. Liu Y, Zheng D, Su L, Wang Q, Li Y. Protective effect of polysaccharide from Agaricus bisporus in Tibet area of China against tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Int J Biol Macromol [Internet]. 2018;118(Pt B):1488–93. [cited 2025 May 3]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.179

115. Naeem A, Hu P, Yang M, Zhang J, Liu Y, Zhu W, Zheng Q. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives.

Int J Mol [Internet]. 2022, 27(23), 8367 [cited 2025 May 3]. Disponible en: https://www.mdpi.com/1420-3049/27/23/8367#:~:text=The%20review%20provides%20a%20comprehensive,in%20importance%20throughout%20the%20world.

116. Radha Abbas Hasoon M, Jawad Kadhim N. Improvement of the selectivity index (SI) and cytotoxicity activity of Doxorubicin drug by Panax ginseng plant extract. Arch Razi Inst [Internet]. 2021 Summer;76(3):659–66. [cited 2025 May 3]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.22092/ari.2021.355413.1681

117. Ugwu DI, Conradie J. Anticancer properties of complexes derived from bidentate ligands. J Inorg Biochem [Internet]. 2023;246:112268. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112268

118. Rojas Valdivia J, Castro Luna AJ, Ramos Cevallos NJ, Ramos Perfecto D, Alcarraz Curi M, Cáceres Antaurco D. Polifenoles y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Petroselinum crispum* (mill) fuss y su aplicación en una crema dermocosmética. Rev Soc Quím Perú [Internet]. 2023 [cited 2024 Nov 15];89(1):49–67. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2023000100049&script=sci_arttext

119. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutricion Hospitalaria [Internet]. 2012 [cited 2024 Nov 15];27(1):76–89. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009

120. Aune D, Chan DSM, Vieira AR, Rosenblatt DAN, Vieira R, Greenwood DC, et al. Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2012;134(2):479–93. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s10549-012-2118-1

121. Muñoz Cendales DR, Cuca Suárez LE. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). Rev Colomb Cancerol [Internet]. 2016;20(3):124–34. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123901516300038

122. Tan S, Stathopoulos C, Parks S, Roach P. An optimised aqueous extract of phenolic compounds from bitter melon with high antioxidant capacity. Antioxidants (Basel) [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 28];3(4):814–29. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26785242/

123. Suárez S, Oré R, Arnao I, Rojas L, Trabucco J. Extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física. An Fac Med (Lima Peru : 1990) [Internet]. 2009 [cited 2024 Jan 29];70(3):181–5. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37912410005

124. Lock de Ugaz. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontifica Universidad Católica del Perú. 1994:114-33.

125. Kornpointner C, Scheibelreiter J, Halbwirth H. Snailase: A promising tool for the enzymatic hydrolysis of flavonoid glycosides from plant extracts. Front Plant Sci [Internet]. 2022;13:889184. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.889184

126. Quradha MM, Tamfu AN, Duru ME, Kucukaydin S, Iqbal M, Qahtan AMF, et al. Evaluation of HPLC profile, antioxidant, quorum sensing, biofilm, swarming motility, and enzyme inhibition activities of conventional and green extracts of Salvia triloba. Food Sci Nutr [Internet]. 2024;12(12):10716–33. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.4580

127. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. Food Chem [Internet]. 2002;76(4):519–25. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(01)00305-3

128. Singleton VL, Rossi JA, Jr J. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16(3):144-58.

129. Zhu H, Wang Y, Liu Y, Xia Y, Tang T. Analysis of flavonoids in Portulaca oleracea L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. Food Anal Methods. 2010;3(2):90-7. doi: 10.1007/s12161-009-9091-2.

130. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol. 2011;48(4):412-22. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.

131. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. J Funct Foods. 2015; 18:757-81. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047.

132. Benzie IF., Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «Antioxidant Power»: The FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(0292):706. doi: 10.1039/c6ay01739h.

133. National Research Council. Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. 8a ed. Washington (DC): National Academies Press; 2011. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=EA1QDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

134. Hernández F, de Morentin JM. Estudio histoquímico sobre la carcinogénesis experimental con dietilnitrosamina en hígado de rata. Rev Med Univ nava [Internet]. 1969 [cited 2024 Feb 16]; XIII (2):12. Disponible en: https://revistas.unav.edu/index.php/revista-de-medicina/article/view/6495

135. Hadem KLH, Sharan RN, Kma L. Inhibitory potential of methanolic extracts of Aristolochia tagala and Curcuma caesia on hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in BALB/c mice. J Carcinog 2014; 13:7.

136. Govindan S, Jayabal A, Shanmugam J, Ramani P. Antioxidant and hepatoprotective effects of Hypsizygus ulmarius polysaccharide on alcoholic liver injury in rats. Food Sci Hum Wellness [Internet]. 2021;10(4):523–35. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453021000628

137. Khan F, Khan TJ, Kalamegam G, Pushparaj PN, Chaudhary A, Abuzenadah A, et al. Anti-cancer effects of Ajwa dates (Phoenix dactylifera L.) in diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2017;17(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1926-6

138. Monks A, Scudiero DA, Johnson GS, Pauli KD, Sausville EA. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. Anticancer Drug Des 1997; 12(7): 533-41.

139. Monks A, Scudeiro D, Skehan P, Shoemaker R, Pauli K, Vistica D, et al. Feasibility of high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J Nat Cancer Inst 1991; 83(11): 757-66.

140. Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. Int J Biol Macromol [Internet]. 2023;233(123470):123470. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470

141. Liu Y, Chen Y, Zhang Y, Hou C, Li J. Black rice anthocyanin extract alleviates cognitive impairment by regulating the MAPK/NF-κB/Nrf2 pathways and modulates gut microbiota dysbacteriosis in D -galactose induced mice. Food Sci Hum Wellness [Internet]. 2026;15(6):9250550. Available from: http://dx.doi.org/10.26599/fshw.2025.9250550

142. Gokulakrishnan M, Kumar R, Pillai BR, Nanda S, Bhuyan SK, Kumari R, et al. Dietary brewer's spent yeast enhances growth, hematological parameters, and innate immune responses at reducing fishmeal concentration in the diet of climbing perch, Anabas testudineus fingerlings. Front Nutr [Internet]. 2022;9:982572. Available from: http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2022.982572

143. Bouyahya A, Omari NE, Bakrim S, Hachlafi NE, Balahbib A, Wilairatana P, et al. Advances in dietary phenolic compounds to improve chemosensitivity of anticancer drugs. Cancers (Basel) [Internet]. 2022;14(19):4573. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers14194573

144. Elekofehinti OO, Iwaloye O, Olawale F, Ariyo EO. Saponins in cancer treatment: Current progress and future prospects. Pathophysiology [Internet]. 2021;28(2):250–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pathophysiology28020017

145. de Luna FCF, Ferreira WAS, Casseb SMM, de Oliveira EHC. Anticancer potential of flavonoids: An overview with an emphasis on

tangeretin. Pharmaceuticals (Basel) [Internet]. 2023;16(9). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ph16091229

146. Chrzanowska E, Denisow B, Ekiert H, Pietrzyk Ł. Metabolites obtained from Boraginaceae plants as potential cosmetic ingredients-A review. Molecules [Internet]. 2024;29(21):5088. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules29215088

147. Erdoğan MK, Geçibesler İH, Behçet L. Chemical constituents, antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of a new endemic Boraginaceae species: Paracaryum bingoelianum. Results Chem [Internet]. 2020;2(100032):100032. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100032

148. Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids--genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. Drug Metab Rev [Internet]. 2004;36(1):1–55. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1081/dmr-120028426

149. Roldán Zavaleta SCA. Compuestos bioactivos de Tiquilia paronychioides (Phil.) A.T. Richardson con actividad diurética en Rattus rattus [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2025.

150. Riedl H. Boraginaceae. Flora Malesiana - Series 1, Spermatophyta. 1997Jan;13(1):43–144.

151. Ganos C, Zengin G, Chinou I, Aligiannis N, Graikou K. Phytochemical Profiling and Biological Assessment of the Aerial Parts from Three Mediterranean Alkanna Species (A. orientalis, A. tinctoria, A. kotschyana) in the Boraginaceae Family. Plants [Internet]. 2024;13(2):278. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/plants13020278

152. Kareem AT, N. Hamad M. Separation and identification of phenolic acid from Borago officinalis (F:Boraginaceae) cultivated in Iraq. Iraqi J Pharm Sci [Internet]. 2020;29(2):139–51. Disponible en: http://dx.doi.org/10.31351/vol29iss2pp139-151

153. Ganos C, Aligiannis N, Chinou I, Naziris N, Chountoulesi M, Mroczek T, et al. Rindera graeca (Boraginaceae) Phytochemical Profile and Biological Activities. Molecules [Internet]. 2020;25(16):E3625. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules25163625

154. Asghari B, Mafakheri S, Zarrabi MM, Erdem SA, Orhan IE, Bahadori MB. Therapeutic target enzymes inhibitory potential, antioxidant activity, and rosmarinic acid content of Echium amoenum. S Afr J Bot [Internet]. 2019 Jan [cited 2025 Apr 5];120:191–7. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.05.017

155. Zemmouri H, Ammar S, Boumendjel A, Messarah M, El Feki A, Bouaziz M. Chemical composition and antioxidant activity of Borago officinalis L. leaf extract growing in Algeria. Arab J Chem [Internet]. 2019 Dec [cited 2025 Apr 8];12(8):1954–63. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.059

156. Kaczorová D, Karalija E, Dahija S, Bešta-Gajević R, Parić A, Ćavar Zeljković S. Influence of extraction solvent on the phenolic profile and bioactivity of two Achillea species. Molecules [Internet]. 2021 [cited 2025 Apr 8];26(6):1601. Disponible en: https://doi.org/10.3390/molecules26061601

157. Laib I, Barkat M. Optimization of conditions for extraction of polyphenols and the determination of the impact of cooking on total polyphenolic, antioxidant, and anticholinesterase activities of potato. Foods [Internet]. 2018 [cited 2025 Apr 8];7(3):36. Disponible en: https://doi.org/10.3390/foods7030036

158. Zavala-Urtecho ED, Tantaleán-Quezada ME, Suárez-Rebaza LA, Ganoza Yupanqui ML. First anti-inflammatory flavonoids identified in Tiquilia paronychioides (Phil.) (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”. In: Martínez Alfaro MA, editor. Proceedings of the X Latin American Congress of Medicinal Plants; 2022 Sep 7–11; Xalapa, Veracruz, Mexico. Disponible en: https://www.uv.mx/citro/files/2023/10/Libro-de-memorias-X-COLAPLAMED-F.pdf

159. Saldaña-Bobadilla V, Ramirez J-K, Perez-Chauca E, Minchan-Herrera P. Tiquilia paronychioides (Phil.) A.T. Richardson (Boraginaceae): An ethnobotanical, ethnopharmacological, and toxicological review. Ethnobot Res App [Internet]. 2020 Mar 11 [cited 2025 Apr 8];19:1–13. Disponible en: https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/1829

160. Platzer M, Kiese S, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Eisner P. How phenol structure influences results of the Folin–Ciocalteu assay. Antioxidants [Internet]. 2021 [cited 2025 Apr 8];10(5):811. Disponible en: https://doi.org/10.3390/antiox10050811

161. Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. Nat Prod Commun [Internet]. 2022 [cited 2025 Apr 8];17(1):1–13. Disponible en: https://doi.org/10.1177/1934578X211069721

162. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Świerczek-Zięba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. Molecules [Internet]. 2014 [cited 2025 Apr 8];19(1):78–101. Disponible en: https://doi.org/10.3390/molecules19010078

163. Escobar-Millán Z, García-Iglesias T, Gómez-Leyva J, Ramírez-Alvarado D, Figueroa-Martínez R, Torres-Bugarín O, et al. Hibiscus sabdariffa L. extract: antioxidant and therapeutic effects. Acta Cienc Salud [Internet]. 2018 [cited 2025 Apr 8];5:14–9. Disponible en: https://doi.org/10.32870/acs.v0i5.52

164. Ch GT, C JA. Estudio fitoquímico de Tiquilia paronychioides (Phil.) A. Richardson “flor de arena” [Internet]. Rev Peru Quím Ing Quím. 2002 [citado 2025 abr 13];5(1):43–6. Disponible en: https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4344

165. Nabipor F, Rahiminejad MR, Ghassemi Dehkordi N, Pirbalouti AG. Determination of secondary metabolites and antioxidant activity of some Boraginaceae species growing in Iran. Res J Pharmacogn. 2015;2(4):15–21.

166. Dousti B, Nabipor F. Evaluation of the phenolic contents and antibacterial activity of different concentrations of Onosma chlorotricum Boiss. BioTechnologia [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2025 Apr 13];102(4):377–86. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9642932/

167. Mašković P, Maksimović J, Maksimović V, Blagojević J, Vujošević M, Manojlović N, et al. Biological activities of phenolic compounds and

ethanolic extract of Halacsya sendtneri (Boiss) Dőrfler. Open Life Sci [Internet]. 2012 Feb 10 [cited 2025 Apr 13];7(2):327–33. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.2478/s11535-012-0021-8

168. Huamán O, Sandoval M, Béjar E, Huamán Z, Tarazona V. Efecto del extracto acuoso de hojas de Tiquilia paronychioides (flor de arena) sobre la hiperplasia benigna de próstata inducida por enantato de testosterona en ratas. An Fac Med (Lima). 2013;74(1):19–29.

169. Dias MC, Silva DI. Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity [Internet]. Molecules. 2021 [citado 2025 abr 13];26(17):5377. Disponible en: https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5377

170. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Anal Methods. 2014;7(9):1776–82.

171. İlhami Gulcin, Alwasel SH. DPPH Radical Scavenging Assay. Processes [Internet]. 2023 Jul 26 [cited 2025 Apr 12];11(8):2248–8. Disponible en: https://www.mdpi.com/2227-9717/11/8/2248

172. Bhosale P, Ha SY, Kim HJ, Kim SH, Kim GS. Functions of polyphenols and its anticancer properties in biomedical research: a narrative review. Transl Cancer Res. 2020 Dec;9(12):7619–31. doi:10.21037/tcr-20-2359.

173. Khan MK, Larysa Paniwnyk, Hassan S. Polyphenols as Natural Antioxidants: Sources, Extraction and Applications in Food, Cosmetics and Drugs. Green chemistry and sustainable technology [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Apr 12];197–235. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-3810-6_8

174. Małgorzata Muzolf-Panek, Kinga Stuper-Szablewska. Comprehensive study on the antioxidant capacity and phenolic profiles of black seed and other spices and herbs: effect of solvent and time of extraction. Journal of Food Measurement & Characterization [Internet]. 2021 Jun 26 [cited 2025 Apr 12];15(5):4561–74. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-021-01028-z

175. Dong JW, Cai L, Xing Y, Yu J, Ding ZT. Re-evaluation of ABTS•+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products. 671 Natural Product Communications. 2015 Dec;10(12):1934578X1501001.

176. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et biophysica acta*, *1721*(1-3), 174–184. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001

177. Asgharian P, Tazekand AP, Hosseini K, et al. Potential mechanisms of quercetin in cancer prevention: focus on cellular and molecular targets. Cancer Cell Int [Internet]. 2022 [cited 2025 Apr 8];22:257. Disponible en: https://doi.org/10.1186/s12935-022-02677-w

178. Qattan MY, Khan MI, Alharbi SH, Verma AK, Al-Saeed FA, Abduallah AM, Al Areefy AA. Therapeutic importance of kaempferol in the treatment of cancer by modulating cell signaling pathways. Molecules [Internet]. 2022 [cited 2025 Apr 8];27(24):8864. Disponible en: https://doi.org/10.3390/molecules27248864

179. del Barrio Alonso G del C, Morier Díaz LF, Marrero RJ. Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* del extracto acuoso de Phyllanthus comosus. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2021 [cited 2025 Jul 7];73(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602021000300003

180. Aranda-Ventura J, Villacrés-Vallejo J, Núñez-Tuesta L, Marín-Sisley P, Nonato-Ramírez L, González-Aspajo G. Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de Artemia salina. Rev Peru Med Integr [Internet]. 2019;3(3):132–7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2018.33.93

181. Contreras CM, Soto JCR, Ruiz JRR. Citotoxicidad y genotoxicidad de plantas dispensadas en las Farmacias de Medicina Complementaria en Perú. Med Natur [Internet]. 2022 [cited 2026 Sept 22];16(2):32–7. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8491413

182. Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, et al. Flavonoids in cancer and apoptosis. Cancers (Basel) [Internet]. 2018;11(1):E28. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers11010028

183. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. Pharmacol Ther [Internet]. 1990;48(3):381–95. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(90)90056-8

184. Venkateswararao R, Arul B, Kothai R. Chemopreventive effects of Costus comosus Linn against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. J Herbmed Pharmacol [Internet]. 2022;11(3):375–82. Disponible en: http://dx.doi.org/10.34172/jhp.2022.43

185. Shahin YR, Elguindy NM, Abdel Bary A, Balbaa M. The protective mechanism of Nigella sativa against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma through its antioxidant effect and EGFR/ERK1/2 signaling. Environ Toxicol [Internet]. 2018;33(8):885–98. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/tox.22574

186. Yakubu OF, Metibemu DS, Adelani IB, Adesina GO, Edokwe CB, Oseha OE, et al. Annona senegalensis extract demonstrates anticancer properties in N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in male Wistar rats. Biomed Pharmacother [Internet]. 2020;131(110786):110786. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110786

187. Anwar HM, Moghazy AM, Osman AAE, Abdel Rahman AAS. The therapeutic effect of Myrrh (Commiphora molmol) and doxorubicin on Diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in male albino rats. Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2021;22(7):2153–63. Disponible en: http://dx.doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.7.2153

188. Sherif AA, Abdelhalim SZ, Salim EI. Immunohistochemical and biochemical alterations following administration of proanthocyanidin extract in rats hepatocellular carcinoma. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017;93:1310–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.039

189. Abouzed TK, Eldomany EB, Khatab SA, Aldhahrani A, Gouda WM, Elgazzar AM, et al. The modulatory effect of bee honey against diethyl

nitrosamine and carbon tetrachloride instigated hepatocellular carcinoma in Wistar rats. Toxicol Res (Camb) [Internet]. 2021;10(6):1092–103. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/toxres/tfab094

190. Ghamry HI. Impending chemotherapeutic impact of Arthrospira platensis nanoparticles and/or sorafenib against hepatocellular carcinoma through modulation of antioxidant status, tumor marker genes, and anti-inflammatory signaling pathways. Toxics [Internet]. 2023;11(2):107. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/toxics11020107

191. Li S, Li Y, Sun H, Jiang Y, Pan K, Su Y, et al. Mulberry fruit polysaccharides alleviate diethylnitrosamine/phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis *in vivo*: the roles of cell apoptosis and inflammation. Bioengineered [Internet]. 2021;12(2):11599–611. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2021.1993716

192. Feng H, Zheng S, Yang J, Mao X, Liu T, Zhang Q, et al. Exploring the anti-cancer properties of nasturtium officinale L. via the HOTAIR/miR-124/Notch1 pathway in rat hepatocellular carcinoma: An investigation using biochemical, molecular, immunohistochemical, and histopathological methods. Int J Morphol [Internet]. 2024;42(5):1361–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4067/s0717-95022024000501361

193. Fu Z, Jiang L. Chebulinic acid ameliorates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats by inhibiting AKT/mTOR activation and inhibits liver cancer cell (HepG2) proliferation. Rev Bras Farmacogn [Internet]. 2024;35(1):101–13. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s43450-024-00590-z

194. Sivakumar G, Devi SA. Evaluation of Chemo-Preventive Effect of Methanolic Fruit Extract of Cucumis melo var. agrestis on DEN-Induced HCC in Sprague Dawley Rats. Ind J Pharm Educ [Internet]. 2023 [cited 2026 Sept 22];57(2s):s360–9. Disponible en: https://www.ijper.org/article/57/2s/s360

195. Biswas AUH, Kamal T, Akter A, Akter S, Bhuiyan AR, Moni ZA, et al. Antioxidant and hepatotoxicity ameliorative potential of Mentha canadensis leaves against paracetamol-induced hepatic damage in mice. Food Sci Nutr [Internet]. 2025;13(12):e71279. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.71279

196. Ahmed KAA, Shareef SH, Nanakaly HT, Ali MA, Fisal DN, Aziz PY, et al. Mangiferin: a novel hepatoprotective for liver cirrhosis via modulation of histological, cellular, biochemical, inflammatory markers and oxidative stress. BMC Pharmacol Toxicol [Internet]. 2025;27(1):26. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s40360-025-01061-4

197. Ahmed RF, Elgamal AM, El-Nashar HAS, Mowaad NA, Elgohary R, El-Saied MA, et al. Phenolic-rich extracts of Teucrium oliverianum confer protection against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: Insights from metabolomics, biochemical and histopathological analysis. PLoS One [Internet]. 2025;20(9):e0330595. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0330595

198. Gür FM, Bilgiç S. Silymarin, an antioxidant flavonoid, protects the liver from the toxicity of the anticancer drug paclitaxel. Tissue Cell [Internet]. 2023;83(102158):102158. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2023.102158

199. Shaalan AAM, Elmorsy EM, Embaby EM, Alfawaz M, Aly NM, Shams AS, et al. Antitumor, antioxidant, and hepatoprotective effects of grape seed oil nanoemulsion as a dietary phytochemical intervention in Ehrlich solid tumors. Nutrients [Internet]. 2025;17(21):3450. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/nu17213450

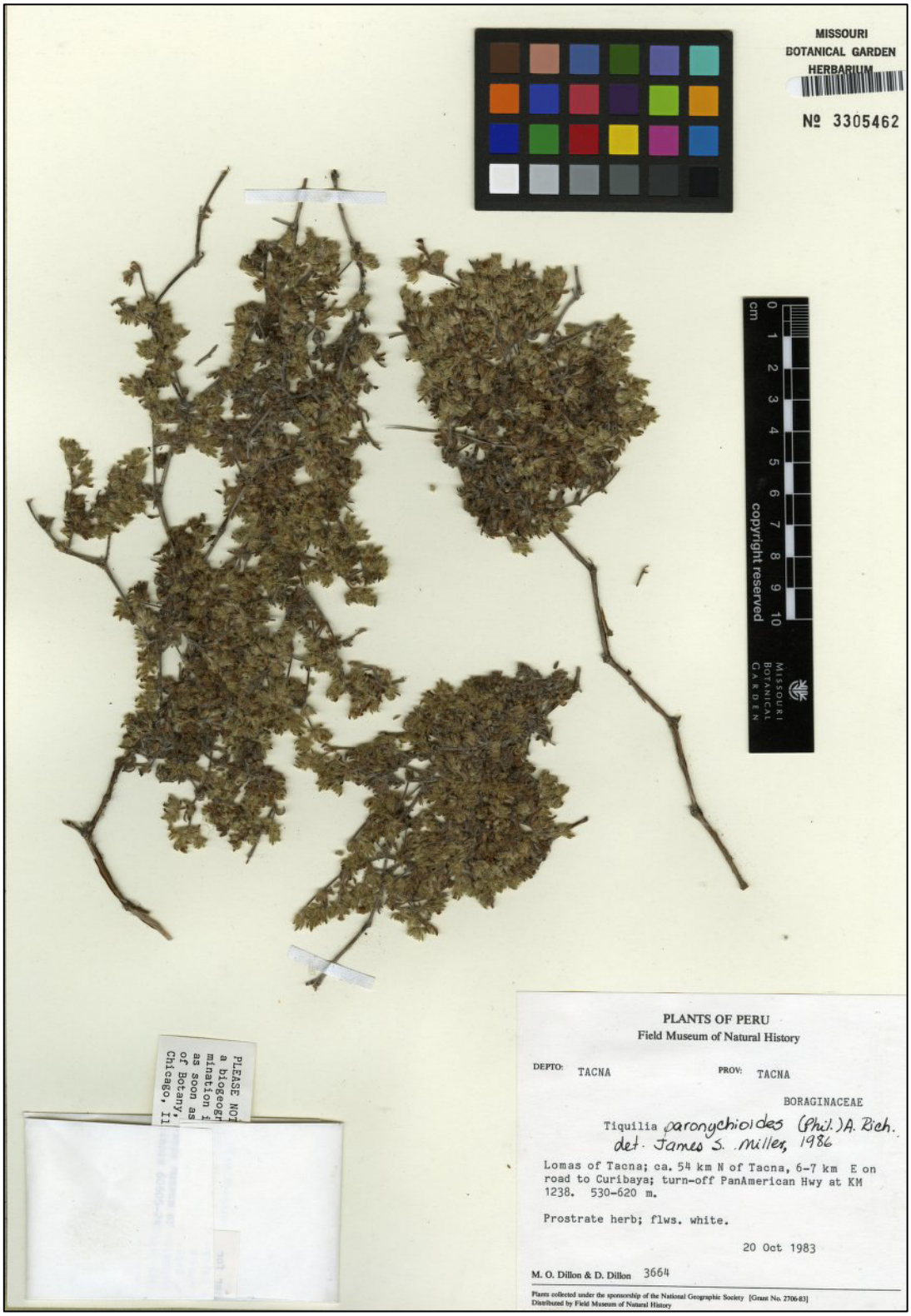
200. Dinleyici G, Kurtoglu F, Suvarikli Alan B, Vanli S, Akcakavak G, Ozdemir O. Evaluation of the effects of Theranekron and Sorafenib treatments on alpha-fetoprotein, heat shock protein 90 alpha and indoleamine 2,3 dioxygenase 1 enzyme levels in experimental hepatocellular carcinoma in rats. Mol Biol Rep [Internet]. 2025;53(1):14. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s11033-025-11112-y

201. Loguercio C, Festi D. Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. World J Gastroenterol [Internet]. 2011;17(18):2288–301. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v17.i18.2288

202. Xie Y, Zhang D, Zhang J, Yuan J. Metabolism, transport and drug-drug interactions of silymarin. Molecules [Internet]. 2019;24(20):E3693. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules24203693

X. ANEXOS

Anexo 1. Herborizado de la especie vegetal *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena” (8).



Anexo 2. Fotografía de la recolecta de la *Tiquilia paronychioides* “flor de arena” en estado silvestre.



Anexo 3. Certificado de Clasificación taxonómica de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Museo de Historia Natural UNMSM

“Año de la Recuperación y Consolidación de la Economía Peruana”

CONSTANCIA N° 050-USM-MHN-2025

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fértil) recibida de **Felix Eduardo Castillo Morales,** estudiante de pregrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha sido estudiada y clasificada como: *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Boraginales Juss. ex Bercht. & J. Presl

FAMILIA : Boraginaceae Juss.

GÉNERO : *Tiquilia* Pers.

ESPECIE : *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson

Nombre vulgar: “Flor de arena”

Procedencia: Ocucaje, Ica

Determinado por: Bach. Julio Torres.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 02 de abril de 2025

MUSEO DE HISTORIA NATURAL - USM - JEFE Herbario San Marcos

Dra. Joaquina Albán Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María, Lima, Perú
Código postal Lima 15072
Celular: +51 932 040 566
Lunes a Viernes 8:00 - 15:45
e-mail: herbariousm@unmsm.edu.pe
https://museohn.unmsm.edu.pe/herbario.html

Anexo 4. Hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson "flor de arena" secas y molidas.



Anexo 5. Extracto hidroalcóholico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”.



Anexo 6. Certificado de aprobación del Comité de ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Oficio Virtual N° 011-FFB-UDI-2025

Lima, 20 de julio del 2025

Señor
Felix Eduardo Castillo Morales
Presente.-

Ref.: Correo c/f 27/04/2025

Asunto: EL QUE SE INDICA

Por medio de la presente le saludo muy cordialmente y en atención a la referencia, le informo que el Proyecto de investigación titulado: **"Compuestos bioactivos de Tiquilia paronychioides A.T. Richardson "flor de arena" como agentes quimiopreventivos sobre carcinoma hepatocelular in vivo y actividad antitumoral in vitro en células tumorales",** ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de nuestra Facultad; el cual se encuentra certificado con el registro **Nro. 0011-CE-UDI-FFB-2025.**

Sin otro en particular, hago propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración y estima.

Atentamente,

UNMSM Firmado digitalmente por SOLIS CALERO Christian FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.08.2025 17:22:47 -05:00

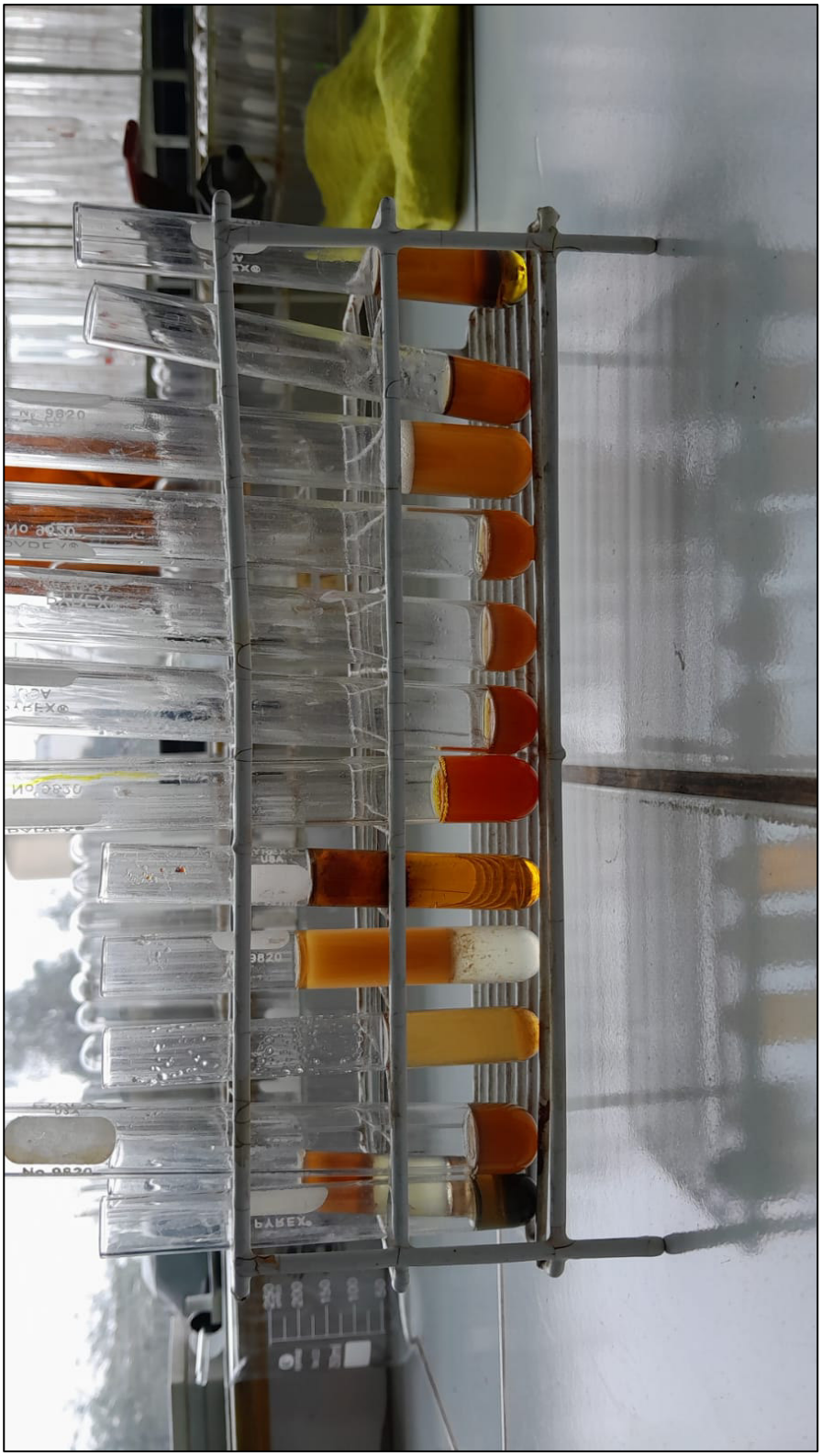
DR. CHRISTIAN SOLIS CALERO
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

CSC/dva

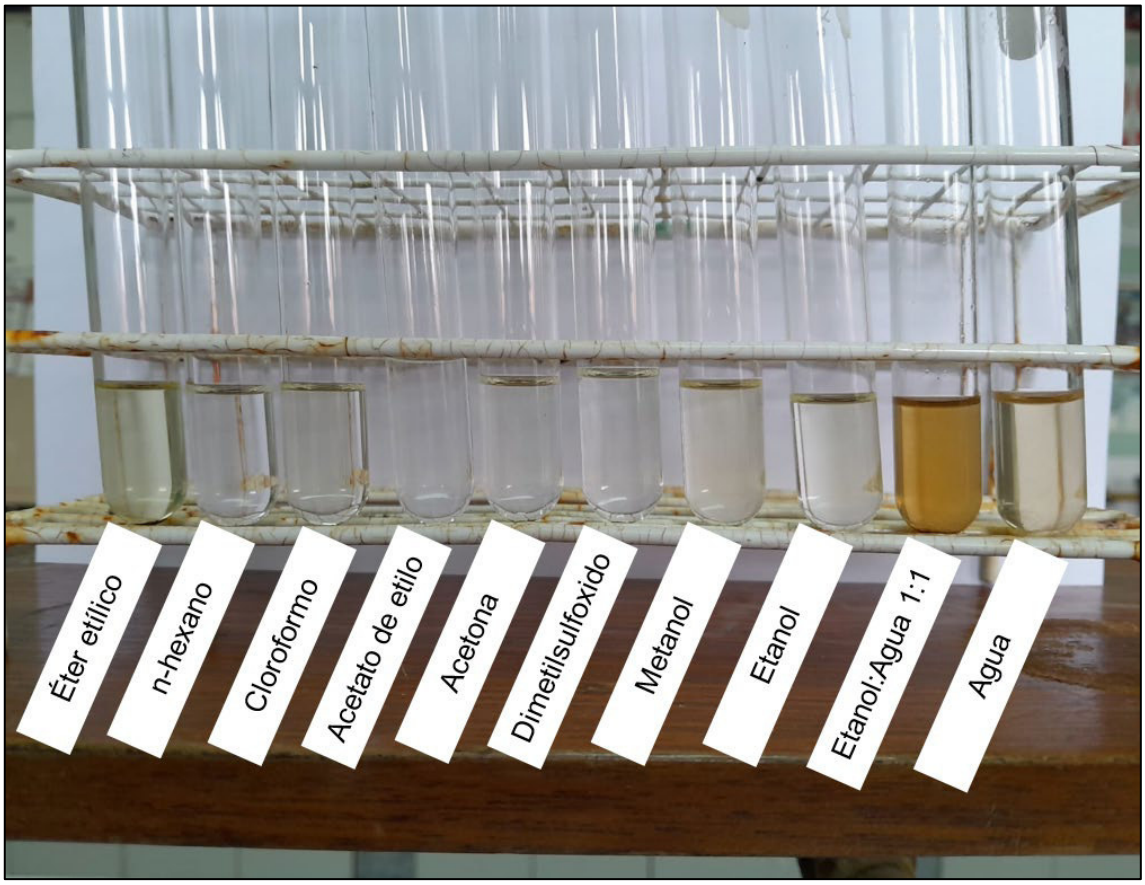
Anexo 7. Formato de Score histopatológico de Daño hepático.

Indicador histopatológico	Descripción	Escala				
		0	1	2	3	4
Degeneración hepatocelular	Cambios reversibles en hepatocitos (balonización celular, vacuolización citoplasmática y pérdida de la eosinofilia normal). Refleja alteraciones funcionales iniciales del parénquima hepático.	Normal	Degeneración leve focal	Degeneración leve multifocal	Degeneración moderada difusa	Degeneración severa difusa
Necrosis hepatocelular	Muerte irreversible de hepatocitos, evidenciada por picnosis, cariorrexis o cariolisis nuclear, así como pérdida de la integridad celular. Es indicativa de daño hepático severo y progresivo.	Ausente	Necrosis focal aislada	Necrosis multifocal	Necrosis extensa	Necrosis masiva/puentes
Inflamación	Presencia, intensidad y distribución del infiltrado inflamatorio, principalmente por células mononucleares, localizado en espacios porta y/o en el lobulillo hepático. Refleja la respuesta inflamatoria secundaria al daño.	Ausente	Infiltrado leve focal	Infiltrado leve multifocal	Infiltrado moderado difuso	Infiltrado severo difuso (Abundante con agregados)
Alteraciones arquitecturales	Grado de desorganización de la arquitectura hepática normal, incluyendo distorsión del patrón lobulillar. Este criterio indica daño crónico y progresión de la lesión.	Normal	Desorganización leve	Desorganización moderada	Distorsión lobulillar marcada (Pérdida parcial)	Pérdida severa de arquitectura (colapso, puentes, pseudonódulos)
Cambios preneoplásicos	Presencia de focos celulares alterados caracterizados por hepatocitos basófilos o eosinófilos, núcleos hipercromáticos, aumento de la relación núcleo/citoplasma y desorganización celular focal. Son indicadores tempranos de transformación neoplásica	Ausente	Células aisladas alteradas	Focos pequeños	Focos múltiples	Lesiones displásicas extensas

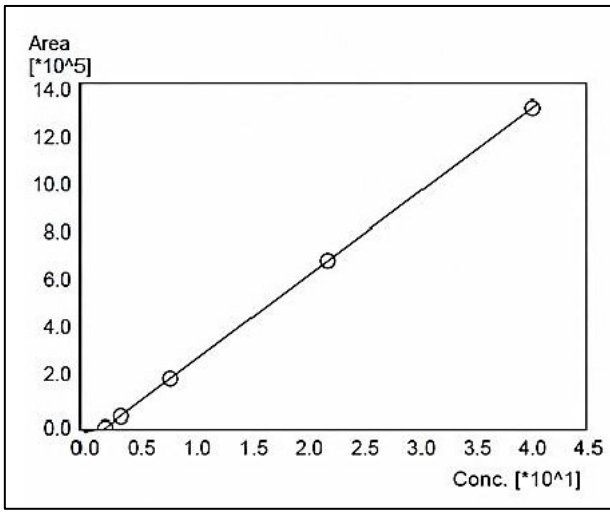
Anexo 8. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”



Anexo 9. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”.

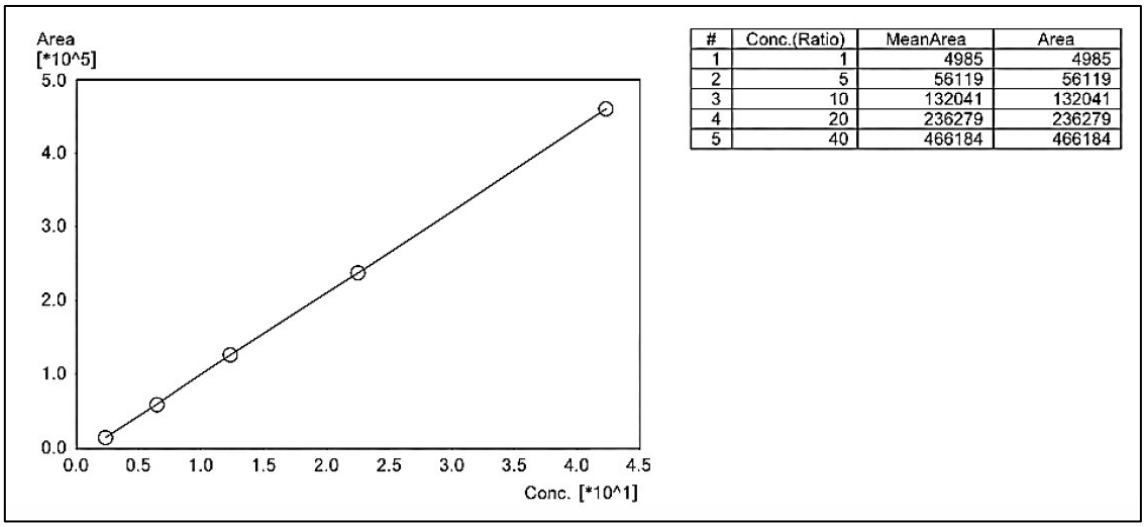


Anexo 10. Curva de calibración de Ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.



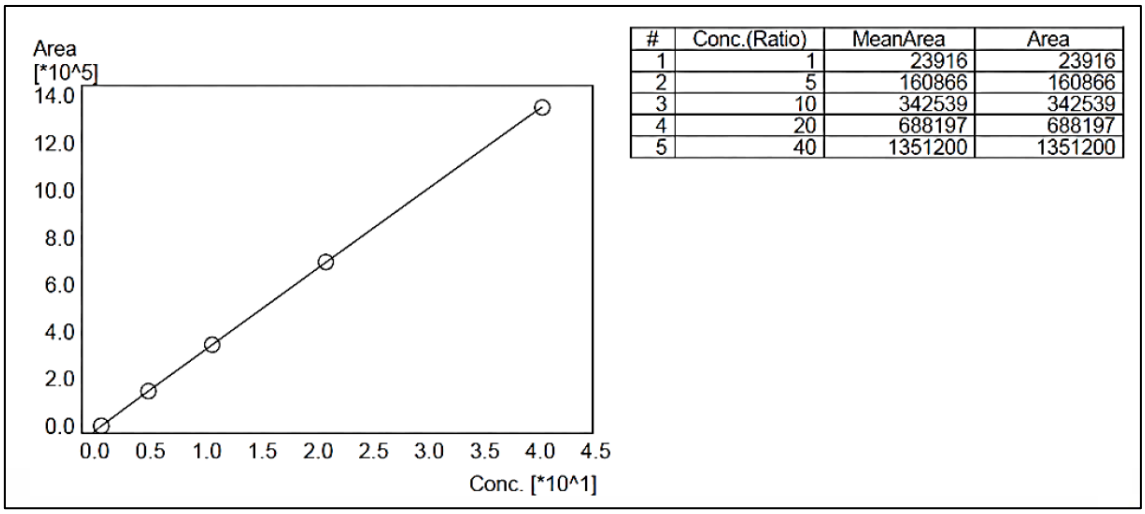
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	22550	22550
2	5	147877	147877
3	10	298229	298229
4	20	676276	676276
5	40	1324880	1324880

Anexo 11. Curva de calibración de Ácido clorogénico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.



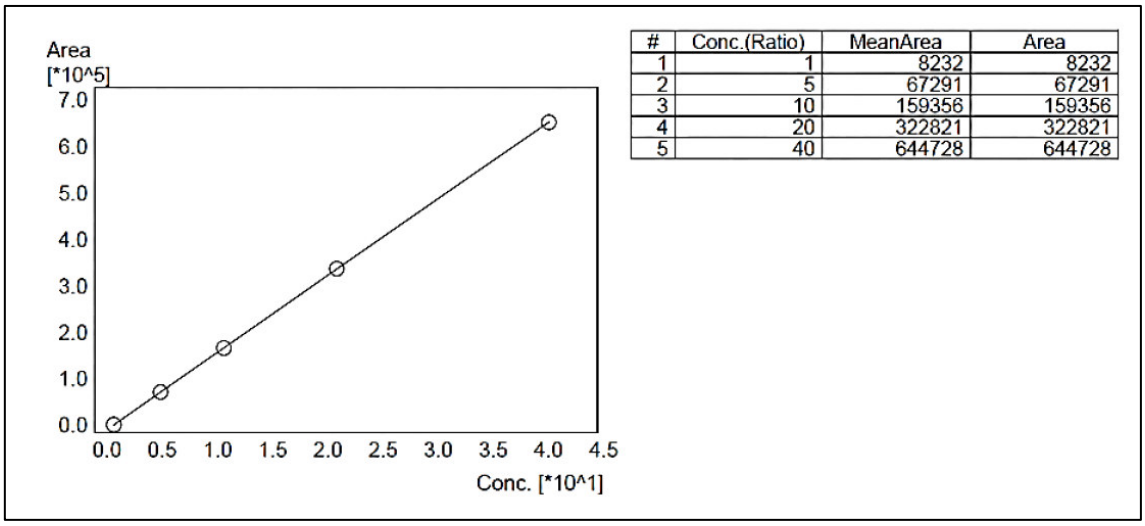
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	4985	4985
2	5	56119	56119
3	10	132041	132041
4	20	236279	236279
5	40	466184	466184

Anexo 12. Curva de calibración de Ácido cafeico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.



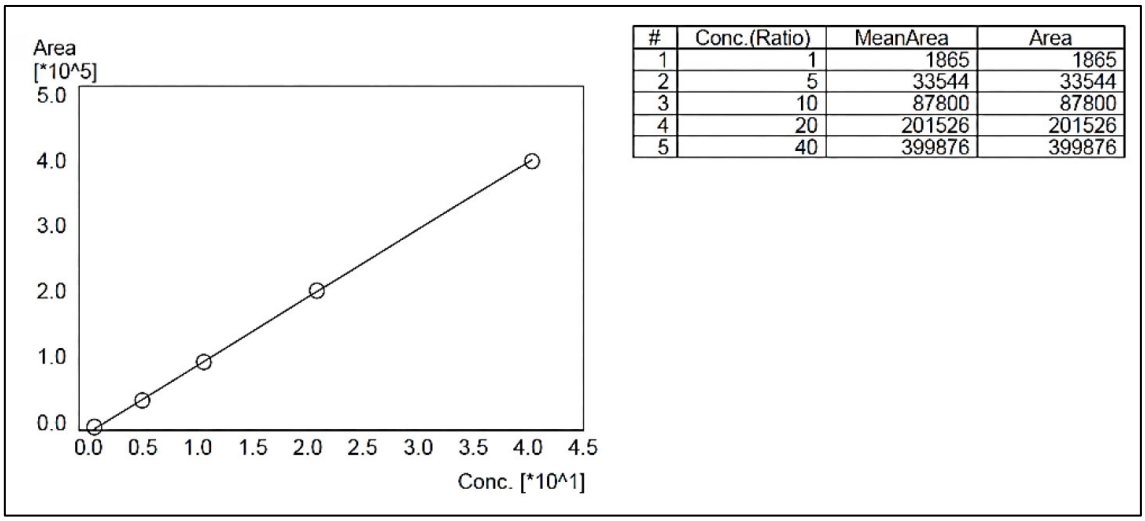
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	23916	23916
2	5	160866	160866
3	10	342539	342539
4	20	688197	688197
5	40	1351200	1351200

Anexo 13. Curva de calibración de Ácido rosmarínico para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.



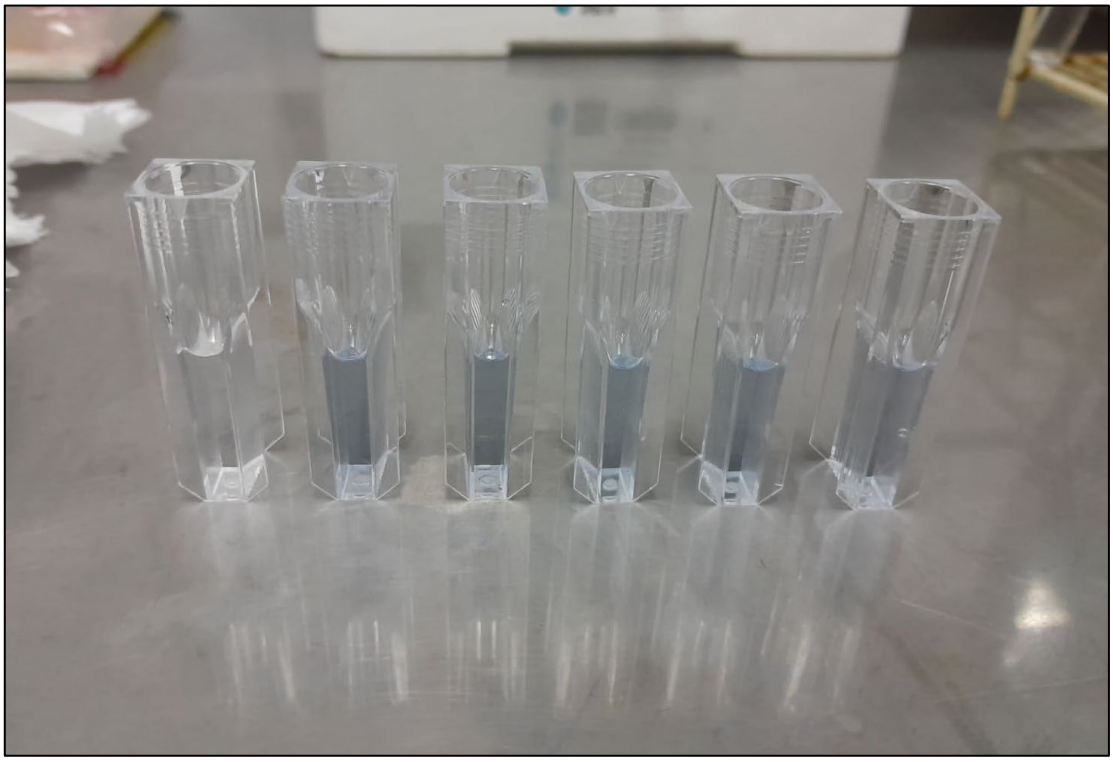
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	8232	8232
2	5	67291	67291
3	10	159356	159356
4	20	322821	322821
5	40	644728	644728

Anexo 14. Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	1865	1865
2	5	33544	33544
3	10	87800	87800
4	20	201526	201526
5	40	399876	399876

Anexo 15. Reacción colorimétrica para cuantificación de polifenoles del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

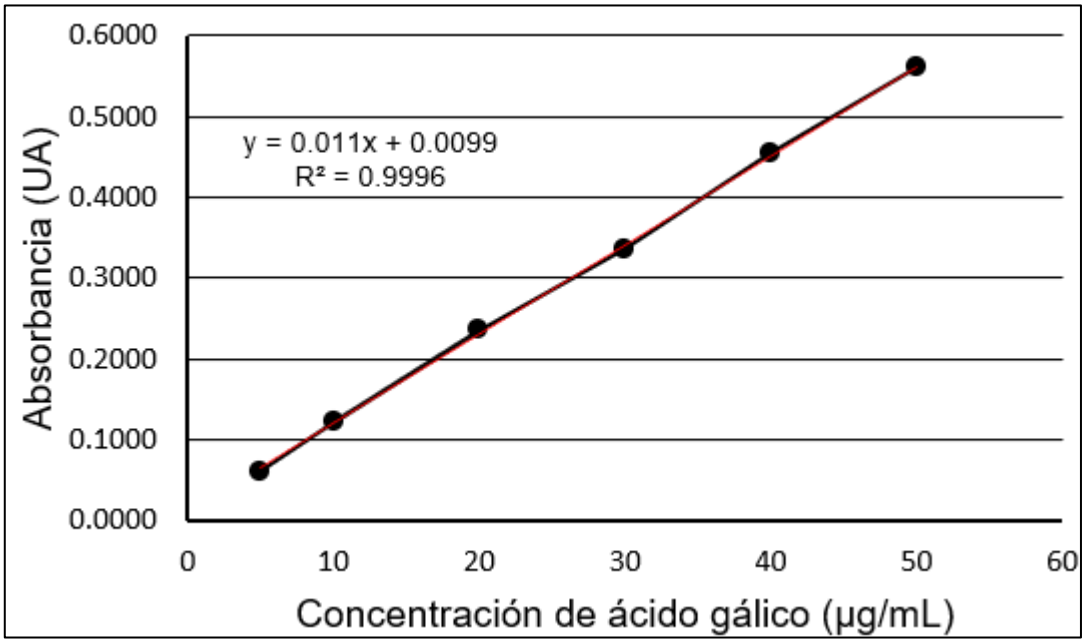


Anexo 16. Datos espectrofotométricos del estándar Ácido Gálico.

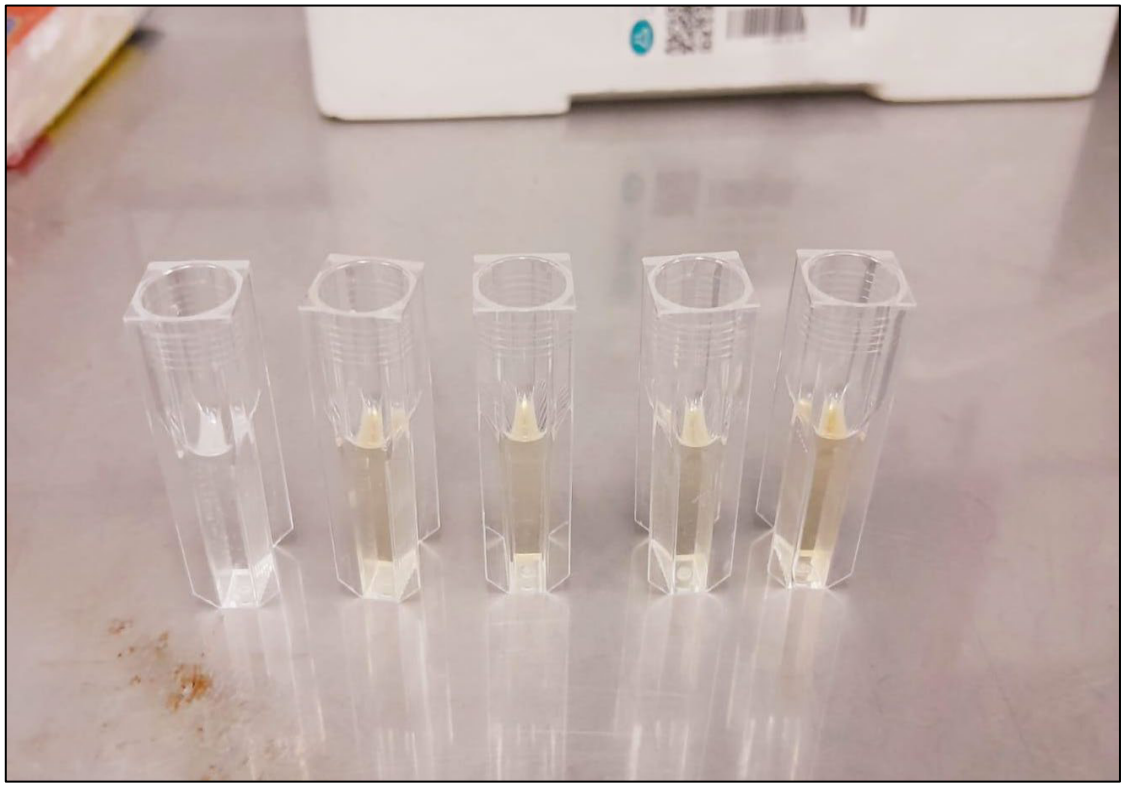
Tabla N° 22. Curva estándar del Ácido gálico para cuantificación de polifenoles.

Ácido gálico (µg/mL)	Promedio Absorbancia (UA)
5	0,0611
10	0,1223
20	0,2364
30	0,3371
40	0,4549
50	0,5604

Anexo 17. Gráfica de dispersión del Ácido gálico para cuantificación de polifenoles.



Anexo 18. Reacción colorimétrica para cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

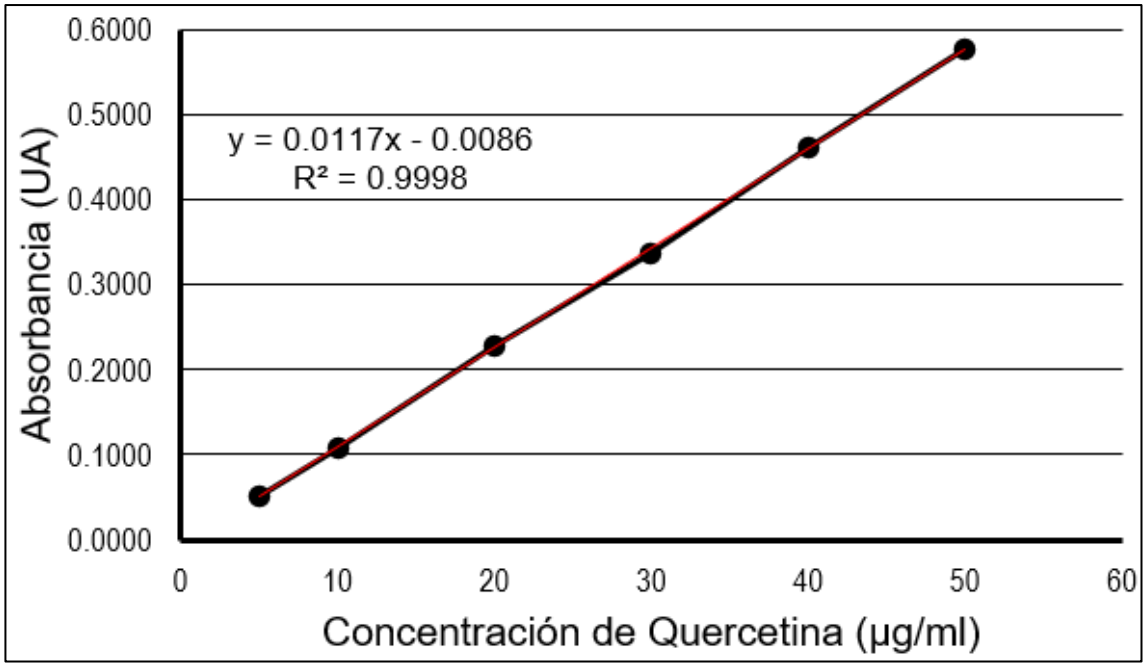


Anexo 19. Datos espectrofotométricos del estándar de Quercetina.

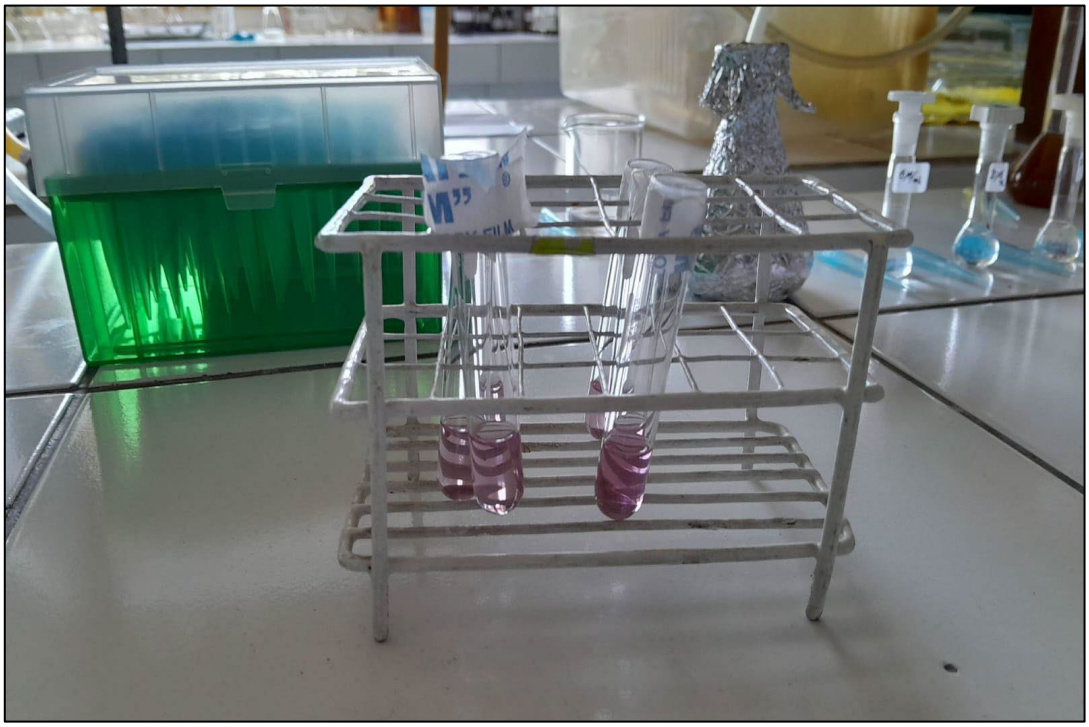
Tabla N° 23. Curva estándar de la Quercetina para cuantificación de flavonoides.

Quercetina (µg/mL)	Promedio Absorbancia (UA)
5	0,0509
10	0,1088
20	0,2273
30	0,3368
40	0,4616
50	0,5785

Anexo 20. Gráfica de dispersión de la Quercetina para cuantificación de flavonoides.



Anexo 21. Reacción colorimétrica para determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH• del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

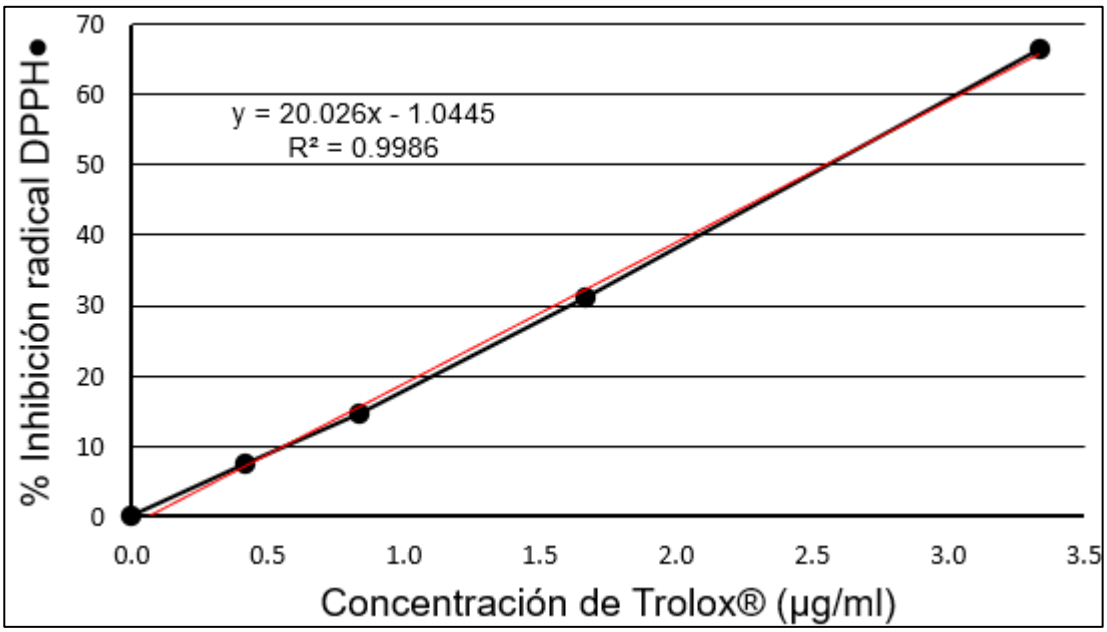


Anexo 22. Datos espectrofotométricos del estándar Trolox® para el método del radical libre DPPH•.

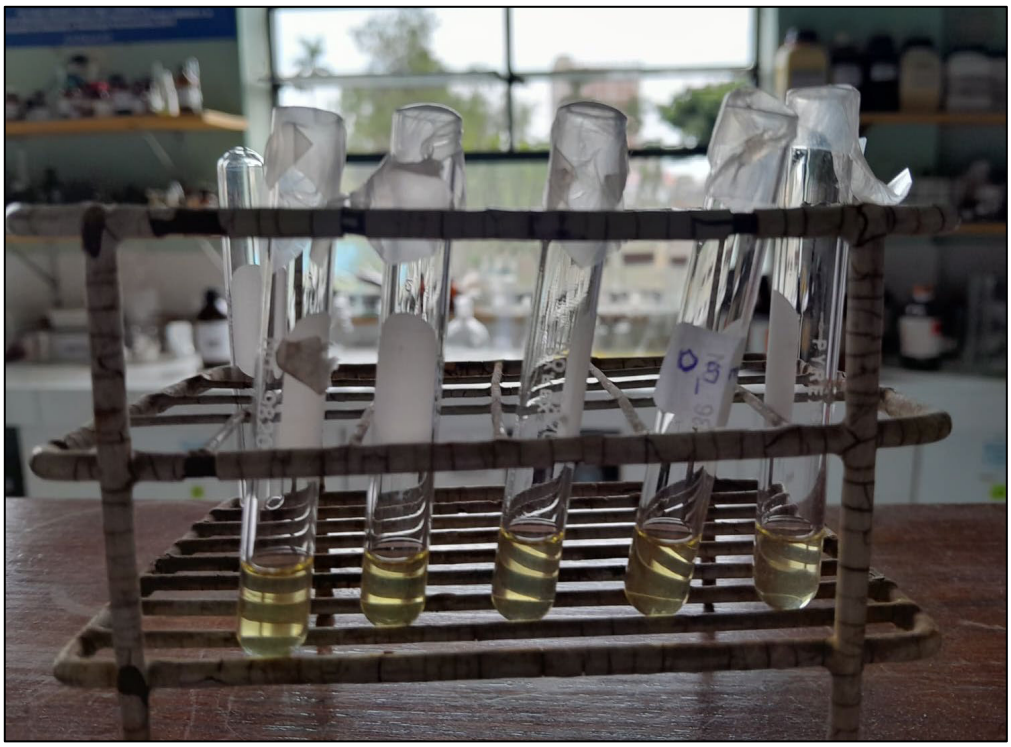
Tabla N° 24. Curva estándar del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH•.

Trolox® (µg/mL)	Promedio Abs. (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)	Inhibición (%)	CI_{50} (µg/mL)
0	0,4694	0,0020	0,43	0,00	
0,42	0,4338	0,0122	2,82	7,59	
0,83	0,4008	0,0079	1,98	14,61	2,55
1,67	0,3226	0,0054	1,68	31,28	
3,33	0,1575	0,0077	4,86	66,46	

Anexo 23. Gráfica de dispersión del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH•.



Anexo 24. Reacción colorimétrica para determinación de la actividad antioxidante por el método del catión radical ABTS•+ del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

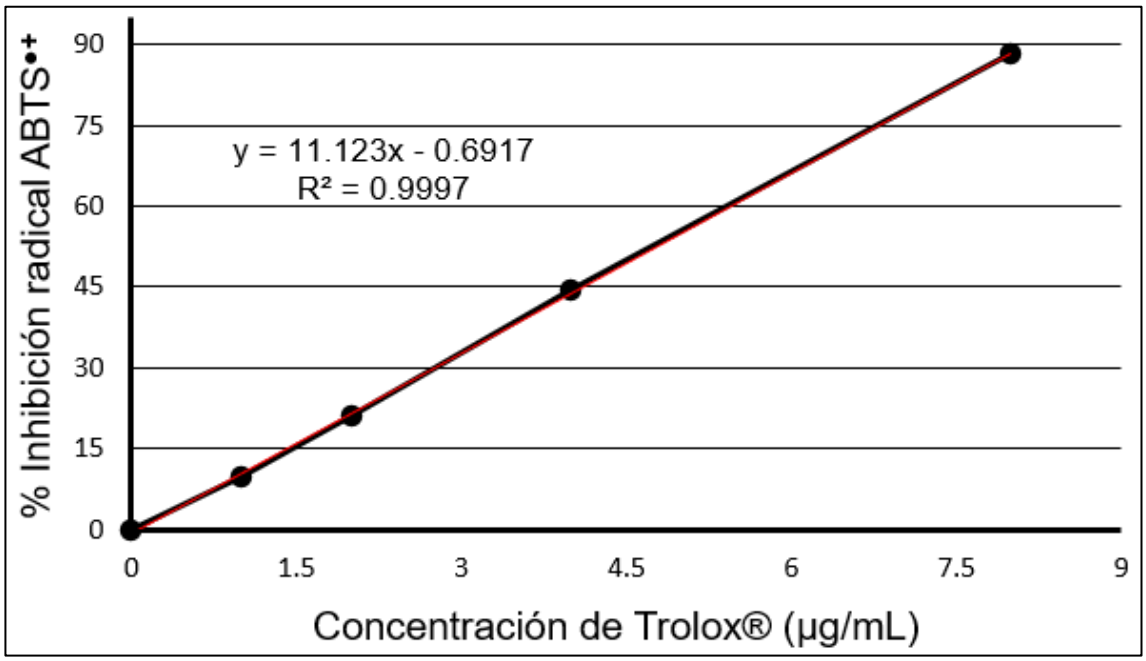


Anexo 25. Datos espectrofotométricos del Trolox® para el método del catión radical ABTS•+.

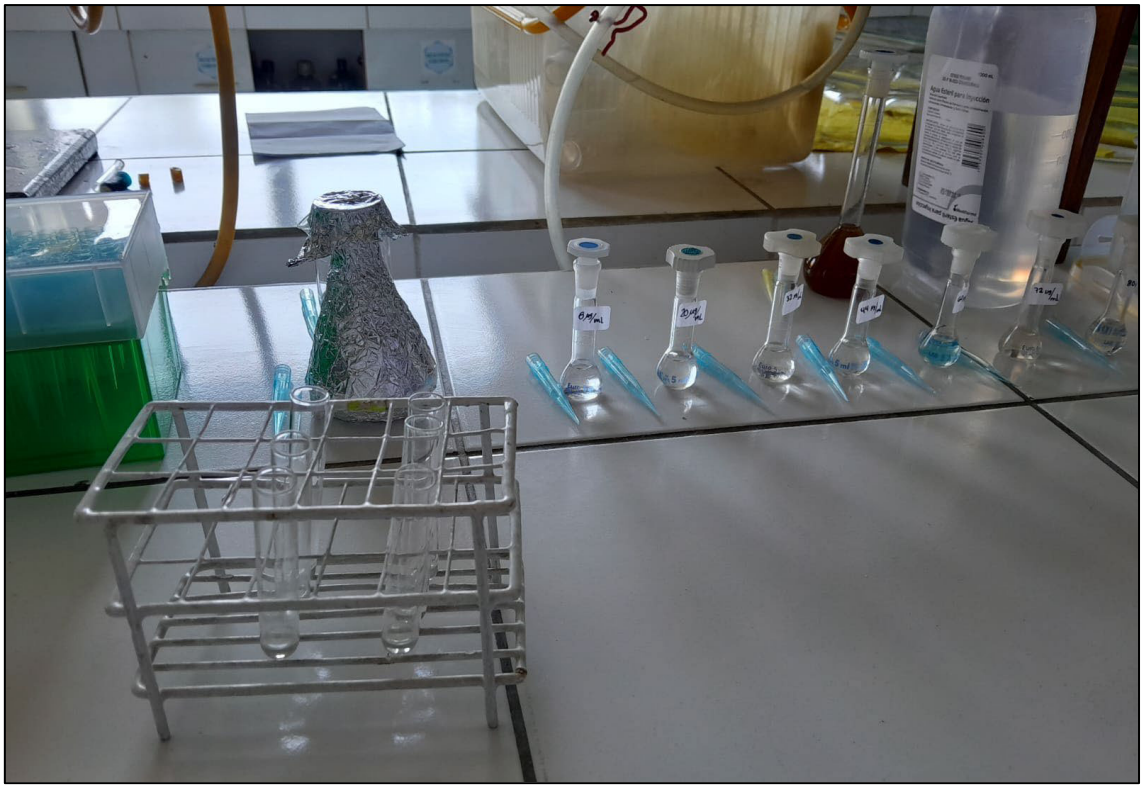
Tabla N° 25. Curva estándar del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del catión radical ABTS•+.

Trolox® (µg/mL)	Promedio Abs. (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)	Inhibición (%)	CI_{50} (µg/mL)
0	0,6729	0,0108	1,61	0,00	
1	0,6078	0,0105	1,73	9,67	
2	0,5308	0,0096	1,82	21,11	4,56
4	0,3740	0,0050	1,34	44,42	
8	0,0795	0,0006	0,73	88,19	

Anexo 26. Gráfica de dispersión del Trolox® para determinación de la actividad antioxidante por el método del catión radical ABTS•+.



Anexo 27. Preparación de batería de reacción para determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP) del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

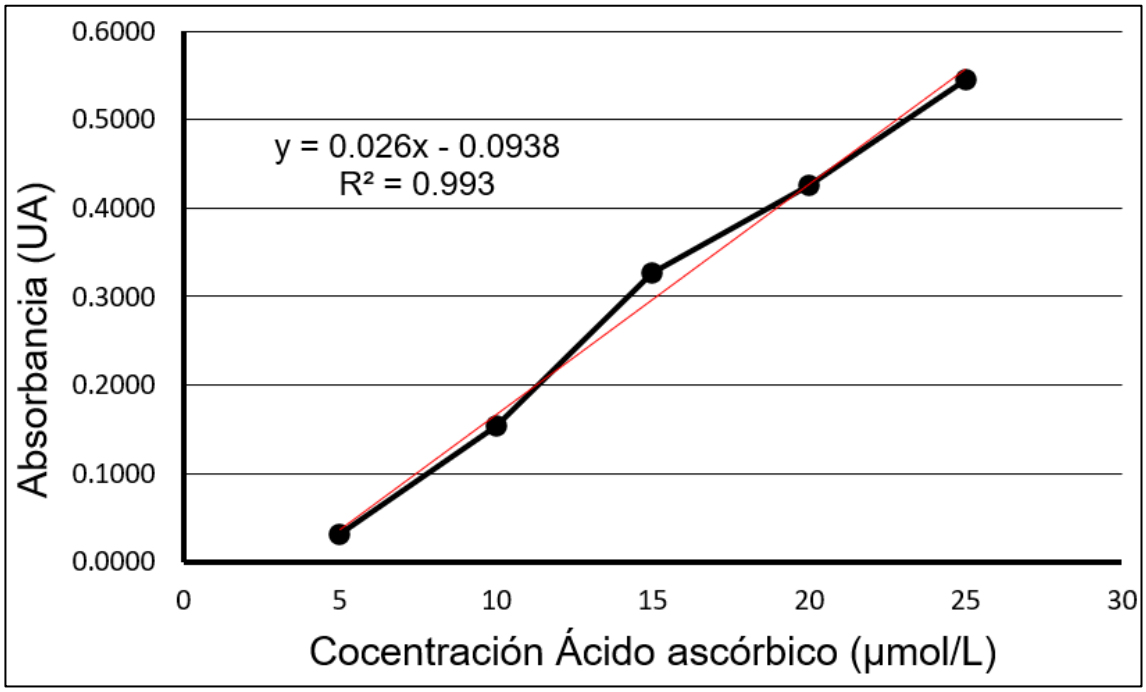


Anexo 28. Datos espectrofotométricos del Ácido ascórbico para el método de reducción de hierro (FRAP).

Tabla N° 26. Curva estándar del Ácido ascórbico para determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP).

Ácido ascórbico (µg/mL)	Promedio Absorbancia (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)
5	0,0310	0,0044	14,06
10	0,1537	0,0006	0,38
15	0,3260	0,0020	0,61
20	0,4250	0,0010	0,24
25	0,5453	0,0038	0,69

Anexo 29. Gráfica de dispersión del Ácido ascórbico para determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP).

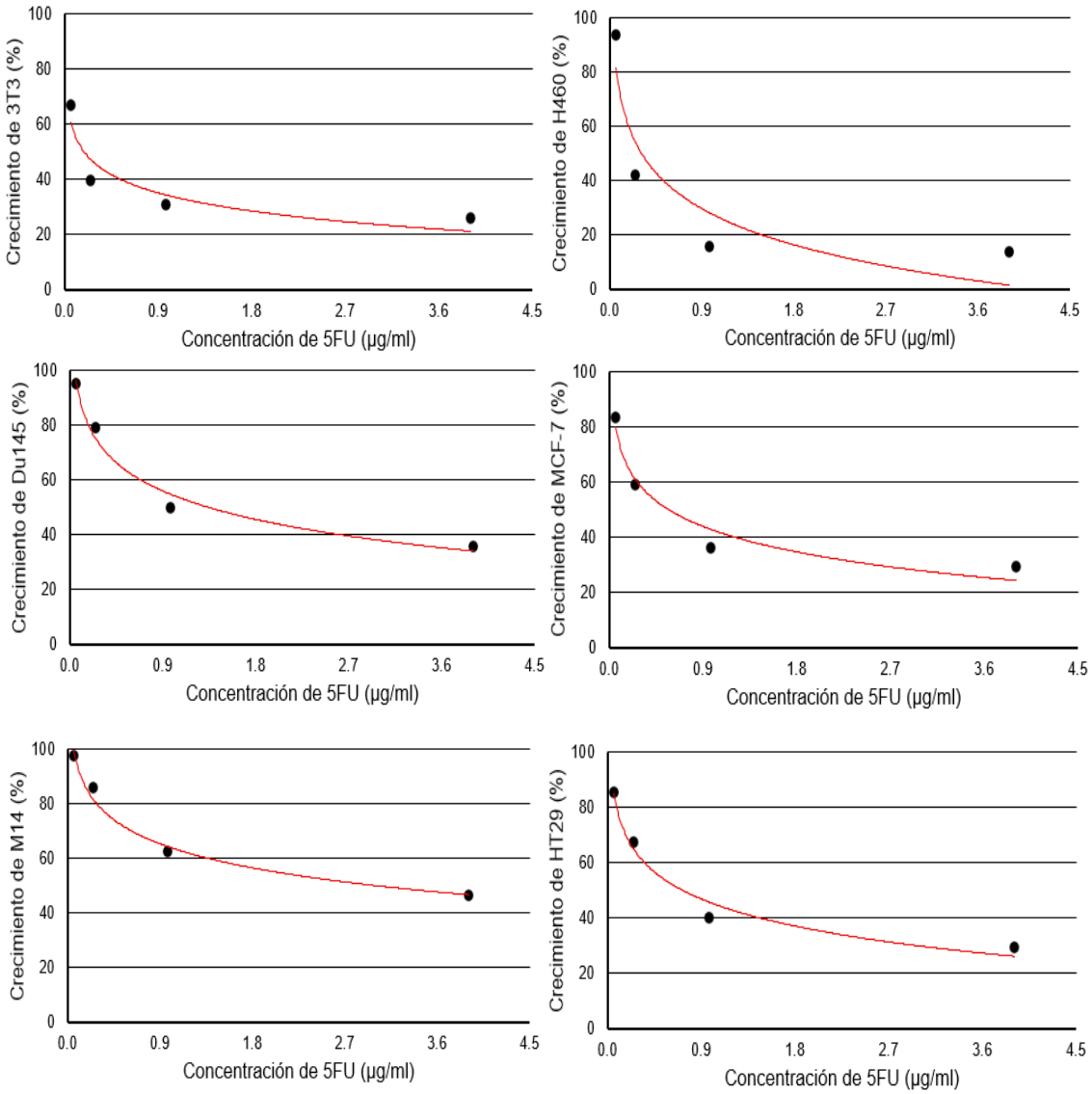


Anexo 30. Datos espectrofotométricos del 5FU para el método de citotoxicidad.

Tabla N° 27. Curva estándar del 5FU para determinación de la actividad citotóxica frente líneas celulares.

Línea celular	5FU (µg/mL)	Promedio Abs. (UA)	DE (±)	Coef. V. (%)	Crecimiento (%)	CI_{50} (µg/mL)
3T3	0,06	0,3389	0,0020	0,58	67,15	0,29
	0,24	0,2508	0,0013	0,54	39,59	
	0,98	0,2239	0,0058	2,59	31,15	
	3,91	0,2076	0,0045	2,15	26,07	
H460	0,06	1,3100	0,0374	2,86	93,86	0,40
	0,24	0,6894	0,0153	2,23	42,17	
	0,98	0,3754	0,0074	1,96	16,01	
	3,91	0,3498	0,0040	1,13	13,88	
Du145	0,06	0,6675	0,0315	0,42	95,23	1,98
	0,24	0,5863	0,0849	3,50	79,33	
	0,98	0,4370	0,0100	2,30	50,11	
	3,91	0,3646	0,0048	1,32	35,94	
MCF-7	0,06	0,6071	0,0050	0,83	83,73	0,85
	0,24	0,4903	0,0142	2,90	58,95	
	0,98	0,3843	0,0042	1,10	36,45	
	3,91	0,3518	0,0179	5,09	29,57	
M14	0,06	0,5947	0,0057	0,96	97,48	5,82
	0,24	0,5427	0,0040	0,74	85,97	
	0,98	0,4377	0,0132	3,01	62,71	
	3,91	0,3643	0,0069	1,90	46,46	
HT29	0,06	1,0504	0,0499	4,75	85,46	1,18
	0,24	0,8648	0,0077	0,89	67,27	
	0,98	0,5873	0,0087	1,48	40,07	
	3,91	0,4778	0,0011	0,22	29,33	

Anexo 31. Gráfica de dispersión del 5FU para determinación de la actividad citotóxica frente a líneas celulares.



Anexo 32. Reacción colorimétrica para determinación de la actividad citotóxica frente a células tumorales humanas del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tiquilia paronychioides* “flor de arena”.

