UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA – CONICYT

PROGRAMA FONDECYT

"ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y SEPARACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE ESPECIES NATIVAS CHILENAS"

Rayma Isabella Plaza Ahumada

Valparaíso, Chile

2023

ESCUELA DE OBSTETRICIA Y PUERICULTURA
FACULTAD DE MEDICINA
CASA CENTRAL

“ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y SEPARACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE ESPECIES NATIVAS CHILENAS”

Rayma Isabella Plaza Ahumada

Tesis para optar al Grado académico de Licenciada en Obstetricia y Puericultura

Director de tesis:

Dr. Iván Montenegro Venegas

Codirector:

Dr. Alejandro Madrid Villegas

Informante:

Dr. Mauricio Cuellar Fritis

Valparaíso, Chile

2023

Dedicatoria

A mis sobrinos, Antonio, Ian y Gael.

.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer con gran humildad a las siguientes personas

En primer lugar, a mis padres, Patricio y Milza, quienes han sido mis firmes cimientos en la vida y siempre me han aconsejado, apoyado y fortalecido en las diferentes etapas de mi vida. Sin ellos, sin dudas algunas, no estaría culminando mi etapa universitaria con éxito, ni ninguna otra. Los amo y son mi mayor ejemplo.

A mi profesor tutor, mentor y amigo, Dr. Iván Montenegro, quien durante todos mis años en pregrado ha creído sinceramente en mí, me ha guiado, alentado y a veces llamado la atención, siempre con el fin de llevar mis capacidades al límite, superarme y ser una excelente profesional, tal como él lo es.

A mi querido amigo Ignacio González, quien con su enorme corazón y gran sabiduría sabía cómo apoyarme y darme las alas para seguir volando hacia mi meta.

A mi amigo Cristóbal González, con quien, al término de cada agotadora jornada para ambos, siempre tenía un minuto para escucharme, alentarme y ser un apoyo diario, Así también, ser un ejemplo brillante de estudiante, profesional e investigador. Estoy segura de que los grandes descubrimientos y avances en el área eléctrica irán de su mano.

A quienes me acompañaron durante las largas y, a veces, abrumadoras horas de trabajo en el laboratorio; Profesora Susana Flores y Mat. Constanza Villarroel. Sin sus palabras de aliento, conversaciones cercanas y risas, hubiera sido muy difícil de realizar.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS 8
RESUMEN 10
ABSTRACT 10
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 11
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS 13
Objetivo general 13
Objetivos específicos 13
CAPITULO 3: FUNDAMENTO TEÓRICO 14
Las plantas como fuente de los compuestos medicinales 14
1. Metabolismo de las plantas 14
2. Metabolismo primario 14
3. Metabolismo secundario 15
4. Extractos vegetales 23
5. Descripción de la especie vegetal 25
CAPÍTULO 2: ANÁLISIS INSTRUMENTAL 34
Introducción a técnicas generales 34
1. Separación y purificación [13] 34
2. Identificación 38
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS 43
1. Materiales 43
2. Reactivos 43
3. Equipos 44
4. Estudios químicos 47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS 52
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN 71
CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN 78
REFERENCIAS 79

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	**:**	Acetilcoenzima A
AcOEt	**:**	Acetato de etilo
CC	**:**	Cromatografía en columna
CCF	**:**	Cromatografía en capa fina
CHS	**:**	Chalcona sintasa
CHI	**:**	Chalcona isomerasa
CTF	**:**	Cantidad totales de fenoles
DCM	**:**	Diclorometano
EM	**:**	Espectroscopía de masas
EtOH	**:**	Etanol
FLS	**:**	Flavonol sintasa
F3'H	**:**	Flavonoide 3'-monooxigenasa
FT-IR	**:**	Espectroscopia de Infrarroja
FLS	**:**	Flavonol sintasa
F3'H	**:**	Flavonoide 3'-monooxigenasa
GC/MS	**:**	Cromatografía de gases/masas (Gas chromatography – mass spectrometry)
Hex	**:**	n-hexano
IPP	**:**	Isopentenil disfofato
L	**:**	Litro
MEP	**:**	Metileritritol
mL	**:**	Mililitros
mg	**:**	Miligramo
g	**:**	Gramos
Mm	**:**	Milímetros
PAL	**:**	Fenilalanina-amino liasa
µL	**:**	Microlitro
µg	**:**	Microgramo

RMN **:** Resonancia magnética nuclear

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Elementos básicos del metabolismo primerio y en relación con el metabolismo secundario de plantas.

Figura 2: Elementos del metabolismo del carbono en relación de las rutas de síntesis de metabolitos secundarios.

Figura 3: Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.

Figura 4: Estructura química del fenol.

Figura 5: Síntesis de derivados fenólicos.

Figura 6: Ruta del ácido siquímco: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaconas, isoflavonas y flavonoides.

Figura 7: Morfología de *Drimys Winteri*. a) semilla, b) fruto, c) corteza, d) flor y hojas.

Figura 8: Equivalentes sintéticos de partida para la síntesis de nuevos drimanos.

Figura 9: Flor de *Leptocarpha rivularis* DC. a) tallo, b) floración.

Figura 10: Ruta metabólica de la Quercetina.

Figura 11: Reacción de Michael o adición de Michael.

Figura 12: Lactona tipo germacronolida.

Figura 13: Estructura química de Leptocarpina.

Figura 14: Esquema de cromatografía en columna.

Figura 15: Elución de una columna bien empaquetada.

Figura 16: Esquema del proceso de Cromatografía Capa fina a) Aplicación de la muestra en la placa. b) Cámara de desarrollo. c) Secado de la muestra. d) Revelado de un agente adecuado. e) Visualización de los compuestos por calcinación. Una vez finalizado el proceso de purificación se prosigue con la identificación de las moléculas sintetizadas, mediante técnicas físicas y espectroscópicas.

Figura 17: Esquema de Fragmentación.

Figura 18: Equipo de extracción Soxhlet.

Figura 19: Columna cromatográfica; en su interior con extractos de flor de *L. rivularis* DC en hexano.

Figura 20: Cromatofolios con muestra sembrada en solvente hexano.

Figura 21: Cámara cromatográfica, capa fina y fase móvil.

Figura 22: Capa fina bajo luz UV, muestras sembradas en Hexano.

Figura 23: Capa fina bajo luz UV, muestra sembrada en Acetato de Etilo.

Figura 24: Capa fina carbonizada, muestras sembradas en Hexano.

Figura 25: Cromatograma total de gases (columna capilar no polar HP Ultra 2) de un extracto de aceites esenciales de *Drimys winteri*.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de compuestos identificados en aceite esencial de *Drimys winteri.*

Tabla 2: Moléculas orgánicas de los principales compuestos de *Drimys winteri*

Tabla 3: Contenido fitoquímico de diferentes extractos de flor de *L. rivularis*

Tabla 4: Actividad antioxidante del extracto de flor de *L. rivularis*

Tabla 5: Reserva de glutatión de los extractos de flor *L. rivularis*

Tabla 6: Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en n-hexano.

Tabla 7: Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en DCM.

Tabla 8: Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en AcOEt.

Tabla 9: Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en Etanol.

Tabla 10: Extracto de Hexano I5.

Tabla 11: Extracto de Hexano T1.

Tabla 12: Extracto en Acetato de Etilo F63-64.

RESUMEN

El presente trabajo de título tiene por finalidad realizar un estudio químico a partir de extractos vegetales de las plantas endémicas chilena *Drimys winteri* Forst y *Leptocarpha rivularis* DC, popularmente conocida como Canelo y Palo Negro respectivamente, las cuales fueron recolectadas en la cuidad de Temuco, provincia de Cautín, región de la Araucanía, de las cuales se lograron identificar y seriar gran cantidad de metabolitos secundarios.

Los extractos vegetales obtenidos fueron inmersos en cuadros diferentes solventes; hexano, acetato de etilo, diclorometano y etanol, obteniéndose la muestra principal con el cual se desarrolló esta investigación.

Para el aislamiento de los compuestos se utilizan técnicas cromatográficas (cromatografía en columna y cromatografía en capa fina), los compuestos aislados son identificados mediante técnicas espectroscópicas: GC/MS, RMN y FT-IR.

ABSTRACT

The main purpose of this research document it is to carry out a chemical study from plant extracts of Chilean endemic plants such as *Drimys winteri* Forst and *Leptocarpha rivularis* DC, popular known as “Canelo” and “Palo negro” respectively, which were recollected in Temuco, Cautin province, Araucania region, of which many secondary metabolites were identified and serialized.

The plant extracts obtained were immersed in four different solvents: hexane, ethyl acetate, dichloromethane and ethanol, obtaining the main sample with which this research was developed.

For the isolation of the compounds chromatographic technics are utilized (column chromatographic and thin layer chromatographic), the isolated compounds are identified by spectroscopic techniques: GC/MS, RMN and FT-IR.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los seres humanos hemos desarrollado una mayor consciencia por el entorno natural que nos rodea y, por ende, formas de poder conectar nuevamente con ella. Es en este auge en que el estudio consciente y constante de la flora endémica, siendo una fuente casi inagotable de compuestos orgánicos, ha permitido nuevas rutas de conocimiento y desarrollo con una base científica, principalmente en el área de la farmacología. Esta ciencia evoluciona y madura cada vez con mejores instrumentos de investigación, así como métodos de preparación, de análisis y pruebas de actividad, sumado al mayor acceso a la información científica. La fitoquímica y la hemisíntesis a partir de compuestos naturales, son plenamente compatibles con una investigación moderna de compuestos terapéuticos [1].

En Chile existen 5.739 de especies considerando los taxas infra específicos, de ellos 2.630 (45,83%) son endémicas. Es de interés en particular el estudio de las siguientes familias: Compositae (Asteraceae) con 1.033 especies y subespecies [2], siendo la más grande y Winteraceae con 65 especies.

Por parte de la familia Winteraceae nuestra atención será dirigida hacia *Drimys winteri* Forst y de la familia Compositae, hacia *Leptocarpha rivularis* DC. Ambas especies poseen un metabolismo que se identifica como un conjunto de reacciones químicas, las cuales hacen posible la sobrevivencia de estos seres vivos.

Es posible identificar un metabolismo primario y uno secundario, el primario son sustancias comunes para todos los seres vivos, los metabolitos secundarios son moléculas complejas biosintetizadas a partir de moléculas simples. Los metabolitos secundarios son de gran interés para el ser humano en diversas áreas industriales tales como la farmacéutica, alimentaria y cosmética entre otras, por lo mismo en los últimos años el estudio de los compuestos orgánicos biosintetizados por plantas se ha transformado en un factor importante para el ser humano. [3]

Drimys winteri Forst posee drimanos; que son sesquiterpenos con esqueleto del tipo biciclo farnesano. Estos drimanos sesquiterpénicos, presentan diversas bioactividades importantes tales como: antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) reportada por Anke et al, 1991; citotóxica (Anke et al, 1991) y (D´Acunto, 2011); repelente (Van Beek et al, 1986), antifeedant (Van Beek et al, 1986), larvicida (Montenegro et al, 2013), inmunomoduladora (Harper et al, 2009), inhibidora de hemólisis (Fukuyama et al,1982) y nociceptiva (D´Acunto, 2012) [1].

A su vez, *Leptocarpha rivularis* ha sido utilizada por el pueblo Mapuche desde antaño, gracias a sus propiedades curativas en patologías asociadas en su mayoría al sistema gástrico.

L. rivularis se caracteriza principalmente por ser rica en los siguientes metabolitos secundarios; compuestos acetilénicos, sesquiterpenos y lactona sesquiterpénica. Así también, cuenta con aceites esenciales, triterpenos y componentes fitoquímicos; flavonoides, fenoles y antraquinonas.

Teniendo en consideración los antecedentes actuales, el presente trabajo se presenta como un documento de información nueva, pudiendo ser un instrumento de contribución a la data existente.

La metodología de este trabajo fue creada para separar e identificar metabolitos secundarios de la Flor de *L. rivularis* y de *Drimys winteri* J.R. Forst, mediante los extractos de estas, para lo cual se usaron cuatro solventes diferentes; Hex, DCM, AcOEt y EtOH.

Luego, los extractos fueron comparados por su composición total de componentes fitoquímicos y actividad antioxidante. Los extractos más activos fueron analizados mediante GS/MS y RMN.

HIPÓTESIS

La identidad y distribución de los componentes químicos específicos de la flor de *Leptocarpha rivularis* DC y *Drimys winteri* J.R. Forst son determinados a través de técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos. Además, variaciones en la polaridad de los solventes de extracción utilizando Soxhlet contribuyen a la obtención de diferentes productos naturales.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y cuantificar los componentes químicos principales presentes en los extractos secuenciales de flor de *Leptocarpha rivularis* DC *y Drimys winteri* J.R. Forst obtenidos por Soxhlet.

Objetivos específicos

OE1: Obtener extractos secuenciales (n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) a partir de la flor de *L. rivularis* y *Drimys winteri*.

OE2: Aislar e identificar los metabolitos secundarios con mayor actividad presentes en la flor de *L. rivularis* y comparar con estándares comerciales.

OE3: Identificar metabolitos presentes en extractos de flor de *L. rivularis* y *Drimys winteri* por GC/MS.

OE4: Identificar y caracterizar los compuestos puros aislados por resonancia magnética nuclear.

CAPITULO 3: FUNDAMENTO TEÓRICO

Las plantas como fuente de los compuestos medicinales

1. Metabolismo de las plantas

Todos los seres vivos que habitan nuestro planeta; animales, plantas, microorganismos, hongos y bacterias, pueden ser clasificados según las características principales y naturaleza de estos, dando paso a una diversidad de reinos de la naturaleza. De estos reinos, el reino vegetal es del que se tiene mayor registro e información, del cual se conoce más de un millón de especies diferentes, con data desde del génesis de la Tierra. Las plantas contribuyeron al cambio de la atmósfera primitiva en el Tierra gracias a que proporcionaron oxígeno, elemento vital e indispensable para el desarrollo de la vida.

El metabolismo es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren a partir de las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples o degradar sustancias complejas a simples [4].

El metabolismo de las plantas, para su estudio diferenciado, lo podemos dividir en dos procesos:

2. Metabolismo primario

Corresponde al conjunto de procesos químicos que cada planta, como organismo autótrofo, realiza día a día. Estos procesos tienen una función metabólica directa, como lo es la mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía que es dirigida a las moléculas comunes de todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. El metabolismo primario está codificado en cada genotipo de todo organismo vivo, tales como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos.

3. Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios tienen origen en la biodegradación de los metabolitos primarios, los cuales están asociado al fenotipo de la plata. (fig. 1). A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa de metabolitos primarios, carbono

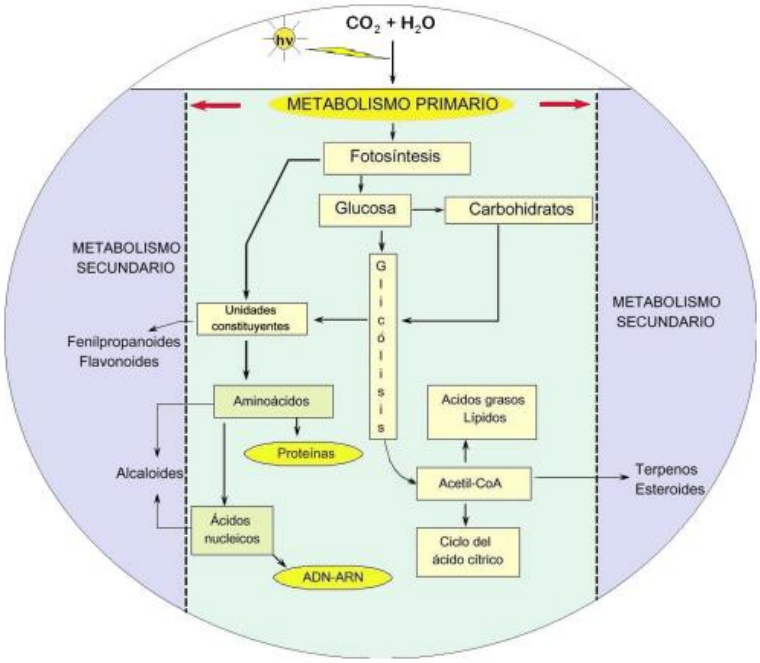


Figura 1: Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.

asimilado y energía, a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. A estos se le denomina metabolitos secundarios o productos naturales.

Los metabolitos secundarios presentan propiedades biológicas y desempeñan funciones ecológicas específicas, como atrayentes de insectos polinizadores, repelentes frente a la fauna que suponga una amenaza o bien, como pesticidas naturales. También, se caracterizan por sus variados usos y aplicaciones en diferentes rubros, como lo es en la farmacéutica, agronómica, cosmética, entre otros.

Las principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono [4].

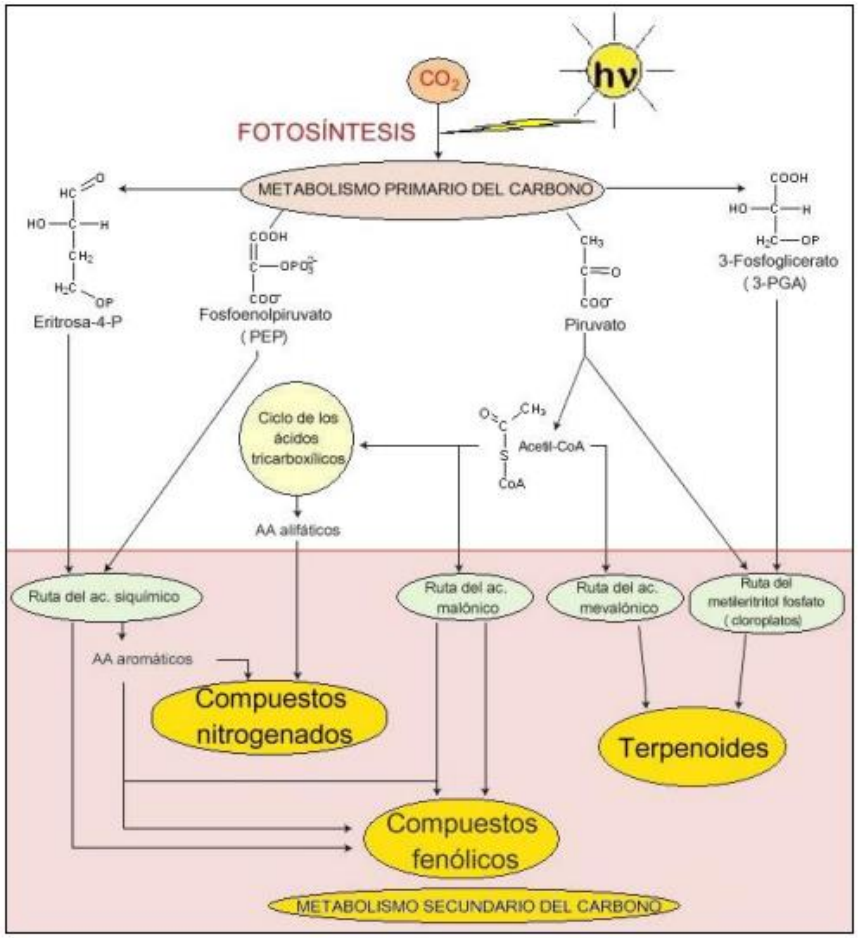


Figura 2: Elementos del metabolismo del carbono en relación de las rutas de síntesis de metabolitos secundarios.

Se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides.

a. Terpenos:

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroles (de gran importancia en las estructuras de membranas). [4]

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (figura 3). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno. [4]

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP [4].

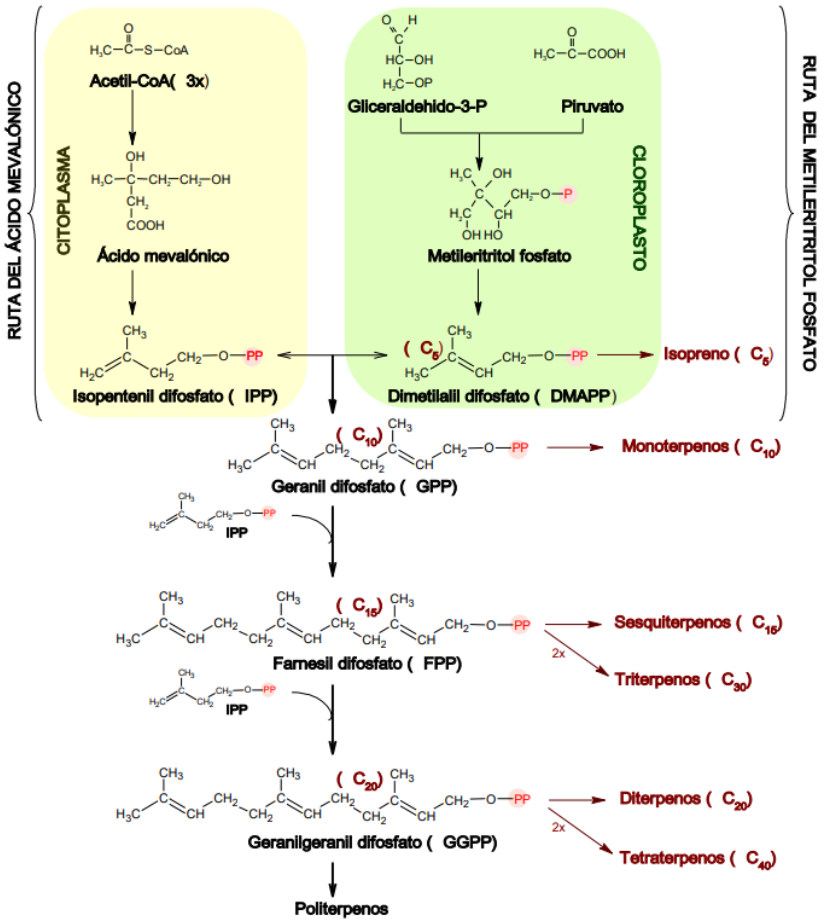


Figura 3: Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.

El grupo de los terpenos, como antes se menciona, incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroles (ergosterol, β-sitosterol, colesterol), derivados de los esteroles (glicósidos cardiacos), látex y **aceites esenciales** (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. [4]

b. Compuestos fenólicos:

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo [4].

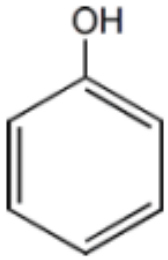


Figura 4: Estructura química del fenol

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro.

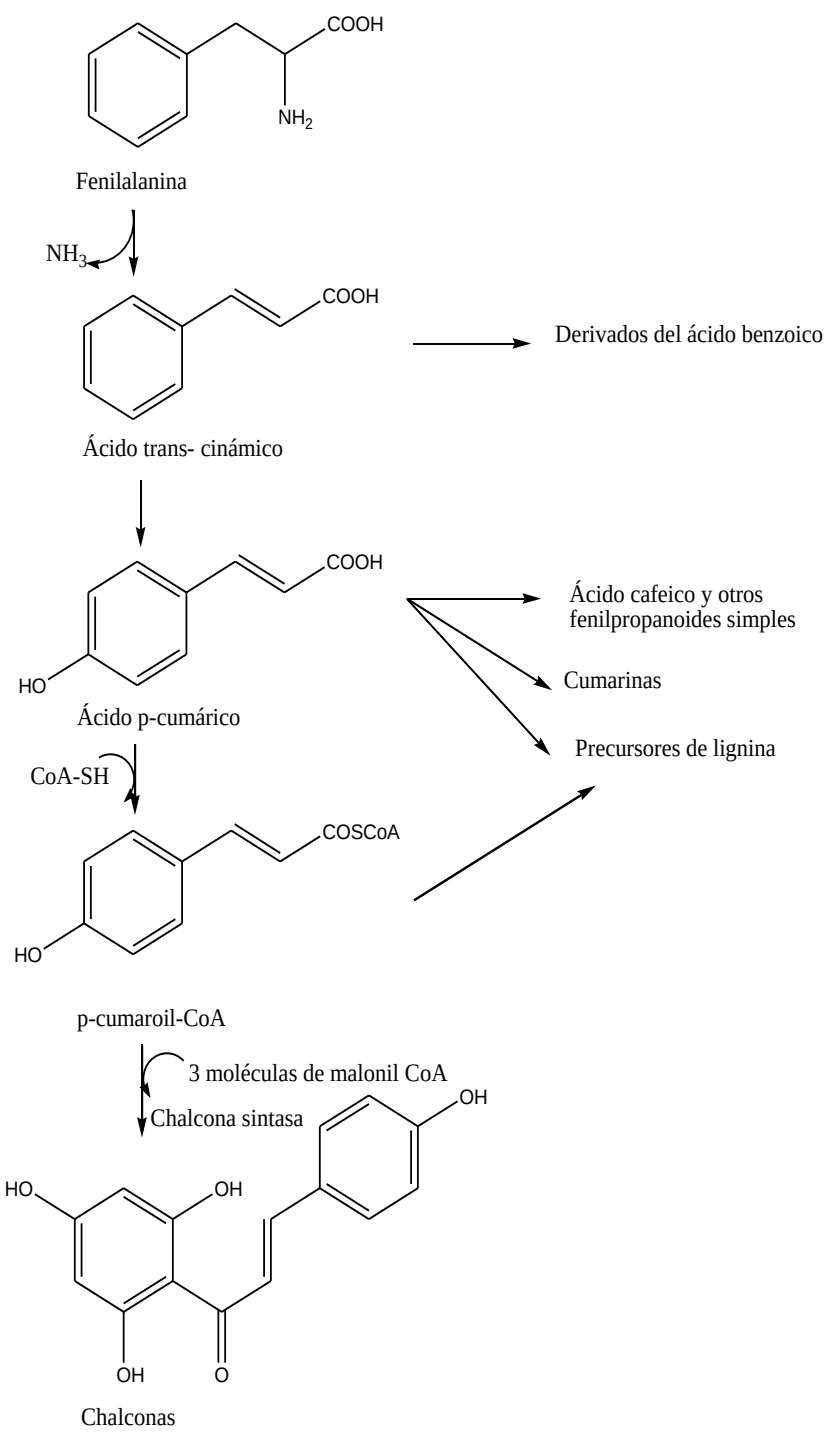


Figura 5: Síntesis de derivados fenólicos

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico [4].

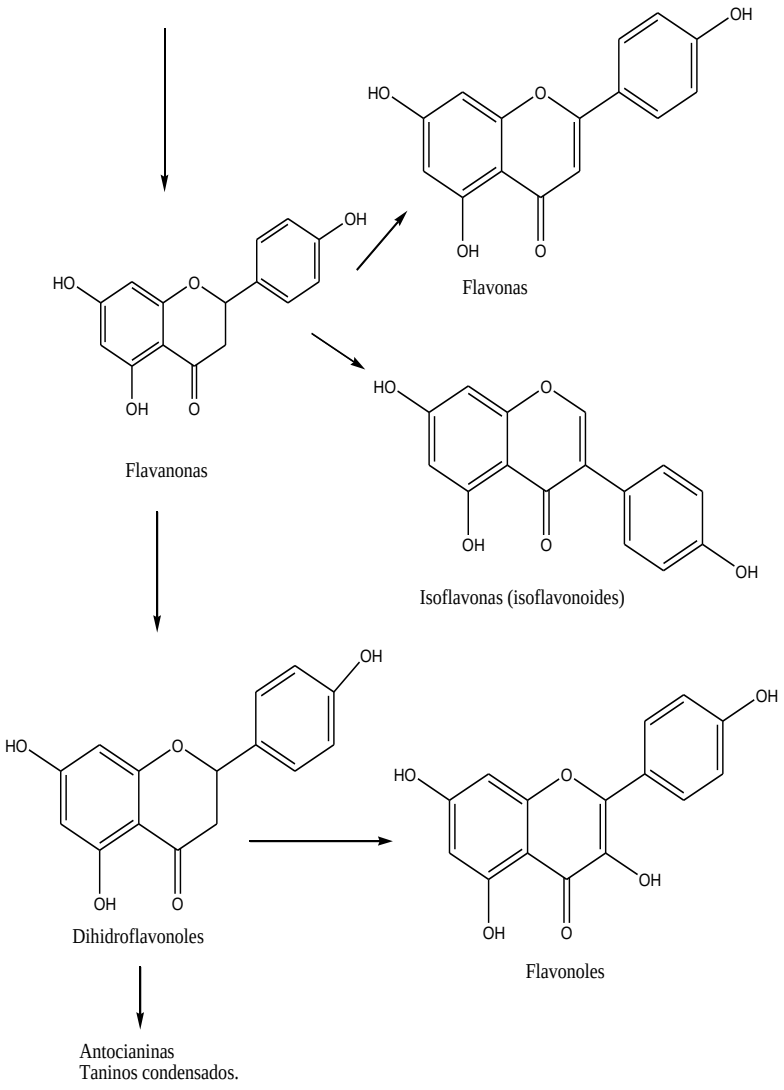


Figura 6: Ruta del ácido siquímco: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaconas, isoflavonas y flavonoides.

La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-fosfato y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la

síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) [4].

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales [4].

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos.

c. Glicósidos:

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos [3].

d. Alcaloides

Los alcaloides son una familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica [4].

La mayor parte de los alcaloides son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mezcalina o la colchicina.

En los seres humanos, los alcaloides transfieren propiedades fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores [4], mientras que, en el reino vegetal se encuentra en plantas vasculares, mayoritariamente dicotiledóneas herbáceas.

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano.

4. Extractos vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol, o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca [5].

4.1 Generalidades

Características de los extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentas las siguientes características específicas de los extractos:

- Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- Algunas son de color café amarillento, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol con el cual han sido preparados.

- Los extractos alcohólicos preparados con hojas dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordell (1995) propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final. Estos trabajos fueron remontados por Corpas, quien propuso realizar ensayos de identidad a los extractos obtenidos [6].

4.2 Conservación de los extractos

Labfarve (1995) determinó las alteraciones y los diferentes métodos de conservación de los extractos. Los extractos son medicamentos en donde la alteración modifica y varía notoriamente la naturaleza del producto. En principio, un extracto seco o de tipo pilular se conserva mejor que un extracto acuoso. Esto no es totalmente exacto, pues la naturaleza del producto interviene igualmente. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica. Algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos. Por otra parte, las alteraciones más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color. Los extractos a base de alcaloides bajan de título, según lo demuestran las investigaciones de Fricotel y Métin (1970). Esta disminución del título alcaloidito, es especialmente sensible a los extractos blandos y de aspecto pilular y bastante menos notorio en los extractos secos [7].

Según Corpas y Barriga (1993), la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

a. Se deben conservar protegiéndolos de la luz.
b. Los envases deben estar bien tapados.
c. Se deben conservar en un medio ambiente seco [7].

4.3 Métodos de extracción

La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo desde sus fuentes naturales. Puede definirse también como la separación de un componente de una mezcla en medio de un disolvente.

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación.

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona. [8]

Los métodos de extracción pueden ser de 2 tipos:

- Extracción líquido-líquido.

- Extracción sólido-líquido.

Sin embargo, nuestro estudio se centrará en la extracción sólido-líquido por el método Soxhlet.

5. Descripción de la especie vegetal

5.1 Descripción botánica

I. D. WINTERI J.R. FORST

REINO	*Plantae*
PHYLLUM	Magboliophyta
CLASE	Magnoliopsida
FAMILIA	Winteraceae

GÉNERO	Drimys
ESPECIE	*D. winteri*
NOMBRE CIENTÍFICO	*Drimys winteri* J.R. Forst
NOMBRE COMÚN	Bioque, voigue, fuñe, choól
DISTRIBUCION GEOGRAFICA	"Mayoritariamente en Argentina, Chile y México".

Fuente: Fundación Jardín Botánico Nacional

La planta del género *Drimys*, Winteraceae, está ampliamente distribuida en toda américa desde México, Chile y parte de Argentina, las especies descritas para este continente son: *D. angustifolia* y *D. brasiliensis* (Brasil), *D. confertifolia*, *D. andina*, *D. winteri* (Chile), D granadensis (México – Perú), especies utilizadas como vegetales y agentes terapéuticos (Orlando Muñoz, Jorge Tapia, Wolf Nevermann, n.d.) [1].

El "Canelo", *D. winteri* J.R. Forst. et G. Forst, Winteraceae, es una especie arbórea siempre verde nativa, que se distribuye en Chile desde el río Limarí (30 ° S) hasta el Cabo de Hornos (56 ° S), alcanzando su máxima expresión en los bosques laurifolios de la Región de Los Lagos (Urra, 2017), es un árbol nativo del centro y sur de Chile y Argentina, que crece en Chile continental desde Coquimbo hasta Aysén, incluida la isla de Chiloé. Es abundante en localidades húmedas y pantanosas, desde el nivel del mar hasta una altitud de 1700 m (O & M, 2015) [1].



Figura 7: Morfología de *Drimys Winteri.* a) Semilla, b) Fruto, c) Corteza, d) Flor y hojas

El extracto de la corteza de varias especies de *Drimys winteri* han sido usadas por mucho tiempo en el tratamiento de enfermedades y en la protección de cultivos, en el sur de Chile esos extractos fueron utilizados para el tratamiento de dermatitis, dolor de estómago, tiña del ganado. La estructura y configuración absoluta de drimenol fue elucidada en 1946, siendo el primer sesquiterpeno bicíclico con estructura y configuración absoluta característica de un sistema de anillos A, B de muchos di-triterpenos (Jansen & De Groot, 1991) [1].

Estudios fitoquímicos previos de *D. winteri* Forst reportan la composición química, indicando la presencia de taninos, flavoniodes, aceites esenciales, drimanos tipo lactona y tipo sesquiterpenos (Monsálvez et al., 2010) , de estos últimos se han aislado Poligodial (1), Isopologodial (2), Drimenol (3) (figura 8), las cuales poseen diversas actividades biológicas como: antibacteriano, antifúngico, larvicida (Huang et al., 2021; Monsálvez et al., 2010; Ivan Montenegro et al., 2014), biopesticida (Iván Montenegro et al., 2018), inflamación vascular(Burgos et al., 2020), antiinflamatorio similar a la dexametasona (Barrosa et al., 2016) [1].

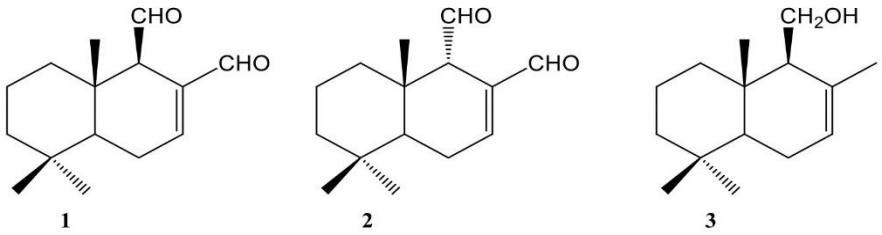


Figura 8: Equivalentes sintéticos de partida para la síntesis de nuevos drimanos.

Recientemente, drimanos sesquiterpenicos 1- ß-(p-coumaroyloxy)-polygodial, drimanial y 1- ß-(pmethoxycinnamoyl)-polygodial demostraron actividad citotóxica contra Leucemia Mieloidea Crónica (k562), células linfoblásticas B agudas (Nalm6) (Fratoni et al., 2018a), antiplasmódico, antimicrobiano, antilesmania (Fratoni et al., 2018.), antialérgico, antiparasitario(Rihak et al., 2018), antifúngico (Santoso et al., 2018), antinoniceptivo(Silveira et al., 2012), antiinflamatorio (Barrosa et al., 2016), cáncer (Ivan

Montenegro et al., 2014; Russo et al., 2019), inhibición de NKA(Garcia et al., 2018), actividad antiproliferativa contra diferentes cepas de leucemia, linfomas, sarcomas y carcinomas (Fratoni et al., 2018b) [1].

II. *L. RIVULARIS* DC

NOMBRE CIENTIFICO	*Leptocarpha rivularis DC*
NOMBRE COMÚN	*Palo negro*
REINO	*Plantae*
PHYLLUM	*Magnoliophyta*
CLASE	*Magnoliopsida*
FAMILIA	*Astaraceae*
GÉNERO	*Leptocarpha* DC
ESPECIE	*L. rivularis* DC
DISTRIBUCION GEOGRAFICA	"En Chile habita entre la región del Maule hasta la región de los Ríos".

La familia Astaraceae, antiguamente denominada como Compositae, comprende arbustos usualmente terrestres de altas elevaciones. Reúne 32.913 especies repartidas en 1.911 géneros a nivel mundial [9], de las cuales se han estudiado químicamente más de 5.000 especies y de ellas cerca de 10.000 han sido aisladas como compuestos naturales. Se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, distribuyéndose a través de todos los hábitats disponibles.

La familia Astaraceae, previamente llamada Compositae, posee más de 20.000 especies. Se han estudiado químicamente más de 5.000 especies y de ellas cerca de 10.000 han sido aisladas como compuestos naturales

Dentro de esta familia está clasificada la *Leptocarpha rivularis* DC, conocida coloquialmente como “palo negro”, debido al oscuro color café que presenta su tallo. Es un arbusto endémico de Chile, de 1 a 2 m de altura con floración desde octubre a mayo. Posee hojas cortamente pecioladas de 1 a 1,5 cm, opuestas y dispuestas en forma alterna respecto al ápice. La lámina alcanza hasta 10 cm de largo por 3 a 5 cm de ancho.

Su flor es periférica, dispuesta en inflorescencia compuesta, envuelta por un invólucro y compuesta por dos hileras de brácteas protegen a la flor. Es posible distinguir dos grupos de flores: masculinas y femeninas, de entre 5 a 6 cm y 4 cm respectivamente.

El fruto es un pequeño aquenio negruzco de aproximadamente 3 mm de longitud. Tiene forma acuñada, redondeada y débilmente tetragonal.

Leptocarpha rivularis DC es una especie, que crece como arbusto dioico de entre 1 y 2 metros de altura, endémica del territorio chileno, pudiéndose encontrar en la zona sur de Chile desde la región del Maule hasta la región de Los Ríos. En las cercanías de Osorno la planta se halla muy esparcida, como también a orillas del lago Llanquihue, mientras que escasamente se halla en el Seno de Reloncaví [10].

Crece tanto en terrenos planos como en ceros y primeros cordones montañosos de las cordilleras de los Andes y la Costa, en lugares húmeros y expuestos al sol, junto a cursos de agua y en las orillas de los bosques en forma abundante (Hoffmann 1982) [10].



Figura 9: Flor de *Leptocarpha Rivularis* DC.

5.2 Usos en la medicina tradicional

En la antigüedad fue nombrado por el pueblo mapuche como Cüdu – mamëll (palo negro) y urë – üre (Ire-ire), que significa “muy mojado”.

Era preparado mediante infusiones para tratar afecciones del sistema digestivo.

Actualmente es comercializado como depurador hepático, disminuir los niveles de glucosa en sangre, antiinflamatorio, problemas relacionados a la próstata, entre otros.

5.3 Estudios previos de *L. rivularis*

Los metabolitos secundarios que caracterizan a la familia Astaraceae, son principalmente compuestos de tipo acetilénicos y sesquiterpenolactonas, así también, contiene triterpenos, aceites esenciales y flavonoides.

Montenegro (2020) describe la presencia de un potente flavonol, quercetina, el cual ha reportado actividad anticancerígena sobre las líneas cancerígenas de próstata y mama [11].

Este flavonol, se obtiene a través de vía metabólica de los fenilpropanoides, precursora de muchos metabolitos en las plantas ya que, por medio de esta, se realiza la biosíntesis de fitoquímicos a partir de la estructura de carbono de la fenilalanina.

Los fenilpropanoides juegan un papel muy importante en la habilidad que tienen las plantas para contrarrestar el ataque de patógenos, entre estos se incluye de manera general a las ligninas y compuestos fenólicos como los flavonoides.

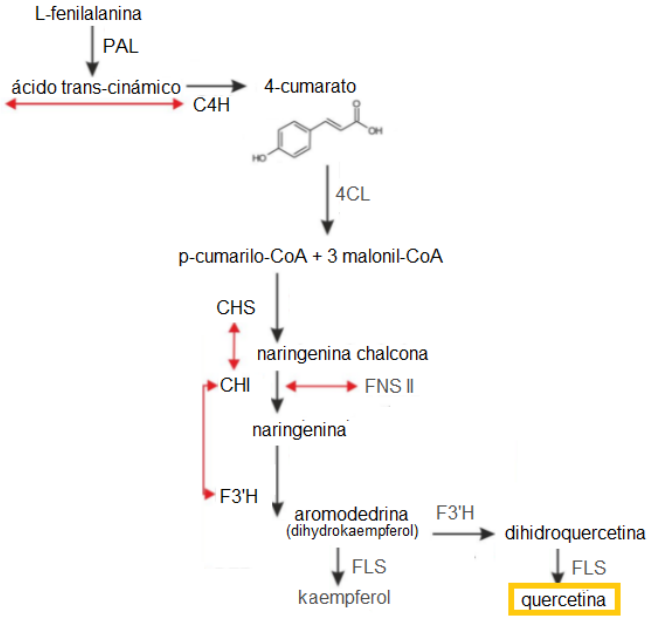


Figura 10: Ruta metabólica de la Quercetina.

Por otra parte, esta Familia no presenta taninos, iridioides y aminoácidos no proteicos; ácido L-canavanina, ácido c-aminobutírico (GABA) o ácido DL-b-aminobutírico (Muñoz 1992) [10].

Uno de los grupos que ha despertado mayor interés científico por sintetizar corresponde a las lactonas sesquiterpénicas (STLs), las cuales son un subgrupo de los sesquiterpenos, así también, son fitoconstituyentes de bajo peso molecular y que poseen características lipofílicas, incoloras y amargas. Se obtienen de la parte aérea de las plantas, tallo, constituyen un grupo de terpenoides C-15 con un anillo lactónico y contienen el agrupamiento α- metilén-γ-lactona. Los compuestos con este grupo ejercen su efecto actuando como agentes alquilantes a través de una adición tipo Michael [12].

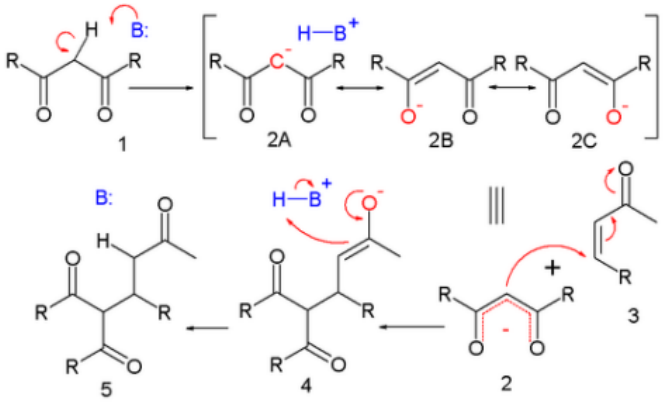


Figura 11: Reacción de Michael o adición de Michael.

El responsable de las actividades biológicas incluyendo la citotoxicidad frente a células tumorales, es la interferencia en las funciones de las proteínas por la formación de enlaces entre las lactonas sesquiterpénicas y los grupos sulfhidrilos (-SH) de dichas macromoléculas [12].

Las lactonas sesquiterpénicas presentan estructuras que parecen tener un origen común, habiéndose formado en procesos biogenéticos estrechamente relacionados y que permiten proporcionar caracteres químicos útiles dentro de la tribu. Así podemos clasificarlas en tres grandes grupos: lactonas tipo germacranolida, lactonas tipo eudesmanolida y lactonas tipo guayanolida [12].

De éstos tres grupos, es de particular interés el estudio de la Lactona tipo germacranolida alfa-beta- insaturada del tipo heliangólica, o mejor conocida como “leptocarpina”, presente en *L. rivularis* DC.

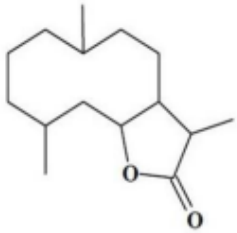


Figura 12: Lactona tipo germacronolida

Leptocarpina exhibe interesante actividad antitumoral, antineoplásica, habiéndose estudiado su comportamiento a nivel de inhibición de replicación del DNA, inhibición de transcripción, modificación de la permeabilidad de la membrana celular e inhibición de incorporación de aminoácidos seleccionados en proteínas [12].

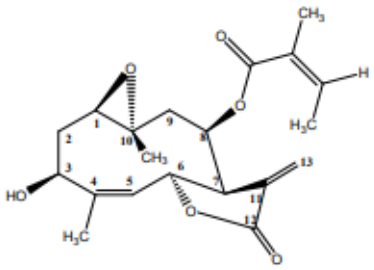


Figura 13: Estructura química de Leptocarpina.

CAPÍTULO 2: ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Introducción a técnicas generales

1. Separación y purificación [13]

Para lograr obtener el compuesto se aplicarán las técnicas de separación principalmente cromatográficas, la cual se define como:

"La Cromatografía es un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es la móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa".

Las técnicas de cromatografías utilizadas en esta investigación, para la separación y purificación son:

1.1 Cromatografía en columna

La cromatografía en columna es aquella en la cual el recipiente de la fase estacionaria es normalmente de vidrio, denominado columna provista de una bomba de aire para regular el flujo de solvente eluído a través de la columna. Como fase estacionaria se puede emplear diversos tipos de adsorbentes tales como: gel de sílice, alúmina, poliamida, resinas de intercambio iónico, entre otros. Se destaca que la fase estacionaria ocupada regularmente es gel de sílice.



Figura 14: Esquema de cromatografía en columna.

La cromatografía en columna se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. La elección de disolvente es crucial para una buena separación, dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de gravedad o bien aplicando presión (cromatografía flash).

Para la preparación de una columna cromatográfica el adsorbente debe estar uniformemente distribuido sin dejar bolsas de aire, ya que si no la elución no será uniforme. La cantidad de adsorbente y el tamaño de la columna son directamente proporcional a la cantidad de muestra que se van a analizar. Se debe colocar un tapón de algodón en el fondo de la columna, para evitar pérdidas de soporte. Se agrega la sílica y se golpea unas pocas veces para eliminar el aire entre las partículas de ésta. La compactación de la columna hace referencia al uso de un solvente elegido por su polaridad y previa ambientación de la columna con el uso de este solvente, Cuando una columna está mal empaquetada, se observa al comienzo de la elución una distorsión del frente de las bandas provocando una mala separación de los analitos.

La preparación de la muestra se aplica en forma de papilla líquida o sólida previamente preparada. Se mezcla una porción de sílica igual o menor a la porción de la muestra con una mínima cantidad de eluyente (solvente orgánico polar o apolar) para solubilizar y mezclar la sílica con la muestra. En el rotavapor se dispone a eliminar el eluyente hasta la obtención de un polvo seco y homogéneo, a esto se le conoce como papilla sólida y se agrega a la columna. Para la forma líquida, al polvo seco se le agrega una mínima cantidad de solvente, se hace una pasta homogénea y se transfiere a la columna. A continuación, se comienza la elución con una degradación de polaridad del eluyente. Las fracciones son recogidas en viales rotulados previamente.

Para alcanzar el éxito en la separación se debe contar con 3 factores importantes:

- Preparación de la columna
- Elección del solvente
- Proceso de elución

Cabe destacar que el factor más importante es ser cuidadoso a la hora de realizar estos procedimientos, ya que pueden existir pérdidas significativas de componentes.

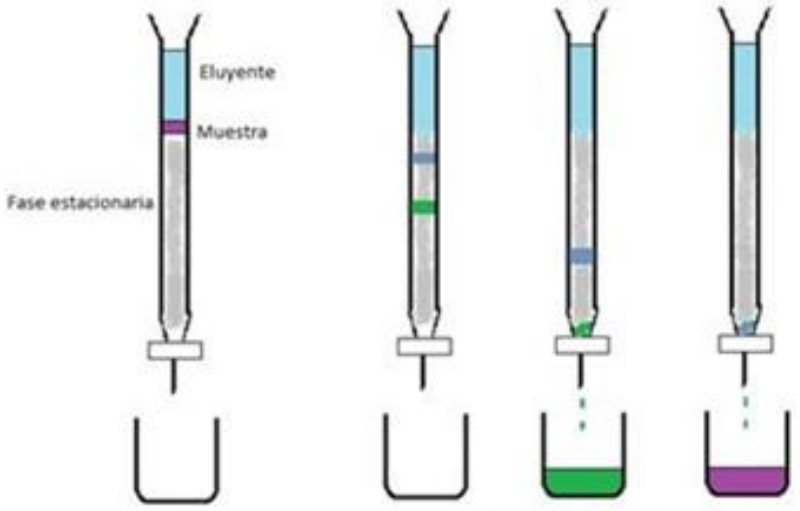


Figura 15: Elución de una columna bien empaquetada

1.2 Cromatografía en Capa Fina

Es una técnica rápida y sencilla, que se utiliza para análisis cualitativo que ayuda a establecer un monitoreo de las sustancias que van eluyendo de una columna cromatográfica, establece también el número de componentes de una mezcla, si existen dos sustancias que sean idénticas o que presentan diferencias estructurales.

La cromatografía de capa fina requiere el uso de una película de adsorbente, que se fabrica con un espesor fijo de 0,25 mm y es soportada sobre vidrio, plástico (poliéster resistente) o placa de aluminio. Un método reproducible en el laboratorio por lo antes descrito. Una vez preparadas las placas se comienza el proceso de "sembrar", en donde los compuestos cromatográficos separados son depositados por medio de un capilar abierto en una línea imaginaria horizontal aproximadamente a un centímetro del borde definido como inferior. Este es el lugar determinado para sembrar el analito [14].

El desarrollo de esta técnica se lleva a cabo sumergiendo las placas en una cámara cerrada, generalmente de vidrio que contiene solvente. De la placa se sumerge la capa de adsorbente sin sobrepasar los puntos de sembrado de la muestra, al entrar en contacto el solvente asciende por capilaridad arrastrando los puntos de sembrado por su polaridad. Las cámaras cromatográficas tienen distintas formas y tamaños, pero es imprescindible asegurar la máxima saturación de estas con eluyente. Para lograr visualizar compuestos que no son coloreados, es necesario revelar la placa, para ello se puede utilizar diversos reactivos que pueden ser identificados o universales esto depende de la estructura del compuesto. Los reactivos universales más usados son el revelado en yodo y en ácido sulfúrico al 15% posteriormente la placa es depositada a 110º-180ºC para carbonizar los compuestos presentes. Un factor importante es el comportamiento migratorio que tiene una sustancia.

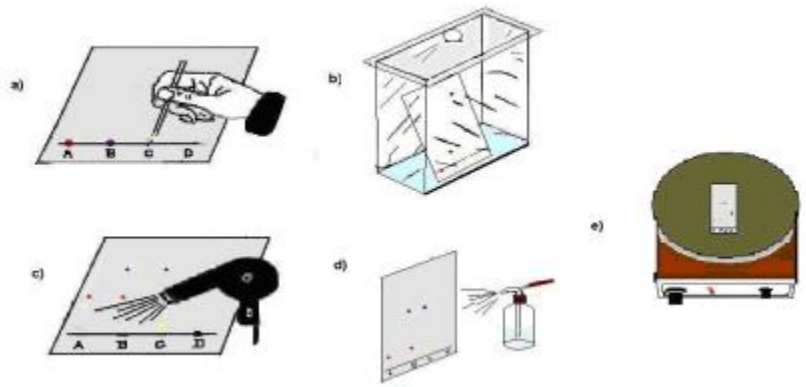


Figura 14: Esquema del proceso de Cromatografía Capa Fina a) Aplicación de la muestra en la placa. b) Cámara de desarrollo. c) Secado de la muestra. d) Revelado de un agente adecuado. e) Visualización de los compuestos por calcinación. Una vez finalizado el proceso de purificación se prosigue con la identificación de las moléculas sintetizadas, mediante técnicas físicas y espectroscópicas

Una vez preparadas las placas cromatográficas, se debe realizar la acción de *sembrar* la muestra, en donde los compuestos previamente separados por columna son depositados por medio de un capilar abierto en una línea imaginario horizontal aproximadamente a un centímetro del borde definido como inferior. Este es el lugar determinado para sembrar el analito

2. Identificación

La identificación de los compuestos aislados en esta investigación, se realizaron por los siguientes métodos físicos y espectroscópicos como:

- Método Físico:
  - Punto de fusión

- Métodos Espectroscópicos:
    - Espectroscopia de Infraoja (FT-IR)
    - Resonancia Magnética Nuclear (RMN)
    - Espectroscopia de masa (EM)

En la presente investigación, se usaron los siguientes métodos:

2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear, es una de las técnicas más potentes que se dispone para dilucidar de forma inequívoca la estructura de una molécula,esta técnica no es destructiva y se basa en la absorción de la energía en la región de radio frecuencias (4 a 900 MHz aproximadamente) por parte de los núcleos de algunos átomos, cuando se colocan éstos en campos magnéticos intensos y de alta homogeneidad [15].

El fenómeno de RMN consiste en que los núcleos de los átomos al estar girando, sus espines provocan una carga asociada a su momento magnético.Los espines nucleares se encuentran distribuidos en todas direcciones del espacio. Cuando la muestra se coloca dentro del campo magnético intenso,estos se alinean en dirección a favor o en contra, los espines que se orientan en contra del campo son de mayor energía y forman la minoría de la población, en cambio los de menor energía se orientan a favor del campo. Al aplicar energíaen el intervalo de radiofrecuencias es posible excitar a los núcleos con el estado de espín de menor energía al estado del espín de mayor energía. Esta energía es medible siempre que el experimento se realice bajo un campo de energía intenso [16].

Los núcleos que no presentan cargas magnéticas, es decir que tienen un espín igual a cero, no se pueden medir bajo esta técnica; los isótopos que tienen un espín igual a cero son aquellos que poseen número de masa par y número atómico par. Hay que tener en cuenta que cuando se realiza una medición por RMN la muestra debe estar en un disolvente inerte que no contenga núcleo de hidrógenos o bien en disolventes que se ha reemplazado los átomos

de hidrógeno por deuterio, como por ejemplo el cloroformo deuterado para eliminar interferencia de solventes.

La solución del analito se encuentra en un tubo delgado de vidrio que se coloca en el centro de una bobina de radiofrecuencias, entre los dos polos de un potente imán para poder realizar la medición. Para la determinación de los productos naturales, los núcleos generalmente observados son los más comunes en los compuestos orgánicos: ^{1}H y el isótopo ^{13}C.

a. ^{1}H RMN

El protón ^{1}H posee un espín ± ½ y debido su abundancia en la naturaleza (la cual es un 99,90%) se puede realizar un espectro con una mínima cantidadde muestra, 5 mg. Para realizar un espectro de protones hay que tener encuenta el desplazamiento químico, este consiste en que el entorno químico y electromagnético del núcleo observado se ve afectado por los átomos cercanosa él, los cuales conforman la molécula, ya que los electrones presentes pueden formar una pantalla magnética en el campo magnético aplicado. Esto se conoce como fenómeno de protección y es el causante del desplazamiento químico [17]. Debido a este fenómeno de protección, se puede observar señales más complejas con dobletes (dos picos) o tripletes (tres picos), multipletes, etc. La separación entre picos de una señal dada se llama constante de acoplamiento, se denomina con la sigla J que toma distintos valores según el caso. En conclusión, un RMN de protón, entrega la siguiente información para resolver la estructura química del compuesto:

- El número de señales y su desplazamiento químico pueden determinar los tipos de núcleos de ^{1}H químicamente diferentes que hay en la molécula.
- El área de las señales indica la cantidad de núcleos de ^{1}H de cada tipo que están presentes.
- El patrón de desdoblamiento de espín – espín proporciona informacióncon respecto al número de ^{1}H vecinos cercanos que presenten un determinado tipo de

núcleo de ^{1}H.

b. ^{13}C RMN

En el año 1957 se comenzó a estudiar por medio de la técnica de RMN el isótopo no radiactivo^{13}C, ya que el ^{12}C posee un espín igual cero el cual nopuede ser medido por el RMN. Se comenzó a utilizar esta técnica ampliamente aprincipios de los años setenta, ya que su abundancia relativa es de 1,10% en la naturaleza, por ende, ese necesita una mayor cantidad de muestra en relación al método de RMN de protón para realizar el espectro, y los instrumentos que existían en esa época no eran los suficientemente sensibles para percibir las débiles señales del mismo. La técnica del RMN ^{13}C permite determinar losnúcleos de carbono presentes en una molécula y presenta la capacidad de identificar estructuras orgánicas y bioquímicas. Las ventajas que posee el ^{13}C en comparación con el ^{1}H son las siguientes [18].

- Da información acerca de la estructura de la molécula más de su periferia.
- Tiene una menor superposición de picos, ya que el desplazamiento químico que posee el ^{13}C es aproximadamente 200 ppm que comparado con ^{1}H es de 15 ppm.

No se da el acoplamiento homo nuclear espín-espín entre los átomos de carbono, debido a que la probabilidad de encontrar átomos de ^{13}C en la misma molécula es prácticamente nula, ya que su abundancia natural es extremadamente baja.

2.2 Espectroscopia de Masas (E.M.)

La técnica consiste en lograr la ionización de la molécula en análisis, al estado gaseoso, mediante bombardeo de electrones de alta energía. El ion producido se fragmenta en otros iones (positivos en su mayor cantidad) y radicales libres mediante el esquema que se muestra a continuación

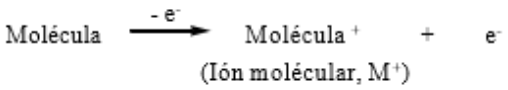


Figura 17: Esquema de Fragmentación

Los iones son conducidos hacia campos magnéticos, consiguiéndose la separación de los iones en series de haces iónicos, estos haces sontransportados a un ánodo colector, se genera una señal y de esta manera se obtiene el espectro de masa, el cual es una representación gráfica de la abundancia relativa de dichos iones frente a su relación masa/carga (m/z) [19].

El pico mayor se denomina pico base y su intensidad se toma como100%, las de los otros máximos se expresan en relación porcentual con el pico base.

No necesariamente el pico del valor (m/z) más alto, es el máximo ión molecular (M^+); pues la mayoría de los elementos se encuentran naturalmenteen forma de varios isótopos, y por lo general predomina ampliamente el más liviano, siendo más escasos los pesados [20].

El espectro de masa de una muestra en particular ayuda a establecer la estructura de una sustancia nueva de varias maneras diferentes:

- Dar un peso molecular exacto
- Indica presencia de unidades estructurales en la molécula
- Entrega una posible fórmula molecular [21]

Una desventaja de la técnica es que se trata de un método destructivo, pero que requiere de una cantidad mínima de compuesto.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Material biológico

En el trabajo experimental se utilizó la flor de la planta *Leptocarpha rivularis* DC y hojas de *Drimys winteri*. Estas especies fueron recolectadas en la ciudad de Temuco, Región de la Araucanía (coordenadas geográficas: -38.73875061214798, -72.62914566909242) y en Collipulli, sector el Amargo, Región de la Araucanía (coordenadas geográficas: -38.0898282020216, -71.82535987972145) respectivamente.

2. Reactivos

2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en los diversos procesos son:

Extracción de los compuestos	Acetato de etilo grado técnico (HES)
Cromatografía en columna	n-Hexano grado HPLC (Merck) Acetato de etilo grado HPLC (Merck)
Cromatografía en capa fina	Acetato de etilo grado cromatográfico (MERCK) Hexano grado cromatográfico (Merck) Ácido sulfúrico 95%- 97% (MERCK)

3. Equipos

3.1 Equipo de extracción Soxhlet

Método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas.

El equipo Soxhlet tiene como función recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima contenido en los cartuchos desechables.

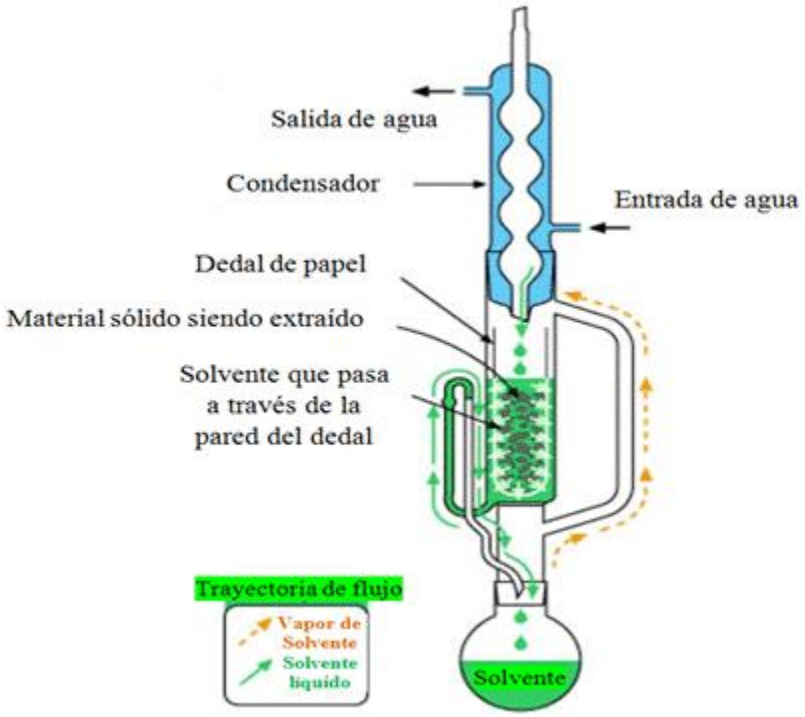


Figura 08: Equipo de extracción Soxhlet

La sustancia sólida se introduce en un cartucho poroso (generalmente hecho con papel de filtro, que permite al solvente entrar y salir reteniendo al sólido) que se coloca dentro del extractor. Se adosa un balón a dicho extractor donde se coloca el volumen de solvente que se utilizará en la extracción. Por el extremo superior del extractor se coloca un condensador. El

solvente se calienta, los vapores ascienden por el tubo externo del extractor, condensan en el refrigerante y caen dentro del extractor impregnando al sólido que se encuentra en el cartucho de papel filtro. El extractor se va llenando lentamente de líquido hasta que llega al tope del tubo y se descarga dentro del balón, ciclo que se repite automáticamente hasta que la extracción sea completa. Finalmente, el solvente de extracción se evapora, recuperando así a la sustancia deseada.

Para la extracción con el equipo Soxhlet se deben tener en cuenta: la selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación.

a. Selección del solvente

Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables:

- Capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente
- Estabilidad química en las condiciones del proceso
- Baja toxicidad e inflamabilidad
- Baja densidad
- Baja tensión superficial
- Facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto
- Bajo costo

Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. El solvente más ampliamente utilizado para extraer extractos vegetales de las plantas es el etanol.

En este trabajo se seleccionó como disolvente el acetato de etilo porque en investigaciones previas tiene eficacia para la obtención de metabolitos de interés farmacológico.

b. Características del solvente. Acetato de etilo:

El compuesto químico acetato de etilo o etanoato de etilo, es un éster que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro, altamente inflamable con punto de ebullición de 77° C y punto de fusión de -84° C.

Es miscible con hidrocarburos, cetonas, alcoholes y éteres. Poco soluble en agua y reacciona violentamente con nitratos, ácidos, álcalis y oxidantes fuertes.

c. Características de la matriz

La extracción con Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas puesto que la difusión interna puede ser el paso limitante durante la extracción. Partiendo de esto se puede decir que se necesitará un menor tiempo de extracción con una buena eficiencia si el tamaño de partícula es menor mientras que si las dimensiones de las partículas son mayores la extracción se realizará en un mayor tiempo.

d. Ventajas y desventajas de la extracción Soxhlet

Ventajas:

- Gran capacidad de recuperación e instrumentación simple.
- No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora quedando sólo el analito.
- El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio.
- El disolvente proviene de una condensación luego es líquido y está caliente. Favorece la solubilidad del analito.

Desventajas

- Es un proceso lento e imposible de acelerar.
- Se requiere gran cantidad de disolvente.
- Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.
- Necesidad de etapa final de evaporación.

- El método no depende de la matriz.
- Alto consumo de agua para refrigeración

3.2 Otros

Se utilizaron placas para cromatografía en capa fina TLC de sílica gel (Sorbtech).

Se utilizó sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) para cromatografía en columna (Merck).

4. Estudios químicos

4.1 Estudios cromatográficos

a. Fraccionamiento en columna cromatográfica (CC)

Se realizó un fraccionamiento de extractos de flor de *L. rivularis* DC, probados con cuatro solventes diferentes: Hexano, Acetato de etilo, Diclorometano y Etanol; en columna cromatográfica (6x40 cm con cabeza de 4 cm), usando como fase estacionaria sílica gel 60 de Merck (18 cm de gel de sílice) con el fin de separar las sustancias presentes en cada extracto. Como fase móvil se utilizó solventes (o mezclas de ellos) de polaridad creciente, como hexano, una mezcla de hexano y acetato de etilo.

Se usó para cada fraccionamiento los siguientes gramajes:

Solvente	Gramos (g)
Hexano	10,9 g
Acetato de Etilo	1,25 g
Diclorometano	11,5 g
Etanol	0,30 g

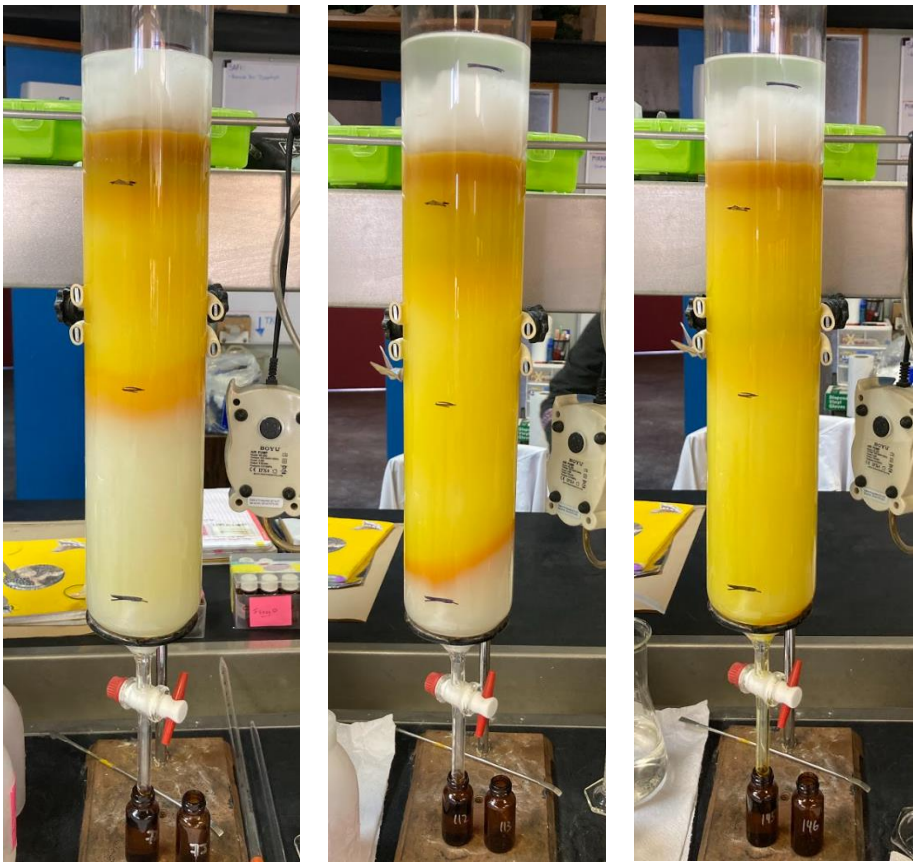


Figura 19: Columna cromatográfica; en su interior con extractos de flor de *L. rivularis* DC en hexano.

b. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (C.C.F.)

Las c.c.f. se realizaron en cromatofolios de gel de sílice 25pk de Sorbtech de 7,5 cm de ancho y 5 de alto. Como fase móvil se empleó una mezcla de AcOet y n-hex.

Se toma una muestra del extracto y se aplica en la línea base de la placa (aproximadamente a 1 cm de la parte inferior) con un capilar fino (figura 20). Luego en una cámara de vidrio con tapa se deposita la placa en una mezcla de solvente, normalmente se usa hexano – acetato de etilo, partiendo por una polaridad baja (si la muestra no se visualiza, se aumenta la polaridad), se espera a que el eluyente haya avanzado hasta más o menos 2 cm desde la parte superior de la placa y se retira con una pinza (figura 21).



Figura 20: Cromatofolios con muestra sembrada en solvente hexano.

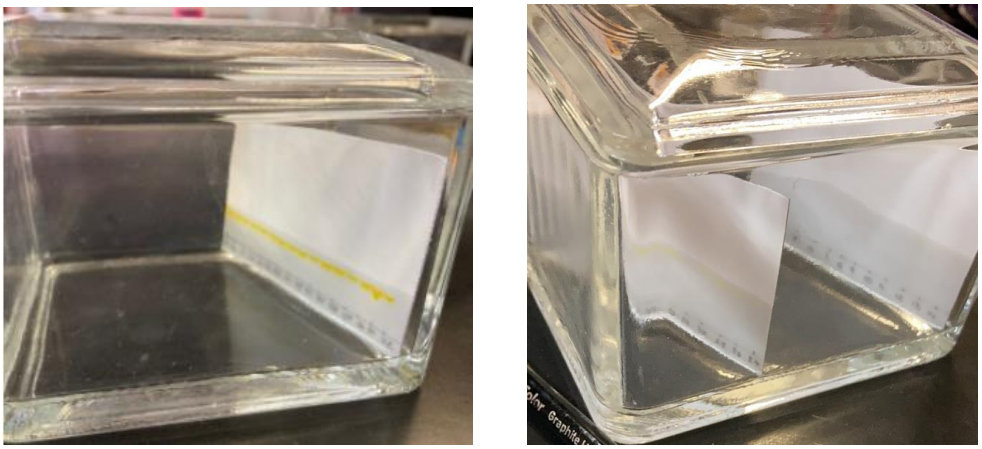


Figura 21: Cámara cromatográfica, capa fina y fase móvil.

La placa es llevada a la cámara de revelado UV y se marcan los compuestos que se logran visualizar (figura 22). Luego se introduce en ácido sulfúrico al 15% (todo esto bajo campana) y se carboniza en un calefactor para observar los compuestos que presenten coloración (figura 23).

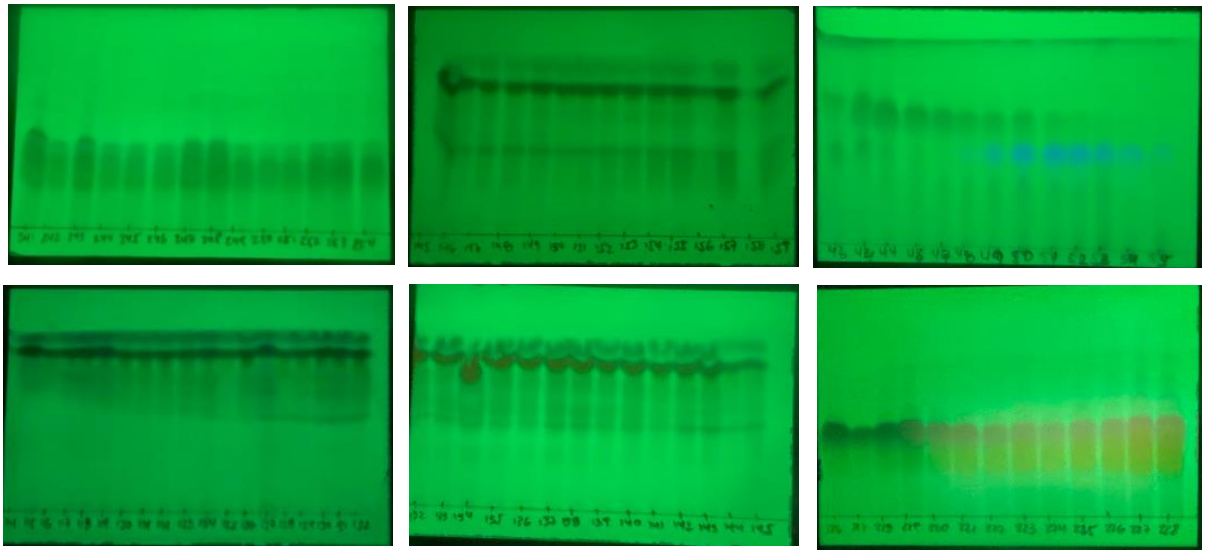


Figura 22: Capa fina bajo luz UV, muestras sembradas en Hexano.

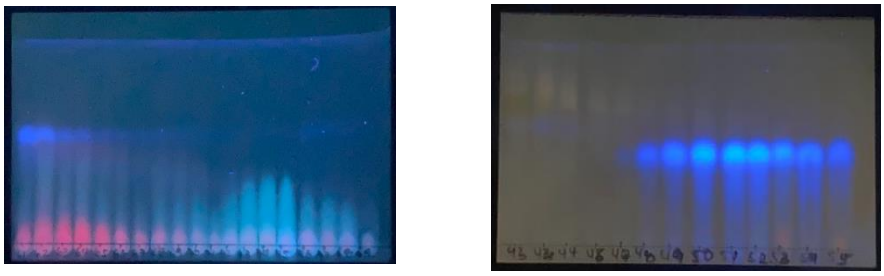


Figura 23: Capa fina bajo luz UV, muestra sembrada en Acetato de Etilo.

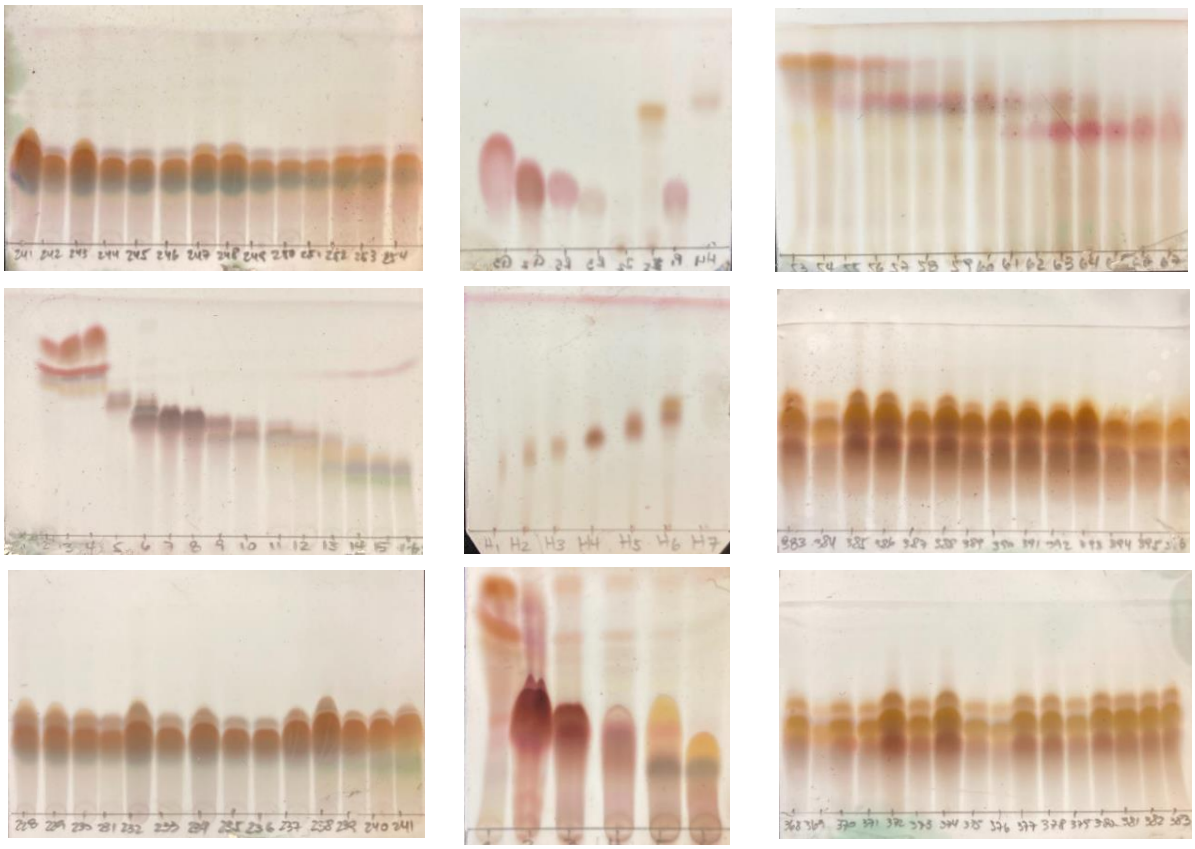


Figura 24: Capa fina carbonizada, muestras sembradas en Hexano.

4.2 Estudios físicos

a. Espectroscopia de masas (E.M.)

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

I. Análisis de aceite esencial de *Drimys wintery* Forst

a. Preparación de la muestra

Una alícuota de 10 µL de aceite esencial de canelo, obtenido por arrastre de vapor, se diluyó en 10 mL de hexano. Un µL. de esta solución fue analizada por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

b. Análisis GC-MS

El análisis se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo de gases HP 5890 acoplado a un detector de masas HP 5972 y provisto de una columna capilar HP Ultra 2 de 25 m de longitud y de 0.2 mm de diámetro interno, y de un sistema de análisis de datos. Para producir la separación cromatográfica de los compuestos presentes en el aceite, el cromatógrafo de gases fue mantenido a una temperatura de 40ºC por 4 minutos y luego programado para subir 5ºC/min hasta 300ºC. La identificación de los compuestos se efectuó por medio de una búsqueda en la biblioteca de espectros de masas. Un compuesto se consideró identificado cuando el espectro de masas del compuesto presente en la muestra y el espectro de masas proveniente de la biblioteca de espectros de masas tuvo un porcentaje de correlación mayor que 95%.

c. Resultados

En la figura 25 a se puede observar el cromatograma de gases total correspondiente al aceite esencial de canelo. En la figura 25; b, c, d, se observan zonas ampliadas del cromatograma de gases. Cada compuesto está identificado por un número, el que también aparece a la izquierda del nombre del compuesto en la Tabla 1. Los compuestos señalados como “sangrado de columna” corresponden a sustancias que son liberadas por la columna cromatográfica capilar.

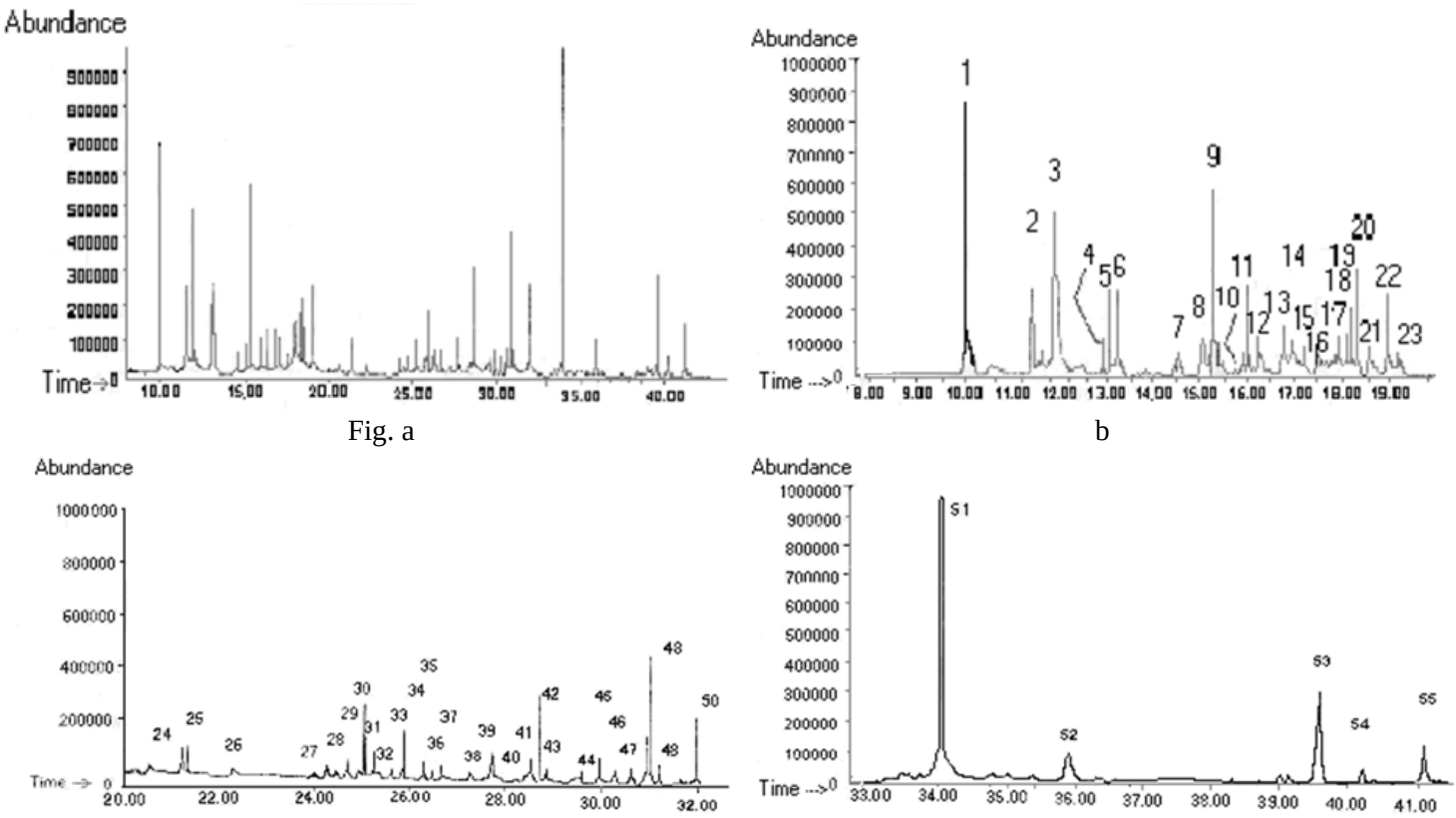


Figura 25: Cromatograma total de gases (columna capilar no polar HP Ultra 2) de un extracto de aceites esenciales de *Drimys winteri.*

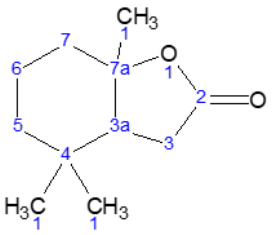
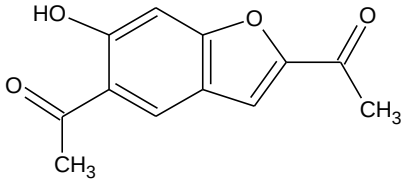
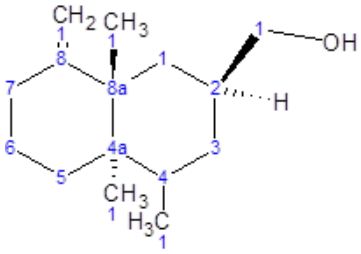
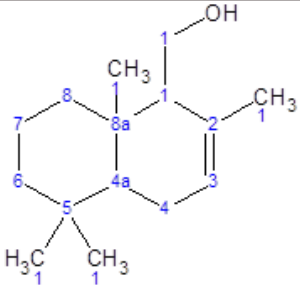
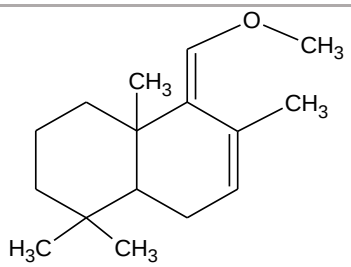
Tabla 1. Lista de compuestos identificados en aceite esencial de *Drimys Winteri*.

N° peak	Componentes principales	%Área[c]
1	α-Pineno	12.77
2	β-Pineno	3.76
3	3-Octanol	7.42
4	1-Metil-4-(1-metiletil)-benceno	1.93
5	Limoneno	2.87
6	Eucaliptol	3.32

7	Cis-5-Trimetil-5-eteniltetrahidrofuranmetanol	0.64
8	1-Metil-4-(1-metiletenil)benceno	1.41
9	3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	4.95
10	1,3,3-Trimetilbiciclo[2,2,1]heptan-2-ol	0.42
11	2,2,3-Trimetil-3-ciclopenten-1-acetaldehido	1.14
12	Alcanfor	0.77
13	2,3,3-Trimetilbiciclo[2,2,1]heptan-2-ol	0.43
14	6,6-Dimetil-2-metilenbiciclo[3,3,1]heptan-3-ona	0.76
15	Borneol	1.36
16	4-Metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-3-ol	1.67
17	2-p-Toluilisopropanol	1.19
18	2-(4'-Metil-3'-ciclohexenil)isopropanol	2.79
19	6,6-Dimetilbiciclo[3,1,1]hept-2-en-2-carboxaldehido	0.66
20	4,4,6-Trimetilbiciclo[3,3,1]hept-3-en-2-ona	2.07
21	2-Metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclohexen-1-ol	0.72
22	Acetato de bornilo	0.75
23	5-(2-propenil)-1,3-benzodioxol	0.75
24	Cis-5-Butilhidro-4-metil-2(H)-furanona	0.51
25	(4a.alfa.5.alfa.,8a.beta.,)Octahidro-4a.,5-dimetil-2(H)-naftalenona	0.55
26	Thujopseno	0.44
27	1,7-Dimetil-7-(4-metil-3-penteniltriciclo[2,2,1,0(2,6)]betano	0.48
28	Aristoleno	0.87
29	[1aR-(1a.alfa.,7.alfa.,7a.alfa.,7b.alfa.)]-1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahidro-1,1,7,7a-tetrametil-1H-ciclopropa[a]naftaleno	0.56
30	1,1-Dimetil-3-metilen-1,6,10-dodecatrieno	1.35
31	(4aS-cis)-2,4a,5,6,7,8,9,9a-octahidro-3,5,5-trimetil-9-metilen-1H-benzocicloheptено	0.75
32	4,6,6-Trimetilbiciclo[3,1,1]hept-3-en-2-ol	0.86

33	1-(1,5-Dimetil-4-hexenil)-4-metilbenceno	0.62
34	Hexahidro-4,4,7a-trimetil-2(3H)benzofuranona	0.42
35	4-Metoxi-5-(2-propenil)-1,3-benzodioxol	0.94
36	1,2,3-Trimetoxi-5-(2-propenil)benceno	0.41
37	2-[4'-Metil-4'-etenil-5'-(1-metiletenil)ciclohexil]isopropanol	0.70
38	3,7,11-Trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	2.71
39	(Z)-3-Heptadecen-5-ino	0.35
40	1,1'-(6-Hidroxi-2,5-benzofurandiil)bisetanona	4.66
41	[2R-(2.alfa.,4a.alfa.,8a.beta)]-4a-trimetil-8-metilendecahidro-2-naftalenometanol	0.90
42	1,6-Dimetil-1,5-ciclooctadieno	2.38
43	1,4,4a,5,6,7,8,8a-tetrametil-1-naftalenometanol	15.48
44	(5a.alfa.,9a.alfa.)-4,5,5a.,6,7,8,9,9a-octahidro-6,6,9a-trimetilnafto[1,2-C]furan-1(3H)-ona (isodrimenina)	3.15
45	Análogo al compuesto 51 con peso molecular 234	1.99

Tabla 2. Moléculas orgánicas de los principales compuestos de *Drimys winteri*.

N° Compuesto	Fórmula orgánica molecular	Nombre
38		4,4,7a-trimethylhexahydro-1-benzofuran-2(3H)-one
48		1,1'-(6-Hidroxi-2,5-benzofurandiil)bisetanona
49		[(2R, 4aS, 8aS)-4,4a,8a-trimethyl-8-methylenedecahydro-2-naphthalenyl]methanol
51		(2,5,5,8a-tetramethyl-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1-naphthalenyl)methanol
55		(5E)-5-(metoximetilen)-1,1,4a,6-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahidronaftaleno

II. Análisis de aceite esencial de *Leptocarpha rivularis* DC

1. Rendimiento de los extractos

El método de extracción secuencial Soxhlet fue adaptado para obtener los diferentes extractos de flor usando los siguientes solventes: Hexano (Hex), Diclorometano (DCM), Acetato de etilo (AcOEt) y Etanol (EtOH). El mayor % de extracción se logró con etanol 15.52% (w/w), seguido por hexano 6.50% (w/w), diclorometano 5.80% (w/w), y acetato de etilo 4.60% (w/w).

2. Contenido fitoquímico

Luego de la obtención de los extractos de flor, el contenido fitoquímico (i.e., contenido fenólico total, flavonoides, antraquinonas) fue medido a través de ensayos colorimétricos, como se muestra en la Tabla 3. El total de antraquinonas y flavonoides mostró una diferencia significativa en los extractos de EtOH ($p < 0.05$) por sobre los otros extractos. El contenido total de fenoles (CTF) de los extractos de flor se expresan en términos de GAE mg L^{-1} y presentados en la Tabla 3. El contenido total de fenoles en ambos extractos, Hex y EtOH, mostraron diferencias significativas entre ellos y con los otros extractos evaluados ($p < 0.05$). El CTFs fueron calculados usando la siguiente ecuación de regresión linear obtenidos a partir de gráfico estándar del ácido gálico: y = 0.001x + 0.021, r_2 = 0.998.

Tabla 3. Contenido fitoquímico de diferentes extractos de flor de *L. rivularis*

Extracto	Fenoles totales (GAE mgL^{-1})	D.S.	Flavonoides totales (QE mgL^{-1})	D.S.	Antraquinonas totales (EE mg L^{-1})	D.S.
Hex	27.8423 **a**	1.7642	70.9333 **a**	1.8986	37.8368 **a**	0.8442
DCM	41.8810 **b**	1.4569	26.4295 **b**	0.4815	10.4092 **b**	0.2330
AcOEt	47.8899 **b**	0.0449	33.8589 **b**	1.0233	12.9897 **b**	0.3568
EtOH	82.6696 **c**	5.8292	103.6202 **c**	3.9844	75.2023 **c**	1.7563

Hex: hexano; DCM: diclorometano; AcOEt: Acetato de etilo; EtOH: etanol; GAE: ácido gálico equivalente; QE: quercetina equivalente; DS: desviación estándar. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas; p < 0.05, n = 3

2.1. Actividad Antioxidante Total

La actividad antioxidante de la flor *L. rivularis* fue evaluada en una serie pruebas in vitro DPPH, FRAP, TRAP y pruebas ORAC (Tabla 4). Las pruebas de testeo DDPH mostraron que el extracto en Hexano tiene una escasa actividad ($p < 0.05$) comparado con el control positivo (trolox(t). DCM fue el extracto más activo comparado con AcOEt y EtOH, pero menos activo que T ($p < 0.05$). Las pruebas FRAP mostraron que los extractos de DCM, AcOEt y EtOH tienen mejor actividad antioxidante que los controles positivos ($p < 0.05$). Bajo TRAP, el extracto de Hex fue menos activo comparado con controles positivos (Ácido gálico (GA) y butilhidroxitolueno (BHT), $p < 0.05$)

Tabla 4. Actividad antioxidante del extracto de flor de *L. rivularis*.

Extracto	DPPH (IC_{50} mgL^{-1})	D.S.	FRAP (TEAC mM)	D.S.	TRAP (TEAC mM)	D.S.	ORAC (TEAC µM)	D.S.
Hex	4.1863 **a**	0.1834	0.3141 **a**	0.0131	0.0074 **a**	0.0022	442.57 **a**	12.21
DCM	1.8953 **b**	0.0437	0.2656 **a**	0.0145	0.0961 **b**	0.0047	932.40 **b**	38.55
AcOEt	2.4088 **c**	0.0758	0.3063 **a**	0.0081	0.1288 **b**	0.0057	1878.17 **c**	37.35
EtOH	2.8300 **c**	0.0626	0.36687 **b**	0.0277	0.0729 **b**	0.0204	744.20 d	26.61
T	0.1060 **d**	0.0050	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
GA	n.a.	n.a.	1.7200 **c**	0.0200	1.1300 **c**	1.0100	696.22 **e**	63.84
BHT	0.0600 **d**	0.0010	1.5200 **d**	0.0700	1.0600 **c**	0.0200	593.84 **f**	41.27

Hex: hexano; DCM: diclorometano; AcOEt: Acetato de etilo; EtOH: etanol; GA: Ácido gálico; BHT: Butilhidroxitolueno; (2,2 difenil-1-picril-hidrasilo-hidratato (DPPH, potencial antioxidante de reducción férrica (FRAP), capacidad antioxidante reactiva total (TRAP); capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)); IC50: representa la concentración de extractos que causan neutralización del 50% de los radicales; TEAC: capacidad antioxidante equivalente al trolox; DS: desviación estándar. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas; p < 0.05, n = 3; n.a.: no aplica.

La determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) mostró una diferencia significativa entre los extractos de AcOEt (Tabla 4), n-Hexano y EtOH, presentando los dos últimos una actividad menor. A diferencia de AcOEt que presentó mayor actividad antioxidante. Esto, sin embargo, tuvo poca correlación con el contenido de compuestos fenólicos ($r_2 < 0.5$).

2.2. Ensayo de Glutatión Reductasa

La relación de glutatión reducido/oxidado (GHS/GSSG), es un indicador de bienestar celular, con GSH reducido que constituye hasta el 98% del GSH celular en condiciones normales. La Tabla 5 muestra los resultados del estudio glutatión reductasa utilizando extractos de flor *L. rivularis* bajo los diferentes solventes analizados. Los extractos de Etanol tuvieron un significativo contenido de GSH comparado con los otros solventes, sin embargo, el contenido de GSSG fue también significativamente mayor (4 veces por sobre AcOEt, y 10 veces más que n-Hexano y DCM). Por lo tanto, el extracto de DCM tuvo la mejor ratio GSH/GSSG – significativamente más alto que otros extractos – y el menor GSH/GSSG escala de conversión.

Tabla 5. Reserva de glutatión de los extractos de flor *L. rivularis*

Extracto	GSH	GSSG	GSH/GSSG
		µMol/gDW	
Hex	1.179 ± 0.909 d	16.432 ± 3.756 c	0.062 ± 0.042 b
DCM	28.185 ± 3.385 b	22.110 ± 5.684 b	1.376 ± 0.204 a
AcOEt	11.461 ± 1.924 c	50.427 ± 5.686 b	0.224 ± 0.013 b
EtOH	86.456 ± 1.755 a	267.863 ± 9.157 a	0.323 ± 0.009 b

GSH: Glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; GSH/GSSG: ratio GSH/GSSG; gDW: gramos del extracto en seco; DCM: diclorometano; AcOEt: Acetato de etilo; EtOH: etanol; Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$: Tukey test). ANOVA.

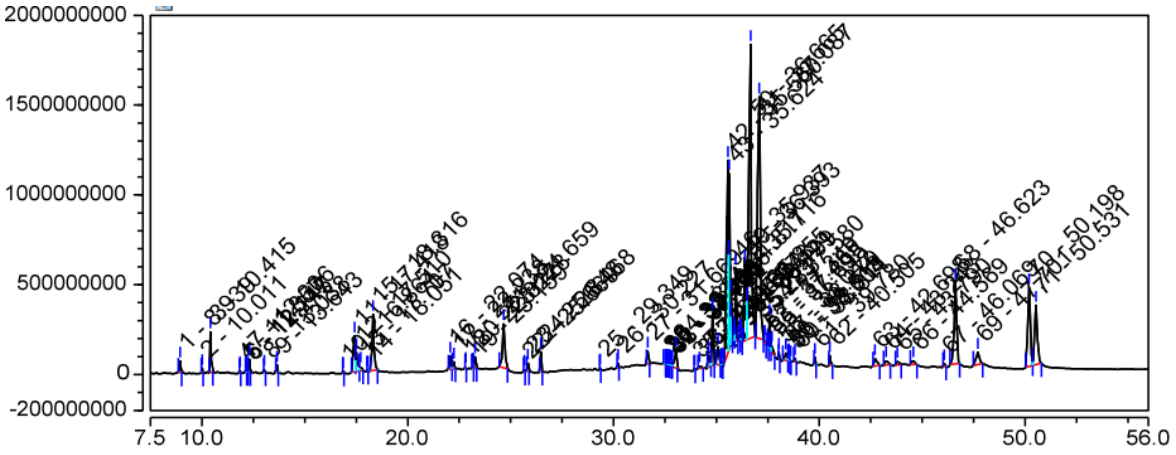
2.3. Análisis GC-MS

Los extractos florales de *L. rivularis* más activos y selectivos contra las líneas celulares de cáncer de mama y de próstata (n-Hexano, DCM, AcOEt) se analizaron mediante análisis cromatográfico (GC/MS).

Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9. El extracto de n-Hexano contenía altas cantidades de ácidos grasos y derivados, incluyendo el diterpeno 4,8,13-Duvatrieno-1,3-diol, el acetato de ß-Amirina, y el acetato de triterpeno de

ésteres de lupeol (41,44% de la composición total del extracto, ver Tabla 6). El extracto DCM tenía el diterpeno thunbergol, y los alcanos de cadena larga tetratriacontane y 1-Heptatriacotanol, y los triterpenoides ß-Amyrin acetate, lupeol acetate, y (43,47% de la composición total, ver Tabla 7). El extracto de AcOEt tenía compuestos terpénicos, entre ellos la leptocarpina, el 4,8,13-duvatrieno-1,3-diol, el esterol estigmasterol, la fenretinida (derivado diterpénico aminofénico) y el alcohol lineal 1-Heptatriacotanol (55,93% de la composición total del extracto, véase la Tabla 8.

Tabla 6. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en *n*- Hexano.

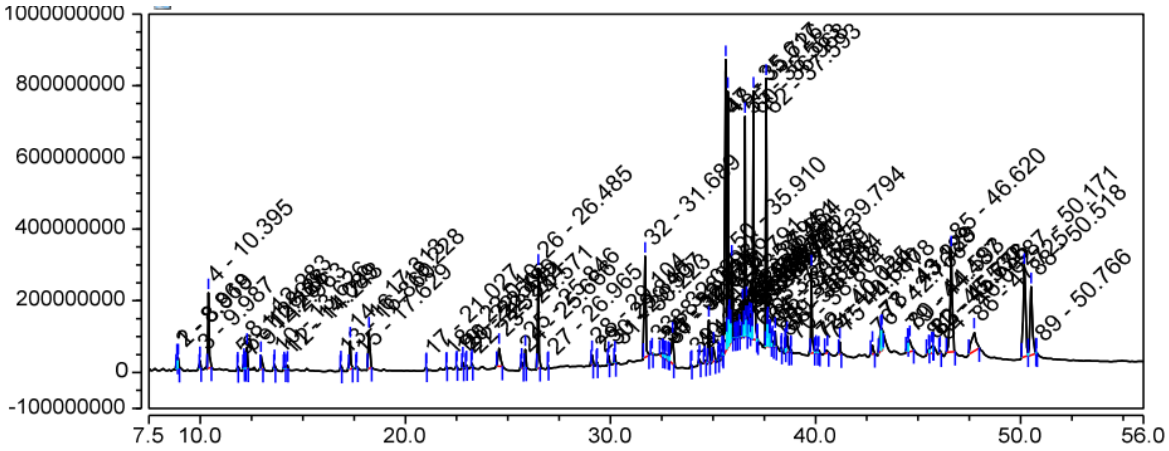


N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI[a]	RIref[b]	%Área[c]	Coincidencia	Identificación
1	8,94	Óxido de cariofileno	1534	1534	0,37	940	RI, MS
2	10,01	Elemol	1539	1537	0,11	900	RI, MS
3	10,41	Epóxido de isoaromadendreno	1580	1579	0,04	890	RI, MS
4	11,86	7-hidroxi farneseno	1582	1584	2,81	870	RI, MS
5	12,15	Paradisol	1624	1627	1,33	940	RI, MS
6	12,31	Epóxido de trans-Z-a-bisaboleno	1823	1820	0,31	850	RI, MS
7	13,64	Dehidrocostus	1865	1866	0,06	870	RI, MS

		lactona					
8	16,86	2-metil-1-hexadecanol	1888	1890	0,29	880	RI, MS, Co
9	17,51	Escopoletina	1924	1924	0,90	870	RI, MS
10	18,32	Ácido tetradecanoico	1940	2000	0,04	900	RI, MS
11	22,07	Eicosano	2000	2000	0,63	920	RI, MS
12	22,24	Ácido α-linoléico	2100	2102	0,27	920	RI, MS
13	22,81	Grosheimin	2143	2143	1,58	850	RI, MS, Co
14	23,28	(Z)-18-Octadec-9-enolida	2155	2158	0,52	950	RI, MS
15	25,67	Linolenato de glicerilo	2157	2161	0,05	880	RI, MS
16	26,46	Reynosina	2266	2266	1,35	900	RI, MS, Co
17	31,66	4,8,13-duvatrieno-1,3-diol	2397	2400	25,70	860	RI, MS
18	34,62	3-etil-5- (2-etilbutil) octadecano	2410	2413	3,89	930	RI, MS
19	34,81	Tetraneurina D	2490	2494	0,69	970	RI, MS
20	35,62	2-metilencolestán-3-ol	2650	2652	0,41	970	RI, MS
21	35,86	α-tocoferol	3149	3149	0,35	950	RI, MS, Co
22	37,69	Estigmasterol	3170	3170	0,70	940	RI, MS, Co
23	40,50	γ-sitosterol	3290	3290	0,33	930	RI, MS, Co
24	42,69	ß-amirina	3330	3337	0,35	850	RI, MS
25	43,79	ß-acetato de amirina	3333	3339	4,78	910	RI, MS
26	44,57	Acetato de lupeilo	3380	3380	10,96	850	RI, MS, Co
27	46,06	Betulinaldehído	3630	3629	0,13	820	RI, MS
28	46,62	1-heptatriacotanol	3941	3942	0,46	900	RI, MS
		Total identificado			**59,41**		
		Desconocido			**40,59**		

a RI: *índices de retención relativos a n-alcanos C8-C36 en la columna capilar HP-5 MS;* ***b RI****: índice de retención de la literatura [9]; c área de superficie del pico de GC;* ***MS****: comparación de los espectros de masas con los del NIST 14;* ***Co:*** *coelución con compuestos estándar disponibles en nuestro laboratorio*.

Tabla 7. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en DCM.



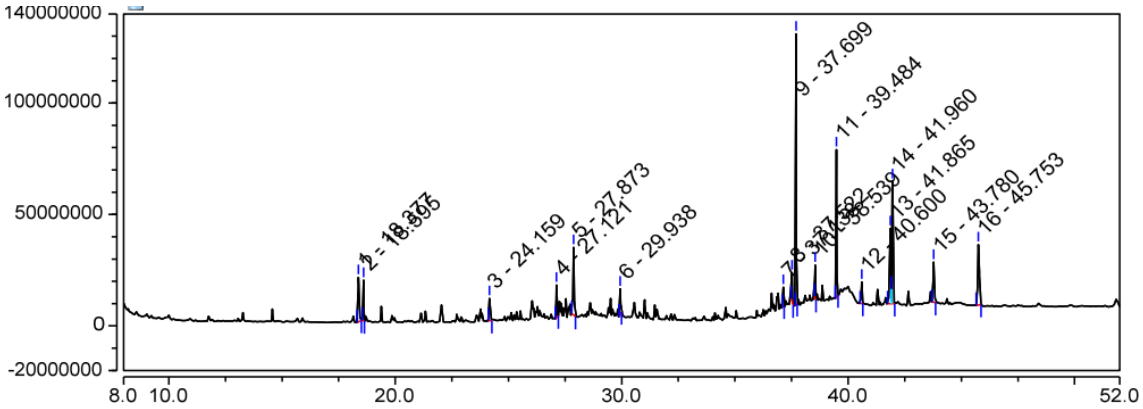
N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI[a]	RIref[b]	%Área[c]	Coincidencia	Identificación
1	8,92	Éster metílico del ácido pirúlico	1210	1217	2,50	880	RI, MS
2	9,98	10-epi-Elemol	1549	1550	0,53	900	RI, MS
3	10,39	Óxido de cariofileno	1600	1606	0,24	910	RI, MS
4	12,13	Intermedeol	1660	1675	2,94	810	RI, MS
5	12,66	Ácido tetradecanoico	1765	1770	0,07	890	RI, MS
6	13,63	Ácido tetradecanoico,	1783	1790	0,55	930	RI, MS

		éster etílico					
7	14,09	Desoxiserecialactona	1825	NF	0,30	900	RI, MS
8	14,25	Neoftadieno	1835	1836	0,15	870	RI, MS, Co
9	15,91	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1852	1855	0,20	900	RI, MS
10	16,03	Dehidrocostus lactona	1860	1866	2,76	890	RI, MS, Co
11	22,01	9-trans-metil trisporato C	2109	2100	0,51	890	RI, MS, Co
12	22,51	Linolenato de glicerilo	2174	2160	0,06	860	RI, MS
13	23,25	5α, 6α-Epoxi-3β, 17-dihidroxi-16αmetilpregnan-20-ona	2189	2189	0,71	850	RI, MS
14	25,66	(Z) -18-Octadec-9-enolida	2190	2208	2,57	980	RI, MS
15	26,48	Reynosin	2260	2266	1,05	860	RI, MS, Co
16	29,10	9-tricoseno, (Z)	2270	2299	0,80	870	RI, MS
17	29,90	Tricoseno	2330	2300	3,85	970	RI, MS
18	31,68	2 - [(Z) -9-octadeceniloxi] etanol	2330	2336	0,36	870	RI, MS

19	32,67	3-etil-5- (2'-etilbutil) octadecano	2410	2413	0,34	940	RI, MS
20	33,95	Thunbergol	2500	2498	8.82	940	RI, MS
21	23,18	2-metilencolestán-3-ol	2650	2652	1,15	920	RI, MS
22	36,05	Triacontano	3000	3000	4,36	870	RI, MS
23	36,34	ß-Amirina	3315	3337	0,43	940	RI, MS
24	36,96	α-Amirina	3360	3376	0,98	940	RI, MS
25	37,59	Tetratriacontano	3400	3400	6,39	860	RI, MS, Co
26	44,48	ß-acetato de amirina	3430	3437	6,43	910	RI, MS
27	44,59	Lupeol	3494	3486	0,25	930	RI, MS, Co
28	45,43	Acetato de lupeilo	3530	3525	14.96	900	RI, MS
29	45,67	Betulinaldehído	3743	3760	0,70	900	RI, MS
30	46,62	1-heptatriacotanol	3940	3942	6,71	880	RI, MS, Co
31	46,62	Éster 3-(octadeciloxi) propílico del ácido oleico	4100	4149	0,76	850	RI, MS, Co
		Total identificado			**72,43**		
		Desconocido			**27,57**		

a RI: *índices de retención relativos a n-alcanos C8-C36 en la columna capilar HP-5 MS;* ***b RI****: índice de retención de la literatura [9]; c área de superficie del pico de GC;* ***MS****: comparación de los espectros de masas con los del NIST 14;* ***Co:*** *coelución con compuestos estándar disponibles en nuestro laboratorio*.

Tabla 8. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en AcOEt.

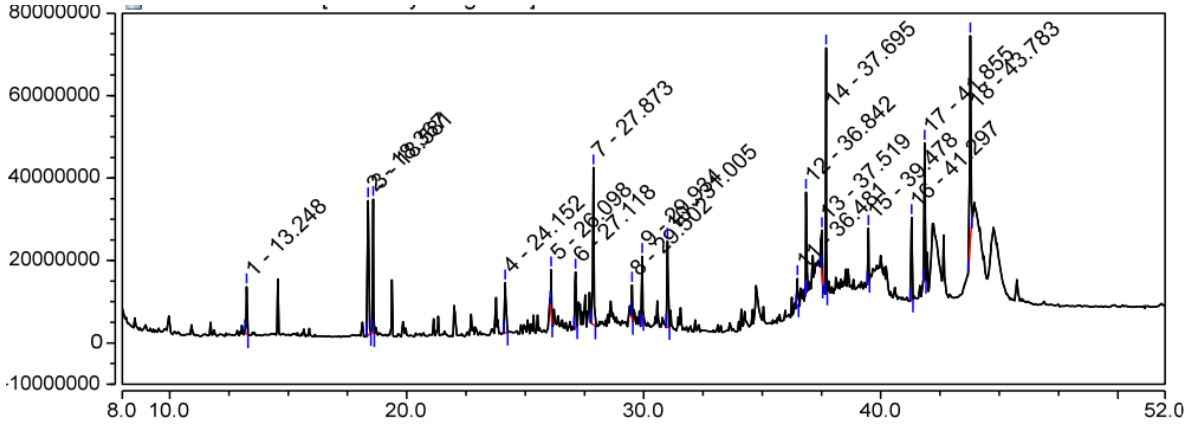


N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI[a]	RIref[b]	%Área[c]	Coincidencia	Identificación
1	9,575	Tujona	1095	1089	6,46	927	RI, MS, Co
2	12,750	Acetato de isopentenilo	1196	1200	2,87	950	RI, MS
3	13,215	Acetato de trans-Sabinilo	1265	1264	4,01	934	RI, MS
4	18,110	Intermedeol	1660	1667	3,44	949	RI, MS
5	18,234	6-epi-Shyobunol	1883	1881	3,59	953	RI, MS
6	18,450	Eicosano	2000	2000	2,87	989	RI, MS
7	18,610	Geraniol linalool	2040	2046	2,08	910	RI, MS
8	19,85	Leptocarpina	2050	2050	3,46	967	RI, Co

9	20,120	4,8,13-duvatrieno-1,3-diol	2395	2400	6,20	960	RI, MS
10	21,250	Linalol	2486	2491	2,26	899	RI, MS, Co
11	21,590	2-metilencolestán-3-ol	2651	2652	2,32	956	RI, MS
12	42,06	Estigmasterol	3140	3142	24,02	940	RI, MS, Co
13	42,70	Fenretinida	3290	3289	13,76	930	RI, MS, Co
14	43,86	1-heptatriacotanol	3938	3942	8,49	900	RI, MS
		Total identificado			**85,83**		
		Desconocido			**14,17**		

a RI: *índices de retención relativos a n-alcanos C8-C36 en la columna capilar HP-5 MS;* ***b RI****: índice de retención de la literatura [9]; c área de superficie del pico de GC;* ***MS****: comparación de los espectros de masas con los del NIST 14;* ***Co:*** *coelución con compuestos estándar disponibles en nuestro laboratorio*.

Tabla 9. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en Etanol.



N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI[a]	RIref[b]	%Área[c]	Match quality	Identificación
1	13,48	Tujona	496721	1089	2,92	897	RI, MS
2	18, 367	Ácido acético 3-metil-6-oxo-hexano-2enil Ester	1465424		8,61	871	RI, MS
3	18,581	(1S,3S,5S)-1-Isopropil-4-metileno	1231435		7,23	939	RI, MS
4	26,098	Óxido de cariofileno	379781	1572	2,23	881	RI, MS
5	27,118	Benzofenona	682710	1217	4,01	917	RI, MS
6	27,873	(1S,4aS,7R,8aS)-1,4-Dimetil-7-(prop-1-en-2-il)decahidronaftalen-1-ol	2111848		12,40	950	RI, MS
7	37,695	Ácido carbónico, eicosil vinil ester			8,37	823	RI, MS
8	39,478	Tetracosano		3212	2,47	846	RI, MS

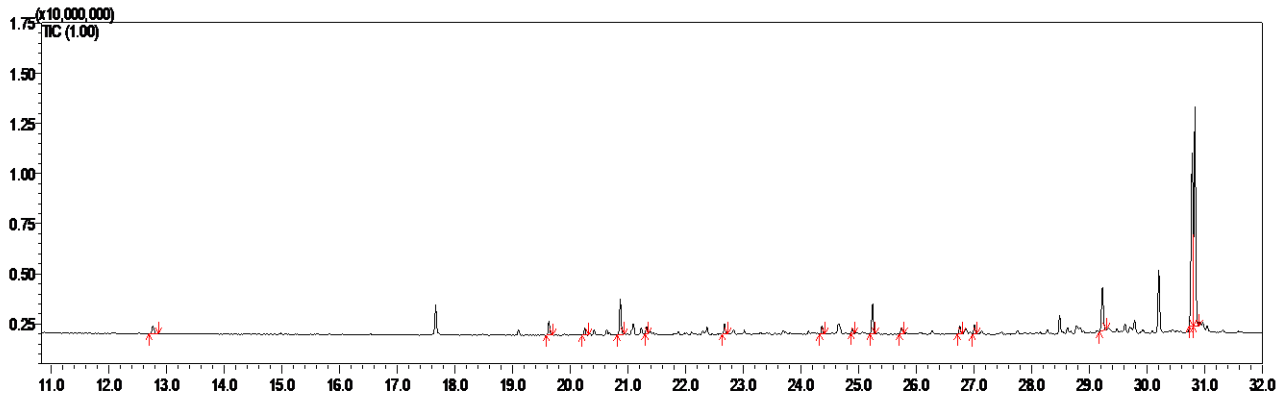
Total identificado	48,24
Desconocido	

a RI: *índices de retención relativos a n-alcanos C8-C36 en la columna capilar HP-5 MS;* ***b RI****: índice de retención de la literatura [9]; c área de superficie del pico de GC;* ***MS****: comparación de los espectros de masas con los del NIST 14;* ***Co:*** *coelución con compuestos estándar disponibles en nuestro laboratorio*.

2.4. Resultados GC-MS a partir de columnas cromatográficas

Los resultados que se muestran en la Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12 a continuación fueron obtenidos a través de columnas cromatográficas.

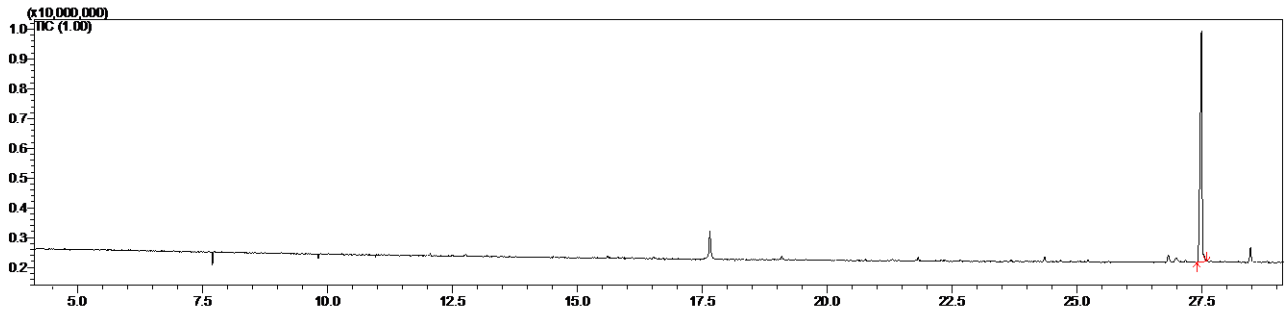
Tabla 10. Extracto en hexano. I5



	Tr (min)	IRe	IRt	Area%	Componentes principales	Match	Referencia
1	12,764	1295	IRNR	1,69	Ácido acético, 3-metil-6-oxo-hex-2-enil éster	95	Espectro MS
2	19,632	1753	1741	2,11	Farnesol	86	Fagan, Kepner, etal., 1982
3	20,249	1800	1800	0,88	Octadecano	94	Patrón de alcanos
4	20,868	1850	1846	5,31	Acetato farnesil	86	Bousaada Ammar, et al., 2008

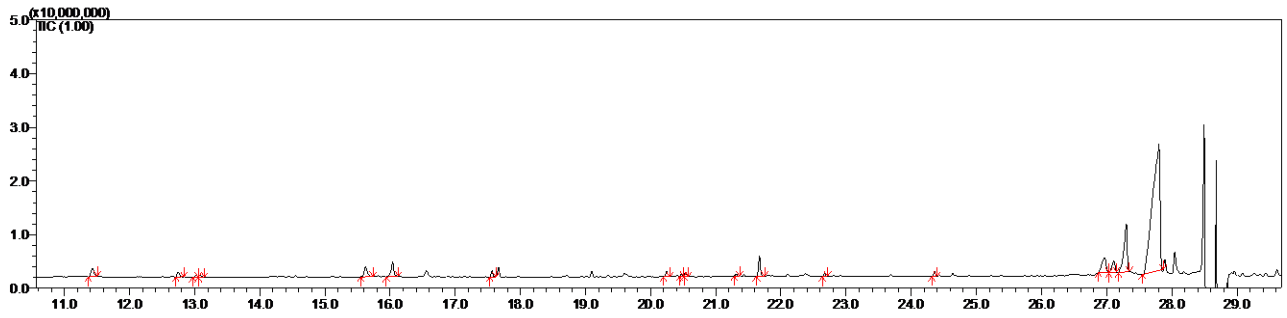
5	21,322	1887	1886	0,95	1-hexadecanol	94	Saidana, Mahioub, et al., 2008
6	22,675	2000	2000	1,56	Eicosano	92	Patrón de alcanos
7	24,893	2200	2200	0,62	Docosano	95	Patrón de alcanos
8	25,241	2235		4,76	Alcohol NI	83	
9	25,746	2284		1,07	Alcohol N	77	
10	26,752	2383		1,25	Terpeno NI	97	
11	27,006	2409	2398	1,42	Ácido hexanodioico bis(2-etilhexil) éster	95	Andriamaharavo, 2014
12	29,224	2647	IRNR	8,42	Kauran-18-al,17-acetiloxi, 4-beta	82	Espectro MS
13	30,781	2826	2963	32,11	Oxirano, 2,2 dimetil-3-(3,7,12,16,20-pentametil-3,7,11,15,19-heneicosapentaenil)-, (all-E)-	82	Andriamaharavo, 2014
14	30,829	2832		36,66	NI		

Tabla 11. Extracto en Hexano T1



	Tr (min)	IRe	IRt	Area%	Componentes principales	Match	Referencia
1	27,488	2460	IRNR	100,00	1,3-bis-(2-ciclopropil,2-metilciclopropil)-but-2-en-1-ona	79	Espectro MS

Tabla 12. Extracto en Acetato de Etilo F63- 64



	Tr (min)	IRe	IRt	Area%	Componentes principales	Match	Referencia
1	11,431	1225	IRNR	1,81	4-(1-hidroxietil) gamma butanolactona	95	Espectro MS
2	12,742	1294	IRNR	0,77	Ácido acético, 3 metil-6-oxo-hex-2-enil ester	86	Espectro MS
3	13,019	1310	IRNR	0,34	Ciclohexano, 3-acetoxi-4-(1-metiletil)-1-metil	94	Espectro MS
4	13,079	1313	1341	0,42	2-oxabiciclo [2.2.2]octan-6-ol,1,3,3-trimetil acetato	86	Radulovic, Dordevic, et al. 2010
5	15,622	1469	IRNR	2,24	Benzaldeido, 2-hidroxi-4-metil	94	Espectro MS
6	16,039	1496	IRNR	2,76	Formamida, N-(2-feniletil)	92	Espectro MS
7	17,564	1600	1600	0,77	Hexadecano	95	Espectro MS + kovats index
8	20,245	1800	1800	0,82	Octadecano	83	Espectro MS + kovats index
9	21,316	1885	1883	0,24	1-hezadecanol	77	Hazzit, Baaliouamer, et al., 2006
10	22,670	2000	2000	0,37	Eicosano	97	Espectro MS + kovats index
11	26,967	2404	IRNR	4,27	6,9,12,15-ácido docosatetranoico, metil ester		Espectro MS

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

El Canelo (*Drimys winteri*) es un árbol perenne que habita gran parte del territorio de Chile, nuestro grupo de investigación ha desarrollado el análisis del aceite esencial de corteza por soxhlet. Se identificaron 55 compuestos en el aceite esencial de *D. winteri*, que representan el 96% de la composición total del aceite total del aceite. Los hidrocarburos monoterpénicos, con 12 compuestos identificados, casi alcanzaron el 17% (16,74 ± 2,42), entre ellos el p-cimeno sólo alcanzó el 0,08 en una muestra, detectándose en las otras dos como trazas (<0,08) dos como trazas (<0,03%). Los porcentajes más elevados correspondieron a γ-terpineno (3,30 ± 0,20), sabineno (2,97 ± 0,68), β-pineno (2,68 ± 0,58), limoneno (2,46 ± 0,48) y α-terpineno (1,70 ± 0,19). Se observaron diferencias sustanciales en los monoterpenos oxigenados entre las dos especies analizadas.

Esta fracción (13,95 ± 1,23), representó el segundo grupo más importante en el aceite esencial de *D. winteri*, con terpinen-4-ol (11,56 ± 1,06) seguido de α-terpineol (1,61 ± 0,11) como principales compuestos. En excepción del 1,8-cineol, cis y trans-sabineno hidratado, linalol, terpinen-4-ol y α-terpineol, que se identificaron en ambos aceites esenciales, los monoterpenos oxigenados encontrados en *P. boldus* no se detectaron en el aceite esencial de *D. winteri*.

Por otra parte, estudios recientes reportan la presencia de compuestos terpenoides mono, sesquiterpenos y diterpenos en el aceite esencial de Canelo. Los resultados obtenidos por estos investigadores mostraron que en el aceite esencial de *D. winteri* caracterizado por análisis CG-MS tenía un total de 5 compuestos principales identificados, 4 sesquiterpenos (β -Cariofilen Elemol, γ-Eudesmol, α-Eudesmol) y 1 diterpeno (Kaurene). Entre ellos los más abundantes γ-Eudesmol en un 39,7%, β -Cariofileno en un 33,7% y Elemol 25,9%. Mientras que los menos abundantes son Kaureno en un 0,4% y α- Eudesmol en un 0,3%.

Los aceites esenciales (AE) ofrecen una plétora de bioactividades, como propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antiproliferativas. La actividad antiproliferativa está relacionada con la apoptosis, la necrosis, la detención del ciclo celular y la disfunción de los

principales orgánulos celulares (Sharifi-Rad et al., 2017). Se ha informado de que los AE pueden inhibir la proliferación y la viabilidad de las células tumorales a bajas concentraciones. proliferación y viabilidad de las células tumorales a bajas concentraciones, mientras que las células epiteliales no tumorales no se ven afectadas (Sharma et al.,2022).

Los resultados muestran que DW_EO ejerce un efecto inhibidor sobre la proliferación y viabilidad en líneas celulares epiteliales tumorales humanas de mama y riñón (MDA-MB-231 y MCF7; ACHN y Casi-1 respectivamente). Estos resultados concuerdan con los de varios autores, que informan de efectos similares de los aceites esenciales de la misma especie vegetal (Montenegro et al., 2014; Russo et al., 2019) y otros miembros de la familia Winteraceae (Allouche et al., 2009). El efecto citotóxico selectivo de DW_EO no afectó a las líneas celulares epiteliales humanas no tumorales MCF10A (mamaria) y HK-2 (renal), que presentan una actividad proliferativa normal. En cuanto a la proliferación y viabilidad de estas células, se observa que los aceites poseen un efecto citotóxico selectivo que puede estar relacionado con la baja actividad metabólica de estas células en comparación con líneas celulares tumorales humanas con una actividad metabólica aumentada, no las afectaron. Los resultados obtenidos para la toxicidad de DW_EO mostraron una baja toxicidad frente a *C. elegans*, similares a los recomendados en estudios de *C. elegans* (1 mg/mL) (Dal Forno et al., 2019). [23]

Por otra parte, los fenoles, antraquinonas y flavonoides presentes en las flores *L. rivularis* fueron evaluadas. Los compuestos fenólicos son importantes debido a sus múltiples propiedades farmacológicas. Estas clases actúan de manera general como antioxidantes naturales debido a sus habilidades de disminuir el oxígeno, realizar reacciones redox y formar quelantes con los metales presentes. Este extracto de planta es rico en compuestos fenólicos que usualmente son asociados a un abundante rango de beneficios terapéuticos y psicológicos. Las antraquinonas son una importante clase de productos naturales encontrados en varias especies, mostrando notables propiedades bioactivas, incluyendo actividad anticancerígena, antitumoral, antinflamatoria, antiartrítico, antifúngico, antibacterial y antimalarial, entre otras. Adicionalmente, varios tipos de flavonoides pueden

promover la apoptosis en células cancerígenas; quercetina, un flavonol, ha sido reportado como una sustancia anticancerígena contra cáncer de próstata y mamas. Otro estudio, con el flavonol Gliricidina7-O-hexosida y Quercetin-7-O-rutinoside obtenidos desde un helecho (*Asplenium nidus*), reporta su potencial quimiopreventivo contra células cancerígenas hepáticas (hepatoma) humanas Hepg2 y células carcinoma humano HeLa [11].

Los ensayos DPPH, FRAP, TRAP y ORAC indicaron que los extractos de flor de *L. rivularis* son una fuente potencialmente rica en antioxidantes naturales. Si bien los extractos en etanol fueron una buena fuente de fitoconstituyentes, con una cantidad elevada de fenoles, flavonoides y antraquinonas comparados con otros de los extractos testeados, los resultados experimentales no confirman la actividad antioxidante esperada. Es posible que la diferencia de polaridad de los extractos pueda contener diferentes componentes antioxidantes de variada reactividad como fue determinada por los cuatro modelos in vitro utilizados en este trabajo. De hecho, el extracto de DCM mostró la actividad más potente de captura de radicales libres, sugiriendo que los compuestos con la mayor actividad de eliminación de radicales libres en esta especie son mediana polaridad. Además, la capacidad de captación de radicales libres del extracto puede estar relacionada con la presencia y la naturaleza de los electrones de las moléculas contribuyentes y su capacidad de transferencia y donación de hidrógeno, incluyendo: intermedeol, que es un sesquiterpeno eudemanetipo con actividad antiproliferativa en las células de leucemia promielocítica HL-60 asociadas con ambas diferenciaciones y efectos de inducción apoptótica; la lactona-dehidrocostus, ha mostrado presentar una potente actividad antioxidante que protege osteoblastos de antimicina A, induce el daño celular vía activación de la PI3K/Akt/CREB; y metil purivato, quien protege células neuronales a través de sus acciones antioxidantes en la mitocondria. También debería considerarse, que los niveles de antioxidantes, así como los efectos sinergísticos que ocurren entre ellos y otros constituyentes de la planta, puede influenciar diferencias en la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas. En este camino, glutatión es el principal tiol con menor peso molecular en la mayoría de los extractos de planta, detectado en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, apoplastos y vacuolas de diferentes especies de plantas y aislable de todo el extracto del tejido de la planta. Las plantas necesitan glutatión o g-glutamilcisteína

que contienen homólogos para sobrevivir. Los roles del glutatión incluyen desintoxicación de xenobióticos, bioquímica antioxidante y homeostasis redox, bajo situaciones normales y de estrés, constituyendo uno de los principales sistemas celulares antioxidantes con otras defensas antioxidantes (polifenoles, flavonoides, tocoferoles y ascorbato) para eliminar el oxígeno reactivo y especies nitrogenadas. En plantas, bajo condiciones fisiológicas sin estrés, tejidos tales como las hojas mantienen proporciones medibles de GSH:GSSG de al menos 20:1. En general, nuestros resultados muestran un ratio menor de GSH/GSSH, dado que las flores fueron cortadas y después secadas, y por ende, el daño mecánico al que se somete la planta induce una rápida liberación y activación de peroxidasas apoplásticas y un estallido oxidativo de especies reactivas de oxígeno (ROS), excediendo la capacidad de defensa antioxidante de los sistemas por la regularización al alza de genes de peroxidasa, siendo el glutatión el electrón dador a los glutationes peroxidasas en la reducción de hidroperóxidos [11].

Por otra parte, este trabajo de investigación ha podido ser aplicado en las siguientes investigaciones

Una investigación previamente realizada por los autores, encontraron que *Leptocarpha rivularis* DC contiene gran porcentaje de lactonas sesquiterpenas (SQL), siendo leptocarpin el mayor componente de los extractos de hoja y tallo, y exhibió una actividad citotóxica significativa con el cáncer en líneas celulares con IC_{50}, valores de 4.5, 3.8 y 3.1 µM contra líneas celulares PC-3, HT.29 y MCF-7 respectivamente, y valores SI entre 2.9 y 4.9; ningún reporte anterior ha proveído de una descripción completa del extracto de flor de *leptocarpha rivularis* DC y su composición, capacidad antioxidante y efectos citotóxicos contra líneas celulares cancerígenas. En efecto, el análisis por GC-MS de los extractos de flor han mostrado la presencia de lactonas sesquiterpenas y otros compuestos con actividad antitumoral, tal como lactona-dehidrocostus y reysosin, deoxisericealactona, tetraneurin D, óxido de cariofileno, escopoletin y tujona [24].

La lactona-deshidrocostus posee una diversa actividad biológica, incluyendo actividad antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena. Investigaciones han asociado la actividad

anticancerígena de la lactona-deshidrocostus a la inhibición de células proliferativas cancerígenas e inducción de apoptosis de células cancerígenas, inhibición de la migración, angiogénesis e invasión. La inducción de la apoptosis está asociada con el incremento proteico, una reducción en la membrana potencial mitocondrial y la libración del citocromo C, desencadenando las vías intrínsecas de apoptosis y/o la activación de caspasas. Por su parte, el óxido de cariofileno posee potentes propiedades anticancerígenas, reduciendo los niveles de proteínas procáncer e inhibidores de apoptosis (bcl-2, bcl-xL, IAP-1, IAP-2) e incrementando los niveles de aquellos con propiedades proapoptoticas. Otra, α-tujona y β-tujona han sido usadas para el tratamiento de numerosas enfermedades debido a su actividad antioxidante y efectos antitumoral, los cuales muestran un descenso significativo en la viabilidad celular, internucleosomal de la fragmentación del ADN, la permeabilidad de la membrana mitocondrial y un incremento en la generación de ROS, y en la libración de citocromo C y activación de las caspasas-3. Otra, Reinosin ejerce un efecto hepato-protector contra la apoptosis inducida por tioacetamida y el daño en el ADN hepacelular en ratones vivos. Los experimentos in vivo demostraron niveles de aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa están disminuidos en ratones tratados con reinosin. Adicionalmente, estudios biológicos en roedores en un sistema modelo para la enfermedad de Parkinson demostraron efectos neuroprotectores de reinosin contra la muerte celular inducida por dopamina. Así también, escopoletina, también presente en el extracto, es una cumarina presente in diferentes especies de plantas que poseen propiedades anticancerígenas induciendo la detención del ciclo celular y la activación de la caspasa-3 en líneas celulares para cáncer de páncreas, mientras induce la escisión de PARO y la fragmentación del ADN en células promieloleucémicas HL-60 que conduce a la apoptosis; y es capaz de mejorar el sistema de defensa neuronal y proteger el cerebro de la rotenona inducida por el estrés oxidativo de la enfermedad de Parkinson [24].

Leptocarpin exhibe significante actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas y selectividad index (SI) en valores entre 2.9 y 4.9. Sin embargo, y aunque es abundante en flores, leptocarpin es sólo extraída por EtOAc, lo que indica que el efecto antitumoral de los

extractos no se limita a la presencia de leptocarpin, sino a la existencia y naturaleza de las moléculas que contribuyen a las diferentes actividades biológicas. Así, la actividad antitumoral de los extractos de flores de *L. rivularis* en las células de cáncer gástrico es probablemente un efecto sinérgico causada por los compuestos más abundante de los extractos. Además, otros estudios han demostrado que algunos de estos compuestos (lactona-dehidrocostus y tujona) inducen apoptosis. Por su parte la lactona-dehidrocostus posee varias actividades biológicas, incluyendo actividades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Investigaciones han asociado la actividad anticancerígena de la lactona dehidrocostus a la inhibición de la proliferación de células cancerígenas y la inducción de apoptosis en las células cancerígenas, la inhibición de migración e invasión, y la inhibición de la angiogénesis. Por otra parte, alfa tujona y beta tujona han sido usadas para el tratar diferentes enfermedades debido a su actividad antioxidante. "Fenretinide" es un ácido retinoico análogo que exhibe variada actividad antitumoral en estudios preclínicos y clínicos en diversos tipos de cáncer. Finalmente, otro compuesto abundante en estos extractos, son los triperpenos α y β acetato amirin, son reconocidos compuestos citotóxicos. Otros procesos celulares relacionados con la agresividad tumoral son la capacidad de migración y de invasión que permiten a las células tumorales llegar a tejidos distantes. Los efectos sobre migración e invasión han sido descritos por algunos de los compuestos mencionados previamente en estos extractos, por ejemplo, la lactona-dehidrocostus y acetato de lupeilo. En el caso de la angiogénesis, un proceso clave que permite el crecimiento tumoral, la tujona y acetato de lupeilo inhiben este proceso in otras líneas cancerígenas. Por supuesto, el esparcimiento celular y la neovascularización son procesos fisiológicos en tejidos adultos que requieren reparación celular. En este punto es relevante, dado que los parámetros de migración e invasión fueron también afectados en cierta medida en GES-1 normales en células gástricas. Por lo tanto, no podemos excluir la posibilidad que estos extractos eventualmente pudieran alterar funciones fisiológicas relevantes [24].

Lo encontrado en nuestro estudio provee evidencia que los extractos de flor de *L. rivularis* en DCM, EtOAc y Hex muestran un efecto antitumoral en líneas celulares derivadas de cáncer gástrico, apuntando a los procesos relevantes requeridos para el crecimiento y la

diseminación del tumor, como la clonogenicidad, senescencia, invasión, migración y angiogénesis. Tales efectos pueden atribuirse a la combinación de los compuestos bioactivos presentes en estos extractos; sin embargo, es necesaria mayor investigación para poder establecer un rol de una molécula en particular para determinar si este efecto ocurre de manera sinérgica [24].

Estudios fitoquímicos previos de esta planta mostraron la presencia de sesquiterpenos y dentro de ellos, el compuesto activo principal es la heliangolido leptocarpa, el cual es un inhibidor de NF-kappa B y posee actividad citotóxica contra células cancerígenas.

El palo negro también es una fuente de compuestos lipofílicos presentes en su aceite esencial llamados alfa tujona, beta-cariofileno y óxido cariofileno, los cuales se cuantifican en mayor proporción en sus hojas y son responsables de la actividad antioxidante de la planta. Sin embargo, no se han reportado propiedades químicas en el extracto en base hídrica (infusión, la forma medicinal de injesta).

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN

El presente estudio ha examinado y analizado los aceites esenciales de *D. winteri* Forst y extractos florales de *L. rivularis* dos especies medicinales de Chile. Ambas especies proporcionaron aceites esenciales y extractos ricos en compuestos oxigenados, los monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados de *D. winteri* (55,65-60,37%). Los resultados corroboraron estudios previos que sugieren que un alto porcentaje de monoterpenos oxigenados está correlacionado con una potente actividad biológica.

Estos resultados tienen un potencial para la industria fitofarmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de patologías debido a los fitoconstituyentes encontrados.

REFERENCIAS

[1] Montenegro I, Estudio comparativo de actividades biológicas para metabolitos secundarios y derivados sintéticos desde *Drimys winteri* Forst, Universidad Técnica Federico Santa María, Universidad de Valparaíso, noviembre 2013.

[2] Flora Chilena [Internet]. Www6.uc.cl. [citado el 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: http://www6.uc.cl/sw_educ/agronomia/herbario/plano/html/flora.html

[3] Osorio J, Estudio químico bioguiado del exudado resinoso de *Escallonia illinita* Potencial fuente de moléculas antioomicetos, Universidad Técnico Federico Santa María, 2015.

[4] Ávalos García A, Pérez-Urría Carril E, Metabolismo secundario de las plantas, Departamento de biología general (fisiología vegetal). Facultad de biología. Universidad complutense, Madrid, 119, 2009.

[5] Ocares Cerón M, Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli y Salmonella spp*, Universidad Austral de Chile, 2012.

[6] Ruiz Giraldo M, Susunaga Susunaga C, Actividad antimicrobiana presente en partes aereas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens (*Burseraceae*), frente a microorganismos como: Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium oxysporum, Trichoderma viride y Botrytis cinere, 2000.

[7] J. F. Barreto B., Antimicrobinaos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aureginosa* causantes de enfermedades de la piel, Pontificia Universidad Javierana, 1997.

[8] X. Dominguez, Métodos de Investigación Fitoquímica, *Editor. Limusa S.A.*, p. 281, 1973.

[9] Jeffrey, C, Compositae: Introduction with key to tribes. in Families and Genera of Vascular Plants, vol. VIII, Flowering Plants, Eudicots, Asterales (J. W. Kadereit and C. Jeffrey, eds.), 2007, Berlin.

[10] C. Cordero, Propagación vegetativa de *Leptocarpha rivularis* Dc Especie Nativa de uso Medicinal, Taller de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2000.

[11] Montenegro I, Moreira J, Ramírez I, Dorta F, Sánchez E, Alfaro JF, Valenzuela M, Jara-Gutiérrez C, Muñoz O, Alvear M, Werner E, Madrid A, Villena J, Seeger M. Chemical Composition, Antioxidant and Anticancer Activities of *Leptocarpha rivularis* DC Flower Extracts. Molecules. 2020 Dec

[12] Negrín Morales G. Lactonas sesquiterpénicas de origen natural que inducen apoptosis y la activación de la vía MAPK en líneas celulares tumorales humanas, 2013.

[13] Flores S, Hemisintesis de oxialquilchalconas y su eficacia como agentes anti-oomicete para el control de Sapralegnia parasítica, Universidad de Playa Ancha, 2015.

[14] Galagovsky L., Química Orgánica Fundamento Teórico-práctico para el Laboratorio, versión ampliada. Eudeba Editorial Universitaria de Buenos Aires, Argentina, 2002. pp. 19-129.

[15] Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G. S., "*Introduction to Spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*". Philadelphia: Saunders College, Saunders golden sunburst series. 367, 1979

[16] Skoog D., Holler F., Nieman T. Principios de Análisis Instrumental, 5ª Edición, McGraw- Hill Higher. España, 2001. pp. 122-565

[17] Espinoza L., Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear de Alta Resolución 1D y 2D. Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso Chile. Impresor Fermín Pastén, 2004. pp. 5-7.

[18] Nathan J. P., Díaz E., Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear. Editorial Limusa S.A, México, 1980. pp 1-29

[19] Garbarino J., "*Química Orgánica*" 1ª ed. Valparaíso.: UTFSM. 737,1998

[20] Stevens K., Jurd L., Manner, G. *Tetrahedron*, 28, 1939-1944, 1972

[21] Rivera G., Conceptos introductorios a la fitopatología. Editorial 1 Universidad Estatal a distancia, Costa Rica, 1991. pp 152.

[22] Escalona A, Galarrága F, Fernández R, Centeno A, Velásquez J, Pérez G, Desarrollo de métodos no convencionales para la extracción de fenantreno y pireno en partículas sedimentadas, Revista de la facultad de Ingeniería U.C.V., Vol. 27, abril 2009.

[23] Zapata N, Budia F, Viñuela E, Medina P, Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). Industrial Crops and products, July 2009.

[24] Carraco N, Garrido M, Montenegro I, Madrid A, Hartley R, Gonzalez I, Rubilar M, Villena J, Valenzuela-Valderrama M, Antitumoral activity of Leptocarpha rivularis flower extracts against Gastric cancer cells. Molecules, january 2023.