

Magíster en Ciencias
Mención Radicales Libres
en Biomedicina

Evaluación de la actividad anti-oxidante y anti-tumoral de extractos de *Puya chilensis* como premisa para su introducción en la medicina complementaria.

**MAGISTER EN CIENCIAS
MENCIÓN RADICALES LIBRES EN BIOMEDICINA**

Manuel Alejandro Martínez Lobos

Director de tesis
Dr. Alejandro Madrid Villegas

Índice	
Agradecimientos	7
Resumen	8
Abstract	9
Capítulo 1: Introducción y Marco Teórico	10
Rol favorable de ERO en el organismo	12
Metabolismo del balance redox	13
Daño Oxidativo	15
Descripción de la planta	33
Hipótesis	37
Objetivos general y específicos	38
Capítulo 2: Marco Metodológico	39
Características del estudio	40
Recolección de la Planta	40
Preparación de Extractos	40
Ensayos de fitoconstituyentes	40
Estimación del contenido de fenoles	40
Estimación del contenido de flavonoides	41
Estimación del contenido de antraquinonas	41
Ensayos Antioxidantes	42
Actividad captadora del radical libre estable 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH·)	42

Análisis del poder reductor férrico (FRAP)	43
Potencial antioxidante de reactividad total (TRAP)	43
Análisis biológicos	44
Ensayo de viabilidad celular mediante tinción con Sulforodamina B (SRB).	44
Análisis estadístico	46
Capítulo 3: Resultados	47
Rendimiento de extracción	48
Estimación de metabolitos secundarios mediante análisis espectrofotométricos (perfil fitoquímico).	48
Estimación de fenoles	48
Estimación de flavonoides	50
Estimación de antraquinonas	51
Actividad antioxidante	52
Determinación de capacidad secuestradora del radical libre estable DPPH.	52
Determinación del potencial antioxidante reductor del ión férrico (FRAP).	53
Determinación del potencial antioxidante total para la captura de radicales (TRAP).	54
Análisis citotoxicidad	55
Concentración inhibitoria media (IC50) de los extractos de P. chilensis en línea celulares HT-29 y CoN.	55

Capítulo 4: Discusión y Conclusión	57
Estimación de fenoles	58
Estimación de flavonoides	58
Estimación de antraquinonas	60
Determinación de capacidad secuestradora del radical libre estable DPPH.	62
Determinación del potencial antioxidante reductor del ión férrico (FRAP).	63
Determinación del potencial antioxidante total para la captura de radicales (TRAP).	64
Evaluación inhibitoria media de la (IC50) de viabilidad celular	65
Conclusiones	66
Proyecciones	68
Referencias bibliográficas	69
Anexos	78

Índice de figuras

Figura 1: Producción y control de ERO en la mitocondria y el citoplasma.	14
Figura 2: Fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer:	24
Figura 3. Estructura de distintos compuestos fenólicos.	27
Figura 4. Estructura básica de los flavonoides y su numeración.	28
Figura 5: Tipos de flavonoides	29
Figura 6. Estructura base de antraquinonas y distintos tipos de éstas.	30
Figura 7: Imágenes de la planta en estudio	33
Figura 8: Puya chilensis y Trichocereus chilensis	34
Figura 9: Mariposa del chagual en las hojas del chagual	35
Figura 10: Interacción entre la Puya y el Tordo	35
Figura 11: Estimación de fenoles	49
Figura 12: Estimación de flavonoides	50
Figura 13: Estimación de antraquinonas	51
Figura 14. Concentración inhibitoria media del radical libre DPPH·	52
Figura 15. Actividad FRAP	53
Figura 16. Capacidad secuestradora de radicales libres	54
Figura 17. Valores de IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto a la viabilidad celular.	55
Figura 18: Estructura de Doxorrubicina	62

Índice de Esquemas y Tablas

Esquema 1: Reacción de Fenton	14
Tabla 1: Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>P. chilensis</i> .	48
Tabla 2: Valores de IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los tratamientos con respecto al medicamento doxorubicina como patrón	56

Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer al Dr. Alejandro Madrid Villegas por dirigir esta investigación y por facilitar todo lo necesario para llevarla término, además por la confianza entregada y por motivar el avance y la superación de este trabajo.

Al Msc. Carlos Jara y al laboratorio de Estrés oxidativo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso por facilitar los espacios e implementos necesarios para desarrollar esta investigación, además agradecer la confianza y el apoyo entregado.

Al Dr. Joan Villena y al Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, por facilitar los espacios e implementos necesarios para desarrollar esta investigación, y por el tiempo dedicado a este trabajo.

También agradecer a los docentes del Magister en Ciencias, mención Radicales Libres en Biomedicina de la Universidad de Valparaíso por ser parte importante de mi formación profesional.

Finalmente corresponde agradecer el apoyo, motivación y confianza entregada por mi familia, en el paso por este programa, especialmente a mi madre Elizabeth Lobos Salas y mi madrina Patricia Lobos Salas, por apoyar y confiar en mi desarrollo profesional y a mi esposa Fabianna Otárola Benavides por caminar junto a mí en este proyecto, fomentando la construcción de una vida juntos, acompañado siempre de su sonrisa.

Resumen

El estudio de *Puya chilensis* (Bromeliaceae) se fundamenta en parte en antecedentes populares, estos señalan que la goma producida por la penetración de la larva de la “mariposa del chagual” (*Castnia psittacus*) en la base del tallo, es usada en ethnomedicina (o complementaria) como reemplazo de la goma tragacanto o arábigo, además de ser usada como emoliente y astringente. Por otro lado, algunos estudios en esta familia de plantas han demostrado las propiedades anticancerígenas de algunos de sus miembros, como por ejemplo *Ananas comosus*, conocida popularmente como “piña”. En donde, el jugo de esta presentó una inhibición de las células tumorales de ovario (A2780) y colon (HT-29) en bajas dosis comparadas con el control alelopático.

En este sentido y en base a los reportes encontrados sobre la familia de las Bromeliaceae, se espera que la especie *Puya chilensis* presente una considerable actividad antioxidante y una potencial actividad anticancerígena sobre la línea tumoral de colon HT-29.

Para esto es necesario determinar el contenido de fitoconstituyentes de interés que aporten a la medicina complementaria, y a la necesidad de mejorar terapias relacionadas con el cáncer reduciendo los efectos secundarios de estas. Para ello se debe estimar el contenido de fenoles, flavonoides y antraquinonas de esta especie, al igual que la evaluación de propiedades antioxidante, por medio de tres técnicas espectrofotométricas, dos basadas en el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógenos (DPPH· y TRAP) y uno basado en el mecanismo de transferencia de electrones (FRAP). Sumado a la medición de la actividad citotóxica de los diferentes extractos en polaridad creciente de la flor y el tallo de esta especie.

Los resultados obtenidos indicaron que el extracto de acetato de etilo de la flor presentó: el mayor contenido de fenoles, flavonoides y antraquinonas y por ende una mayor actividad antioxidante en todos los modelos utilizados, lo cual respalda la mayor actividad citotóxica presentada por este extracto sobre las células cancerígenas de colon (HT-29) y las células epiteliales control (CoN). Estos resultados requieren ser complementados con ensayos de permeabilidad de membrana, actividad de caspasa-3, entre otros, como su vez la determinación de los principios activos presentes en el extracto de acetato de etilo de la flor de *Puya chilensis*; con el fin de introducir en un futuro a la especie como un co-ayudante en la medicina complementaria para los tratamientos paliativos de esta enfermedad.

Abstract

The study of *Puya chilensis* (Bromeliaceae) is based, in part, on popular backgrounds, they indicate that the gum produced by the penetration of the larva of the "Chagual butterfly" (*Castnia psittacus*) at the base of the stem, is used in ethnomedicine (or complementary medicine) as a replacement for tragacanth or arabic gum, as well as being used as an emollient and astringent. On the other hand, some studies about this family of plants have demonstrated the anticancer properties of some members, such as the *Ananas comosus*, popularly known as "pineapple". In this case, the juice of this one presents an inhibition of ovarian (A2780) and colon (HT-29) tumor cells in low doses compared to the allelopathic control.

In this sense and based on the reports found on the family of Bromeliaceae, the *Puya chilensis* species is expected to exhibit considerable antioxidant activity and potential anticancer activity on the HT-29 colon tumor line.

To this end, it is necessary to determine the content of phyto-constituents of interest that they contribute to complementary medicine, and to the need to improve cancer-related therapies by reducing the side effects of these. In order to do so, the content of phenols, flavonoids and anthraquinones of this species should be estimated, as well as the evaluation of antioxidant properties, using three spectrophotometric techniques, two of them based on the hydrogen atom transfer mechanism (DPPH and TRAP) and one based on the electron transfer mechanism (FRAP) besides the measurement of the cytotoxic activity of the various extracts in the growing polarity of the flower and stem of this species.

The results obtained indicate that the ethyl acetate extract of the flower showed: the higher content of phenols, flavonoids and anthraquinones and; therefore, a higher antioxidant activity in all the models used, which supports the greater cytotoxic activity presented by this extract on colon cancer cells (HT-29) and control epithelial cells (CoN). These results require being completed with membrane permeability assays, caspase-3 activity among others, as well as the determination of the active principles in the extract of ethyl acetate of the *Puya chilensis* flower, in order to introduce the species in the future as a co-assistant in complementary medicine for the palliative treatments of this disease.

Capítulo 1: Introducción / Marco Teórico

A lo largo del desarrollo de las sociedades, estas han intentado determinar las causas de fenómenos propios de la vida, como el envejecimiento, enfermedades o la muerte, hoy en día sabemos que pertenecen a procesos fisiológicos propio de los organismos celulares, como es el crecimiento, declive, envejecimiento y muerte de las células, este ciclo parece tener una función directa con el metabolismo y específicamente con el equilibrio homeostático de este, donde las especies reactivas de oxígeno (ERO) cumplen un rol fundamental^{1,2}.

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas donde dicho elemento puede encontrarse de forma radicalaria y no radicalaria, estas actúan como agentes oxidantes, pero también una ERO son aquellas moléculas que fácilmente son convertidas en radicales libres. Por lo tanto, el oxígeno es inestable en estas especies, ya que posee una gran actividad como agente oxidante, debido a conservar un estado físico apropiado para esto, pues posee solubilidad en agua y propiedades termodinámicas satisfactorias para realizar el trabajo oxidativo, las cuales no presentan otros elementos como los halógenos, ya que la reactividad cinética de estos, los hace inadecuados como agentes oxidantes biológicos, y por otro lado el nitrógeno es un agente oxidante demasiado pobre^{1,3}. Es por esto que en el concepto ERO se incluye a los radicales libres de oxígeno (RL) y a otros compuestos del mismo elemento, que si bien no pueden clasificarse químicamente como RL, sí son altamente prooxidantes y capaces de generar estas inestables moléculas durante su metabolismo⁴.

Un RL se puede definir como aquella especie química que posee un electrón (e-) desapareado. Esta situación le confiere una alta capacidad de reacción, prácticamente con cualquier molécula, lo que también condiciona su corta existencia. Los RL se pueden formar a partir de átomos o moléculas por tres vías⁴.

- 1) Ruptura homolítica del enlace covalente de una molécula.
- 2) Pérdida de un e-.
- 3) Adición de un e-.

Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye

nuestras células. La vida media biológica de un radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a biomoléculas, membranas celulares y tejidos². Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias (que pueden estar en cualquier parte) y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal, y en las plantas a nivel de cloroplastos, además de las reacciones de oxidación, como consecuencia producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.

Rol favorable de ERO en el organismo.

Por otra parte, las ERO cumplen un rol fundamental en nuestro propio organismo, cuando este los produce en concentraciones adecuadas, es por esto que lucha contra microorganismos que puedan presentar una amenaza para el desarrollo del sistema², empleando el procesos de fagocitosis, además de esto favorece la síntesis de colágeno y de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis⁵.

Por otro lado, en los años 80 se describió la naturaleza química y la vía biosintética de un mediador difusible de corta vida media responsable de la relajación del músculo liso vascular, identificado como óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Este hallazgo representó el descubrimiento de un nuevo RL reconocido como un mediador central del flujo sanguíneo y la entrega de oxígeno a los tejidos y demostró que las ERO desempeñan una función crítica no solo en la respuesta inflamatoria y en lesiones de tejidos del organismo (daño hístico), sino que también regulan la transducción de señales intracelulares⁵. Otra función vital de esta molécula es establecer un adecuado flujo sanguíneo útero-placenta-feto es esencial para un buen crecimiento fetal. El óxido nítrico liberado por las células endoteliales de la placenta, arterias uterinas, y vasculatura umbilical, inhibe la activación plaquetaria y promueve la dilatación de la vasculatura útero-placentaria-fetal, por lo que disminuye la resistencia vascular en estas estructuras y facilita el flujo sanguíneo al feto⁶. Además datos recientes, muestran que niveles fisiológicos de ERO en determinadas etapas de la gestación, regulan la función celular, a través del control de la producción y activación de sustancias con gran actividad biológica, capaces de activar muchas vías de

señalización intracelular, lo que les confiere valor fisiológico a las especies reactivas en este período, pues la generación de estas especies y la de enzimas antioxidantes está en un perfecto balance oxidativo, si este se ve alterado y aumentan las concentraciones de ERO esto puede traer complicaciones del embarazo como el parto prematuro, restricción del crecimiento, preeclampsia y aborto espontáneo^{6,7}.

Metabolismo del balance redox

La evidencia demuestra que existe un rol fisiológico fundamental para estas especies, en diferentes ámbitos del organismo, en donde existe un estricto manejo de las concentraciones de estas, para así poder evitar el desbalance redox, además es necesario tener en cuenta que este balance se logra a partir de enzimas que son antioxidantes endógenas y controlan las concentraciones de las ERO⁵ (Figura 1), en esta se observa que la enzima que actúa frente al radical anión superóxido ($O_2^- \cdot$), el cual como principal fuente tiene a la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, es la superóxido dismutasa, la cual dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Cuando es generado el H_2O_2 este puede ser transformado por dos enzimas, por la Catalasa (CAT) o por otro lado por el complejo glutatiónico, la cual es enzima selenio-dependiente, pero en ambos caso el resultado es la estabilidad de la ERO formando como producto principal el agua. En el caso de estas dos últimas enzimas pueden actuar a nivel mitocondrial y citoplasmático, y en el caso de SOD cuando actúa en el citoplasma es dependiente de cobre y cinc (CuZn-SOD), y en la mitocondria será dependiente de manganeso (MnSOD)⁵, como lo muestra la Figura 1. A partir de esto se puede mantener un balance oxidativo que asegure la homeostasis celular.

Estas enzimas antioxidantes endógenas, en ocasiones pueden verse sobrepasadas y establecer un estado de desbalance redox, lo cual promoverá un estrés oxidativo, pues al no poder estabilizar el H_2O_2 este puede ser transformado a radical hidroxilo ($OH\cdot$) por medio de la reacción de Fenton, la que a través de la presencia del Hierro (II) o cobre (I) es capaz de generar este dañino radical, como lo muestra el Esquema 1, que por su vida media corta es capaz de dañar a cualquier macromolécula que se encuentre a su alrededor², promoviendo entonces el estrés oxidativo de la célula.

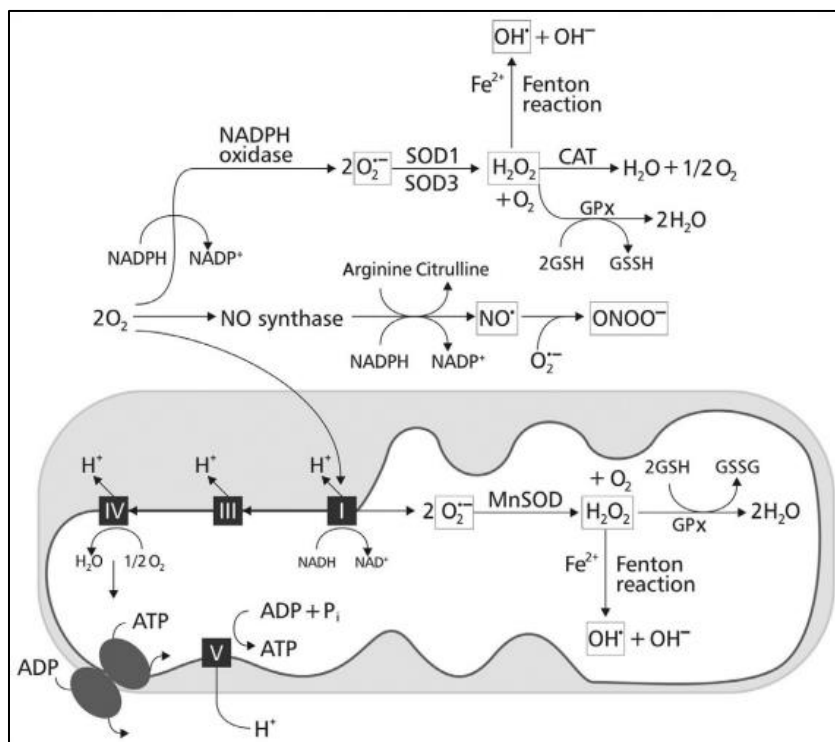
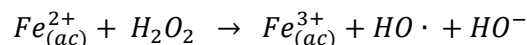


Figura 1: Producción y control de ERO en la mitocondria y el citoplasma. Los electrones son recogidos por NADH e incorporados en la cadena transportadora de electrones a través de los diferentes complejos con el fin de generar energía.

Dicha reacción de Fenton consiste en la oxidación de una sal de hierro en estado acuoso en presencia de H_2O_2 , como lo muestra el esquema de Fenton en el que el hierro es oxidado de hierro (II) a hierro (III), generando el peligroso radical hidroxilo ($HO \cdot$)⁸.



Esquema 1: Reacción de Fenton

De esta forma se establece un estado de estrés oxidativo en la célula, el cual se presenta en diversos estados patológicos, donde se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer².

Por lo tanto, el daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio redox que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes

encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos⁵. El aumento considerable de la concentración ERO puede estar determinado por agentes externos como por la administración de paracetamol y furosemida, entre otros, pero además existen agentes como la exposición a tetracloruro de carbono, humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el shock térmico, aumento de metales pesados, xenobióticos, y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH), como producto de aumento de estas especie^{5,9}.

Por otro lado existen otras formas de aumento de la concentración de ERO, desde el punto de vista metabólico, no relacionados necesariamente con la producción natural de estas especies por parte del organismo, como son la dieta hipercalórica e insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia - reperfusión y ejercicios extenuantes⁹.

Daño oxidativo.

El evidente aumento en la concentración de estas especies promueve el estrés oxidativo lo cual provoca que las especies radicalarias actúen en las macromoléculas, es decir, se sabe que los RL oxidan a los aminoácidos, que constituyen a las proteínas produciendo diversas modificaciones tales como: la formación de grupos carbonilo, asociación de fragmentos proteicos por entrecruzamientos de enlaces disulfuro, rompimiento de enlaces peptídicos, incremento en la hidrofobicidad, ocasionando que las proteínas sufran cambios en su estructura, actividad y funcionalidad, esta pérdida de funcionalidad genera un daño oxidativo que presentan un deterioro en la actividad hormonal y enzimática, así como el transporte de iones, además de una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica¹⁰.

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados, que son parte esencial de los fosfolípidos, que forman la bicapa lipídica de los diferentes tipos de membranas, los cuales proporcionan en éstas fluidez, al ser oxidados por los RL dan lugar a la

lipoperoxidación, una reacción en donde estos lípidos ceden sus electrones a los RL, promoviendo una reacción en cadena que está compuesta por tres etapas, la primera es la de iniciación, en donde el RL es capaz de sustraer un electrón, oxidando al lípido poliinsaturado promoviendo la radicalización de este. En la segunda etapa se da curso a la reacción de propagación, donde el radical lipídico comienza una reacción en cadena autocatalítica con suficiente potencial para consumir a estos lípidos. Finalmente, en la tercera etapa se generan productos no radicales por la reacción de la interacción radical-radical, formando productos de aldehídos como el malondialdehído (MDA), el cual es el más conocido y estudiado¹¹.

Este efecto provoca el mayor daño a la célula al producir cambios en la estructura molecular de la membrana, lo anterior aunado a la formación de puentes disulfuro de las proteínas de membrana, dan como resultado la pérdida de permeabilidad y estabilidad de la membrana, provocando la muerte celular¹⁰. Por lo tanto la peroxidación de lípidos expuestos al oxígeno es responsable del daño a los tejidos in vivo; los cuales pueden producir cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis y envejecimiento. Los efectos deletéreos se consideran atribuidos a los radicales libres ($\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{OH}\cdot$), producidos durante la formación de peróxidos a partir de ácidos grasos con enlaces dobles interrumpidos¹².

Los RL también atacan los ácidos nucleicos como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual es una molécula donde se guarda la información genética que se transmite de una generación a otra; dañando a los genes que codifican a las proteínas necesarias y lleven a cabo todas las funciones celulares. Se sabe que el daño oxidativo sobre el ADN es producido específicamente por el $\text{OH}\cdot$, conduce a diversas modificaciones, principalmente en la desoxirribosa, provocando una liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar. Lo anterior produce el rompimiento de una o ambas cadenas ocasionando deleciones que dan como resultado mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes, que afectan incluso la biosíntesis de cadenas de ADN. Además el Estrés oxidativo produce errores durante la transcripción y traducción del ácido ribonucleico (ARN). Así, el daño oxidativo sobre las diversas biomoléculas puede conducir a un deterioro del metabolismo y estructura celular que provoca la muerte de las células¹⁰.

Este daño a ADN se considera el suceso crucial en la carcinogénesis. Se han reportado al menos 100 diferentes tipos de lesiones oxidativas al ADN que promueven el proceso de carcinogénesis. El ataque oxidante a esta molécula puede ocurrir a nivel de las bases nitrogenadas o el azúcar fundamentalmente. El daño a las bases nitrogenadas origina modificaciones de bases, tales como la 8-hidroxi,2'-desoxiguanosina, la cual es una modificación altamente mutagénica, además del timidín glicol y la 8-hidroxi-citosina. Por otra parte, el daño oxidativo al azúcar produce la pérdida de la base nitrogenada, lo cual genera sitiosapurínicos o apirimidínicos (sitios AP) que promueve la ruptura de una cadena o de las dos cadenas del ADN, esto a su vez provoca inestabilidad genética. También pueden generarse entrecruzamientos de las cadenas de ADN. De esta forma, el estrés oxidativo es una causa significativa de daño al ADN que provoca mutaciones e inestabilidad genética, ambos implicados en la carcinogénesis^{13, 14}.

A partir de esto es posible señalar que el daño oxidativo al ADN no es la única característica que sostiene al cáncer, de hecho este es un conjunto complejo de enfermedades genéticas distintas unidas por características comunes, las cuales surgen a partir de variadas etapas y procesos mutagénicos¹⁵. Dentro de estos se incluye un potencial ilimitado de proliferación, autosuficiencia a señales de crecimiento, por ende presenta también resistencia a las señales de anti-crecimiento, evasión a la apoptosis, genera nuevos vasos sanguíneos para poder llevar nutrientes y oxígeno a todas las células carcinogénicas (angiogénesis), y además metastatiza, estas son las seis características expuestas por Hanahan y Weinberg en el año 2000¹⁶, posteriormente fue señalada la existencia de una séptima característica que es la evasión de vigilancia inmune¹⁷.

Posteriormente además de estas siete características surgen cinco más con el fin de comprender a mayor cabalidad el mecanismo y características de las células cancerígenas. Estas cinco características están relacionadas con el estrés, estas son: estrés proteotóxico, el mitótico, metabólico y el oxidativo, y por último, el estrés y daño en la replicación del ADN, a pesar de que estas se describen para el cáncer, no son exclusivas de este, puesto que se pueden observar en otras condiciones como inflamación crónica¹⁵. Finalmente las doce características se orientan y describen de la siguiente manera:

1. Potencial ilimitado de proliferación: muchos y tal vez todos los tipos de células de mamíferos llevan un programa intrínseco, de células autónomas que limita su multiplicación. Este programa parece operar independientemente de las vías de señalización de célula a célula¹⁶.

Las observaciones de las células cultivadas indican que varios tipos de células humanas normales tienen la capacidad de 60-70 duplicaciones antes de morir. Los primeros trabajos han demostrado que las células en cultivo tienen un potencial de replicación finito. Una vez que tales poblaciones celulares han progresado a través de un cierto número de duplicaciones, dejan de crecer, un proceso denominado senescencia^{16, 18}.

El mantenimiento de los telómeros, lo cual evade la senescencia celular, es evidente en prácticamente todos los tipos de células malignas. De una u otra forma, los telómeros se mantienen a una longitud por encima de un umbral crítico, y esto a su vez permite la multiplicación ilimitada de células descendientes, lo cual lleva al aumento de células aberrantes o malignas^{16, 19}.

2. Autosuficiencia a la señal de crecimiento: las células normales requieren señales de crecimiento mitogénicas antes de que puedan pasar de un estado de reposo a un estado proliferativo activo. Estas señales se transmiten en la célula por receptores transmembrana que se unen a distintos tipos de las moléculas de señalización como: factores de crecimiento difusible, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión/interacción célula a célula. Ningún tipo de célula normal puede proliferar en ausencia de tales señales estimuladoras¹⁶.

La dependencia de la señalización de crecimiento es evidente cuando se produce la propagación de las células normales en cultivo, que típicamente proliferan cuando se alimentan con factores difusibles mitógenos apropiados y un sustrato adecuado para sus integrinas. Tal comportamiento contrasta fuertemente con las células tumorales, que muestran invariablemente una dependencia muy reducida de la estimulación de crecimiento exógeno. La conclusión es que las células tumorales generan muchas de sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia de la estimulación de su microambiente del tejido normal. Esta ausencia de la dependencia de las señales provenientes de forma exógena interrumpe un mecanismo homeostático críticamente

importante que normalmente funciona para garantizar un comportamiento adecuado de los diversos tipos de células dentro de un tejido²⁰.

3. Resistencia a la señales de anti-crecimiento: dentro de un tejido normal, múltiples señales anti-proliferativas operan para mantener la quiescencia celular y la homeostasis del tejido; Estas señales incluyen ambos inhibidores de crecimiento solubles y los inhibidores inmovilizados embebidas en la matriz extracelular y en las superficies de las células cercanas. Estas señales inhibitoras del crecimiento, como sus homólogos que actúan positivamente, son recibidas por receptores de superficie celular de transmembrana acoplados a los circuitos de señalización intracelular^{16, 21}.

Las células cancerosas incipientes deben evadir estas señales anti-proliferativas si han de prosperar. Gran parte de la señalización que permite a las células normales responder a las señales anti-crecimiento está asociado con las etapas del ciclo celular, específicamente los componentes que regulan el tránsito de la célula a través de la fase G1 de su ciclo de crecimiento^{16, 21}.

4. Apoptosis: la capacidad de las poblaciones de células tumorales para expandirse en número se determina no sólo por la velocidad de proliferación celular, sino también por la tasa de desgaste de la célula. La muerte celular programada (apoptosis) representa una fuente importante de este desgaste. La resistencia a la apoptosis, es una característica de la mayoría y quizás todos los tipos de cáncer¹⁶.

La resistencia a la apoptosis puede ser adquirido por las células cancerosas a través de una variedad de estrategias. Sin duda, la pérdida que ocurre más frecuentemente de un regulador pro-apoptótico a través de la mutación implica el gen p53 que es un supresor de tumor. La inactivación funcional resultante de su producto, la proteína p53, se ve en más de 50% de los cánceres humanos y los resultados en la eliminación de un componente clave del sensor del daño en el ADN que pueden inducir la el efector de la cascada apoptótica. Las señales evocadas por otras anomalías, incluyendo la hipoxia y la hiperexpresión oncogénica, también son canalizadas a través de p53 en parte a la maquinaria apoptótica; estos también están deteriorados en la apoptosis cuando la obtención de la función de p53 se pierde. Además, la vía PKB/PI3 quinasa AKT, que transmite señales de supervivencia anti-apoptóticas, es probable que participan en la mitigación de la apoptosis en una fracción sustancial de los tumores humanos. Este circuito de señalización de supervivencia se puede activar por factores extracelulares

tales como IGF-1/2 o IL-3, por señales intracelulares que emanan de Ras, o por la pérdida del supresor de tumores PTEN, un fosfolípido fosfatasa que normalmente atenúa la señal de supervivencia AKT. Recientemente, un mecanismo de supresión de la señal de la muerte FAS ha sido revelado en una alta proporción de líneas celulares de carcinoma de pulmón y colon. Por lo cual se espera que prácticamente todas las células cancerosas albergan alteraciones que permiten la evasión de la apoptosis^{16, 22}.

5. Angiogénesis: el oxígeno y los nutrientes suministrados por la vasculatura son esenciales para la función celular y la supervivencia. Durante la organogénesis, esta cercanía es asegurada por el crecimiento coordinado de los vasos. Una vez que se forma un tejido, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, el proceso de angiogénesis es transitoria y cuidadosamente regulado. Debido a esta dependencia de los capilares cercanos, parece plausible que la proliferación de células dentro de un tejido tendría una capacidad intrínseca para fomentar el crecimiento de los vasos sanguíneos. Pero la evidencia es lo contrario. Con el fin de progresar a un tamaño más grande las neoplasias incipientes deben desarrollar la capacidad angiogénica^{16, 23}.

6. Metástasis: más pronto o más tarde durante el desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer humano, masas tumorales primarias generan células pioneras que invaden los tejidos adyacentes, y desde allí viaja a sitios distantes en los que pueden tener éxito en la fundación de nuevas colonias. Estos asentamientos distantes de células tumorales en proceso de metástasis son la causa del 90% de las muertes por cáncer humano. La capacidad de invasión y metástasis de cáncer permite a las células escapar de la masa del tumor primario y colonizar nuevos terrenos en el cuerpo donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no son limitativos²⁴.

7. Evasión a la vigilancia inmune: el microambiente metabólico de las células tumorales puede inhibir la función antitumorales de efectores inmunes tales como linfocitos T citotóxicos (CTL) y células asesinas naturales (NK), promoviendo la atracción de células inflamatorias que participan en la progresión tumoral. Los macrófagos asociados a tumores (TAM) a menudo se enriquecen en áreas tumorales hipóxicas perinecroticas, lo cual constituyen un marcador de pronóstico negativo. La acidificación de zonas tumorales puede inhibir la actividad de las células NK.

Los pacientes con alta carga tumoral han aumentado los niveles de lactato en suero, y lactato pueden ejercer efectos inmunosupresores potentes, como se ve en el cáncer avanzado. Por lo tanto, lactato suprime la proliferación, producción de citoquinas, y la actividad citolítica de CTL. Las células cancerosas a menudo sobreexpresan indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que cataboliza triptófano para la vía de la quinurenina y el estrés oxidativo. IDO sobreexpresión se ha implicado en el cáncer asociado a la anorexia, y está puede ser producida por las células tumorales, provocando la muerte de CTL por apoptosis. Estos ejemplos ilustran que las intervenciones terapéuticas diseñadas para corregir el metabolismo del tumor anormal y, en particular, la inhibición de producción de lactato, o IDO pueden restablecer una respuesta inmune antitumoral defectuosa¹⁷.

8. Estrés y daño en la replicación del ADN: basado en los análisis de mutaciones, es evidente que los tumores, especialmente tumores sólidos, pasan a través de etapas de inestabilidad genómica extrema que resultan en la acumulación de mutaciones puntuales, deleciones, reordenamientos cromosómicos complejos, y la amplia aneuploidía¹⁵.

Se cree que los niveles elevados de daño a ADN en tumores de fase inicial se deben a varios factores. Primero, el acortamiento de los telómeros debido a la replicación en ausencia de actividad de suficiente telomerasa conduce a la aparición de roturas de la doble hebra (DSB) en extremos teloméricos. Las fusiones posteriores de estos extremos desprotegidos inician los ciclos de rotura-fusión de puente que resultan en translocaciones y eventos de amplificación génica. Además la activación de oncogenes en las lesiones precancerosas se ha demostrado que aumenta la deleción de la doble hebra y la inestabilidad genómica, probablemente por la hiper-replicación del ADN. Por último, la mutación de genes implicados en cualquiera de los programas de reparación del ADN (tales como la escisión, reticulación, o de reparación de genes) o en las vías de ATM y la señalización de p53, puede conducir a un mayor daño en el ADN, y una progresión del ciclo celular inapropiada, y la inestabilidad genómica¹⁵.

9. Estrés proteotóxico: el estrés proteotóxico se ve alterado por la aneuploidía y el número de copias de genes alterando el equilibrio relativo de las señales de crecimiento y de supervivencia, promoviendo la tumorigénesis. Estos desequilibrios aumentan la cantidad de agregados de proteínas no plegadas tóxicos en la célula y una carga adicional sobre los mecanismos de plegamiento de proteínas y de degradación. Este

estrés proteotóxico se contrarresta, en parte, por la ruta de respuesta de choque térmico, que promueve el plegamiento apropiado y / o la degradación proteolítica de proteínas¹⁵.

10. Estrés mitótico: la inestabilidad genómica genera defectos en proteínas mitóticas, lo cual se traduce en la segregación cromosómica y defectos en el punto de control de ensamblaje del huso mitótico, el cual coordina la entrada a anafase. Este fenómeno podría estar determinado por mutaciones en oncogenes (Ras) y supresores de tumores (p53)¹⁵.

11. Estrés metabólico: las células normales obtienen la mayor parte de su ATP a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial, pero por otro lado las células cancerosas para producir predominantemente energía lo hacen por el método menos eficiente de la glucólisis y secretan una gran cantidad de ácido láctico, incluso en condiciones de alta concentraciones de oxígeno. Esta transición a la glucólisis para la producción de energía proporciona varias ventajas al tumor incluyendo adaptación a un entorno bajo en oxígeno y la acidificación del microambiente circundante, que promueve la invasión tumoral y suprime la vigilancia inmune¹⁵.

12. Estrés oxidativo: finalmente, la última característica a analizar es el estrés oxidativo, el cual tiene una gran implicancia en las células cancerígenas, las cuales llegan a generar más ERO que las células normales, esto puede estar dado tanto por la señalización oncogénica y la regulación a la baja de la función mitocondrial. Además, ERO son mediadores de señalización importantes, y su presencia puede contribuir a la transformación. Por ejemplo, ERO promueve la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1), el cual puede promover el interruptor glucolítica y la angiogénesis observada en los tumores y por ende generar una mayor cantidad de vasos sanguíneos que puedan nutrir y oxigenar a las células cancerígenas¹⁵.

Este conjunto de características se ve implicado en los diferentes tipos de cánceres, los cuales tienen múltiples tratamientos, donde el objetivo de estos es que los procedimientos demuestre una toxicidad diferencial hacia las células tumorales con respecto a células normales, de esta manera el cáncer puede ser tratado mediante la inducción de estas células a experimentar apoptosis, necrosis, senescencia o bien la diferenciación, promoviendo así la interrupción de la autonomía del cáncer¹⁵.

Estos tratamientos cada vez se hacen más importantes, pues el cáncer se ha tornado más frecuente en la sociedad moderna, y el diagnóstico y clasificación debe ser cada vez más certeros, pues si se analiza el contexto de esta enfermedad según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad (proporción de personas que enferman en un sitio y tiempo determinado) y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. En el mismo año, los tipos de cáncer diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, estómago, hígado, próstata, colon y recto, y en el caso de la mujer fueron los de mama, pulmón, estómago, cuello uterino, colon y recto²⁵.

Por otra parte el cáncer de colon y de recto representa la tercera causa de muerte en Chile, después del gástrico y biliar. Excluyendo los tumores del recto, la tasa cruda de mortalidad del cáncer de colon ha aumentado de 3,7 por cada 100.000 habitantes en 1990 a 6,2 por cada 100.000 habitantes en 2003, tendencia que se observa tanto en hombres como en mujeres. Particularmente, según el Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS), ministerio de salud, gobierno Chile, en la región de Valparaíso la tasa de defunciones por este cáncer está por sobre los límites nacionales, registrándose en el año 2000 una tasa de 7,3 por cada 100.000 habitantes y el 2011 10,9 por cada 100.000 habitantes²⁶.

Es por esta alza de pacientes que es importante analizar los tratamientos que se llevan a cabo contra el cáncer de colon con el fin último de complementar estas terapias y hacerlas más selectivas, la principal modalidad terapéutica para el cáncer de colon es la cirugía, la cual consiste en la resección en bloque del tumor y su drenaje linfático, con márgenes adecuados tanto longitudinal como circunferencial, con esto se pretende lograr la curación de los casos de las etapas iniciales hasta en el 70% de estas²⁷.

El manejo quirúrgico del cáncer de colon juega un papel importante en las modalidades del tratamiento actual; de hecho, los avances de manejo adyuvante en enfermedad avanzada han aumentado la sobrevida²⁸. El cirujano tiene un papel preponderante en el pronóstico final; una resección del tumor con márgenes adecuados y ganglios resecados en su totalidad, proporcionará un pronóstico adecuado para tomar la decisión de manejo adyuvante en los casos necesarios; un procedimiento quirúrgico inadecuado con márgenes insuficientes, o bien con resección incompleta de ganglios va a

producir mayor número de recaídas, ya sea a distancia o locales, sin repuesta adecuada a manejos posteriores, pues Las posibilidades de recurrencia luego del tratamiento, ya sea sólo quirúrgico o con fármacos adyuvantes, son directamente relacionados con la etapa clínica, siendo aproximadamente de 10, 30 y 60% para las etapas I, II y III, respectivamente²⁸.

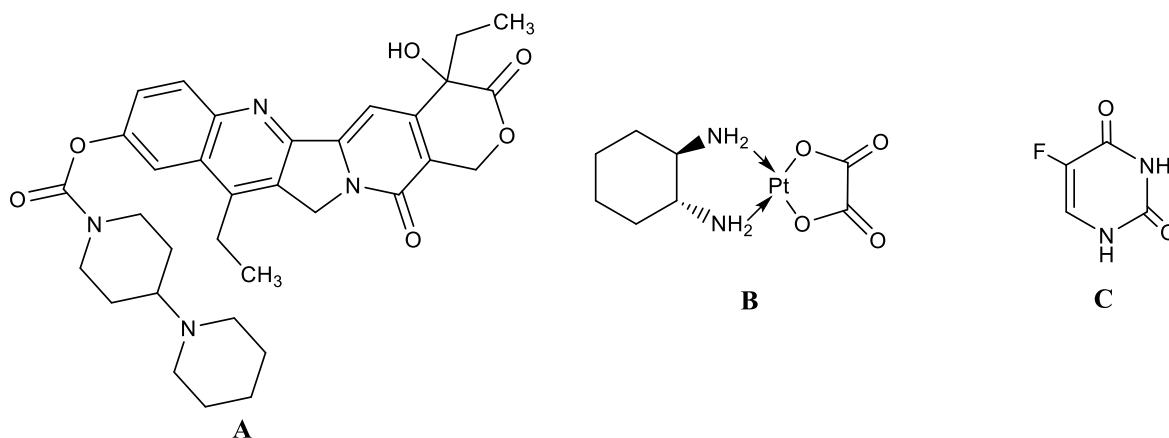


Figura 2: Fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer:

A) Irinotecan, B) Oxaliplatino y C). 5-fluorouracilo

Además de las cirugías, los tratamientos estándar en pacientes con cáncer metastásico de colon y/o recto desde hace décadas se basan en el uso de quimioterapia con una fluoropirimidina. La aparición de nuevas drogas en la práctica cotidiana ha permitido incorporar dos agentes más, como los derivados del platino e inhibidores de topoisomerasa I. De acuerdo con los resultados obtenidos en diversos estudios, hoy en día se sabe que la combinación de una fluoropirimidina con oxaliplatino o irinotecan (ver Figura 2) incrementan de manera importante el tiempo de vida, tiempo libre de progresión y calidad de vida en comparación con sólo ofrecer terapia de apoyo con 5-fluorouracilo (5FU), si bien en sus inicios, se utilizó como monoterapia y, en la actualidad, se aplica de manera combinada con otros citostáticos, es la sinergia de estos fármacos la que ha demostrado un incremento de seis a doce meses de supervivencia^{28, 29}.

Para poder potenciar estas terapias, se han introducido complementariamente los productos naturales al tratamiento del cáncer, y otras enfermedades, pues las plantas tienen una larga historia en este tipo de tratamiento. Sin embargo, a veces han sido observadas con cierto escepticismo por las características propias de la enfermedad,

actualmente, muchas personas que padecen de cáncer desean someterse a terapias conocidas como alternativas³⁰.

Estas terapias alternativas o complementarias se basan en la utilidad que poseen compuestos activos de frutas y/o verduras, entre otros, frente a estas enfermedades. Específicamente en el cáncer se cree que las propiedades antioxidantes de estos alimentos protegen las células de ERO y daño al ADN que puede resultar en mutación y posterior carcinogénesis^{31, 32}. Los compuestos activos o micronutrientes con propiedades antioxidantes incluyen la vitamina E, vitamina C, β -caroteno y otros carotenoides, además de fitoconstituyentes conocidos como metabolitos secundarios, donde confluyen flavonoides, antraquinonas, y algunos polifenoles, entre otros³³.

Se ha demostrado que micronutrientes como la vitamina E induce la muerte celular en células del cáncer colorrectal y aumenta la inhibición del crecimiento de éstas células por el 5-fluorouracilo (posiblemente el único tratamiento más eficaz para el cáncer colorrectal avanzado), lo que sugiere que es útil como tratamiento complementario para éste tipo de cáncer³⁴. La vitamina E parece ser beneficiosa en ciertos casos y experimentos con animales sugieren que las altas dosis de vitamina E pueden aumentar la eficacia de la quimioterapia.

También Se ha descubierto que el consumo de alimentos con β -caroteno, protege contra los daños producidos por los rayos x, además de que el consumo de alimentos con vitamina C y β -carotenos disminuye el riesgo de desarrollar algunos tipos de cánceres³⁴. Sin embargo estudios clínicos en fumadores utilizando tetraterpenoides, especialmente el β -caroteno mostraron un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón y un aumento de la mortalidad por este cáncer, en comparación a aquellos sujetos que no consumieron estos suplementos. Este efecto negativo se ha atribuido a que la atmósfera libre de radicales libres en los pulmones de los individuos expuestos al humo del cigarro puede aumentar la oxidación del β -caroteno y la formación de ciertos metabolitos que aceleran el proceso de tumorigénesis^{33, 34}. Por lo tanto, es evidente que utilizar estos micronutrientes como terapia complementaria aporta a los tratamientos medicinales establecidos, sin embargo, el consumo de estos es importante administrarlos en dosis y condiciones adecuadas, pues el efecto que estos poseen puede variar según el contexto en el que se está suministrando, es necesario también mantener un balance de estos para obtener el resultado esperado.

En cuanto a los fitoconstituyentes activos son moléculas que provienen de un metabolismo especial, formadas producto de la biosíntesis, transformación y degradación de metabolitos primarios mediante la acción de proteínas especializadas. Una de las principales diferencias que presentan estos con relación a los metabolitos primarios es su distribución restringida a los microorganismos y el reino vegetal, siendo, a veces, característicos de un género o especie^{35, 36}. Los metabolitos secundarios a menudo contienen más de un grupo funcional, por lo tanto, suelen presentar múltiples bioactividades. Además, puesto que estos compuestos están presentes en las mezclas complejas, garantizan protección contra una amplia variedad de predadores como herbívoros, y agentes patógenos como virus y bacterias³⁷. Dentro de estos metabolitos secundarios podemos encontrar un gran número de estos constituyentes activos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas, alcaloides, terpenos, entre otros³⁸.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos entre los metabolitos secundarios presentes en las plantas y son responsables de numerosos efectos beneficiosos en diversas enfermedades, por la diversidad estructural que presentan y las propiedades farmacológicas, de amplio espectro, que se le atribuyen a estas sustancias, tales como: antialérgico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitrombóticos, efectos cardioprotectores y vasodilatadores, entre otras, es recomendable el consumo de frutas y verduras, las cuales contienen una gran cantidad de este tipo de compuestos³⁹.

Se cree, además, que los compuestos fenólicos trabajan en sinergia para promover la salud humana a través de sus propiedades antioxidantes y su capacidad para modular la actividad de diversas enzimas⁴⁰.

Estos compuestos incluyen un gran número de subclases, tales como los flavonoides, los ácidos fenólicos, incluidos los ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, lignanos, taninos y polifenoles, que muestran una gran diversidad de estructuras⁴¹. Alguno de estos son los que se encuentran en la Figura 3.

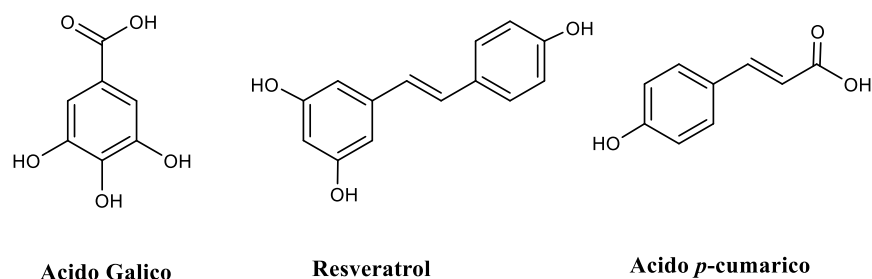


Figura 3. Estructura de distintos compuestos fenólicos³⁹.

Así, los compuestos fenólicos pueden ser clasificados como inhibidores de radicales libres, descomponedores de peróxido, quelantes metálicos o eliminadores de especies reactivas de oxígeno⁴¹.

Estos compuestos desempeñan un papel importante en el crecimiento y la reproducción, proporcionando protección contra los agentes patógenos y depredadores, además de contribuir a las características de color y sensoriales de las frutas y verduras³⁹.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar los radicales libres, donando átomos de hidrógeno o electrones, además de quelar cationes metálicos, los cuales potencialmente forman radicales libres a través de las reacciones de Fenton (Esquema 1) y Haber Weiss. Así también los posibles beneficios para la salud del ser humano que derivan de la ingesta de compuestos fenólicos dependen de su absorción y metabolismo³⁹. Además se ha reportado que los taninos de frijol negro inhiben la actividad mutagénica de la aflatoxina B1, del benzo (a) pireno y de la ciclofosfamida en ratones⁴². El ácido gálico, clorogénico y caféico inhiben la capacidad mutagénica de varios compuestos⁴³.

Dentro de los compuestos fenólicos encontramos un grupo de gran importancia, estos son los flavonoides, los que se pueden clasificar como polifenoles que están distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como también en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo. Su estructura puede ir desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30.000 Dalton⁴⁴.

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las hojas, semillas, cortezas y flores de las plantas. En las plantas, estos compuestos otorgan una protección

contra la radiación ultravioleta, agentes patógenos y herbívoros⁴⁴. Dentro de este grupo de compuestos existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5.000 compuestos, todos presentando un esqueleto hidrocarbonado (Figura 5) del tipo C6-C3-C6 (difeníl-propano) derivado del ácido shiquímico y de restos de acetato (Figura 4). Poseen propiedades antioxidantes; antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumorales; antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II⁴⁴.

La actividad anti-oxidante que poseen estos metabolitos depende de la distribución estructural que imparte, siendo la sustitución en 3',4'-orto dihidroxi en el anillo B, la disposición de grupos hidroxilos en posición meta en los carbonos 5 y 7 de los anillo B y A respectivamente, y también el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en combinación con los grupos 4 ceto y 3 hidroxilo en el anillo C, los que potenciarán esta actividad⁴⁵.

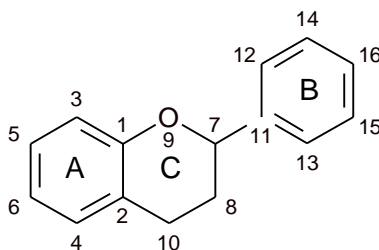


Figura 4. Estructura básica de los flavonoides y su numeración⁴⁴.

Por otro lado, se han descrito para los flavonoides posee efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, inflamaciones y cáncer. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias, puesto que son capaces de retirar oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos⁴⁴. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células, además en estudios epidemiológicos se ha demostrado que con el consumo incrementado de frutas y vegetales ricos en flavonoides se experimenta una reducción del 50% en el riesgo de cánceres digestivos y de las vías respiratorias⁴⁶. En experimentos *in vitro* se ha confirmado el papel protector de la quercitina (ver Figura 5), la

cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon⁴⁷, glándula mamaria y ovario, en región gastrointestinal y en la leucemia⁴⁶. También se ha demostrado que la actividad quimioprotectora del cáncer por los flavonoides puede ser explicada porque induce apoptosis al activar la caspasa 8 y Bax, inhibir la expresión del Bcl-2 y liberar citocromo C, también, por su actividad antioxidante y antiangiogénica, al suprimir la proliferación del factor de crecimiento vascular⁴⁸.

En cuanto a componentes fitoquímicos de los alimentos se ha reportado que los compuestos fenólicos como rutina (glusido flavonoide) (ver Figura 5) extraídos de *Glycine max* (soya) han mostrado una alta capacidad para proteger a ratas de laboratorio del cáncer de colon³⁸, al igual que rutina extraído de *Phyllanthus urinaria*, el cual posee un extracto rico en polifenoles específicamente de rutina, y también se ha demostrado que inhibe notablemente la extensión del tumor en ratones⁴⁹.

También se ha reportado que las antocianinas (ver Figura 5), que se clasifica dentro de los flavonoides, cuando son extraídas de *Myrica rubra*, una baya de origen chino conocida como árbol de fresas, actúan con una alta actividad antioxidante, inhibiendo el crecimiento de células cancerosas e inducen la apoptosis⁴³.

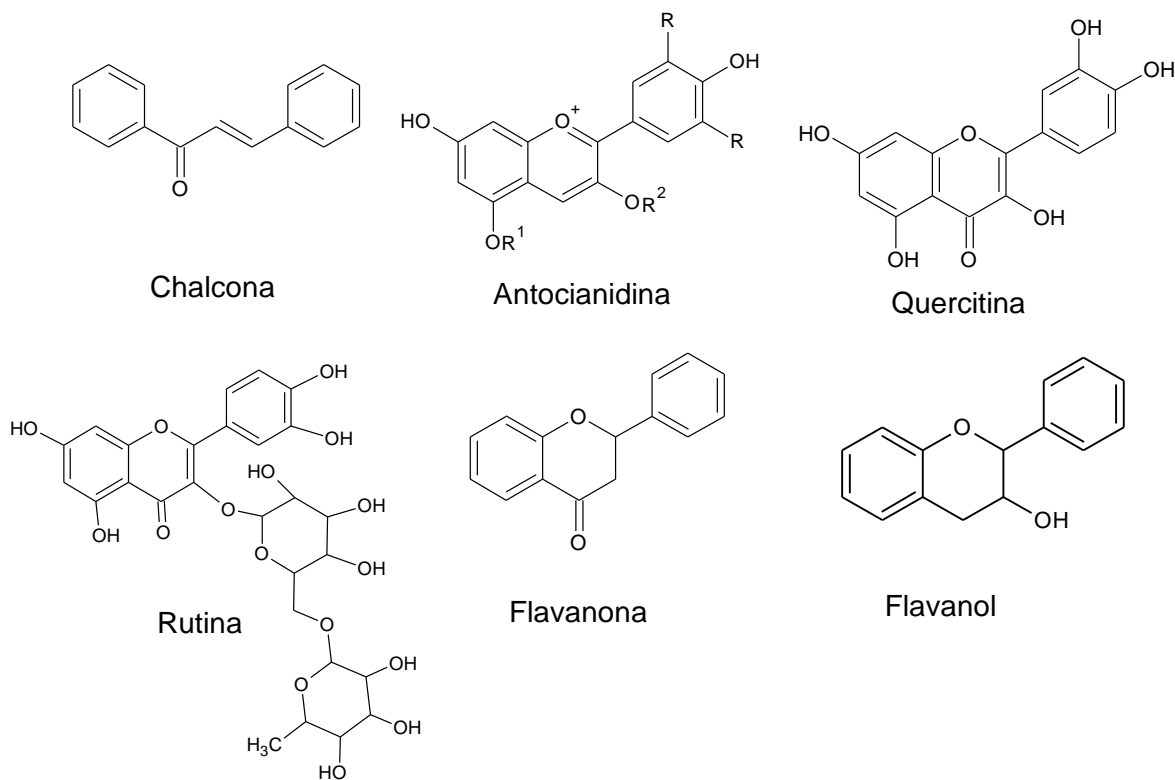


Figura 5: Tipos de flavonoides ⁴⁴.

Por otro lado, otros metabolitos secundarios relevantes para el mantenimiento del balance oxidativo en el organismo son las antraquinonas, estas han mostrado una amplia variedad de actividades farmacológicas tales como: antiinflamatorio, curación de heridas, analgésica, antipirética, antimicrobiana y actividades antitumorales, además de sus propiedades purgantes, también poseen actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante y antitumoral²². Las diferentes actividades con las que cumplen estos metabolitos se debe a que existen diferentes estructuras como lo muestra la Figura 3, siendo la 1,6,8-trihidroxi-3-metil-antra-9,10-quinona (emodina) una de las más utilizada por la industria farmacéutica^{50, 51}, este compuesto cumple con una gran importancia dentro de las antraquinonas, pues es el principio activo de variados medicamentos a base de hierbas que poseen este tipo de compuestos.

Esta antraquinona se ha informado que exhibe propiedades antiinflamatorias, disminución de la producción de citoquinas en células de linfocitos T humanos y endotelial, además de efectos anti-proliferativos. Se ha encontrado recientemente en esta molécula, la propiedad para inhibir a la proteína quinasa CK2, lo cual pudiese estar relacionado con sus actividades anti-cancerígenas y anti-virales. Es por esto que los extractos comerciales de plantas que contienen antraquinonas son cada vez más utilizados debido a su amplio margen terapéutico y propiedades farmacológicas⁵¹.

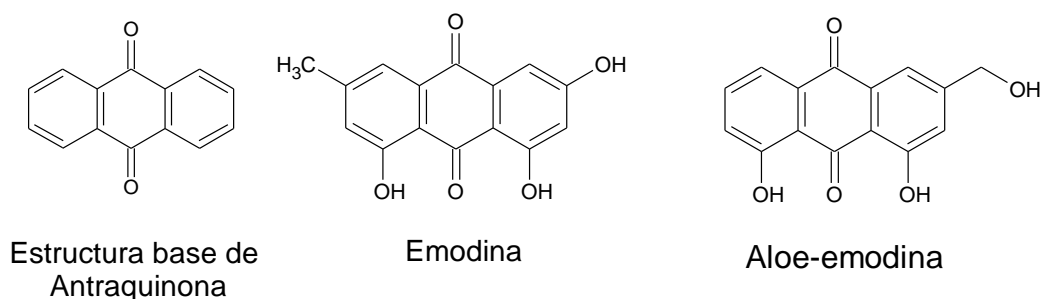


Figura 6. Estructura base de antraquinonas y distintos tipos de éstas⁵¹.

Es importante tener en cuenta que estos fitoconstituyentes activos cumplen un rol fundamental no solo en el organismo animal o humano, sino que también en las plantas, ya que esta protección química en las plantas se ha establecido como estrategia, con funciones determinadas, según el contexto en el que se encuentre la especie. Las funciones fisiológicas de estos compuestos de baja masa molecular, en las plantas, están todavía bajo investigación, pero se asocian a funciones tan importantes como la

protección de los órganos de las plantas contra los herbívoros y patógenos, también de la luz ultravioleta y el calor. Además, los procesos de biosíntesis y acumulación de metabolitos son regulados de manera temporal y espacial en los órganos de la planta, donde se pueden acumular de manera apropiada^{38, 52}.

El conjunto de estos constituyentes activos se encuentran presentes en diferentes familias, donde cada uno de estos cumple un rol fundamental en el desarrollo de estas, que dependiendo de sus requerimientos fisiológicos, la concentración de estos compuestos puede ir variando en los diferentes miembros de las distintas especies del reino vegetal^{36, 53}.

En cuanto a la familia Bromeliaceae es predominantemente Neotropical y comprende 58 géneros y aproximadamente 3172 especies. La fitoquímica de esta familia se caracteriza por la presencia de flavonoides, triterpenoides, esteroides, diterpenos, derivados del ácido cinámico, lignanos, compuestos nitrogenados, entre otros. Algunos estudios han demostrado que especies de la familia Bromeliaceae tienen propiedades antioedematosas, antinociceptivo y anti-inflamatorio, antialérgico y actividad citotóxica, además, pues controla la concentración y producción de radicales libres⁵⁴.

El ejemplo más representativo de esta familia es la *Ananas comosus* (piña), la cual posee enzima proteolítica (proteasas, las más conocidas son las denominadas “bromelina de tallo” o “bromelina de fruto”.) que son capaces de decrecer significativamente los tumores, logrando conseguir en las terapias incremento en la tasa de respuesta, duración de las remisiones y tiempo de sobrevivencia⁵⁵. De esta manera los estudios realizados frente a la acción anticancerígena de la piña, han demostrado que en zumos naturales de varias partes de la piña, particularmente la carne, el vástago y el núcleo de *Gandul*, contienen cantidades sustanciales de bromelina que muestra potencial para inhibir el crecimiento de cáncer de ovario (A2780) y el colon (HT29) las células cancerosas in vitro⁵⁶.

Además, en el mismo estudio se demostró que la Inducción de apoptosis en las células tratadas, reveló propiedades distintivas de la apoptosis como la fragmentación nuclear y la contracción celular, sin embargo el estudio señala que es necesario realizar más investigaciones frente a los métodos por los cuales el jugo fresco de piña puede inducir la apoptosis o inhibir el crecimiento de tumores⁵⁶.

Cabe destacar que estas propiedades del jugo de piña se atribuyen a la presencia de la enzima proteolítica bromelina, donde investigaciones científicas recientes inferen que la bromelina puede tener beneficios para la salud incluyendo multitudinarios beneficios digestivo, antiinflamatorio, inmunomodulador, además del efectos contra el cáncer⁵⁶.

Los extractos acuosos de bromelina de piña contienen una mezcla compleja de tior proteasas y componentes no proteasa. Las proteasas constituyen los principales componentes de la bromelina e incluyen bromelaína (80%), la bromelina de frutas (10%), y la ananaína (5%) del tallo. Entre los componentes no proteasa son fosfatasas, glucosidasas, peroxidasas, celulasas, glicoproteínas e hidratos de carbono⁵⁷. La evidencia de la actividad anti-cáncer de la bromelina proviene de las observaciones tradicionales en estudios de animal y modelos basados en células y estudios clínicos, los cuales demuestran que la actividad anti-cancerígena de bromelina se atribuye predominantemente a sus componentes de la proteasa⁵⁷. Además se ha demostrado que la bromelina como ingrediente alimentario ejerce efectos antiproliferativos y proapoptóticos en células de carcinoma colorrectal y acciones quimiopreventivos contra la carcinogénesis de colon *in vivo*⁵⁸, además se ha descrito que tiene efectos beneficiosos en una variedad de enfermedades gastrointestinales, incluyendo enfermedad inflamatoria intestinales⁵⁸.

Por otro lado, en otro estudio realizado a la actividad anticancerígena del jugo de piña, se observó un aumento de la inhibición del crecimiento de células al administrar jugo de piña enriquecido con Pycnogenol®, esta actividad en el artículo se atribuye al contenido fenólico del jugo de piña, pues se cree que la actividad antioxidante de los componentes fenólicos es responsable de estas propiedades, actuando como potentes carroñeros de radicales libres, antioxidantes eficaces y agentes antiproliferativos⁵⁹.

En la familia Bromeliaceae, existe un género denominado *Puya*, en el que se encuentra predominantemente en Chile la especie *Puya chilensis*⁶⁰. Esta especie como la *Puya berteroniana*, poseen utilidades medicinales y comestible, pero no se describen los mecanismos ni la composición fitoquímica de estas, ni menos la función medicinal que presentan⁶¹, lo cual hace interesante su investigación, considerando la actividad que poseen las especies pertenecientes a esta familia.

Existen escasos reportes sobre el género *Puya*, solo se sabe que otras especies como la *Puya hamata*, *Puya raimondii*, *Puya sodiroan*, son utilizadas como alimentos y en el caso de la *Puya gummifera* esta es utilizada por los nativos de Ecuador para las dolencias del riñón⁶¹. Es por esto que surge la necesidad de realizar un estudio fitoquímico, antioxidante y citotóxico de la especie *P. chilensis*.

Descripción de *Puya chilensis* Mol.

Puya chilensis Mol. También conocida como “cardón”, “chagual”, “coto”, “coto de pastor” perteneciente a la familia Bromeliaceae, la cuales son una familia conocida particularmente por frutos comestibles como la piña, *Ananas comosus* L., fruto suramericano que se dio a conocer en Europa luego del viaje de Cristóbal Colón en 1492⁶². La bromeliáceas presentan usos muy variados, y en Latinoamérica, han sido empleadas como ornamental, medicinal, fines alimenticios, decorativos (en festividades) y ceremonial, así como también para la realización de bebidas, obtención de fibras, sustituto del café, relleno de cojines, instrumento musical, decoración de piñatas, fibra para lavar trastes e incluso algunas especies son empleadas por aves como material para realizar nidos de “heno” (nombre común empleado para *Tillandsia usneoides*)⁶¹.

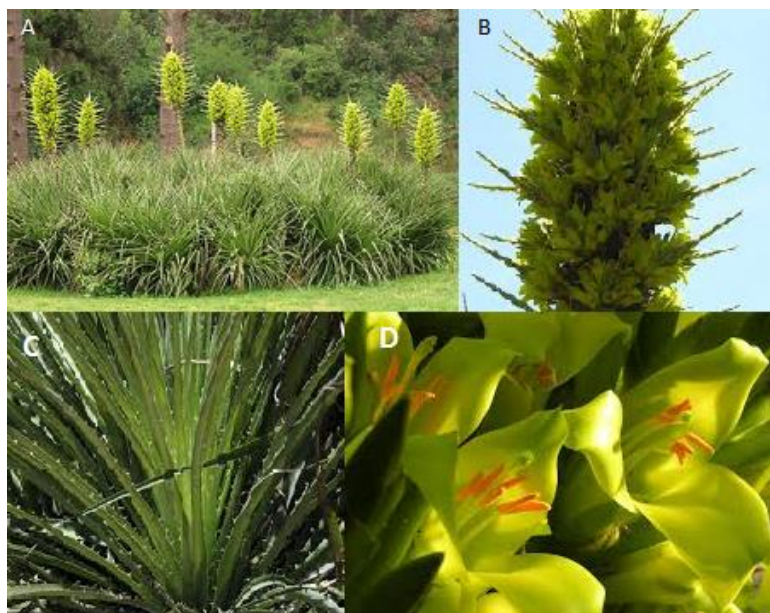


Figura 7: Imágenes de la planta en estudio A) *Puya chilensis*; B) roseta *Puya chilensis*; C) Hojas *Puya Chilensis*, D) Flores *Puya Chilensis*

En cuanto a *Puya chilensis* es una especie esclerófila siempre verde de hojas alargadas, con bordes espinosos, que forman una roseta alrededor del meristema apical, como lo muestra la Figura 7. Domina en las laderas ecuatoriales de la cordillera de la costa, desde IV a la VIII región, y está comúnmente asociada con la especie suculenta *Trichocereus chilensis*, como lo demuestra la Figura 8. Se propaga vegetativamente por medio de tallos horizontales risomatosos, que a menudo muestran proceso de auto-combustión, mecanismo adaptativo que permite el retorno de nutrientes al suelo⁶³.



Figura 8: *Puya chilensis* y *Trichocereus chilensis*, especies que tienden a encontrarse en el mismo habitat.

Las hojas están agrupadas alrededor de un tallo, erectas, rígidas, cóncavas en su cara superior por lo que son levemente arqueadas, de más de 1 m de largo por 5 cm de ancho, orladas de espinas marginales, ganchudas de 15 mm de largo y separadas de 3 a 5 cm. Del centro de las hojas nace el tallo vigoroso que crece rápidamente hasta 3-4 metros de alto, incluidas las hojas, y 10 cm de diámetro, cubierto de numerosas brácteas⁶⁴.

Esta es una planta de varios usos, ya que el escapo seco sirve para asentar navajas, los trozos de tallo sirven para flotadores de redes de pescadores, las fibras de las hojas se utilizan en la confección de cuerdas y esteras. Además el género *Puya* es interesante por sus utilidades culinarias, industriales y en medicina popular tradicional. En Chile, de las hojas de *Puya chilensis* se obtiene una fibra resistente empleada para las redes de pesca⁶¹.

La goma producida por la penetración de la larva de la “mariposa del chagual” (*Castnia psittacus*) en la base del tallo (Figura 9), es usada en medicina en remplazo de la goma tragacanto o arábiga; se le usa como emoliente y astringente^{64, 65}, ya que, en Chile, los nativos empleaban como emoliente y astringente, a una goma marrón acumulada en las inflorescencias, producto de la secreción de la planta luego de la picadura de larvas de esta mariposa⁶⁵. También se ha documentado para Chile que la flora nativa ha sido empleada por pobladores locales por sus propiedades emolientes como es el caso de *Puya berteroniana*; también se realizan, a partir de hojas y tallo de *P. chilensis*, infusiones con propiedades antiinflamatorias, alivio de fiebre y diarrea⁶⁴.

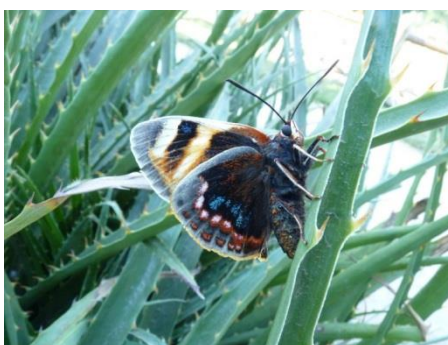


Figura 9: Mariposa del chagual en las hojas del chagual

La abundancia de esta especie se explica por su rusticidad, presentando especial resistencia a condiciones edáficas y climáticas adversas, como baja fertilidad y déficit hídrico^{66, 67}.

La polimerización de las flores se realiza generalmente por el “tordo” (*Curaeus curaeus*)⁶⁴, como queda demostrado en la Figura 10.



Figura 10: Interacción entre Chagual y el Tordo

Montenegro *et al.*, en su publicación “Potencialidad de la flora nativa Chilena como fuente de productos naturales en uso medicinal” describe que esta especie posee actividad anti-diarreico, anti-disentérico, anti-febril y además señala que los constituyentes químicos que posee esta especie son aceites esenciales y taninos⁶⁷.

A partir de estos antecedentes, se plantea un estudio del perfil fitoquímico, la actividad antioxidante y citotóxica, para poder identificar las características de esta especie y poder establecer los aportes de esta a la medicina complementaria, para mejorar la selectividad y efectividad de tratamientos sobre el cáncer de colon.

Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes expuestos en esta investigación, se propone la siguiente hipótesis:

Los extractos secuenciales de la parte aérea (tallo y flor) de *Puya chilensis* presentarían una potencial actividad antioxidante y antitumoral, debido a la presencia de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y antraquinonas), los cuales inducirían la muerte celular de la línea de cáncer de colon HT-29.

Objetivo general

1. Evaluar el contenido de fitoconstituyentes, actividad antioxidante y viabilidad celular frente al tratamiento de cáncer de colon (HT-29), de extractos de la especie *Puya chilensis* como propuesta para su introducción en la medicina complementaria.

Objetivos específicos

1. Recolectar los órganos aéreos de la especie *P. chilensis* desde Laguna Verde, en el predio de la Universidad de Playa Ancha, provincia de Valparaíso (V región), Chile.
2. Obtener los extractos de los órganos de la *P. chilensis* con disolventes en polaridad creciente: hexano, acetato de etilo y etanol.
3. Estimar la cantidad de fenoles, flavonoides y antraquinonas, presentes en los distintos extractos de *P. chilensis* mediante técnicas espectrofotométricas.
4. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la *Puya chilensis* por medio de métodos de transferencia de átomos de hidrógeno (ensayos DPPH• y TRAP) y mediante el método de transferencia de electrones (potencial antioxidante reductor del ión férrico, FRAP).
5. Determinar la viabilidad de células de cáncer de colon HT-29 y células control CoN sometidas a tratamientos con extractos de flor y tallo de *P. chilensis* en solventes con polaridad creciente.

Capítulo 2: Marco Metodológico

Características del estudio

Este es un estudio cuantitativo descriptivo que busca realizar una caracterización de constituyentes activos y de actividad antioxidantes presentes en *P. chilensis*, además de evaluar la actividad citotóxica en la línea tumoral H-29 por medio de técnicas espectrofotométricas.

Recolección de la planta

La parte aérea de *P. chilensis*, fue recolectada en Laguna Verde, en el predio de la Universidad de Playa Ancha, provincia de Valparaíso (V región), Chile, específicamente en 33° 04' 22" S- 71° 39' 27" O, en septiembre del 2015 e identificada por el ingeniero forestal Patricio Novoa.

Preparación de extractos

El material vegetal es separado entre los órganos tallo y flor, para luego en el caso del tallo ser sometido a un proceso de secado a temperatura ambiente. Del material vegetal seco se obtiene aproximadamente 500 g de del tallo y 3000 g en el caso de la flor, como masa húmeda.

El material vegetal es sometido a un proceso de maceración en solventes en polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, etanol) y posteriormente cada uno de los extractos es llevado a sequedad utilizando un evaporador rotatorio a 45°C.

Ensayo de Fitoconstituyentes

Estimación del contenido de fenoles

El contenido fenólico total se determinará por método espectrofotométrico descrito en la literatura⁶⁸, el cual permite determinar el contenido total de fenoles en los dos órganos en estudio. En este ensayo 0,5 mL del extracto (1 mg/mL) se mezclan con 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (0,2 N). Después de 5 minutos, se añaden 2 mL de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7,5%. La mezcla se mantiene en la oscuridad durante 2 hrs. a temperatura ambiente, después la absorbancia se lee a 700 nm.

El contenido de fenoles totales se determinó a partir de la extrapolación en una curva de calibración de ácido gálico, donde el contenido de fenoles totales se expresó

como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extracto seco. La estimación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo por triplicado.

Estimación del contenido de flavonoides

Otro de los constituyentes activos importantes de analizar es el contenido total de flavonoides tras el método descrito en la literatura actual^{68, 69}, el cual permite determinar el contenido de flavonoides totales de los órganos en estudio. En este método se toman 5 mL de solución del extracto (1,0 mg/mL) y se mezcla con una cantidad igual de una solución de 2% de cloruro de aluminio en etanol. Después 10 min, se midió la absorbancia contra el reactivo blanco a 415 nm, el cual consta de 1,5 mL de extracto con 1,5 mL de etanol sin $AlCl_3$. La curva estándar para flavonoides totales se hizo utilizando la solución patrón de quercetina bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Los flavonoides totales se expresaron como mg de equivalentes de quercetina (QE) por g de extracto seco. La estimación del contenido de flavonoides totales se llevó a cabo por triplicado.

Estimación del contenido de antraquinonas.

El contenido total de antraquinona se estimará de acuerdo a la literatura⁶⁸, el cual busca determinar por métodos espectrofotométricos la concentración de este metabolito secundario en los dos órganos en análisis.

El método consiste en mezclar 5 mL de solución del extracto (1,0 mg/mL) con una igual cantidad de solución de cloruro de aluminio en etanol al 2%. Después de 10 minutos, se midió la absorbancia contra el blanco de reactivo a 485 nm de longitud de onda, el cual consiste en 1,5 mL de extracto con 1,5 mL de etanol sin $AlCl_3$.

Para la curva estándar de antraquinonas totales se hizo uso de la solución estándar emodina bajo el mismo procedimiento que el descrito anteriormente. El contenido total de antraquinona se expresa en mg equivalentes en emodina (EE) por g extracto seco. La estimación del contenido de antraquinonas totales se llevó a cabo por triplicado.

Ensayos Antioxidante.

Actividad captadora del radical libre estable 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH·)

Una de las principales técnicas para evaluar la actividad antioxidante de los extractos se realiza por medio de la actividad captadora del radical libre 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH·), esta fue realizada como lo demuestra la literatura actual^{68, 70}, la cual busca evaluar la capacidad de los diferentes extractos de *P. chilensis* en análisis para captar el radical libre estable DPPH·.

Para desarrollar esta técnica es necesario preparar el reactivo DPPH· a una concentración de 50 µM, el volumen que se prepara dependerá de la cantidad de muestra que se desea evaluar, teniendo en cuenta que debe reaccionar 2,9 mL de este reactivo con 100 µL de cada extracto en estudio, este reactivo se prepara en el momento y no se puede almacenar de un día para otro.

Consiguientemente 2,9 mL de esta solución se mezcló con 100 µL de la muestra que se encontraban a cinco concentraciones distintas (1,0 mg/mL, 3,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 7,0 mg/mL, 10,0 mg/mL). La mezcla de reacción se agitó hasta generar una solución homogénea. La absorbancia (Abs.) se midió a tiempo cero y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 517 nm. Los controles fueron preparados como se menciona anteriormente, sin la presencia de la muestra, estos fueron de ácido gálico y TroloxTM. Además se determina la Abs. del color de la muestra con 100 µL de esta y 2,9 mL de etanol, con el fin de descontar el color que presenta cada uno de los extractos. La actividad captadora se estimará sobre la base del porcentaje de inhibición del radical DPPH· como se presenta en la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto bloqueador (\%)} = \left[\frac{(Abs._0 - Abs._{15'} - Abs. \text{color})}{Abs._0} \right] \times 100$$

A partir de esto, el porcentaje de inhibición obtenido proporciona el valor IC₅₀, que representa las concentraciones de extractos que causaron 50% de neutralización, tal como se determina por análisis de regresión lineal. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Análisis del poder reductor férrico (FRAP)

El poder reductor férrico es también un ensayo que se utiliza frecuentemente para la determinación de la capacidad antioxidante de diferentes extractos, este se realizó como lo plantea la literatura actual^{68, 72}. Este ensayo busca evaluar el poder que tienen los extractos para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , por medio del reactivo FRAP, el cual presenta tres componentes, una solución Buffer de 300mM, el reactivo 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triacin (TPTZ) y el tercer componente es cloruro férrico, estos componentes se mezclan en una proporción de 10:1:1 respectivamente, esta mezcla no se puede almacenar de un día para otro, por lo que el ensayo se debe realizar de inmediato.

Una vez que el reactivo FRAP está preparado se mezclan 3 mL de este con 300 μ L de agua destilada y 100 μ L de la muestra, la cual debe estar a 1gr/mL de concentración, se incuba la mezcla por 30 minutos. Luego los cambios de absorbancia se detectan a una longitud de onda de 593nm en el espectrofotómetro UV-Visible utilizando un blanco de agua destilada.

La curva de calibrado en la que se extrapolarán los datos obtenidos de absorbancia se prepara utilizando al menos ocho concentraciones distintas de TroloxTM (0-120mg/mL) y la capacidad reductora de los extracto se expresó en mM TEAC. Todas las mediciones se replicado tres veces.

Potencial antioxidante de reactividad total (TRAP)

El potencial antioxidante de reactividad total, es otra de las técnicas empleadas en la determinación de la actividad antioxidante, está se llevó a cabo como lo plantea la literatura⁷¹, la cual busca evaluar la actividad antioxidante de metabolitos secundarios por medio de métodos espectrofotométricos.

En primer lugar es necesario preparar los reactivos que se van a utilizar, la solución Buffer salina (PBS) se prepara con anticipación mezclando las siguientes sales: cloruro de sodio (NaCl), fosfato disodico (Na_2HPO_4) y bifosfato de sodio (NaH_2PO_4), a una concentración de 0,005 M para todas las sales, una vez disuelta, se debe ajustar el pH con hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar un pH de 7,4.

Los otros dos reactivos que se deben utilizar son 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotialina-6-sulfónico) (ABTS) y el 2,2'-azo-bis (2-amidino propano) (ABAP) en

donde se requiere una concentración de 150µM y 10mM respectivamente, las cuales en una relación de 1:1 se mezclan con la solución buffer, la que se debe aforar a 1000mL, esta es llevada a incubación a 45°C durante 30 minutos en donde cada 10 minutos se debe agitar para asegurar una mezcla homogénea, luego se enfría agregando agua a temperatura ambiente para detener la reacción. Esta reacción tiene una coloración característica de azul-verde la cual corresponde al radical ABTS.

La lectura se realiza a 734 nm cada 10 segundos hasta completar los 50 segundos de una solución blanco que corresponde a ABTS y a una muestra que contiene 1 mL de la mezcla y 10 µL del extracto, la cual se encuentra en una relación de 1:100, lo que significa que son 10 µL de muestra en 990 µL de buffer.

$$Abs_{total} = \frac{Abs_{50''} - Abs_{10''}}{Abs_{30''}}$$

La capacidad antioxidante total TRAP de los extractos se expresa en la capacidad antioxidante equivalente mM de TroloxTM (TEAC µM), utilizando una curva estándar de TroloxTM (de 0-120 mg / L). Todas las mediciones se repiten tres veces.

Análisis biológico

Ensayo de viabilidad celular mediante tinción con Sulforodamina B (SRB).

Al evaluar la viabilidad de células de cáncer de colon HT-29 comparadas con células control CoN, son tratadas con los diferentes extractos en estudios de *P. chilensis*, a las que se realiza el ensayo de Sulforodamina B como lo manifiesta la literatura actual^{73, 74 y 75}, el cual permite determinar a qué concentración del extracto ha disminuido la viabilidad de las células en estudios. Para poder realizar esta técnica es necesario cumplir con los siguientes pasos:

Preparación de extractos para los ensayos de viabilidad:

Un vez que se ha recepcionado el producto natural, que en este caso fueron los extractos en polaridad creciente de la parte aérea de la *P. chilensis*, deben mantenerse protegidos de la luz, se debe trabajar en fresco y mantener a -20°C la solución madres y a la solución de trabajo a 4°C. Manteniendo estas condiciones se debe diluir en

dimetilsulfoxido (DMSO) o etanol a una concentración de 0,1M, la cual será la solución madre, con esto se conseguirá una concentración de 1mM que será la concentración de trabajo, a partir de esta se realizaron cuatro concentraciones distintas (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL). Luego de esto se debe filtrar, utilizando filtros especiales (millipore para DMSO o etanol) para la solución de trabajo.

Cultivo:

Las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y la línea celular CoN deben ser lavadas y tripsinizadas antes de llegar a una confluencia del 90-100%, la tripsinización se realiza para poder remover las células que están adheridas a los pocillos, se debe lograr una solución homogénea 1:1 (suspensión celular: 0,4% (wt/vol) de azul de tripan), la densidad celular de siembra debe estar a 3 a 5×10^3 cel/pocillos. Las células son incubadas a 37°C, la cual es la temperatura fisiológica, en una incubadora de atmosfera 5% CO₂ y 95% de O₂, estas deben ser tratadas con los extractos antes preparados durante 72Hrs.

Teñido:

Posteriormente las células son fijadas con ácido tricloroacético durante 1hr. a 4°C, luego deben ser lavadas con agua destilada 3 veces por inmersión, para ser teñidas con 0,1% de sulforodamina B disuelta en ácido acético durante 30 minutos y nuevamente deben ser lavadas 3 veces pero esta vez con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no fijado en las células, cabe destacar que este colorante se va a unir precisamente a las células que han sobrevivido al tratamiento y es necesario eliminar el exceso de este colorante para obtener una lectura más limpia.

Lectura:

Finalmente la densidad celular se analiza en un lector de placas a 540 nm, la viabilidad de las células en estudio se estimará sobre la base del porcentaje de inhibición, los datos son expresados como \pm desviación estándar de tres o cuatro pocillos para tres experimentos independientes.

Análisis Estadístico

Los datos son reportados, mediante el programa STATISTICA 7.0, como valores medios \pm desviación estándar (DE). En este caso, se realizó una prueba de distribución para verificar si los datos obtenidos de las pruebas espectrofotométricas (perfil fitoquímico, actividad antioxidante y viabilidad celular) poseen una distribución normal, a partir de esta prueba se determinó que los datos no tienen este tipo de distribución y por lo tanto se realizan pruebas no paramétricas. A partir de esto se realizan pruebas Mann Whitney o Kolmogorov-Smirnov, para dos variables independientes y en el caso de múltiples variables independientes se utiliza la prueba de Kruskal-Wallis. En todos estos casos el nivel de confianza es del 95%.

Capítulo 3: Resultados

Rendimiento de extracción

Tabla 1: Porcentaje de rendimiento de los extractos de *P. chilensis*.

Órgano	Extracto	Masa total.	Masa extracto.	% Rendimiento.
Flor	HF	3000	6,86	0,23
	AF	3000	17,56	0,59
	EF	3000	49,63	1,65
Tallo	HT	562,5	3,55	0,63
	AT	562,5	8,62	1,53
	ET	562,5	36,21	6,44

HF: Hexano Flor, AF: Acetato de Etilo flor, EF: Etanol Flor, HT: Hexano Tallo, AT: Acetato de Etilo Tallo, ET: Etanol Tallo.

Estimación de metabolitos secundarios mediante análisis espectrofotométricos (perfil fitoquímico).

A partir de los extractos y de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente, se dan a conocer a continuación los resultados obtenidos, por métodos espectrofotométricos de la estimación de fitoquímicos con relevancia antioxidante (fenoles, flavonoides y antraquinonas) presentes en los extractos de los órganos de flor y tallo de *P. chilensis*.

Estimación de Fenoles.

Para el análisis de fenoles se utiliza una curva de calibrado de ácido gálico, mediante la cual se interpolan los datos obtenidos en cada uno de los extractos de *P. chilensis*, lo cual se muestra en la Figura 11.

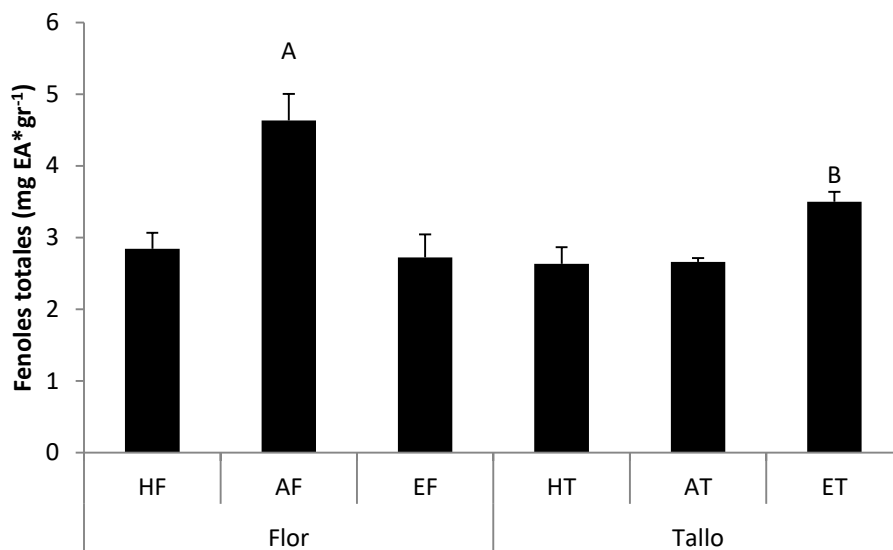


Figura 11. Estimación de Fenoles (mg EA*gr⁻¹) de extractos de *P. chilensis*. HF: Hexano flor; AF: acetato de etilo flor; EF: etanol flor; HT: hexano tallo; AT: acetato de etilo tallo; ET: etanol tallo.

Cuando se realiza el análisis estadístico de los órganos de la especie en cuanto a la concentración de fenoles totales, estos dejan de manifiesto que no existen diferencias significativas ($p= 0,34$) entre ellos (ver Figura 11), lo que indica que ambos poseen concentraciones similares de esto metabolitos.

Al analizar el contenido de fenoles entre los extractos independientes del órgano, se aprecia que no existen diferencias significativas entre dichos extractos ($p=0,63$), lo que significa que poseen una distribución similar en todos los extractos tratados, sin considerar el órgano del que provienen, es decir el solvente no suscita una variable entre las concentraciones de fenoles en los diferentes extractos.

Al comparar los extractos de un mismo órgano, en ambos casos se expresan diferencias significativas, en el caso de la flor el extracto AF presenta diferencias significativas ($p = 0,041$), con respecto al resto del grupo (representado por A), y en cuanto al tallo es el extracto ET el que presenta diferencias significativas ($p=0,042$) con el resto del grupo (representado por B). Por lo tanto, es el extracto AF y el extracto ET son los que presentan una mayor concentración de fenoles.

Estimación de Flavonoides.

Para el análisis de flavonoides se utiliza una curva de calibrado de quercitina, mediante la cual se interpolan los datos obtenidos en cada uno de los extractos de *P. chilensis*.

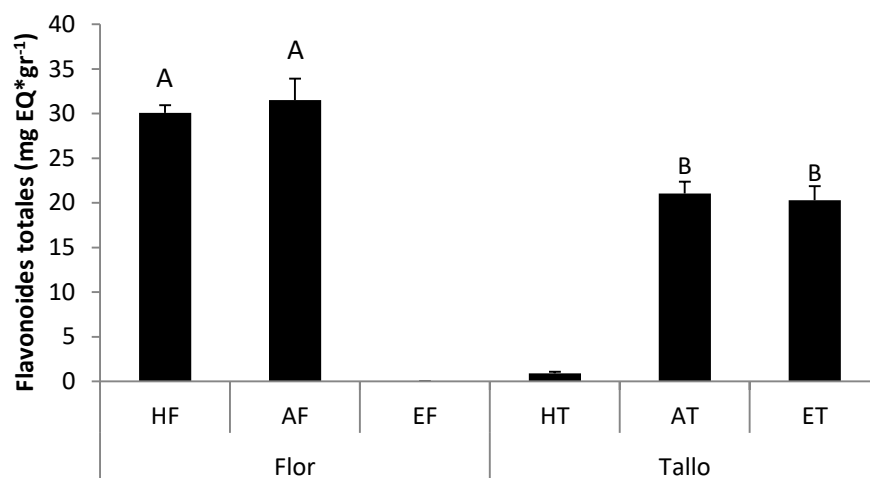


Figura 12. Concentración de Flavonoides (mg EQ*gr⁻¹) de extractos de *P. chilensis*. HF: Hexano flor; AF: acetato de etilo flor; EF: etanol flor; HT: hexano tallo; AT: acetato de etilo tallo; ET: etanol tallo

En el caso de los flavonoides la prueba estadística realizadas determinan que no existen diferencias significativas entre los órganos (ver Figura 12), dando como resultado que tanto la flor y el tallo poseen concentraciones similares de estos metabolitos secundarios ($p= 0,258$).

En cuanto al análisis de extractos de un mismo órgano, se observa, por medio de pruebas estadísticas que la concentración de flavonoides en los extractos de flor AF y HF no presentan diferencias significativas entre ellos (ver Figura 12), pero presenta diferencias significativas con el extracto EF ($p= 0,05$). En el caso de los extractos del tallo los extractos AT y ET no presentan diferencias significativas entre ellos pero si estos dos con respecto al extracto HT ($p= 0,042$).

Estimación de antraquinonas.

Para el análisis de las antraquinonas se utiliza una curva de calibrado de emodina, mediante la cual se interpolan los datos obtenidos en cada uno de los extractos de *P. chilensis* (ver Figura 13).

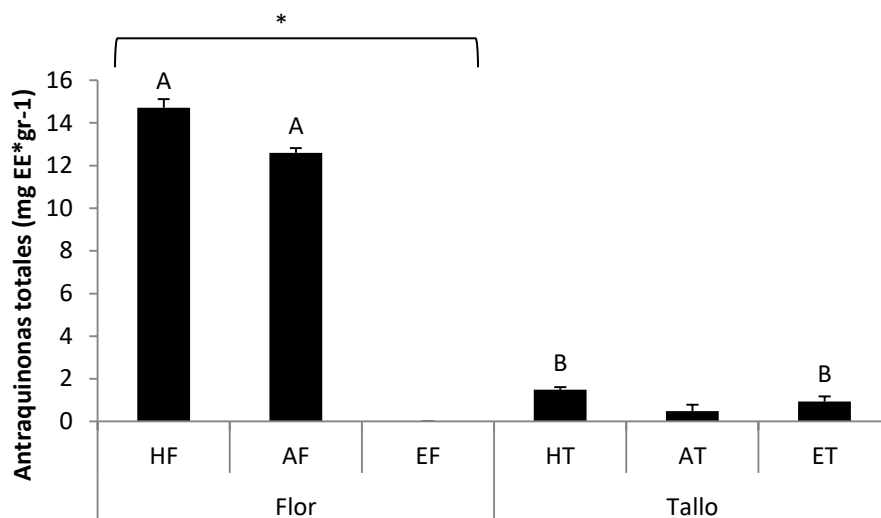


Figura 13. Estimación de Antraquinonas (mg EE*gr⁻¹) de extracto de *P. chilensis*. HF: Hexano flor; AF: acetato de etilo flor; EF: etanol flor; HT: hexano tallo; AT: acetato de etilo tallo; ET: etanol tallo

Cuando se realiza el análisis del contenido de antraquinonas en los órganos en estudios de la especie, muestra diferencias significativas entre estos ($p= 0,0015$), lo cual indica que la flor posee una mayor concentración de antraquinonas totales, con respecto al tallo.

El análisis de los extractos de un mismo órgano, refleja que no existen diferencias significativas entre el extracto HF y AF (representado por la letra A) pero si presentan diferencias significativas ($p= 0,02$) entre estos dos y el extracto EF, quedando entonces de manifiesto que la concentración de antraquinonas en el extracto EF es menor que la concentración de antraquinonas en HF y AF

Por otra parte, al realizar la misma prueba, pero para los extractos del tallo de la especie, los resultados indican que no existen diferencias significativas entre los extractos HT y ET (representado por la letra B), pero si es diferente significativamente ($p= 0,039$)

entre estos con el extracto AT, lo cual indica que el extracto HT y ET del tallo poseen una mayor concentración de antraquinonas que AT, y estos a su vez menor concentración que los extractos de la flor.

Actividad Antioxidante

La capacidad antioxidante que poseen los metabolitos secundarios de *P. chilensis* fue determinada por medio de ensayos espectrofotométricos, los cuales son DPPH \cdot , FRAP y TRAP, estos proporcionan un panorama de la actividad antioxidante que poseen cada uno de los extractos en estudio.

Determinación de capacidad secuestradora del radical libre estable DPPH \cdot .

Para esta determinación se calcularon los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de cada uno de los extracto de la especie contra el radical libre estable DPPH \cdot , y esto se contrastaron con patrones de referencia TroloxTM y ácido gálico, como lo manifiesta la Figura 14.

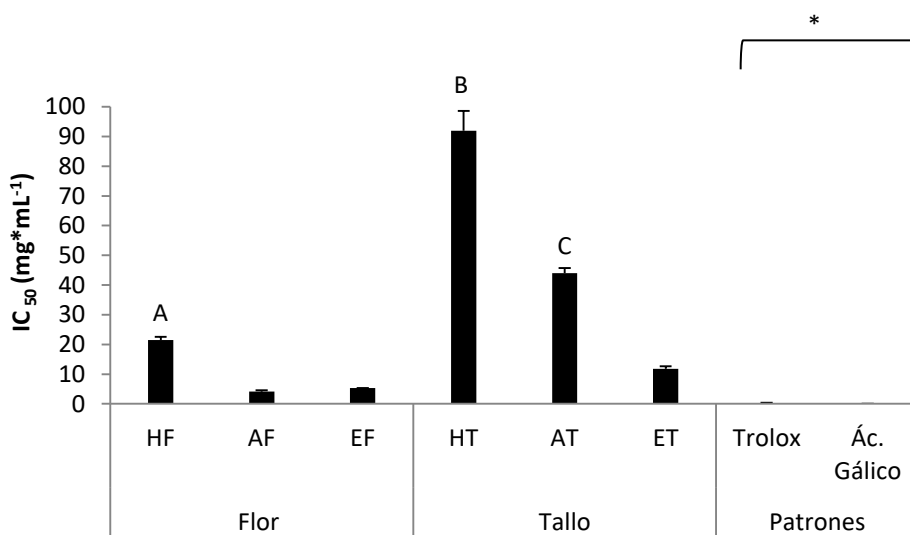


Figura 14. Concentración inhibitoria media del radical libre DPPH \cdot (IC_{50} mg*mL⁻¹) de los extractos de *P. chilensis*, comparados con controles positivos de TroloxTM y ácido gálico.

A partir de la figura 14 que muestra los análisis estadísticos de esta prueba, es posible señalar que existen diferencias significativas entre los patrones y los órganos de la

planta ($p= 0,0005$), lo que implica que los extractos poseen una menor capacidad inhibitoria media del radical libre estable DPPH·con respecto a los controles.

Al comparar los extractos de cada órgano, la flor manifiesta diferencias significativas ($p= 0,026$) entre el extracto HF (representado por A) y los otros extractos del mismo órgano, siendo este el que posee menor concentración inhibitoria media en el órgano. Para el caso del tallo se demuestra que existen diferencias significativas ($p= 0,027$) entre HT (representado por B) y los otros dos extractos, en el caso del extracto AT (representado con la letra C) también presenta diferencias significativas ($p=0,027$) con los otros dos extracto del mismo órgano, es decir los extractos HT y AT son los que presentan una menor concentración inhibitoria media en este órgano.

Determinación del potencial antioxidante reductor del ión férrico (FRAP).

Para esta determinación los resultados obtenidos de la actividad antioxidante medida por la reducción del ión férrico en cada uno de los extractos de *P. chilensis* se utilizó una curva de calibrado de TroloxTM, mediante la cual se interpolan los datos obtenidos de cada uno de los resultados, como se muestra en la figura 15.

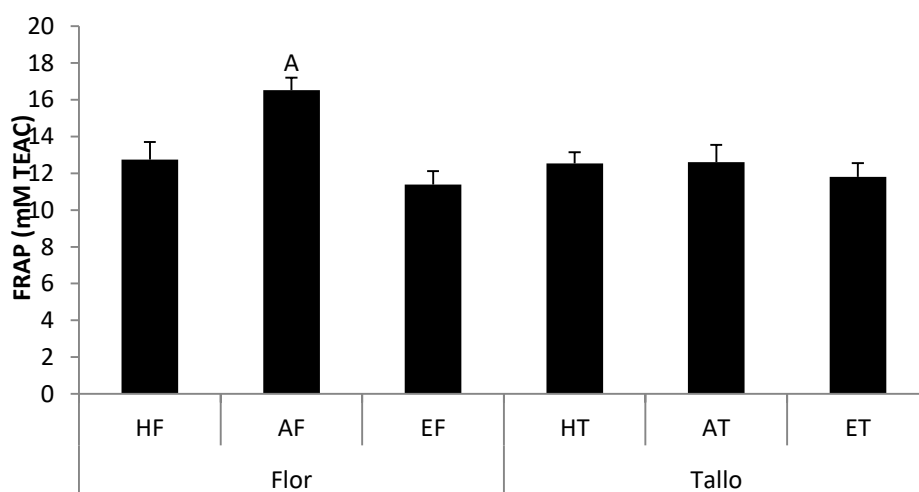


Figura 15. Actividad FRAP expresada en valores de mM TroloxTM (equivalente TEAC).

Para el análisis de la actividad antioxidante FRAP las prueba estadística arrojaron que no existen diferencias significativas ($p= 0,38$) entre los dos órganos, lo que implica que la distribución de la actividad antioxidante es homogénea.

En cuanto a la comparación de los extractos y su capacidad antioxidante FRAP las pruebas arrojaron como resultados que no existen diferencias significativas entre todos los extractos ($p= 0,24$), lo que reafirma que la distribución es similar en todos los extractos en forma general.

Por otro lado, cuando se establece el análisis entre los extractos de un mismo órgano, los extractos de la flor demuestran que existen diferencias significativas ($p=0,039$) entre el AF con los otros dos extractos (representado por A), con ello se puede señalar que existe una mayor actividad del extracto AF que de los extractos HF y EF. Finalmente, los extractos del órgano tallo no presentan diferencias significativas ($p=0,28$), lo que indica que ninguno de estos tiene mayor actividad que el otro.

Determinación del potencial antioxidante total para la captura de radicales (TRAP).

De acuerdo al protocolo, se dan a conocer los resultados de la actividad TRAP presentes en los distintos extractos de la especie en estudio (ver Figura 16). Para esta determinación se utilizó una curva de calibrado de Trolox™ (0-120 mg / L), mediante la cual se interpolan los datos obtenidos de cada uno de los extractos de la planta.

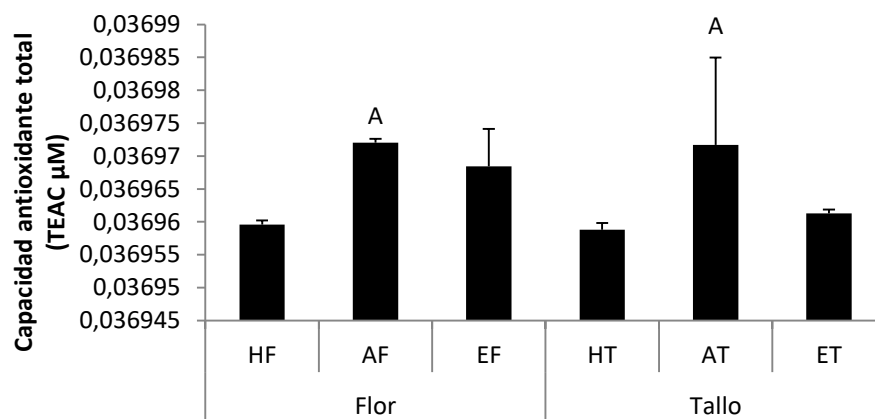


Figura 16. Capacidad secuestradora de radicales libres (TRAP expresada en valores de mM Trolox™ (equivalente TEAC). de los extractos *P. chilensis*.

Al realizar el análisis estadístico correspondiente a la actividad antioxidante TRAP se expresa que entre los órganos no existen diferencias significativas ($p= 0,34$) lo que implica que poseen una actividad antioxidante similar.

Al realizar el análisis estadístico entre todos los extractos se demuestra que si existen diferencias significativas ($p=0,015$) entre estos, pero que AF y AT no presentan diferencias entre sí, por lo tanto son estos los que tendrían mayor actividad antioxidante según el ensayo TRAP.

Por otra parte, al realizar el análisis estadístico para cada órgano se demuestra que en el caso de la flor el extracto AF presenta una pequeña diferencias significativa ($p= 0,429$) con los otros dos, de la misma forma el extracto AT del órgano tallo presenta diferencias significativas ($p= 0,027$) entre los otro dos extracto del mismo órgano, es decir, siguen siendo los extracto de acetato de etilo los que presentan mayor actividad antioxidante según el ensayo TRAP.

Análisis de citotoxicidad

Para realizar los análisis de citotoxicidad el ensayo realizado fue la viabilidad celular de células de cáncer de colon (HT-29) y una línea celular control (CoN), donde los resultados se expresan en concentración inhibitoria media de los tratamientos utilizados (ver Figura 17).

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los extractos de *P. chilensis* en línea celulares HT-29 y CoN.

A continuación se presentan las concentraciones inhibitorias medias de ambas líneas celulares en estudio.

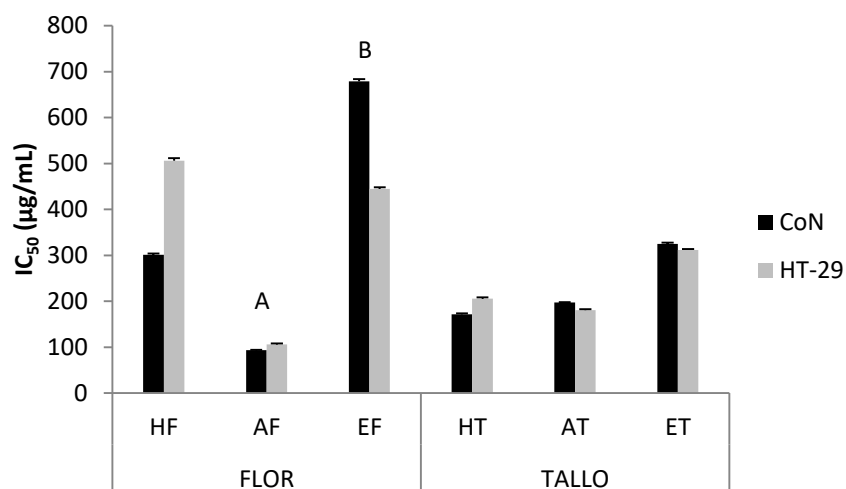


Figura 17. Valores de IC₅₀ (µg/mL) con respecto a la viabilidad celular.

La Figura 17 representa la concentración de diferentes tratamientos, donde se muestra la inhiben el 50% de la viabilidad celular, y a partir de diferentes pruebas estadístico se puede señalar que no existen diferencias significativas ($p= 0,924$) entre las líneas celulares, es decir, tienen un comportamiento similar, análogo es lo que ocurre con los órganos de la planta en estudio, pues no existen diferencias significativas entre ambos órganos, lo que indica un comportamiento similar, que se ajusta claramente a los resultados de % de viabilidad.

Por otro lado, al realizar la prueba estadística para el comportamiento de los diferentes tratamiento, se reflejan diferencias significativas ($p= 0,0012$), donde tratamiento expresado como A es diferente significativamente con el tratamiento expresado como B y entre el resto de los tratamientos no existen diferencias significativas, por ende, el tratamiento A que representa a AF es el que posee menor concentración inhibitoria media para la viabilidad celular, es decir, es este tratamiento el que inhibe el 50% de la viabilidad celular a menor concentración.

Tabla 2: Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los tratamientos con respecto al medicamento doxorubicina como patrón

ORGANO	TRATAMIENTO	HT-29	CoN
Flor	HF	506,3 \pm 5,1	301,4 \pm 2,5
	AF	105,9 \pm 2,5	93,3 \pm 0,9
	EF	444,6 \pm 3,5	678,8 \pm 4,7
Tallo	HT	205,5 \pm 2,7	171,4 \pm 1,9
	AT	180,4 \pm 2,5	197,5 \pm 0,4
	ET	311,6 \pm 2,0	325,1 \pm 2,8
-	Doxorrubicina	1,17 \pm 0.02	-

La tabla 2 muestra que la relación de los tratamientos que se realizaron a células de cáncer de colon se demuestra que el fármaco, presenta cien veces mayor toxicidad en las células cancerígenas de colon que el extracto de AF, mientras que en el extracto menos activo (HF) el farmaco presenta una actividad cuatrocientas veces mayor que HF.

Capítulo 4: Discusión y Conclusión

Estimación de Fenoles

Los resultados obtenidos (ver Figura 11) demuestran que no existen diferencias significativas entre los órganos y extractos de esta especie, lo que puede deberse a que los compuestos fenólicos cumplen con una gran diversidad de funciones en la planta, entre las que destaca la defensa ante el estrés biótico, la protección contra agentes patógenos, depredadores, y también como mecanismo de defensa contra estrés abiótico como la radiación UV, bioacumulación de metales pesados, estrés hídrico y salino entre otros, los cuales se comprometen de distintas formas a la respectiva estructura de la planta³⁹.

Por otro lado al analizar los extractos de la flor, esta si presentan diferencias significativas ($p= 0,041$), pues la concentración de fenoles en el extracto AF es mayor que en resto de los extractos de este miembro, lo que puede significar es que el extracto de acetato de etilo tiene una hidroxilación media³⁹. En el caso del extracto etanolico del tallo (extracto ET), presenta diferencias significativas ($p=0,042$) con el resto de los extractos de este miembro, es decir, el extracto ET está mayormente sustituido por grupos hidroxilo que el extracto AF, producto de las polaridades de estos solventes³⁹.

La importancia del contenido fenólico de estos extractos radica en que los compuestos fenólicos pueden interferir distintas etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos, ya que son capaces de proteger al ADN del daño oxidativo, inhibiendo además la expresión de los genes mutágenos y de la actividad de las enzimas encargadas de la activación de procarcinógenos, y activando los sistemas enzimáticos responsables de la detoxificación de xenobióticos⁷⁶. Se ha demostrado que la digestión gastrointestinal causa un aumento en compuestos fenólicos en diferentes alimentos. Por ejemplo, en extracto de trigo, el contenido de fenoles aumentó después de la hidrólisis gastrointestinal, además se ha observado que la concentración fenólica aumentó en digestión gastrointestinal in vitro de las manzanas, debido a la degradación de los polímeros en monómeros y agliconas⁵⁹.

Estimación de Flavonoides.

Cuando se realiza el análisis por órgano se expresa que el extracto de hexano (HF) y acetato de etilo (AF) de la flor presentan una mayor concentración de estos metabolitos que el extracto etanolico (EF), del mismo miembro, así lo indica la Figura 12,

esto revela que los flavonoides obtenidos son de baja polaridad, esto puede deberse a que tienen pocas sustituciones de grupos hidroxilos en la estructura, o bien pocas azúcares asociadas a la misma, lo cual permite extraer este tipo de compuestos en solventes con polaridad menor, como en hexano o acetato de etilo, de esta manera serán moderadamente solubles en solventes polares como el etanol, metanol, butanol⁶². Por otra parte los extractos de hexano generalmente contienen clorofila⁶² y cuando la especie en estudio tiene presencia de agliconas de flavonoides altamente metoxiladas, este extracto como también el de cloroformo y acetato de etilo son ricos en este metabolito secundario, debido a su baja polaridad³⁹.

En el caso del tallo los extractos con mayor concentración de estos metabolitos son AT y ET, presentando diferencias significativas entre estos y el extracto HT, lo cual puede deberse a que los flavonoides extraídos de este órgano tengan mayor polaridad, es decir, mientras más hidroxilos sustituidos y azúcares posea el flavonoide, mayor será la polaridad y por ende el extracto etanólico es quien debería poseer mayor concentración de estos metabolitos³⁹, como ocurre en este caso, en donde el extracto AT y el ET no presentan diferencias significativas entre ellos.

La Figura 12 muestra que los flavonoides poseen una distribución homogénea en los diferentes órganos de *P. chilensis*, esto se puede deber a que ambos órganos corresponden a la parte aérea de la planta y por ende están expuestos a agentes de estrés abiótico como la radiación UV, puesto que se ha descrito que estos metabolitos cumplen una función importante en la fotoprotección contra este tipo de radiación⁴². Además existe evidencia de que estos metabolitos secundarios son inducidos por la radiación UV⁴³, las características de absorción de la radiación ultravioleta por parte de los flavonoides se han considerado durante mucho tiempo como el principal papel que cumplen los flavonoides en las plantas, de hecho, los flavonoides a menudo están presentes en altas concentraciones en las capas de células epidérmicas de hojas y en tejidos susceptibles a la luz UV, como el polen y el meristema apical⁴³, lo cual permite encontrar mayor concentración de estos metabolitos en órganos expuestos a la radiación, como lo son la flor y el tallo de la especie en estudio.

Cabe destacar, que la protección contra la radiación UV no es la única función protectora que cumple este metabolito en la planta, sino que además es capaz de proteger de microorganismos, tanto bacteriano como hongos, insectos y también animales

herbívoros, esto producto de que el metabolismo de estos fitoconstituyentes, que son fenólicos, se activa a nivel transcripcional como respuesta a estos diferentes agentes de estrés biótico y abiótico⁴⁵, por ende es posible señalar que las concentraciones de flavonoides en el tallo puede ser producto de la penetración de la mariposa del chagual en el tallo de la especie. De esta manera, la labor protectora no es la única que cumplen los flavonoides, sino que también son capaces de actuar a nivel de señales químicas y efectos contra enzimas, por ende, es difícil adjudicar la concentración de estos metabolitos en esta especie, solo a la protección de la radiación UV⁴⁵, pues además están descritas otras funciones para estos metabolitos.

De la misma forma en que los flavonoides cumplen variadas funciones en las plantas, en los seres humanos también puede tener diferente actividad, la cual se debe principalmente a la alta reactividad química de estos fitoconstituyentes, la cual se expresa en su afinidad de enlace a polímeros naturales, e iones de metales pesados, así como también su capacidad para catalizar el transporte de electrones y secuestrar radicales libres^{77, 78, 79}. Es por esto que la relación de estas moléculas con el hombre, presentan una serie de actividades farmacológicas, dependiendo de ciertas características de su molécula, entre las que se destaca su actividad sobre el sistema circulatorio disminuyendo la fragilidad capilar, la parodontosis en la que se produce inflamación y destrucción del tejido conectivo, también actúa en la prevención de la formación de placas de aterosclerosis, siendo beneficiosos en la prevención de la arterioesclerosis y el infarto del miocardio, además opera en la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer actuando a diferentes niveles dentro del proceso de inducción y proliferación de los tumores, principalmente en cáncer de pulmón, asimismo su actividad se presenta en otras enfermedades e incluso es utilizado en la cosmética^{45, 80}.

Finalmente, la actividad molecular de estos fitoconstituyentes, como el secuestro de radicales libres genera el interés por el estudio de estos, resaltando su actividad antioxidante y los beneficios que traen consigo al desarrollo tratamientos de enfermedades o de terapias complementarias.

Estimación de antraquinonas.

Al realizar un análisis de la Figura 13 se observa que existe una mayor concentración de antraquinonas en la flor de la especie, lo cual se debe a que las

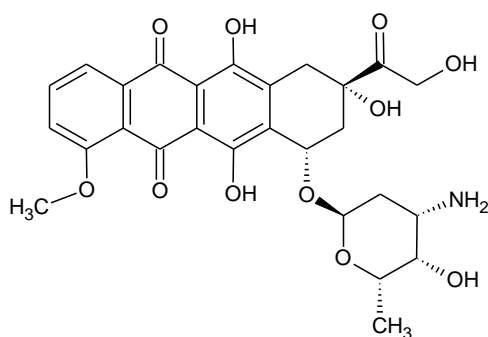
antraquinonas son pigmentos de color amarillo a rojo intenso, color que es característico de la flor en la especie en estudio.

La flor de *P. chilensis* posee un color amarillo particular, esto puede deberse a que las antraquinonas son de color amarillo claro, aunque cuando están sustituidas por grupos auxocrómicos (ejemplo -OH, -COOH, -NH₂⁸¹), en una o más de sus ocho posiciones disponibles, se produce un incremento de la intensidad del color, el cual se desplaza al rojo intenso. Cuando mayor es el número de los grupos sustituyentes donadores de electrones, más fuerte y profundo será el color. La sustitución en posición alfa da más color que en la posición beta, debido a la interacción de un par de electrones no compartidos del grupo auxocromo quinónico⁸². En cuanto a la información presentada es posible señalar que en la flor de *P. chilensis* existe una mayor concentración de este metabolito poco sustituido por grupos auxocrómicos, lo cual revela una baja polaridad de estos fitoconstituyentes, permitiendo extraer una mayor concentración de antraquinonas en los solventes menos polares como hexano y acetato de etilo, expresando en la Figura 13.

Una de las antraquinonas más representativa es la emodina está presente en numerosas plantas medicinales donde la actividad anticancerígena es una de las más relevante, se ha demostrado que el mecanismo que esta utiliza, además de inhibir numerosas proteínas quinasas, es que la emodina puede ser un inhibidor de la caseína quinasa II (CK2), una serina-treonina quinasa altamente expresada en numerosos tipos de cáncer y puede sensibilizar las células tumorales para incrementar los efectos citotóxicos de algunos agentes quimioterapéuticos, tales como el trióxido de arsénico y el cisplatino⁸³, con esta información y teniendo en cuenta que los extractos más activos en la inhibición del cáncer de colon (ver Figura 17) son precisamente aquellos donde existe mayor concentración de antraquinonas, se puede señalar que estos extractos podrían ser utilizados en terapias complementarias de diferentes tipos de cáncer.

Si tomamos en cuenta que el tratamiento clínico de las enfermedades neoplásicas se basa en los procedimientos complementarios de cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia, es sabido que este último es un tratamiento en el que se utiliza doxorubicina (Dox) que es un antibiótico antitumoral que pertenece al grupo de las antraciclinas, la cual tienen una estructura antraquinónica enlazada con un amino-azúcar (ver Figura 18), el cual es capaz de intercalarse en la cadena de ADN como mecanismo de acción de este antibiótico, se considera que el encaje en la cadena del ADN, se debe a la afinidad del grupo amino de estos antibióticos por los fosfatos del ADN, ocasionando la

inestabilidad de este complejo y obstaculizando la replicación del mismo, la transcripción y la traducción, con el consecuente daño que conduce a la muerte de la célula tumoral^{84, 85}.



Doxorrubicina

Figura 18: Estructura de doxorubicina utilizada en tratamientos contra el cáncer⁸⁶.

Si bien, esta droga cumple un rol fundamental en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, esta posee fuertes efectos secundarios que se pueden mitigar con bajas dosis, pero prolongadas, para de esta manera evitar náuseas, vómitos, arritmias, neutropenia, alopecia completa, mielosupresión, supresión inmune, pero además este medicamento puede dañar el corazón, porque su administración lleva a la producción de radicales libres al mismo tiempo que se anula el glutatión peroxidasa intracelular, el cual es fundamental contra el ataque de los radicales libres⁸⁷. Es por estos antecedentes que es de suma importancia avanzar en estudios que permitan encontrar nuevas estructuras con efectos secundarios reducidos al mínimo, y tanto la emodina como la evidencia de esta droga con base antraquinónica proporciona el sustento para incorporar las altas concentraciones de antraquinonas encontradas en los solventes menos polares de la flor de *P. chilensis* en estudios orientados a la medicina complementaria.

Determinación de capacidad secuestradora del radical libre estable DPPH·.

El ensayo DPPH·, es un ensayo altamente utilizado para la determinación de la actividad antioxidante de diferentes jugos de frutas, como también de extractos de plantas, donde el radical libre DPPH· enfrenta una decoloración desde el violeta al amarillo en presencia de moléculas antioxidantes⁸⁸, en este caso se determinó la actividad antioxidante de los extractos de *P. chilensis*, frente a patrones, como ácido gálico y Trolox™, donde se observa en la Figura 14 la existencia de diferencias significativas entre los patrones utilizados y los diferentes extractos, lo que implica que estos extractos tienen

una menor capacidad secuestradora del radical libre estable DPPH·, comparando esta actividad con dichos patrones.

Entre los extractos que tienen una mayor capacidad para inhibir el 50% del radical DPPH· se encuentra el extracto AF, lo cual se puede justificar, pues la mayor cantidad de metabolitos secundarios se encuentran precisamente en este extracto, es decir, los tres tipos de fitoconstituyentes en estudio (fenoles, flavonoides y antraquinonas) muestran una alta concentración de estos, con respecto al resto de los extractos. Por otro lado, los extractos etanolicos de ambos órganos (EF y ET) presentan una cercana inhibición del radical, pero esta sigue siendo menor que la de los patrones de ácido gálico y TroloxTM, lo cual se debe a que los extractos de dicho solvente, si bien no presentan la mayores concentraciones, de igual forma se destacan frente al resto de los extractos, en el caso de EF en los fitoconstituyentes en estudio solo se presenta una alta concentración en el análisis de fenoles, pues en el resto no hay presencia de estos metabolitos (flavonoides y antraquinonas), lo cual permite señalar que el porcentaje de inhibición se debe a los compuestos fenólicos cuando se observa el extracto etanólico y su inhibición.

Por otro lado los extractos ET en todos los casos en estudio existe presencia de este, siendo en el análisis de fenoles y antraquinonas donde la concentración de los metabolitos destaca por sobre el resto de los extractos del mismo órgano, lo cual permite adjudicar a estos la capacidad inhibitoria media que posee el extracto etanólico del tallo.

La actividad antioxidante de algunos extractos polares es debida, al menos en parte, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por donación de protones (capacidad secuestradora de radicales libre), lo cual explicaría que sean los extractos con mayor polaridad los que presentan una mayor capacidad inhibitoria media, es por esto que en cualquier caso es importante la estructura del compuesto antioxidante presente en el extracto⁸⁹.

Finalmente, si se observa la Tabla 3 de los anexos, la cual se refiere a las correlaciones de los ensayos realizados, la actividad DPPH· se debe en una mayor proporción al contenido fenólicos de los diferentes extractos, pues entre estos dos ensayos existe un 45% de correlación, lo cual se ajusta a la presencia de grupos hidroxilos como se menciona con anterioridad.

Determinación del potencial antioxidante reductor del ión férrico (FRAP).

El método FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso; en esta forma, el ion forma un complejo

coloreado con el compuesto 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ)⁹⁰. El método FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones⁹¹.

Al realizar el análisis de la Figura 15, esta demuestra que no existen diferencias significativas entre los órganos, ni tampoco cuando se analizan todos los extractos entre sí, lo cual puede deberse a la distribución similar de los compuestos fenólicos, los cuales presentan un porcentaje de correlación del 80%, entre este y el ensayo FRAP. Sin embargo, el extracto de acetato de etilo de la flor vuelve a destacar frente a los extractos del mismo órgano esto puede deberse a que las pruebas que se realizaron a los fenoles también demuestran un aumento de estos metabolitos en el extracto AF, puesto que existe una directa relación entre estos compuestos y la actividad antioxidante establecida por este ensayo⁹².

Por lo tanto, en el extracto AF existen compuestos fenólicos con una alta capacidad de reducir al Fe^{+3} a Fe^{+2} , además de compuestos que posean una actividad neutralizadora de radicales libres, puesto que en el ensayo DPPH· el extracto que inhibía a este radical a una menor concentración, precisamente era el extracto de acetato de etilo de la flor.

Determinación del potencial antioxidante total para la captura de radicales (TRAP).

Este método se basa en la protección proporcionada por los antioxidantes sobre la degradación del color durante una reacción de peroxidación controlada. La coloración se apaga mediante ABAP y la interacción con el reactivo ABTS· como un generador de radicales. Esta reacción se mide en la presencia de antioxidantes presentes en los extractos empleados, lo cual provoca la desintegración de la decoloración del cromóforo color verde característico del reactivo⁹³. Se ha descrito que el potencial antioxidante TRAP se debe a la presencia de compuestos fenólicos y sus derivados⁹⁴.

Al observar la Figura 16, la actividad antioxidante que evalúa este ensayo presenta una distribución similar en los órganos analizados, pero al realizar pruebas estadísticas para cada órgano, se expresa que son los extractos de acetato de etilo los que han vuelto a manifestar diferencias significativas con el resto de los extractos de cada órgano, esto se puede deber a que existe una correlación entre el ensayo y la concentración de

flavonoides en el extracto AF, la cual es del 40%, muy por sobre a la correlación que existe entre este ensayo y el resto de los ensayos de fitoconstituyentes.

Evaluación inhibitoria media de la (IC₅₀) de viabilidad celular

Evaluar la capacidad inhibitoria media es de absoluta relevancia en estos casos en donde extractos a concentraciones crecientes actúan sobre una célula, estas células son las líneas HT-29 y CoN, en este caso los tratamientos que inhiben a menor concentración el 50% de la viabilidad celular, en ambas líneas en estudio, son el AF, HT y AT, donde se observa en la figura 17 que los tratamientos con extractos de acetato de etilo son los que inhiben a menor concentración el 50% de la viabilidad celular.

Esto se puede deber a que la concentración de antraquinonas posee una correlación con la actividad inhibitoria media de 52%, lo cual no es extraño pensando en que existen medicamentos que se utilizan actualmente para el tratamiento del cáncer que se basan en una estructura antraquinónica llamado doxorubicina, por otra parte el ensayo que puede justificar esta actividad es el DPPH·, el cual presenta una correlación del 64% con la actividad inhibitoria media, esto producto de que se destaca nuevamente el extractos de acetato de etilo los que presentan un mejor perfil fitoquímico y actividad antioxidante y como se mencionó anteriormente son diversos los compuestos o fitoconstituyentes que podrían actuar sobre la actividad antitumoral.

Es importante destacar que existe una alta concentración de flavonoides en extractos HF, AF, AT, ET; de fenoles en los extractos AF, y ET; y de antraquinonas en los extractos HF y AF, lo cual permite señalar que la actividad anti-tumoral no depende solo de un grupo de metabolitos o compuestos, sino que son variados los compuestos que podrían aportar en esta actividad, pues la literatura señala que las plantas presentan una composición muy variada en su estructura y de ellas son diversos los compuestos activos que manifiestan efecto antitumoral. Por estas razones la búsqueda de agentes antitumorales a partir de plantas continúa siendo una tarea de interés en la obtención de mecanismos novedosos de actividad antitumoral⁹⁵. Por lo tanto, los análisis de viabilidad son solo preliminares y es por esto que no se pueden realizar conjeturas resolutivas sobre estos resultados.

Por otro lado, es importante destacar que no existen diferencias significativas entre ambas líneas celulares, lo cual puede indicar que el comportamiento de los

tratamientos con los extractos más activos, frente a estas líneas celulares de cáncer de colon y la línea celular sana es similar, por ende, los extractos más activos (AF, AT y HT) no son selectivos tanto para HT-29 como para las células CoN.

Como se aprecia en la Tabla 2, al comparar el resultado de los extractos frente a los tratamientos (HT-29 y CoN) con el valor de Doxorubicina como tratamiento control⁹⁶, se demuestra que el fármaco, presenta cien veces mayor toxicidad en las células cancerígenas de colon que el extracto de AF, la actividad de este se puede observar en base a la alta presencia de antraquinonas y a la actividad antioxidante en dicho extracto, que al tener la misma estructura molecular base que el medicamento utilizado, podría estar cumpliendo funciones similares, si bien, los mecanismos de acción no están estudiados ni aclarados, es importante desarrollar más estudios que permitan determinar estos mecanismos, para poder introducir la planta en la medicina complementaria.

Conclusiones

En relación al objetivo general, el cual consiste en evaluar el contenido de fitoconstituyentes (fenoles, flavonoides y antraquinonas), la actividad antioxidante por medio de ensayos espectrofotométricos (DPPH[•], FRAP y TRAP) y la viabilidad células en cepas HT-29 y CoN frente a tratamiento con extractos en solventes con polaridad creciente de *P. chilensis*, se logró evaluar y determinar cada uno de estos parámetros por medio de métodos establecidos, determinando su presencia y actividad en diferentes proporciones.

Respecto a la estimación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de la especie en estudio, se concluye:

El extracto que presenta una mayor actividad antioxidante y mejor distribución de los metabolitos secundarios en estudio es el de acetato de etilo de la flor, representando diferencias significativas con el resto de los extractos. En el caso de fenoles tienen una distribución homogénea en todos los extractos sin distinción de órgano, pero sí de extracto, donde el extracto de acetato de etilo de la flor presenta diferencias significativas con el resto de ellos. En cuanto a los flavonoides se distribuyen de forma heterogénea por medio de los órganos en estudio destacando en la flor los extractos con polaridad menor (HF y AF) y en el tallo los extractos con polaridad mayor (AT y ET). Finalmente la flor de la

planta es la que presenta mayor cantidad de antraquinonas, específicamente en los extracto de hexano y acetato de etilo.

Respecto a la estimación de la actividad antioxidante que presentan los extractos de *P. chilensis*, se concluye:

El extracto que presenta una mejor actividad antioxidante en los ensayos en estudio (DPPH·, FRAP y TRAP) es el de acetato de etilo de la flor, encontrándose en este, diferencias significativas en todos los ensayos con el resto de los extractos del mismo órgano. En cuanto al extracto que presenta una mejor actividad antioxidante en el ensayo DPPH· es el AF, presentando una actividad cercana a la de los controles positivos TroloxTM y ácido gálico. En el caso del ensayo FRAP la distribución de la actividad de los extractos de la planta en estudio es similar, pero resalta la actividad del extracto AF, el cual presenta diferencias significativas con el resto de ellos. Al igual que en el ensayo FRAP la distribución de la actividad antioxidante para el ensayo TRAP es similar en todos los extractos, pero destacando significativamente solo los extracto de acetato de etilo para ambos órganos.

En relación al ensayo de concentración inhibitoria media, de las líneas celulares tratadas con extractos de la planta en estudio, se concluye:

Al obtener la concentración inhibitoria media (IC_{50}) es el extracto de acetato de etilo de la flor, el que posee mejor actividad inhibitoria media de la viabilidad celular a una menor concentración, en ambas cepas celulares.

Proyecciones

En función de los resultados obtenidos en la determinación de fitoconstituyentes, actividad antioxidante y viabilidad celular, se propone:

- Aislar los compuestos activos de los extractos que presentan mayor concentración de fitoconstituyentes o mejor actividad antioxidantes de *P. chilensis* y probarlos en células de cáncer de colon, y realizar pruebas de citotoxicidad.
- Realizar un ensayo de permeabilidad de membrana a los tratamientos de las líneas celulares realizados con los extractos de *P. chilensis*, con el fin de dilucidar el mecanismo de muerte celular al que se está sometiendo estas células.
- Realizar un ensayo de caspasa-3 a los tratamientos de las líneas celulares realizados con los extractos de *P. chilensis*, con el fin de dilucidar el mecanismo de muerte celular al que se está sometiendo estas células.
- Por medio de estos estudios publicar los resultados, ya sea en congresos y artículos con el fin de dar a conocer las propiedades de la especie y protegerla de la tala indiscriminada por fines gastronómicos.

Referencias bibliográficas

1. Harman, D. (2002). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science's SAGE KE*, **14**, 298-300.
2. Avello, M., Suwalsky, M. (2006) Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)* **494**, 161-172.
3. Naqui, A., Chance, B. (1986) Reactive oxygenintermediates in Biochemistry. *Annual Review of Biochemistry*. **55**, 137-166
4. Martínez Sánchez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*, **39**, 0-0.
5. Gutiérrez, V., Justo R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, **31**, 126-133.
6. Allaire, A. D., Ballenger, K. A., Wells, S. R., McMahon, M. J., & Lessey, B. A. (2000) Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, **96**, 271-276.
7. Sugino, N., Takiguchi, S., Umekawa, T., Heazell. A., Caniggia, I. (2007) Oxidative Stress and Pregnancy Outcome: A Workshop Report. *Placenta*. **21**, 48-50.
8. Ríos-Enríquez, M., Shahin, N., Bossmann, S., Oliveros, E., Braun, A., Durán-de-Bazúa, C. (2002) Experimento en un reactor solar para la degradación de xilidina y sulfolán empleando reacciones tipo Fenton. *Tecnología, Ciencia Educación*. **17**(1): 23-34.
9. Rodríguez, J., Menéndez, J., Trujillo, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, **30**(1), 15-20.
10. Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., & Sumaya Martínez, M. T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia*, **18**(50), 10-15.
11. Cheeseman, K., Slater, T. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49**, 481-493.
12. Ramos, F., Muñoz, A., Alvarado, C., Yañez, A. (2010). Antocianinas, polifenoles, actividad anti-oxidante de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.)

- y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. *Revista Sociedad Química de Perú*. **76**, 61-72.
13. García, B., Saldaña, A., Saldaña L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, **12**(2), 187-196.
 14. Miwa, S., Muller, S., Beckman, K. (2008). The basics of oxidative biochemistry. *Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases*. Totowa, NJ: Humana Press.11-37.
 15. Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, **136**(5), 823-837.
 16. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**(1), 57-70.
 17. Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*, **13**(6), 472-482.
 18. Wyllie, A. H., Kerr, J. R., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, **68**, 251-306.
 19. Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal*, **11**(5), 1921.
 20. Fedi, P, Tronick, S.R, and Aaronson, S.A. Growth factors. *Cancer Medicine* .Williams y Wilkins ,Baltimore, MD ; 1997
 21. Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**(3), 323-330.
 22. Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, **281**(5381), 1317-1322.
 23. Bouck, N., Stellmach, V., & Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Advances in cancer research*, **69**, 135-174.
 24. Sporn, M.B. (1996) The war on cancer. *Lancet*.**347**, 1377-81
 25. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Nota descriptiva N°297 Febrero de 2015.

26. Defunciones y mortalidad por causas. (s.f.) Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS), ministerio de salud, gobierno Chile <http://www.deis.cl/defunciones-y-mortalidad-por-causas>.
27. Ávila, E. (2008) Tratamiento quirúrgico en colon. *Gaceta mexicana de oncología*, **7**, 31-33.
28. Cortés, P., Salazar, J. (2008) Seguimiento terapéutico en cáncer colorrectal (CCR). *Gaceta mexicana de oncología*, **7**, 54-57.
29. Aldaco, F. (2008) Quimioterapia (sin anticuerpos monoclonales) en cáncer metastásico de colon y recto. *Gaceta mexicana de oncología*, **7**, 40-41.
30. Laza, D., Rodríguez, I., Sardiña, G. (2003) Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **8**(3), 0-0
31. Bresciani, G., da Cruz, I. B. M., & González-Gallego, J. (2015). Chapter four-manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in clinical chemistry*, **68**, 87-130.
32. Brambilla, D., Mancuso, C., Scuderi, M., Bosco, P., Cantarella, G., Lempereur, L., Di Benedetto, G., Pezzino, S., Bernardini, R. (2008) The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutrition Journal*, **7**, 1-9.
33. Norman, H., Butrum, R., Feldman, E., Heber, D., Nixon, D., Frances, M., Rivlin, R., Simopoulos, A., Wargovich, M., Weisburger, E., Zeisel, S. (2003) The Role of Dietary Supplements during Cancer Therapy. *American Society for Nutritional Sciences* **133**, 3794S-3799S.
34. Zamora, J. (2007) Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, **34**, 17-26.
35. García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, **27**(1), 1-13
36. Gross, E., Pomilio, A., Aeldes, A., Burton, G. (1985) *Introducción a los productos Naturales*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo científico y Tecnológico.

37. Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**(1), 3-19.
38. Yazaki, K. (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*. **580**, 1183-1991.
39. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, **99**(1), 191-203.
40. Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., & Pratapa, V. M. (2012). Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. *Food Chemistry*, **133**(1), 156-162.
41. Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A.; Guillamon, E. & Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, **128**(3), 674-678.
42. Azevedo, L., Gomes, J., Stringheta, P., Gontijo, A., Padovani, C., Ribeiro, L., Salvadori, D. (2003). Black bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) as a protective agent against DNA damagen in mice. *Food Chemical Toxicology*. **41**, 1671–1676.
43. Reynoso, R., Ríos, M., Torres, I., Acosta, J., Palomino, A., Ramos, M., González, E., Guzmán, S., (2007) El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agricultura técnica en México*, **33**, 43-52.
44. Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, **22**(1), 0-0.
45. Cartaya, O., Inés Reinaldo. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. **22**, 5-14.
46. Martínez, S., González, J., Culebras, J., Tuñón, M. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. **17**, 271-278.
47. Ranelletti, F., Ricci, R., Larocca L. (1992) Growth-inhibitory effect of quercitin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, **50**, 486-492.
48. Arroyo, J., Bonilla, P., Ráez, E., Suárez, S., Palomino de la Gala, R., Terán, S., Justil, H. (2007). Compuestos fenólicos de la fracción metanólica de *Bidens*

- pilosa, sobre la neoplasia gástrica, inducida en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*. **68**, 105-112.
49. Perk, A., Shatynska-Mytsyk, I., Gerçek, Y., Boztaş, K., Yazgan, M., Fayyaz, S., y Farooqi, A. (2014) Rutin mediada por la orientación de la señalización maquinaria en las células cancerosas. *Cancer Cell Internacional*, **14**, 124.
50. Kremer, D., Kosalec, I., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., & Končić, M. Z. (2012). Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur and *Frangula alnus* Mill. bark. *Food Chemistry*, **131**(4), 1174-1180.
51. Alves, D. S., Pérez-Fons, L., Estepa, A., & Micol, V. (2004). Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochemical pharmacology*, **68**(3), 549-561.
52. Sepúlveda, G., Porta-Ducoing, H., & Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **21**(3), 355-362.
53. Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**(3), 331-342.
54. Gomes, S., Silva, J. C., Branco, C. R. C., Branco, A., Amorim, E. L. C., da Silva Almeida, J. (2014). Antinociceptive effect of *Encholirium spectabile*: A Bromeliaceae from the Brazilian caatinga biome. *Pharmacognosy magazine*, **10**(3), S655.
55. Hornung-Leoni, C. T. (2011). Avances sobre usos etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **10**(4).
56. Gani, M., Nasiri, R., Hamzehalipour Almaki, J., Majid, F., Marvibaigi, M., Amini, N., Chermahini, S., Mashudin, M. (2015) In Vitro Antiproliferative Activity of Fresh Pineapple Juices on Ovarian and Colon Cancer Cell Lines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. **21**, 353–364.
57. Chobotova, K., Vernallis, A., Majid, F. (2010) Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters*. **290**, 148-156.
58. Romano, B., Fasolino, I., Pagano, E., Capasso, R., Pace, S., De Rosa, G., Milic, N., Orlando, P., Izzo, A., Borrelli, F. (2014). The chemopreventive action

- of bromelain, from pineapple stem (*Ananas comosus* L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects. *Molecular nutrition & food research*, **58**(3), 457-465.
59. Frontela, S., López, N., González, C., Peso, E., Ros, B., Martínez, G., Canali, R., Virgili, F. (2011). Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with Pycnogenol® in colon carcinoma cells. The effect of in vitro gastrointestinal digestion. *Phytotherapy Research*, **25**(12), 1870-1875.
60. Quezada, I. M., Zotz, G., & Gianoli, E. (2014). Latitudinal variation in the degree of crassulacean acid metabolism in *Puya chilensis*. *Plant Biology*, **16**(4), 848-852.
61. Hornung-Leoni, C. T. (2011). Avances sobre usos etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **10**(4).
62. Cartaya, O., Inés Reinaldo. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. **22**, 5-14.
63. Montenegro Rizzardini, G. (1984). Atlas de anatomía de especies vegetales autóctonas de la Zona Central. *Santiago, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile*.
64. Muñoz, M. (1985) Flores del norte chico. 2º edición. Dirección de bibliotecas archivos y museos. 25.
65. Smith, L., Loser, G. (1935) Las especies Chilenas del género *Puya*. *Revista universitaria, Universidad Católica*. 241-279
66. Montenegro, G., Gómez, M., Iturriaga, L., Timmermann, B. (1994). Potencialidad de la flora nativa Chilena como fuente de productos naturales de uso medicinal. 49-66.
67. Avila, S., Sofía, A., & Gajardo, M. (1999). Bosque esclerófilo del valle de Colliguay (V Región, Chile) como fuente de productos forestales secundarios.
68. Mellado, M., Madrid. A., Jara, C., Espinoza, L. (2012). Antioxidant effects of *Muehlenbeckia hastulata* J. (Polygonaceae) extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **57**(3), 1301-1304.

69. Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation dun extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*, **49**, 462–468.
70. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. U Technol*, **28**, 25-30.
71. Romay, C., Pascual, C., Lissi E.A. *Brazilian J.* (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Medical and Biological Research*. **29**, 175.
72. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. and Mérillon, J.M. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1768, (2009).
73. Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, **1**(3), 1112-1116.
74. Leiva, B., Carrasco, I., Montenegro, I., Gaete, L., Lemus, I., Tchernitchin, A., Bustamante, R., Párraga, M., & Villena, J. (2015) Equol and daidzein decrease migration, invasion and matrix metalloproteinase (MMPs) gene expression in prostate cancer cell lines, DU-145 and PC-3. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **14** (3): 251 – 262.
75. Madrid, A. Cardile, V. González, C. Montenegro, I. Villena, J. Caggia, S. Graziano, A. and Russo, A. (2015). Psoralea glandulosa as a potential source of anticancer agents for melanoma treatment. *International journal of molecular sciences*, **16**(4), 7944-7959.
76. Martínez, I., Periago, M., Ros, G. (2000) Significado nutricional de los compuestos fenólicos. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. **50**, 5-17.
77. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal*, **312**(7029), 478-481.
78. Sheu, S. Y., Lai, C. H., & Chiang, H. C. (1997). Inhibition of xanthine oxidase by purpurogallin and silymarin group. *Anticancer research*, **18**(1A), 263-267.
79. Sakuma, S., Fujimoto, Y., Tsunomori, M., Tagano, S., Nishida, H., Baba, K., & Fujita, T. (1998). Effects of daphnodorin A, B and C, new flavans isolated from traditional Chinese medicine, on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, **58**(2), 143-146.

80. Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, **45**(12), 4505-4515.
81. Hernandez, J. (1999). Estudio de pigmento por medio de microscopia electrónica. Universidad Autónoma de Nuevo León. 16-17.
82. Gibaja, S. (1998). Pigmentos Naturales Quinónicos. Universidad Nacional Mayor de San Marco.
83. Nogales, E., Pérez, M. S., Rodríguez, L., Lares, M., Ferrer, E., Fraile, G. (2012) Efectos de los complejos de oro auranofina y clotrimazol-oro-trifenilfosfina sobre epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* preparados con emodina y genisteína. *Avances en Ciencias de la Salud*, **2**(1), 12-19.
84. Lown, J. W. (1993). Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacology & therapeutics*, **60**(2), 185-214.
85. Saavedra, F. E., López, B. C., Yrei, V. J., Gallardo, G. C., & Gordillo, G. C. Actividad antibacteriana y fungicida de las antraquinonas de Aloe vera L. combinadas con cationes Cobre, Hierro, Plata y Bismuto. *Ciencia e Investigación*, **15**(1), 30-35.
86. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, **56**(2), 185-229.
87. Doroshow, J. H., Locker, G. Y., Myers, C. E. (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *The Journal of Clinical Investigation*. **65**, 128–135.
88. Haripyaree, A., Guneshwor, K., & Damayanti, M. (2010). Evaluation of Antioxidant Properties of Phenolics Extracted from Ananas comosus L. *Notulae Scientia Biologicae*, **2**(2), 68.
89. Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., Méndez, J. (2007). Potencial Antioxidante de Bauhinia Kalbreyeri Harms. *Información Tecnológica*. **18** (6).
90. Mesa-Vanegas, A. M., Gaviria, C. A., Cardona, F., Sáez-Vega, J. A., Blair Trujillo, S., & Rojano, B. A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género Calophyllum. *Revista Cubana de plantas medicinales*, **15**(2), 13-26.

91. Mercado, G., Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López, J., Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*. **28**(1): 36-46.
92. Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Katalinić, A., Burčul, F., & Katalinić, V. (2011) Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food chemistry*, **127**(2), 427-433.
93. Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21**(2), 143-152.
94. Leyton, M., Mellado, M., Jara, C., Montenegro, I., González, S., & Madrid, A. (2015). Free radical-scavenging activity of sequential leaf extracts of *Embothrium coccineum*. *Open Life Sci*, **10**, 260-268.
95. Colom, Y., Azcue, M., Pérez, R., Respall, M., Ruiz, R., Quesada, W. (2005). Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388. *Revista Cubana Plantas Medicinales* **10** (2).
96. Madrid, A., Espinoza, L., Catalan, K., Gonzalez, C., Montenegro, I., Mellado, M., Werner E., Cuellar, M., Villena, J. (2013). Preliminary antiproliferative evaluation of natural, -synthetic benzaldehydes and benzyl alcohols. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **58**(3), 1814-1816.

Anexos

Resumen de análisis del perfil fitoquímico y antioxidante

Con el fin de contrastar la estimación de los distintos metabolitos secundarios analizados en la *P. chilensis*, se presentan a continuación el resumen de estos datos.

Tabla 1: Distribución de metabolitos secundarios en los diferentes extractos.

Órgano	Extracto	Ant		Fen		Fla	
	HF	14,714	± 0,398	2,84	± 0,224	30,068	± 0,859
Flor	AF	12,599	± 0,23	4,63	± 0,371	31,5	± 2,42
	EF	n.d.		2,72	± 0,321	n.d.	
	HT	1,484	± 0,121	2,63	± 0,236	0,921	± 0,168
TALLO	AT	0,484	± 0,301	2,66	± 0,051	21,060	± 1,310
	ET	0,932	± 0,245	3,5	± 0,136	20,285	± 1,598

Ant: antraquinonas totales (mg EE*gr⁻¹); Fen: fenoles totales (mg EA*gr⁻¹);

Fla: flavonoides totales (mg EQ*gr⁻¹)

De acuerdo con la Tabla 1 se observa que no se han detectado antraquinonas en el extracto EF y flavonoides en el mismo extracto. Por otro lado las antraquinonas se encuentran en extractos menos polares (HF y AF), los fenoles tienen una distribución similar en todos los extractos y los flavonoides en la flor se encuentran en los extractos menos polares (HF y AF), mientras que en el tallo se encuentran distribuidos en los más polares (AT y ET).

Por otro lado, con el fin de contrastar la estimación de la actividad antioxidante analizada en la *P. chilensis*, se presentan a continuación el resumen de estos datos.

Tabla 2: Distribución de la actividad antioxidante de los ensayos DPPH·, FRAP y TRAP

Órgano	Extracto	DPPH·(mg*mL-1)	FRAP(mM TEAC)	TRAP(TEAC μM)
Flor	HF	21,433 ± 1,101	12,749 ± 0,949	0,037 ± 0,000
	AF	4,145 ± 0,411	16,515 ± 0,68	0,037 ± 0,000
	EF	5,323 ± 0,006	11,378 ± 0,733	0,037 ± 0,000
Tallo	HT	91,933 ± 6,664	12,532 ± 0,606	0, 37 ± 0,000
	AT	44,033 ± 1,71	12,605 ± 0,931	0,037 ± 0,000
	ET	11,767 ± 0,874	11,797 ± 0,761	0,037 ± 0,000

Al apreciar la Tabla 2 se observa que el ensayo TRAP posee baja actividad antioxidante de manera uniforme dentro de los extractos, en cuanto al ensayo FRAP es el extracto AF el que destaca la actividad antioxidante, pues la distribución en este ensayo es similar para el resto de los extractos. Por ultimo en cuanto al ensayo DPPH· se debe tener en cuenta que los valores presentados son de IC₅₀, por lo tanto los extractos que posean una menor concentración inhibitoria serán los que presenten una mayor habilidad para inhibir al radical libre estable DPPH· que en este caso son los extractos AF, EF y ET.

Correlación

Con el propósito de comprender como los resultados de los diferentes ensayos se relacionan entre sí, es que se presenta la siguiente tabla 1 de correlación entre los fitoconstituyentes, la actividad antioxidante y la viabilidad celular.

Tabla 3: Porcentaje de correlación del perfil fitoquímico, actividad antioxidante y viabilidad celular.

	Fen	Ant	Fla	DPPH	FRAP	TRAP	HT-29	CoN
Fen		44	34	45	80	8	15	21
Ant			58	31	14	3	52	72
Flav				39	13	40	46	55
DPPH					29	31	64	67
FRAP						6	15	19
TRAP							17	36
HT-29								60
CoN								

A partir de la tabla 3 de correlación de los resultados de fitoconstituyentes, actividad antioxidante y viabilidad celular, se demuestra que existe una correlación del 80% entre los fenoles totales y la actividad FRAP, lo cual puede ser señalado como una buena correlación. El resto de los ensayos no mantienen buenas relaciones que se puedan rescatar.