



Universidad Técnica Federico Santa María
Universidad de Valparaíso

Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias, mención
Química

**Aislamiento bioguiado y caracterización química de
metabolitos secundarios de cuatro plantas nativas
obtenidas del Desierto de Atacama: *Skytanthus acutus*,
Krameria cistoidea, *Nolana albescens* y *Pintoa chilensis*,
con actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante.**

Dioni Antonio Arrieche Polanco

Valparaíso, Chile
Junio 2024



Universidad Técnica Federico Santa María
Universidad de Valparaíso

Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias, mención Química

Aislamiento bioguiado y caracterización química de metabolitos secundarios de cuatro plantas nativas obtenidas del desierto de atacama *Skytanthus acutus*, *Krameria cistoidea*, *Nolana albescens* y *Pintoa chilensis*, con actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante

Tesis de grado presentada por

Dioni Antonio Arrieche Polanco

Como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en Ciencias, mención Química.

Director(a) de Tesis
Dr. Lautaro Taborga

Codirector(a) de tesis
Dr. Héctor Carrasco

Valparaíso, Chile
Junio 2024



Universidad Técnica Federico Santa María Universidad de Valparaíso

Programa Conjunto de Doctorado en Ciencias, mención Química

Título de la Tesis:

Aislamiento bioguiado y caracterización química de metabolitos secundarios de cuatro plantas nativas obtenidas del desierto de atacama *Skytanthus acutus*, *Krameria cistoidea*, *Nolana albescens* y *Pintoa chilensis*, con actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante

Autor:

Dioni Antonio Arrieche Polanco

Trabajo de Tesis, presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para el Grado de Doctor en Ciencias, mención Química de la Universidad Técnica Federico Santa María y de la Universidad de Valparaíso.

Dra. María Gabriela Lobos

.....

Dr. Aurelio San - Martín

.....

Dr. Luis Espinoza

.....

Dr. Joan Villena

.....

Valparaíso, Chile, Junio 2024

A Dios por darme salud y a mi familia por su apoyo

Agradecimientos

A mi director de Tesis, el Dr. Lautaro Tabora por darme la oportunidad de formarme en su línea de investigación, por abrirme las puertas de su laboratorio y por darme la oportunidad de explorar objetos de estudio que no estaban dentro de su área (Productos Naturales Marinos), pero quien aceptó a brindarme las herramientas necesarias y los conocimientos para poder realizarlo. Gracias por su paciencia, por su confianza, por sus consejos y por su amistad.

A mi co-director de Tesis, Dr. Héctor Carrasco, por todo su apoyo durante toda mi carrera como estudiante de Doctorado y su excelente disposición y ayuda en esta tesis. También por brindarme su confianza y su amistad.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora: Dr. Luis Espinoza, por su dedicación como profesor del programa, por su valiosa colaboración en cada uno de los seminarios, por sus oportunas sugerencias y por su excelente disposición en ayudar para la culminación de la tesis.

Al Dr. Aurelio San-Martín de la Universidad de Magallanes, es un privilegio para mí haber contado con un experto en el estudio de los Productos Naturales conocido en Chile e internacionalmente. Gracias por su excelente disposición, por sus valiosos consejos durante cada una de las presentaciones y recomendaciones.

Al Dr. Joan Villena de la Universidad de Valparaíso, por todo su apoyo en la realización de los ensayos citotóxicos. Por apoyarme en esta titánica tarea que es el estudio del Cáncer. Por abrir las puertas de su laboratorio y brindarme sus consejos en cada uno de los ensayos, sus recomendaciones, sus correcciones y por sus conversaciones acerca de la muerte celular.

A la Dra. María Gabriela Lobos de la Universidad de Valparaíso, por su apoyo incondicional y excelente disposición, por sus aportes, correcciones, recomendaciones y consejos.

Al Dr. Carlos Jara de la Universidad de Valparaíso, por toda su colaboración en la realización de los ensayos antioxidantes y citotóxicos, quien me orientó en la realización de estos, así como en el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A la Dra. Paula Santana de la Universidad Autónoma de Chile, por toda su colaboración en la realización de los ensayos antimicrobianos, quien me orientó en la realización y discusión de los resultados obtenidos.

Al Dr. José Javier Fernández, Dra. María Luisa Souto y la Dra. Ana Raquel Díaz-Marrero del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Dr. Antonio González” (IUBO) de la Universidad de La Laguna (ULL) en Tenerife, por toda su colaboración durante la realización de mi pasantía doctoral. Así como al Dr. José M. Padrón y todo el equipo de BioLab por la realización de los ensayos antiproliferativos. A la Dra. Sara García y Dra. Nathalia Nocchi por toda su colaboración en la separación de los compuestos mediante

HPLC. Al Dr. Francisco Pachecho, Dr(c) Victor Hernández y al Dr. Adrián Morales, por toda su colaboración.

Al Dr. Rafael Viteri de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) de Guayaquil, por la colaboración en el análisis de GC-MS.

Al Sistema de Beca interna del Programa de Doctorado Conjunto entre la Universidad Técnica Federico Santa María y la Universidad de Valparaíso por el financiamiento durante mis estudios de Doctorado.

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por el financiamiento en mi último año de estudio del Programa.

A la Dirección de Postgrado de la Universidad Técnica Federico Santa María por el otorgamiento de financiamiento mediante el programa de Incentivo a la Iniciación Científica (PIIC) durante los años 2019 – 2020 y 2022-2023. También por el financiamiento a la asistencia a congresos y pasantías.

A la Dirección de Postgrado de la Universidad de Valparaíso por el financiamiento a la asistencia de congresos y pasantías.

Al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María y su equipo, por su apoyo en el desarrollo de la Tesis Doctoral, por poner a disposición cada uno de sus espacios, equipos y personal.

A los proyectos FONDECYT regular 1201097, FONDEQUIP EQM190025 y FONDEQUIP EQM200241.

Al Ingeniero Javier Pardo-Baeza por su valiosa colaboración en la recolección e identificación del material vegetal utilizado en este proyecto.

Al Dr. Andrés Olea por toda su colaboración en la revisión, edición, recomendaciones y consejos en la escritura de los artículos científicos.

Al Ingeniero Santiago Valenzuela de la Universidad Autónoma de Chile, por su colaboración en la realización de los ensayos antimicrobianos.

Al Grupo de QBAB del Instituto de Ciencias Aplicadas, de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Chile por su colaboración.

Al Programa de Doctorado en Conjunto y todo el equipo que forma parte de este, a los profesores por su valiosa colaboración durante todo el tiempo de estudio.

A los compañeros del Laboratorio de Productos Naturales B-100 del Departamento de Química, al Dr. Mauricio Soto, Dra. Laura Gamboa, por sus consejos y toda su colaboración. A mis compañeros con quienes pasé gran parte de mi tiempo Karol Quiroz, Romanet Berrios y Gerard Núñez.

A los compañeros del Laboratorio de Síntesis Orgánica B-154, César Gonzalez, Dr. Mauricio Osorio, Ernesto Valdés por toda su colaboración. A Karen Catalán por toda su colaboración en la realización de los análisis de RMN.

A mis compañeros del programa de Doctorado con quienes compartí buenos y no tan buenos momentos: Felipe Salas, Bianca Guzmán, Katherine Ariz, María Núñez y Ligia Llovera.

A mis padres David Arrieche y Dubisay Polanco, por creer en mí, por apoyarme en cada una de mis ideas de seguir estudiante hasta el infinito y por sacrificar tantas cosas para que yo pudiera obtener todo lo que tengo hasta hoy.

A mis hermanos David Arrieche, Danuby Arrieche y Dairuth Arrieche por creer en mi y en mis planes de seguir estudiando, así como por regalarme la oportunidad de ser el tío de tres hermosas princesas: María Esperanza, María Victoria y Susej a quienes quiero y amo con locura.

A mis amigos que, aunque son pocos aprecio cada uno de sus consejos, de sus enseñanzas y el tiempo que hemos invertido en mantener nuestra amistad a pesar de la distancia: Fátima Rodríguez, Jesús Ramos, Sorenlis González, Daniel Carrero, Kelly Marrugo, Yearlys Perez, Alejandra Ugarte, Alí Rivero, Libia Julio, Rodolfo Marcano. A quienes conocí durante mi locura de comenzar este maravilloso mundo de la Investigación.

Resumen

AISLAMIENTO BIOGUIADO Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE CUATRO PLANTAS NATIVAS OBTENIDAS DEL DESIERTO DE ATACAMA *SKYTANTHUS ACUTUS*, *KRAMERIA CISTOIDEA*, *NOLANA ALBESCENS* Y *PINTOA CHILENSIS*, CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA Y ANTIOXIDANTE

Palabras Claves: Metabolitos secundarios, Plantas nativas, Desierto de Atacama, Caracterización química, Actividad biológica.

En años recientes, los organismos extremófilos, se han convertido en el objetivo de muchos investigadores interesados en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos con importancia farmacológica. Estos organismos deben enfrentarse a constantes variaciones de temperaturas, de pH, de salinidad, de presión, poca disponibilidad de nutrientes y algunos deben enfrentar alta radiación UV, por lo que los mismos requieren de diversos mecanismos de adaptación para poder sobrevivir. Estas adaptaciones están acompañadas por modificaciones tanto en la regulación genética como metabólica, incrementando la posibilidad de encontrar metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas de importancia farmacológica. Chile posee tres ambientes extremos de gran importancia en el campo de la investigación: el desierto de Atacama, el territorio Antártico y las zonas volcánicas con aguas termales en la región de la Araucanía. Los organismos que habitan en estos ambientes podrían compartir propiedades y mecanismos que les permiten soportar grandes variaciones de temperatura, esta información puede ser utilizada para diferentes aplicaciones, incluidas su utilización en salud humana, de allí la importancia del estudio de estos.

En vista de los antecedentes obtenidos a partir de nuevos metabolitos secundarios aislados de plantas extremófilas del Norte de Chile, que muestran interesantes actividades biológicas tales como: antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, gastroprotectiva, entre otras. La presente tesis tiene por objetivo realizar un estudio fitoquímico bioguiado de las plantas extremófilas *Skytanthus acutus*, *Nolana albescens*, *Krameria cistoidea* y *Pintoa chilensis* para aislar y caracterizar aquellos metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante. Para cumplir con el objetivo, se prepararon 6 extractos etanólicos de los cuales tres fueron los mas activos frente a las actividades evaluadas: antioxidante, citotóxica y antimicrobiana. La actividad antioxidante se evaluó mediante tres ensayos: FRAP, TRAP y DPPH; la actividad citotóxica se determinó mediante el ensayo de la sulforrodamina B sobre diferentes líneas celulares cancerígenas humanas: MCF-7 (mama), HT-29 (colorrectal), HBL-100 y T-47D (mama), HeLa (cervical), A549 (pulmón), SW1573 (pulmón) y WiDr (colon). La actividad antimicrobiana se evaluó determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre tres cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las técnicas cromatográficas empleadas para la purificación de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Skytanthus acutus* incluyeron: Cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y preparativa, Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía líquida preparativa (PLC), utilizando como fase estacionaria Sílica gel, C18 y columna de partición centrífuga (CPC). Mediante espectroscopía de RMN (1D y 2D), se logró la caracterización de seis compuestos mayoritarios.

Abstract

BIOGUIDED ISOLATION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITES FROM FOUR NATIVE PLANTS OBTAINED FROM THE ATACAMA DESERT *SKYTANTHUS ACUTUS*, *KRAMERIA CISTOIDEA*, *NOLANA ALBESCENS* AND *PINTOA CHILENSIS*, WITH ANTIMICROBIAL, CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY.

Keywords: Secondary metabolites, Native plants, Atacama Desert, Chemical characterization, biological activity.

In recent years, extremophilic organisms have become the target of many researchers interested in the search for new bioactive compounds with pharmacological importance. These organisms must face constant variations in temperature, pH, salinity, pressure, low availability of nutrients and some must face high UV radiation, so they require various adaptation mechanisms to survive. These adaptations are accompanied by modifications in both genetic and metabolic regulation, increasing the possibility of finding secondary metabolites with unique chemical structures of pharmacological importance. Chile has three extreme environments of great importance in the field of research: the Atacama Desert, the Antarctic territory and the volcanic areas with thermal waters in the Araucanía region. The organisms that inhabit these environments could share properties and mechanisms that allow them to withstand low and high temperatures, this information can be used for different applications, including its use in human health, hence the importance of studying them.

In view of the excellent results obtained from new secondary metabolites isolated from extremophilic plants of northern Chile, which show interesting biological activities such as: antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, gastroprotective, among others. In this sense, the present thesis aims to perform a bioguided phytochemical study of the extremophilic plants *Skytanthus acutus*, *Nolana albescens*, *Krameria cistoidea* and *Pintoa chilensis* to isolate and characterize those secondary metabolites responsible for the antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity. To meet the objective, 6 ethanolic extracts were prepared, of which three were the most active against the evaluated activities: antioxidant, cytotoxic and antimicrobial. Antioxidant activity was evaluated by three assays: FRAP, TRAP and DPPH, cytotoxic activity was determined by sulforhodamine B assay on different human cancer cell lines: MCF-7 (breast), HT-29 (colorectal), HBL-100 and T-47D (breast), HeLa (cervical), A549 (lung), SW1573 (lung) and WiDr (colon). Antimicrobial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) on three bacterial strains: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The chromatographic techniques used for the purification of the secondary metabolites of the ethanolic extract of *Skytanthus acutus* included: Column chromatography using Sephadex LH-20 as stationary phase and preparative, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Preparative Liquid Chromatography (PLC), using silica gel, C18 and centrifugal partition column (CPC) as stationary phase. By means of NMR spectroscopy (1D and 2D), the characterization of six major compounds was achieved.

Contenido

1	Introducción	1
2	Marco teórico	2
2.1	Ambientes extremos y Organismos Extremófilos	2
2.1.1	Ambientes extremos	2
2.1.2	Organismos extremófilos	3
2.1.3	Plantas terrestres extremófilas	5
2.2	Cáncer	6
2.2.1	Terapia disponible contra el Cáncer	6
2.2.2	ROS y su relación con el cáncer	8
2.2.3	Productos Naturales como fuente de nuevos agentes anticancerígenos	9
2.3	Antioxidantes	10
2.3.1	Quimioterapia, estrés oxidativo y antioxidantes	10
2.4	Antimicrobianos	13
3	Antecedentes	17
3.1	Plantas endémicas del Norte de Chile y su uso medicinal	17
3.2	Plantas de Chile pertenecientes a las familias: <i>Solanaceae</i> , <i>Zygophyllaceae</i> , <i>Krameriaceae</i> y <i>Apocynaceae</i>	18
3.2.1	<i>Solanaceae</i>	18
3.2.2	<i>Zygophyllaceae</i>	18
3.2.3	<i>Krameriaceae</i>	19
3.2.4	<i>Apocynaceae</i>	19
3.3	Metabolitos secundarios aislados de plantas pertenecientes a las familias: <i>Solanaceae</i> , <i>Zygophyllaceae</i> , <i>Krameriaceae</i> y <i>Apocynaceae</i> recolectadas en Chile.	20
4	Planteamiento del problema	25
4.1	Hipótesis	25

4.2	Objetivo General	25
4.2.1	Objetivos específicos.....	25
5.	Metodología	26
5.1.	Sección Química	26
5.1.1.	Solventes, reactivos y equipos.....	26
5.1.2.	Recolección del material vegetal.....	26
5.1.3.	Preparación del extracto etanólico	27
5.1.4.	Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico.....	27
5.1.5.	Contenido de Fenoles Totales	27
5.1.6.	Contenido de Flavonoides Totales	28
5.1.7.	Purificación de las fracciones bioactivas.....	28
5.1.8.	Caracterización de los metabolitos secundarios	28
5.2.	Sección biológica	28
5.2.1.	Materiales	28
5.2.2.	Capacidad antioxidante total - TRAP.....	29
5.2.3.	Ensayo de actividad secuestradora del radical DPPH [•]	29
5.2.4.	Poder antioxidante reductor del Hierro - FRAP.....	30
5.2.5.	Cultivo celular para determinar la actividad citotóxica.....	30
5.2.6.	Ensayo de citotoxicidad de la Sulforodamina B.....	30
5.2.7.	Determinación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial por citometría de flujo	30
5.2.8.	Determinación de lipoperoxidación por citometría de flujo.....	31
5.2.9.	Determinación de ROS por citometría de flujo	31
5.2.10.	Determinación de Caspasas activas por citometría de flujo	31
5.2.11.	Determinación de la actividad antiproliferativa	32
5.2.12.	Determinación de la actividad antimicrobiana	32
5.3.	Análisis estadístico.....	32

6.	Resultados y Discusión	34
6.1.	Objetivo específico 1.....	34
6.1.1.	Recolección del Material vegetal	34
6.1.2.	Obtención de los extractos etanólicos del material vegetal recolectado	36
6.2.	Objetivo específico 2.....	37
6.2.1.	Actividad antioxidante de los extractos etanólicos	37
6.2.2.	Actividad citotóxica de los extractos etanólicos	39
6.2.3.	Actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos	41
6.2.4.	Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos	42
6.2.5.	Selección de los extractos etanólicos más bioactivos.....	43
6.3.	Objetivo específico 3.....	44
6.3.1.	Extracto etanólico de <i>Pintoa chilensis</i> (f)	44
6.3.2.	Extracto etanólico de <i>Skytanthus acutus</i> (Pa).....	51
6.3.3.	Extracto etanólico de <i>Krameria cistoidea</i> (Pa).....	53
6.4.	Objetivo específico 4.....	63
6.4.1.	Análisis del perfil cromatográfico de la fracción de diclorometano (FD) de <i>P. chilensis</i> (f) mediante Cromatografía de Gases acoplado a masas (GC-MS).....	63
6.4.2.	Fraccionamiento de la fracción de diclorometano (FD) y purificación de moléculas de <i>S. acutus</i> (Pa).....	66
6.4.3.	Fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo (FA) y purificación de moléculas de <i>S. acutus</i> (Pa).....	89
6.4.4.	Análisis del perfil cromatográfico de la fracción de acetato de etilo (FA) de <i>K. cistoidea</i> (Pa), mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar y de tiempo de vuelo (QTOF-MS).....	93
6.5.	Objetivo específico 5.....	98
6.5.1.	Evaluación de la actividad antiproliferativa de los compuestos aislados de <i>Skytanthus acutus</i> (Pa).....	98

6.5.1.1. Efecto cistotáticos causados por los compuestos activos aislados de <i>Skytanthus acutus</i> (Pa).....	98
7. Conclusiones	100
8. Proyecciones	102
9. Abreviaturas	103
10. Bibliografía	108
11. Anexos.....	124

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Nolana albescens</i> , planta endémica del Norte de Chile.....	18
Figura 2. <i>Pintoa chilensis</i> , planta endémica del Norte de Chile.	19
Figura 3. <i>Krameria cistoidea</i> , planta endémica del Norte de Chile.	19
Figura 4. <i>Skytanthus acutus</i> , planta endémica del Norte de Chile.	20
Figura 5. Estructuras de compuestos detectados en <i>Nolana leptophylla</i> , <i>N. aplocaryoides</i> y <i>N. ramosissima</i> , recolectadas en valle de Paposó, II región de Chile.....	21
Figura 6. Estructuras de flavonoides aislados del extracto metanólico de <i>N. ramosissima</i> , recolectadas en valle de Paposó, II región de Chile.	22
Figura 7. Estructuras de isoguaiacinas aisladas de <i>L. nitida</i> , recolectadas en Jarilla, Chile.	23
Figura 8. Estructura del neolignano aislado de <i>K. lappacea</i> , recolectada en Ollagüe, Chile.....	24
Figura 9. Estructuras de alcaloides monoterpénico aislados de <i>S. acutus</i> , recolectados en Chile. ..	24
Figura 10. Región de recolección de las plantas: <i>S. acutus</i> , <i>P. chilensis</i> , <i>K. cistoidea</i> y <i>N. albescens</i> , en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile.....	34
Figura 11. Material vegetal recolectado en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile...	34
Figura 12. IG ₅₀ (µg/mL) de los extractos etanólicos de Na (<i>Nolana albescens</i> partes aéreas), Sa (<i>Skytanthus acutus</i> partes aéreas), KcPa (<i>Krameria cistoidea</i> partes aéreas), Kcf (<i>Krameria cistoidea</i> frutos), PcPa (<i>Pintoa chilensis</i> Partes aéreas) y Pcf (<i>Pintoa chilensis</i> frutos).	42
Figura 13. Efecto de la producción de ROS en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (f). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 µg/mL, C2 = 100 µg/mL, C3 = 200 µg/mL. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.	45
Figura 14. Efecto de la producción de lipoperoxidación en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (s). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 µg/mL, C2 = 100 µg/mL, C3 = 200 µg/mL. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.	46
Figura 15. Efecto de la permeabilidad de la membrana celular en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (s). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 µg/mL, C2 = 100 µg/mL, C3 = 200 µg/mL. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.	47
Figura 16. Producción de caspasas activas en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (f). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1	

= 50 µg/mL, C2 = 100 µg/mL, C3 = 200 µg/mL. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.	48
Figura 17. IG ₅₀ (µg/mL) de las fracciones de <i>S. acutus</i> (Pa) contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr. FH: Fracción de hexano, FD: Fracción de diclorometano, FA: Fracción de acetato de etilo, FM: Fracción de metanol, FQ: Fracción acuosa.	52
Figura 18. TGI (µg/mL) de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>S. acutus</i> (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr. FH: Fracción de hexano, FD: Fracción de diclorometano, FA: Fracción de acetato de etilo, FM: Fracción de metanol, FQ: Fracción acuosa.	53
Figura 19. Efecto del extracto etanólico sobre la viabilidad de las células HaCaT. * Diferencias significativas entre concentración.	54
Figura 20. Determinación del valor de CBM de la mezcla de fracciones FA + FQ para la cepa <i>S. aureus</i> después de 24 horas de incubación a 37°C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y la placa mostrando CBM de la concentración de 2 fracciones a 1 mg/mL.	56
Figura 21. Determinación del valor de CBM de la mezcla de fracciones FD + FA, FA + FM y FA + FQ para la cepa <i>P. aeruginosa</i> después de 24 horas de incubación a 37 °C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y las placas mostrando CBM de la combinación de 2 fracciones a 1 mg/mL.	57
Figura 22. Determinación del valor de CBM de la mezcla de tres fracciones para la cepa <i>S. aureus</i> después de 24 horas de incubación a 37°C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y las placas mostrando CBM de la combinación de 3 fracciones a 0,5 y 1 mg/mL.	59
Figura 23. Determinación del valor de CBM de la mezcla de cuatro fracciones para la cepa <i>S. aureus</i> después de 24 horas de incubación a 37°C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y las placas mostrando CBM de la combinación de 4 fracciones a 0,5 y 1 mg/mL.	61
Figura 24. Estructura química del ácido palmítico, identificado en la fracción de diclorometano de <i>Pintoa chilensis</i> (f).	65
Figura 25. Estructura química de la β-D-alopiranososa, identificada en la fracción de diclorometano de <i>Pintoa chilensis</i> (f).	65

Figura 26. Estructura química del D-pinitos, identificado en la fracción de diclorometano de <i>Pintoa chilensis</i> (f).....	66
Figura 27. Estructura química del mio-inositol, identificado en la fracción de diclorometano de <i>Pintoa chilensis</i> (f).....	66
Figura 28. Cromatograma del perfil cromatográfico de la fracción de diclorometano (FD) de la planta <i>Pintoa chilensis</i>	64
Figura 29. IG ₅₀ (μg/mL) de las subfracciones de la fracción de diclorometano de <i>S. acutus</i> (Pa) contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.67	
Figura 30. Espectro de ¹ HRMN (600 MHz, CD ₃ OD) de la mezcla de compuestos triterpénicos....	69
Figura 31. Cromatograma de las subfracciones obtenidas a través de la separación de la mezcla mediante HPLC preparativo.....	70
Figura 32. Cromatografía de capa fina de las subfracciones obtenidas a través de la separación de la mezcla mediante HPLC preparativo.	70
Figura 33. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 1.....	71
Figura 34. Estructura química del compuesto 1: ácido betulínico.	73
Figura 35. Espectro de ¹ HRMN (600 MHz, CD ₃ OD) de la subfracción 2: mezcla de compuestos triterpénicos.....	73
Figura 37. Espectro de ¹³ C-RMN (600 MHz, CD ₃ OD) de la subfracción 2: mezcla de compuestos triterpénicos.....	74
Figura 36. Ampliación del espectro de ¹ HRMN (600 MHz, CD ₃ OD) de la subfracción 2: mezcla de compuestos triterpénicos.....	74
Figura 38. Espectro de masas de alta resolución de la subfracción 2: Mezcla de compuestos triterpénicos.....	75
Figura 39. a) Reacción de metilación del ácido carboxílico con diazometano (CH ₂ N ₂). b) TLC de la reacción.	75
Figura 40. Espectro de ¹ HRMN (400 MHz, CDCl ₃) de la subfracción 2 metilada: mezcla de compuestos triterpénicos metilados.	76
Figura 41. Ampliación del espectro de ¹ HRMN (400 MHz, CDCl ₃) de la subfracción 2 metilada: mezcla de compuestos triterpénicos metilados.	76
Figura 42. Comparación de las ampliaciones del espectro de ¹ HRMN (400 MHz, CDCl ₃) de la subfracción 2 sin metilar (a) y metilada (b).	77
Figura 43. Estructuras químicas del compuesto 2: ácido oleanólico metilado y el compuesto 3: isómero del ácido oleanólico metilado.....	78

Figura 44. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 4.....	79
Figura 45. Estructura química del compuesto 4: ácido oleanólico.....	80
Figura 46. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 5.....	85
Figura 47. Estructura química del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.	86
Figura 48. Estereoquímica del compuesto 5: N-óxido de β -esquitantina.....	86
Figura 49. Parte inferior: Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5. Arriba: Experimento NOESY 1D ^1H , donde muestran las interacciones espaciales entre CH_3 -10 y H-9.	87
Figura 50. Parte inferior: Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5. Arriba: Experimento NOESY 1D ^1H , donde muestran las interacciones espaciales entre H-5, H-4, H-6 y H-9.....	88
Figura 51. Parte inferior: Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5. Arriba: Experimento NOESY 1D ^1H , donde muestran las interacciones espaciales entre H-5 y CH_3 -11.	88
Figura 52. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 6.....	90
Figura 53. Estructura química del compuesto 6: Flavonol glicosilado.	92
Figura 54. Estructura química del ácido clorogénico.....	94
Figura 55. Estructura química del ácido quínico.....	94
Figura 56. Estructuras químicas de isorhamnetin y tilirosido.	95
Figura 57. Otros compuestos identificados en la fracción activa de <i>K. cistoidea</i> (Pa)	95
Figura 58. Estructuras químicas de los compuestos identificados en modo positivo en el extracto de acetato de etilo <i>K. cistoidea</i> (Pa), mediante análisis por UHPL-QTOF-MS.....	97
Figura 59. Efectos fenotípicos en células HeLa tratadas con 30 μM de ácido betulínico (1) y oleanólico (4) durante 20 h. (A) Recuento celular normalizado, (B) Confluencia, (C) Fracción de muerte celular y (D) Factor de forma obtenidos con el software EVE a partir de los índices de reflexión resultantes de la adquisición cada 10 min. C = control, BA = ácido betulínico (1), OA = ácido oleanólico (4).....	99

Lista de tablas

Tabla 1. Información de testigo del herbario de las plantas: <i>S. acutus</i> , <i>P. chilensis</i> , <i>K. cistoidea</i> y <i>N. albescens</i> , en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile.	35
Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de las plantas <i>S. acutus</i> , <i>P. chilensis</i> , <i>K. cistoidea</i> y <i>N. albescens</i>	36
Tabla 3. Contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de las plantas <i>S. acutus</i> , <i>P. chilensis</i> , <i>K. cistoidea</i> y <i>N. albescens</i>	37
Tabla 4. Capacidad antioxidante total de los extractos etanólicos de las plantas <i>S. acutus</i> , <i>P. chilensis</i> , <i>K. cistoidea</i> y <i>N. albescens</i> , medida a través de los ensayos TRAP, DPPH y FRAP.....	39
Tabla 5. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) de los extractos etanólicos de <i>P. chilensis</i> (Pa y f), <i>K. cistoidea</i> (Pa y f), <i>S. acutus</i> (Pa) y <i>N. albescens</i> (Pa) contra dos líneas celulares cancerígenas: MCF-7 y HT29.	40
Tabla 6. Valores de IS de los extractos etanólicos de <i>P. chilensis</i> (Pa y f), <i>K. cistoidea</i> (Pa y f), <i>S. acutus</i> (Pa) y <i>N. albescens</i> (Pa) contra dos líneas celulares cancerígenas: MCF-7 y HT29.	41
Tabla 7. Valores de IG ₅₀ (µg/mL) de los extractos etanólicos, contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.....	41
Tabla 8. Valores MIC de los extractos etanólicos de <i>P. chilensis</i> , <i>K. cistoidea</i> , <i>S. acutus</i> y <i>N. albescens</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Tabla 9. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (f), contra la línea celular cancerígena MCF-7 y utilizando como control positivo la línea celular no tumoral MCF-10A.....	49
Tabla 10. Valores de IS de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (f), contra la línea celular cancerígena MCF-7.	50
Tabla 11. Valores de IG ₅₀ (µg/mL) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de <i>S. acutus</i> (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.....	52
Tabla 12. Valores de TGI (µg/mL) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de <i>S. acutus</i> (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.....	52
Tabla 13. Valores MIC de las fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55

Tabla 14. Valores MIC de las fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
Tabla 15. Valores MIC de las fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Tabla 16. Valores MBC de las fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Tabla 17. Valores MIC de las fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
Tabla 18. Valores MBC de las fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
Tabla 19. Tabla resumen con los valores MIC de las fracciones y las mezclas de fracciones obtenidas de <i>K. cistoidea</i> contra las bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
Tabla 20. Compuestos mayoritarios identificados mediante análisis de GC-MS de la fracción de diclorometano de <i>P. chilensis</i> (f).	63
Tabla 21. Valores de IG ₅₀ (µg/mL) de las subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de diclorometano de <i>S. acutus</i> (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.	67
Tabla 22. Datos de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN del compuesto 1: ácido betulínico (600 MHz, CD ₃ OD). 71	
Tabla 23. Comparación de los datos de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN del compuesto 1: ácido betulínico (600 MHz, CD ₃ OD), junto con lo reportado por Noviany 2021 (400 MHz, DMSO-d ₆).	72
Tabla 24. Datos de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN de los compuestos 2: ácido oleanólico metilado y 3: isómero del ácido oleanólico metilado (400 MHz, CDCl ₃).	78
Tabla 25. Datos de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN del compuesto 4: ácido oleanólico (600 MHz, CD ₃ OD). 80	
Tabla 26. Comparación de los datos de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN del compuesto 4: ácido oleanólico (600 MHz, CD ₃ OD), junto con lo reportado por Seebacher 2003 (600 MHz, Pyridine-d ₅).	81
Tabla 27. Datos de RMN del compuesto 5: N-óxido de β-esquitantina (600 MHz, CD ₃ OD).	85
Tabla 28. Datos de RMN del compuesto 6 (400 MHz, DMSO).	91
Tabla 29. Compuestos identificados por UHPL-QTOF-MS en modo negativo de la fracción de acetato de etilo de <i>K. cistoidea</i> (Pa).	93
Tabla 30. Compuestos identificados por UHPL-QTOF-MS en modo positivo de la fracción de acetato de etilo de <i>K. cistoidea</i> (Pa).	96
Tabla 31. Actividad antiproliferativa (IG ₅₀) frente a líneas celulares de tumores sólidos humanos. 98	

Lista de esquemas

Esquema 1. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (f) con solventes de diferentes polaridades, junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	49
Esquema 2. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de <i>S. acutus</i> (Pa) con solventes de diferentes polaridades, junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	51
Esquema 3. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de <i>K. cistoidea</i> (Pa) con solventes de diferentes polaridades, junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	54
Esquema 4. Fraccionamiento de la fracción de Diclorometano (FD), obtenida del extracto etanólico de <i>P. chilensis</i> (f).....	¡Error! Marcador no definido.
Esquema 5. Fraccionamiento de la fracción de Diclorometano (FD), obtenida del extracto etanólico de <i>S. acutus</i> (f).....	67
Esquema 6. Separación de la fracción FD4 de diclorometano de <i>S. acutus</i> (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	68
Esquema 7. Separación de la fracción FD43 de diclorometano de <i>S. acutus</i> (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	68
Esquema 8. Separación de las subfracciones FD432 y FD433 de <i>S. acutus</i> (Pa), utilizando HPLC preparativo.....	69
Esquema 9. Separación de la subfracción FD44 de <i>S. acutus</i> (Pa), utilizando cromatografía de columna flash. AO: ácido oleanólico (4), AB: ácido betulínico (1), IAO: Isómero del ácido oleanólico.....	82
Esquema 10. Separación de la subfracción FD47 de <i>S. acutus</i> (Pa), utilizando cromatografía de columna flash. AO: ácido oleanólico (4) y AB: ácido betulínico (1).....	83
Esquema 11. Separación de la fracción FD5 de diclorometano de <i>S. acutus</i> (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	84
Esquema 12. Purificación de la subfracción de diclorometano FD6 de <i>S. acutus</i> (Pa).....	89
Esquema 13. Separación de la fracción de acetato de etilo de <i>S. acutus</i> (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.....	90

Lista de anexos

Anexo 1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 1: ácido betulínico.....	124
Anexo 2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 1: ácido betulínico.....	124
Anexo 3. Espectro de DEPT-135 del compuesto 1: ácido betulínico.....	125
Anexo 4. Espectro de ^1H - ^1H -COSY del compuesto 1: ácido betulínico.....	125
Anexo 5. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto 1: ácido betulínico.....	126
Anexo 6. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 1: ácido betulínico.....	126
Anexo 7. Espectro de ^1H -RMN de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.....	127
Anexo 8. Espectro de ^{13}C -RMN de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.....	127
Anexo 9. Espectro de DEPT-135 de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.....	128
Anexo 10. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.....	128
Anexo 11. Anexo 11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 4: ácido oleanólico.....	129
Anexo 12. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 4: ácido oleanólico.....	129
Anexo 13. Espectro de DEPT-135 del compuesto 4: ácido oleanólico.....	130
Anexo 14. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto 4: ácido oleanólico.....	130
Anexo 15. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 4: ácido oleanólico.....	131
Anexo 16. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.....	131
Anexo 17. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.....	132
Anexo 18. Espectro de DEPT-135 del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.....	132
Anexo 19. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.....	133
Anexo 20. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.....	133
Anexo 21. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 6: Flavonol glicosilado.....	134
Anexo 22. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 6: Flavonol glicosilado.....	134
Anexo 23. Espectro de DEPT-135 del compuesto 6: Flavonol glicosilado.....	135
Anexo 24. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto 6: Flavonol glicosilado.....	135
Anexo 25. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 6: Flavonol glicosilado.....	136

1 Introducción

En nuestro planeta hay una gran diversidad climática: desde los polos hasta las regiones ecuatoriales, el clima puede variar considerablemente. Hay regiones que registran ciertas condiciones atmosféricas extremas, por lo que se denominan regiones o ambientes extremos. Una manera de definir un ambiente extremo, congruente con la definición etimológica del término, considera que los factores físicos (temperatura, presión, radiación), geoquímicos (deseccación, salinidad, acidez, disponibilidad de oxígeno, potencial de óxido-reducción) o biológicos (nutrientes, formas de energía), se pueden visualizar como un amplio y continuo intervalo de valores en los que se han identificado organismos o microorganismos adaptados y que sobreviven exitosamente. Las fronteras que enmarcan este intervalo continuo de valores es lo que se identifica como un ambiente extremo. Es precisamente en estas fronteras en donde no todos los organismos tienen la posibilidad de sobrevivir, ya que algunos de esos valores extremos pueden, degradar o destruir ciertas biomoléculas impidiendo entonces la sobrevivencia del organismo. Los organismos extremófilos se las han ingeniado para proliferar en estos ambientes extremos.

En años recientes, los organismos extremófilos, se han convertido en el objetivo de muchos investigadores interesados en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos con importancia farmacológica. Estos organismos deben enfrentarse a constantes variaciones de temperaturas, de pH, de salinidad, de presión, poca disponibilidad de nutrientes y algunos deben enfrentar alta radiación UV, por lo que los mismos requieren de diversos mecanismos de adaptación para poder sobrevivir. Estas adaptaciones están acompañadas por modificaciones tanto en la regulación genética como metabólica, incrementando la posibilidad de encontrar metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas de importancia farmacológica.

Chile posee tres ambientes extremos de gran importancia en el campo de la investigación: Desierto de Atacama, el territorio Antártico y las zonas volcánicas con aguas termales en la región de la Araucanía. A pesar de ser regiones tan diferentes, tienen en común a los extremófilos. Estos organismos podrían compartir propiedades y mecanismos que les permiten soportar bajas y altas temperaturas, información que puede ser utilizada con diferentes aplicaciones, incluidas la utilización de estos en salud humana, de allí la importancia del estudio de estos.

2 Marco teórico

2.1 Ambientes extremos y Organismos Extremófilos

2.1.1 Ambientes extremos

Se entiende como ambiente extremo aquel en el que la temperatura, la acidez, la salinidad, la presión o el nivel de radiación son hostiles para la vida, desde un punto de vista antropocéntrico. Los organismos que viven en estos ambientes se denominan extremófilos y están tan perfectamente adaptados al medio que todos sus componentes funcionan de manera óptima en esas condiciones extremas (Giddings and Newman, 2015). Los ambientes extremófilos incluyen aquellos con temperaturas muy elevadas (55-121 °C) o bajas (-20 a -2°C), alta salinidad (NaCl 2-5M) y alta alcalinidad (pH por encima de 8) o alta acidez (pH menor de 4) (Ninfa Ramírez D. et al., 2006).

2.1.1.1 *Distribución de ambientes extremófilos en todo el mundo*

Los ambientes extremófilos surgen continuamente debido a la formación de cuencas endorreicas, actividad de placas tectónicas, la criosfera dinámica, asociaciones mutualistas evolutivas y cambios ambientales hechos por el hombre. Las cuencas endorreicas son esencialmente cuencas de drenaje sin salida de agua (generalmente con alto contenido de solución salina) con un lago salado. La formación de volcanes, dorsales oceánicas, montañas y fosas de aguas profundas, así como otros fenómenos geotérmicos pueden surgir de la actividad tectónica de placas, que es el choque de los límites de dos placas tectónicas. Los entornos que resultan de estos cambios son típicamente altos en pH, presiones, calor, contenido de metal, y gases disueltos (Giddings and Newman, 2015).

La criosfera está compuesta por casquetes polares, glaciares, capas de hielo y permafrost. Esta se ve influenciada debido a las constantes precipitaciones, la circulación hidrológica y los Océanos. Actualmente, los nuevos ecosistemas están evolucionando a lo largo de escalas de tiempo geológicas (por ejemplo, formación rocosa subterránea), así como los que resultan de la actividad humana, como derrames de petróleo, perforación de pozos profundos para el agua, contaminación industrial, o contaminación por radiactividad debido a una falla en una planta de energía. Además, las asociaciones mutualistas entre un microbio y un huésped, como los invertebrados marinos y plantas, crean nichos ecológicos únicos en los que se encuentran metabolitos secundarios únicos. En conjunto, estos cambios dinámicos o accidentales crean nuevos ecosistemas (Giddings and Newman, 2015).

Muchos ecosistemas extremos permanecen inexplorados debido a los costos y los grandes esfuerzos para obtener muestras de estos entornos extremófilos. Sin embargo, desde mediados de la década de 1970, el número de extremófilos reportados ha aumentado en la medida en que existen revistas especializadas, sociedades científicas y simposios internacionales dedicados al estudio de estos organismos. Entre algunos ambientes extremófilos que se conocen en el planeta podemos mencionar:

Chernóbil: Después del desastre nuclear de 1986, la región se ha convertido en uno de los lugares más inclementes para la vida. Sin embargo, podemos encontrar especies que se adaptan a las duras condiciones de radiactividad, como el gusano *Anisakis simplex*.

Mar Muerto: Un lago salado situado a 416,5 m bajo el nivel del mar entre Israel, Cisjordania y Jordania, se llama así, porque tiene una gran concentración de sal en sus aguas, lo que elimina todo rastro de vida. A excepción de las bacterias que hospedan, como la *Chromohalobacter beijerinckii*.

Desierto: Bacterias y microorganismos, como los tardígrados, pueden sobrevivir en ambientes muy áridos y sin agua durante casi una década. En ese sentido, el lugar más árido que se conoce es el desierto de Atacama: un año registró 0 litros de agua por metro cuadrado. Técnicamente, un desierto es un lugar donde las precipitaciones anuales son inferiores a 254 milímetros, y en el Sáhara solo llueve una media de 25; pues en Atacama solo llueve 0,1 milímetros de media: 250 veces más árido que el Sáhara.

Cuevas oscuras: En las cuevas donde nunca penetra la luz del sol viven escarabajos, como el *Aphaenops tellkamp* o escarabajo de la cueva.

Dentro de Rocas: A tres kilómetros bajo la superficie de la Tierra habitan amebas y algunas bacterias resistentes que viven dentro de las rocas. Se llaman, por ello, endolíticas.

Volcanes: Los volcanes, a pesar de ser tan destructivos, pueden albergar vida. Por ejemplo, los volcanes en Micronesia albergan el pájaro *Megapodius laperouse*, la talégala de las Marianas, que coloca sus huevos en las cenizas calientes de los volcanes para incubarlos. En lugares como la cueva de Kauai, hay canales horadados por la lava volcánica en los que viven ciempiés y arañas, como la araña lobo (*Adelocosa anops*).

Fuentes hidrotermales: Son respiraderos submarinos con temperaturas de hasta 400 °C son el hábitat de bacterias, gusanos de tubo y del *Crysmallon squamiferum*, un caracol con cáscara de hierro: la parte externa está compuesta por partículas de sulfuro de hierro, la del medio es de material orgánico y la más interna es una capa calcificada.

La Antártida: Es el continente más aislado del planeta, debido a este aislamiento las actividades antropogénicas son mínimas, por lo que se considera un lugar prístino. A 183 metros de profundidad, podemos encontrarnos con un '*Lyssianasid amphipod*', una criatura parecida a un camarón o gamba. También habitan una gran cantidad de organismos y microorganismos que sobreviven a temperaturas bajas, altas presiones, fuertes radiaciones UV y poca disponibilidad de nutrientes.

Por lo tanto, la biosfera extrema ahora se ha vuelto de gran interés ya que representa una fuente sin explotar nuevos productos naturales (Giddings and Newman, 2015).

2.1.2 Organismos extremófilos

El término extremófilo fue acuñado por RD Malceroy en 1974 y estos organismos incluyen microorganismos, plantas y animales que sobreviven bajo condiciones extremas (Kumar et al., 2010). Estos son organismos altamente especializados con adaptaciones de proteínas específicas, como sistemas de chaperonas o enzimas capaces de funcionar en el entorno sin desnaturalizarse. Estas proteínas son capaces de funcionar en condiciones en las que las proteínas mesófilas pueden no hacerlo. Varias proteínas obtenidas de extremófilos ya se

han utilizado en la industria para fines tan diversos como los reactivos de biología molecular (Terpe, 2013) o tan comunes como los detergentes para ropa (Ito et al., 1998). Los extremófilos también han encontrado uso como parte de la biorremediación de ambientes contaminados (Zhuang et al., 2010), debido a sus actividades metabólicas únicas y tolerancia a ciertas condiciones extremas. También hay un interés creciente en rastrear estos ambientes extremos en busca de productos naturales, particularmente aquellos que exhiben actividades antimicrobianas, ya que es poco probable que los patógenos mesófilos hayan encontrado tales compuestos para desarrollar una resistencia (Pettit, 2011; Rojas et al., 2009). A continuación, se mostrará la clasificación de los extremófilos.

2.1.2.1 Termófilos

Los termófilos son organismos capaces de sobrevivir a temperaturas fuera del rango mesófilo, es decir, entre 40 °C a 85 °C, y estos entornos incluyen respiraderos hidrotermales o minas calentadas geotérmicamente, sistemas de cavernas y fuentes termales. Las enzimas obtenidas de termófilos son ampliamente valoradas por su termotolerancia, el ejemplo más notable quizás sea la ADN polimerasa procedente de *Thermophilus aquaticus*, comúnmente conocida como polimerasa Taq, que permitió el proceso de PCR, que es un pilar fundamental de la biología molecular (Saiki et al., 1988).

2.1.2.2 Psicrófilos

Además de las altas temperaturas que representan un desafío para la vida, las bajas temperaturas también pueden ser un obstáculo para el crecimiento y la supervivencia. Los organismos capaces de sobrevivir a bajas temperaturas a menudo se denominan psicrófilos. Estos habitan en ambientes fríos como los que se encuentran en las regiones polares, zonas montañosas, algunos nichos de aguas profundas, así como algunos organismos que parecen habitar zonas atmosféricas altas como la mesosfera y la estratosfera durante parte de su ciclo de vida (Joly et al., 2013; Morris et al., 2008). Una de las adaptaciones clave de los psicrófilos para prosperar en ambientes fríos es la capacidad de sus enzimas para funcionar a un alto nivel de actividad a estas bajas temperaturas. Las enzimas obtenidas de psicrófilos son de particular interés para la industria debido a la alta actividad catalítica y su capacidad para funcionar a bajas temperaturas de manera eficaz (Feller, 2013).

2.1.2.3 Acidófilos

Los acidófilos son organismos capaces de prosperar en entornos con pH bajo, como las fuentes termales, así como en nichos artificiales como los sistemas de drenaje de minas (Johnson D. B, 1995). Una de las adaptaciones clave de los organismos acidófilos es una serie de sistemas de proteínas transportadoras ubicados en la membrana celular para ayudar a mantener los niveles de pH citosólico (Baker-Austin and Dopson, 2007). Debido a la capacidad de los acidófilos para reducir los iones de metales pesados al medio ambiente, los sistemas de drenaje ácido de las minas pueden representar un problema para los sistemas de agua circundantes. Estos sistemas de drenaje ácido de minas a menudo contienen otros compuestos orgánicos peligrosos (como compuestos alifáticos) que también pueden ser degradados por acidófilos (Gemmell and Knowles, 2000), y es posible mediante el uso de acidófilos que estos ambientes puedan ser biorremediados (Rani et al., 2009).

2.1.2.4 Alcalífilos

Los alcalífilos están en el extremo opuesto del espectro de pH, tolerando niveles extremos de alcalinidad, es decir $> \text{pH } 9$. Uno de los ambientes alcalinos naturales más comunes son las lacas de soda que pueden ser fuertemente alcalinas ($\text{pH } 10-12$) así como altamente salina, dependiendo del lago individual (Tindall et al., 1984).

2.1.2.5 Halófilos

Los organismos que pueden sobrevivir a las tensiones iónicas que les imponen los ambientes salinos se denominan halófilos. El rango en el que se definen los halófilos es amplio (aproximadamente $0,3 \text{ M}$ a $5,1 \text{ M}$ de contenido de sal), desde condiciones moderadamente halófilas del medio marino hasta lagos salados y minas, así como lugares más exóticos como el Mar Muerto (Oren et al., 1995), incluso sobreviviendo dentro de los cristales de sal durante un período de tiempo (Norton and Grant, 1988).

2.1.2.6 Piezófilos

Las presiones barométricas extremas, como las que se encuentran en las profundidades del océano, pueden alcanzar los 110 MPa , con una presión promedio de aproximadamente 38 MPa (Abe and Horikoshi, 2001), y esto puede representar un desafío importante para que la vida prospere. Los organismos que pueden adaptarse a la presión barométrica extrema a menudo se denominan piezófilos u ocasionalmente barófilos. Un ejemplo bien estudiado de un nicho de alta presión es el de los respiraderos hidrotermales de aguas profundas. Los respiraderos hidrotermales de aguas profundas son áreas donde se produce actividad geotérmica en el fondo del océano, lo que da como resultado una temperatura de pH y una disponibilidad de nutrientes muy variadas, condiciones que a su vez pueden sustentar un nicho ambiental diverso y único (Jebbar et al., 2015).

2.1.2.7 Otros extremófilos

Existen otros organismos que reciben el apodo de extremófilos pero que no encajan en ninguna de las categorías discutidas anteriormente. Estos pueden incluir organismos radiotolerantes, que son muy tolerantes a la radiación a través de impresionantes sistemas de reparación del ADN (Minton and Daly, 1995), y se están considerando con fines de biorremediación en sitios contaminados radiactivamente (Brim et al., 2003). De manera similar, también se han considerado funciones de biorremediación para organismos capaces de sobrevivir a altas concentraciones de metales pesados (Nies, 2000), o la presencia de compuestos tóxicos como los hexaclorobencenos (Adrian and Görisch, 2002).

2.1.3 Plantas terrestres extremófilas

Las plantas terrestres extremófilas pueden desarrollarse y crecer en ambientes hostiles con estrés abiótico extremo, como ocurre en los extremos de las condiciones latitudinales (ambientes árticos, Antártida) y altitudinales, en desiertos, en ambientes de altas concentraciones de metales, y en ambientes salinos. Por lo tanto, pueden definirse por sus propiedades de tolerancia al estrés, su ecología o su historia evolutiva. Los musgos tolerantes a la desecación y los musgos antárticos son ejemplos de vida de briofitas en condiciones extremas o subextremas. Entre las plantas vasculares, las plantas árticas, antárticas y subantárticas, plantas alpinas, manglares, plantas xerófitas, las plantas criofitas, las halófitas y las metalófitas se consideran extremófilas (Boulc'h et al., 2020). Las

adaptaciones de estas plantas podrían resultar de modificaciones evolutivas que optimizan el funcionamiento de las enzimas y proteínas funcionales en condiciones fisicoquímicas adversas (Hmidi et al., 2019). Además, tales adaptaciones estructurales de proteínas funcionales no excluyen la participación de mecanismos reguladores y de señalización adaptados que controlan la expresión de tales enzimas y proteínas extremófilas (Gu et al., 2019; Polle and Chen, 2015).

2.2 Cáncer

Según el fondo mundial para la investigación del Cáncer (WCRF), en el 2020 hubo un estimado de 18.1 millones de casos de cáncer en todo el mundo. De estos, 9.3 millones de casos fueron en hombres y 8.8 millones en mujeres. El cáncer más común es el de mama con 2,261,119 de nuevos casos, seguido de Pulmón con 2,206,771 nuevos casos en todo el mundo (“Worldwide cancer data _ World Cancer Research Fund International”). En Chile, la principal causa de muerte es el cáncer, en el informe de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de 2020 contabilizaron 54,227 nuevos casos. El cáncer de próstata es la principal causa de muerte con 2,342; seguido del cáncer de mama con 1,688 (“The global cancer observatory 2021”). Es por estas razones que hoy en día existe una urgente necesidad de buscar nuevos compuestos bioactivos que puedan hacer frente a esta enfermedad y que puedan presentar el menor número de efectos secundarios en los pacientes. En los últimos años ha aumentado el interés por explorar métodos para la búsqueda de compuestos selectivos contra el cáncer, debido a que las células cancerosas pueden desarrollar tumores en cualquier parte del cuerpo. El problema con estos tumores es que son un grupo de células que muestran un comportamiento anormal y pueden viajar a través del sistema sanguíneo y linfático atravesándolos y diseminándose a todo el sistema del cuerpo (Raichel Nivetha et al., 2019; Teixeira et al., 2019).

2.2.1 Terapia disponible contra el Cáncer

Desde su aprobación desde hace más de 60 años el tratamiento más utilizado contra el cáncer es la quimioterapia tradicional. Sin embargo, el problema es que estos fármacos no solo se dirigen hacia las células cancerígenas (se dividen rápidamente), sino también hacia las células normales causando una serie de efectos secundarios en los pacientes a los cuales se les administra. Por lo que en la actualidad ha surgido una nueva generación de tratamiento contra el cáncer: las terapias dirigidas. Al igual que la quimioterapia tradicional se utilizan fármacos dirigidos contra las células cancerígenas, pero los mecanismos de acción por los cuales estos actúan son distintos. En este caso las terapias dirigidas interfieren proteínas específicas implicadas en la formación del tumor, centrándose en cambios moleculares específicos de un tipo de cáncer en particular (Baudino, 2015). Existen tres tipos principales de terapias dirigidas: 1) anticuerpos monoclonales, 2) inhibidores de moléculas pequeñas y 3) inmunotoxinas. Los dos primeros métodos son los que más se han desarrollado en los últimos años (Ranieri et al., 2006; Zhang et al., 2009).

2.2.1.1 Anticuerpos monoclonales

El mecanismo de acción de estos es la interrupción de las interacciones entre el ligando y el receptor, ya sea porque el anticuerpo bloquea el sitio de interacción o por la eliminación de la proteína por endocitosis o por los mastocitos (Golay and Introna, 2012; Ritchie et al.,

2013). Los anticuerpos monoclonales son más específicos, ya que se dirigen exclusivamente a una proteína en particular, pero esta proteína debe ser extracelular, ya que los anticuerpos no pueden entrar en la célula a través de la membrana plasmática.

2.2.1.2 Inhibidores de moléculas pequeñas

La actividad inadecuada de las quinasas es una vía importante a través de la cual las células se vuelven cancerosas, restringiendo el desarrollo normal del ciclo celular. Los inhibidores de moléculas pequeñas o inhibidores de las TC (tirosina-quinasa) se unen de forma competitiva al sitio de unión al ATP activo o inactivo de una tirosina quinasa. De esta forma se utilizan para atacar proteínas que se han desregulado o que se han vuelto no reguladas o reguladas al alza, como BCR-ABL, Akt o mTOR. Una vez que estas moléculas se unen a su objetivo específico, inactivan el dominio tirosina quinasa e impiden las vías de señalización. Estos fármacos han demostrado ser muy útiles cuando se administran a los pacientes con agentes quimioterapéuticos (Gerber, 2008).

2.2.1.3 Inmunotoxinas

Las inmunotoxinas son una nueva clase de fármacos que incluyen anticuerpos monoclonales modificados o factores de crecimiento (Alewine et al., 2015; Kreitman, 2006). Originalmente, las inmunotoxinas se producían uniendo químicamente una toxina a una proteína. Sin embargo, en la actualidad se producen ADN recombinante que genera una proteína de fusión que tiene la toxina como un dominio adicional en el anticuerpo o factor de crecimiento. La inmunotoxina se une a una proteína de la superficie celular y se internaliza a través de foseas recubiertas de clatrina. Una vez internalizada, la toxina provoca la apoptosis de la célula objetivo en combinación con la proteína en el citosol. Las toxinas vegetales y bacterianas que se están diseñando para su uso en inmunotoxinas son la toxina diftérica (DT), la proteína antivírica de hierba carmín (PAP), la exotoxina A de pseudomonas (PE), la ricina y la saporina (Alewine et al., 2015; Kreitman, 2006).

Por otro lado, la alta producción de ROS generada por las células cancerígenas ha llamado la atención del mundo científico, presentando estas especies como posible blanco para su tratamiento, lo que se conoce como erradicación selectiva del cáncer a través de la interferencia del balance redox, de lo que se discutirá a continuación (Jia et al., 2020).

2.2.2 ROS y su relación con el cáncer

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que contienen átomos de oxígeno con una alta reactividad. Las ROS son producidas en las células eucariotas a través del metabolismo aeróbico y juegan un papel fundamental como reguladores de importantes vías de señalización (Perillo et al., 2020). Estas incluyen radicales libres como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), también se incluye en esta clasificación moléculas no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es la especie menos reactiva pero que es capaz de llegar a cualquier compartimiento celular antes de ser convertida en agua y oxígeno por las enzimas correspondientes (Forman et al., 2014). Las ROS son producidas en la mitocondria, los peroxisomas (a través de la β -oxidación de ácidos grasos) y en el retículo endoplasmático (a través de la oxidación de las proteínas), también son generados después de la exposición a agentes físicos (Rayos UV y calor) y después de la aplicación de la quimioterapia y radioterapia del cáncer (Bedard and Krause, 2007).

A niveles bajos, las ROS están involucradas en la regulación de muchos procesos biológicos y fisiológicos, como importantes moléculas de señalización. Los niveles intracelulares de ROS normalmente permanecen estables, porque las ROS son fuentes oxidantes que pueden participar en el estrés oxidativo (aumento de la producción normal de las ROS), ocasionando daños importantes en lípidos, ADN y proteínas (Jia et al., 2020; Stefanatos and Sanz, 2018). En el microambiente tumoral, las ROS en niveles relativamente bajos desempeñan un papel importante en la señalización y proliferación celular, así como en la revascularización. Sin embargo, un aumento gradual de estas puede promover la proliferación celular y metástasis de tumores. Por el contrario, las ROS en niveles elevados dañan el ADN de las células cancerosas, provocando apoptosis y necrosis tumoral (Holmström and Finkel, 2014; Kim et al., 2016; Mishra et al., 2019). La compleja interconexión entre los niveles de ROS y el cáncer se basan esencialmente en el ajuste preciso entre la producción de ROS y la eliminación de estos. El inicio y la progresión del cáncer se ve beneficiado por un ligero aumento en los niveles de ROS, por lo que las células cancerígenas prosperan con niveles de ROS que son moderadamente más altos que los de su contraparte normales, ya que han desarrollado un mayor sistema antioxidante (Perillo et al., 2020). Esta característica hace que las células cancerosas sean más sensibles a estímulos externos que incrementan la producción de ROS, por lo que en la actualidad se están desarrollando cada vez más estrategias terapéuticas para elevar los niveles de ROS y superar la adaptación redox de las mismas células para inducir estrés oxidativo (Perillo et al., 2020). Un gran número de reacciones de oxidación hacen que la concentración de ROS en el tumor sea mayor que en los tejidos normales. Por lo tanto, las ROS están estrechamente relacionadas con las distintas fases del tumor, y esto puede ser de gran ayuda para la producción de efectos terapéuticos en el tumor. Por mencionar algunas de las estrategias para combatir el cáncer mediante las ROS tenemos, la terapia fotodinámica, la medicina oncología y la inmunoterapia (Jia et al., 2020).

2.2.2.1. ROS y la terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) es una terapia intervencionista muy eficaz para el tratamiento de tumores en los últimos años. Durante la TFD, el fotosensibilizador (PS) cargado en el interior de nanomateriales, convierte el oxígeno circundante en ROS

mediante transferencia de elección bajo la irradiación de una longitud de onda de luz específica, lo que conduce a una mayor producción de ROS (Yang et al., 2018). El aumento del nivel de ROS en el microambiente tumoral romperá el equilibrio de oxidación-antioxidación, inhibirá el crecimiento del tumor, dañará el ADN y, por tanto, inducirá la apoptosis de las células cancerosas (Yang et al., 2018).

2.2.2.2. ROS y la medicina oncológica

La mayoría de las células pueden amortiguar cierta cantidad de ROS mediante el mecanismo de reducción del sistema redox del glutatión (GSH), pero las ROS a largo plazo en niveles elevados pueden causar daños celulares (Fernández-Bertólez et al., 2019). Factores externos como la radiación, la contaminación atmosférica y los fármacos quimioterapéuticos pueden estimular a las mitocondrias para que produzcan ROS, generando la apertura de los poros de la membrana externa mitocondrial, lo que involucra la liberación de iones de calcio, así como de citocromo C, provocando así la muerte celular vía apoptosis. Aunque la terapia quimiofotodinámica tiene un importante efecto sinérgico sobre los tumores malignos, los nanotransportadores disponibles en la actualidad tienen capacidades limitadas en cuanto a toxicidad selectiva, liberación del fármaco y penetración en el tumor. Por esto, se han desarrollado nanotransportadores de polietilenglicol (PEG)-estearilamina (C18) (PTS) autoensamblado con un enlazador tiocetal (TL) sensible a las ROS, y se combinó con la doxorrubicina (DOX) y decolorante fotosensible A (PhA) para mejorar el tratamiento quimiofotodinámico local. Estas nuevas nanomicelas activadas por luz administraron eficazmente dos fármacos quimiofotodinámicos y minimizaron los efectos secundarios (Fernández-Bertólez et al., 2019).

2.2.2.3. ROS y la inmunoterapia

La inmunoterapia adoptiva (IA), se presenta como una terapia novedosa que afecta al metabolismo tumoral a través de ROS. En general, la IA se refiere a la transferencia de linfocitos del donante al receptor para mejorar la inmunidad celular del receptor. La IA puede dividirse en dos categorías: especificidad- la transferencia de linfocitos antigensibilizados a un receptor para que sea inmune al antígeno; y la categoría no específica - la transferencia de linfocitos normales, no antigénicos, a un receptor para que sea inmune al antígeno o a múltiples antígenos. En la actualidad, la inmunoterapia adoptiva con células T es una inmunoterapia clínicamente eficaz contra los tumores. Este enfoque puede provocar una respuesta autoinmune hiperactiva que puede causar reacciones adversas graves e incluso potencialmente mortales. Por tanto, el controlar de forma más eficaz y fiable y dilucidar el mecanismo de acción es uno de los principales puntos de investigación de la inmunoterapia en la actualidad (Habtetsion et al., 2018).

2.2.3 Productos Naturales como fuente de nuevos agentes anticancerígenos

El descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas inspiradas en productos naturales han sido el foco de muchas investigaciones en los últimos años (Wright, 2017; Yao et al., 2017). Alcaloides, flavonoides, terpenos, polisacáridos, saponinas y otros han sido reportados como compuestos bioactivos de origen natural con potente actividad anticancerígena (Joshi et al., 2017). Mas del 60% de los fármacos anticancerígenos comercialmente disponibles o que se encuentran en diferentes fases clínicas y que han demostrado importante eficacia para combatir el cáncer, son productos naturales derivados de plantas, organismos marinos

o microorganismos (Seelinger et al., 2012). La actividad anticancerígena de la mayoría de los productos naturales está relacionada con la función inmunitaria, inducción de la apoptosis o la autofagia, o inhibición de la proliferación celular (Rayan et al., 2017).

Por muchos años, las culturas indígenas alrededor del mundo han utilizado plantas para el tratamiento de muchas enfermedades (Seca, 2018). Las plantas constituyen una conocida alternativa para el tratamiento del cáncer en muchos países y más de 3000 plantas alrededor del mundo han sido reportadas con propiedades anticancerígenas (Alves-Silva et al., 2017; Tariq et al., 2017), a pesar de que actualmente las medicinas tradicionales se utilizan menos, el uso de plantas medicinales sigue siendo habitual en la terapia oncológica en todo el mundo (Diorio et al., 2017; Yan et al., 2017). Los productos naturales han atraído cada vez más atención en la quimioterapia contra el cáncer porque se consideran biológicamente más amistosos y, en consecuencia, más evolucionados con sus sitios activos y menos tóxicos para las células sanas (Mishra et al., 2019). Considerando estos hechos, muchas investigaciones en la actualidad han centrado sus investigaciones en el potencial de los productos naturales provenientes de las plantas para la industria farmacéutica (Bernardini et al., 2018; Katz and Baltz, 2016; Kotoku et al., 2016).

2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que pueden proteger a las células del daño causado por los radicales libres, y pueden desempeñar un papel importante en enfermedades cardíacas, cáncer y otras enfermedades. Los antioxidantes neutralizan los radicales libres donando uno de sus electrones y poniendo fin a la reacción radicalaria, ayudando a prevenir el daño celular y tisular de los tejidos (Singh et al., 2018). Los compuestos endógenos de las células pueden ser: enzimáticos como la enzima superóxido dismutasa, catalasa, enzimas dependientes del glutatión y antioxidantes no enzimáticos, que pueden ser metabólicos y antioxidantes nutritivos. Entre los antioxidantes metabólicos podemos mencionar GSH, ácido lipoico, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, etc., los cuales son producidos por el organismo a través del metabolismo. Mientras que los nutrientes antioxidantes exógenos se deben suministrar a través de la alimentación, tales como la vitamina E, vitamina C, los carotenoides, los oligoelementos, flavonoides, polifenoles, etc. (Alexieva et al., 2010; Valko et al., 2007). Existe un delicado balance entre el sistema de reparación antioxidante y los mecanismos prooxidantes de destrucción tisular, que si se inclina a favor del daño celular podría provocar una mutilación significativa de los tejidos, por lo que es importante estudiar esta relación (Sharma and Sharma, 2011; Singh et al., 2018).

2.3.1 Quimioterapia, estrés oxidativo y antioxidantes

Los fármacos quimioterapéuticos que provocan altos niveles de estrés oxidativo son utilizados debido a que emplean este mecanismo de estrés para destruir las células cancerígenas. Sin embargo, se cree que el estrés oxidativo reduce la eficacia general de la quimioterapia ya que ralentiza el proceso de replicación celular, pero es durante este proceso cuando los fármacos matan las células cancerígenas. Por lo tanto, una replicación celular más lenta puede significar menor eficacia de la quimioterapia (Conklin, 2004).

Es por esto, que en la actualidad se recomienda la adición de ciertos antioxidantes en dosis específicas para reducir el estrés oxidativo y aumentar así la eficacia de la quimioterapia (Perumal et al., 2005). La interacción entre la quimioterapia y los antioxidantes es mucho más compleja que la promoción e inhibición del estrés oxidativo. Sin embargo, existen varios mecanismos por los que la quimioterapia y los antioxidantes también tienen diversos efectos en el organismo. Por lo que cada antioxidante tiene una interacción diferente en la quimioterapia y este efecto puede incluso ser modificada en función de la dosis utilizada (Singh et al., 2018).

2.3.1.1. Antioxidantes y quimioterapia

Hay dos tipos diferentes de dosis de antioxidantes utilizados en la terapia del cáncer. Una dosis preventiva, que es una dosis baja y una dosis terapéutica, que es una dosis alta. En el caso de la dosis preventiva se ha reportado la protección de células normales y tumorales. Para la dosis terapéutica, los reportes muestran que inhibe el crecimiento de las células cancerosas, pero no de las normales (Singh et al., 2018).

Muchos estudios llevados a cabo en los años recientes reportan conclusiones positivas sobre la interacción de los antioxidantes y la quimioterapia. Esto se debe en gran medida a que los pacientes de cáncer sufren deficiencias vitamínicas (ácido fólico, vitamina C, piridoxina, etc.) debido a una pobre nutrición o a un tratamiento deficiente. Además, la quimioterapia reduce los niveles séricos de vitaminas y minerales antioxidantes debido a la peroxidación lipídica por lo que se produce un mayor nivel de estrés oxidativo. Por lo tanto, la suplementación de ciertos antioxidantes puede ayudar a mejorar el estado de salud de los pacientes sometidos a un régimen continuo de quimioterapia (Drisko et al., 2003).

2.3.1.2. Potencial redox de los antioxidantes

El estado redox se define como el potencial de reducción de todas las moléculas antioxidantes en los constituyentes celulares o fluidos biológicos. De hecho, el equilibrio redox se mantiene hacia un estado de valores negativos de potencial redox debido a la actividad de los mecanismos de homeostasis celular. Este equilibrio redox celular puede verse alterado debido a cambios en las condiciones fisiológicas o cuando se produce una reducción de los niveles de antioxidantes celulares (Pham-Huy et al., 2008). El resultado neto puede manifestarse como daños funcionales para la salud o diversas condiciones de enfermedad, incluido el cáncer (George and Abrahamse, 2020). Existen moléculas antioxidantes grandes (catalasa, GPx, SOD) o pequeñas (carotinoides, GSH, vitaminas C y E) capaces de controlar el equilibrio redox en las células malignas (Nimse and Pal, 2015). Por lo tanto, una de las estrategias para inducir la reducción tumoral es atacar el metabolismo redox aumentando la capacidad antioxidante de la célula cancerosa (George and Abrahamse, 2020).

Cuando aumenta el estrés oxidativo, el exceso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se convierte en radical hidroxilo ($OH\cdot$) que puede dañar diversos componentes celulares (Marengo et al., 2016). La capacidad de invasión y de metástasis también depende del nivel de ROS generado por los tumores primarios (Gorrini et al., 2013). Varios estudios han identificado que la inhibición del ROS mitocondrial es una estrategia terapéutica eficaz para el control y la prevención de la metástasis (Goh et al., 2011; Porporato et al., 2014). Por el contrario, las células de melanoma que circulan por el torrente sanguíneo

experimentan varios cambios metabólicos reversibles para soportar un mayor estrés oxidativo (Piskounova et al., 2015). En este caso, los antioxidantes pueden apagar el exceso de ROS en la sangre circulante que causa graves daños celulares y facilita la metástasis. Tal vez, ésta sea una de las razones por las que la terapia antioxidante consigue o no la remisión efectiva y la recuperación de los tumores malignos. Por lo tanto, es necesario diseñar estrategias para eliminar las ROS de los compartimentos mitocondrial y celular mediante el uso de compuestos antioxidantes (George and Abrahamse, 2020).

2.3.1.3. Rol de los antioxidantes en la terapia fotodinámica

El metabolismo energético mitocondrial es la principal fuente de radicales libre. Los radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el superóxido ($O_2\cdot^-$) aumentan la tasa de replicación y proliferación del ADN celular. Un número excesivo de radicales libres puede tener consecuencias perjudiciales que provoquen enfermedades sistémicas y cáncer. Cualquier desequilibrio en el estado redox celular, ya sea por un aumento de radicales libres o por una escalada de agentes reductores, favorece la detención del crecimiento y la apoptosis (Abrahamse and Hamblin, 2016). De hecho, el mecanismo de acción de las radiaciones no ionizantes y ionizantes en la eliminación de las células cancerosas implica la generación de niveles anormalmente altos de radicales libres en el organismo. La terapia fotodinámica (TFD) con radiaciones no ionizantes utiliza un compuesto fotosensible (fotosensibilizador) que reacciona con el oxígeno molecular (O_2) para generar un exceso de radicales libres, especialmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido ($O_2\cdot^-$), que provocan la detención del crecimiento y la muerte celular. Por el contrario, la radioterapia con radiaciones ionizantes da lugar a la formación de radicales de oxígeno en las células vivas por interacción de la radiación con el agua, proceso conocido como radiólisis (Vile and Tyrrell, 1995).

Una combinación de antioxidantes sintéticos y naturales sirve como radioprotector para los pacientes sometidos a radioterapia. Antioxidantes como la vitamina E (α -tocoferol) y la melatonina han resultado eficaces contra la mucositis inducida por la radiación, el cáncer cerebral y la proctopatía inducida por la radiación, respectivamente (Moss, 2007). En cambio, la TFD puede servir como modalidad terapéutica para inducir radicales libres que pueden estimular la señalización celular que conduce a la respuesta inmune antitumoral, la reducción de la masa tumoral, la apoptosis y la necrosis (Broekgaarden et al., 2015). A diferencia de la acción de las radiaciones ionizantes sobre los sistemas biológicos, que dan lugar a la formación de cantidades excesivas de radicales libres por radiaciones no dirigidas, las TFD provocan una producción controlada de estrés oxidativo mediante el uso de fármacos específicos y una respuesta dirigida. Sin embargo, la presencia de antioxidantes en las reacciones fotodinámicas reduce la eficacia de la TFD, aunque algunos de ellos, como el ácido ascórbico, el α -tocoferol o el butil-4-hidroxianisol, pueden potenciar el efecto fotodinámico en las células malignas (Jakus and Farkas, 2005). Las razones exactas que subyacen a la naturaleza variable de estos antioxidantes en los cánceres requieren investigaciones más detalladas (George and Abrahamse, 2020).

En resumen, la TFD puede modular las respuestas antioxidantes celulares, la respuesta proinflamatoria y la respuesta de supervivencia durante el estrés oxidativo. La TFD asistida por nanomedicina tiene una mayor especificidad para la destrucción de células cancerosas con efectos secundarios mínimos. Los fotosensibilizadores junto con las moléculas

específicas de la diana también pueden acumularse en la bicapa lipídica de las células madre cancerosas para generar radicales libres tras la irradiación con luz de longitud de onda adecuada, lo que conduce a la remisión de la masa tumoral. De hecho, la TFD dirigida junto con adyuvantes e inmunoestimulantes adecuados será otra opción factible para erradicar estos tumores recalcitrantes (Mfouo Tynga and Abrahamse, 2018).

2.4 Antimicrobianos

Las infecciones microbianas y la resistencia de estos a los antibióticos han sido uno de los grandes retos que amenazan la salud de muchas personas alrededor del mundo. Una investigación publicada en *The Lancet*, reveló que la segunda causa de mortalidad en el planeta se produce debido a infecciones bacterianas. El trabajo liderado por la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington (EE. UU), concluyó que, solo en 2019, 7.7 millones de personas fallecieron a causa de alguna infección y que la mitad de esos decesos fue atribuible a cinco bacterias: *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. En el aumento de la resistencia a los antibióticos intervienen varios factores, sobre todo el uso excesivo y abusivo de antibióticos en humanos y animales, además de la falta de desarrollo de nuevos antibióticos. El campo del descubrimiento y desarrollo de antibióticos necesita urgentemente de innovación para revitalizar los fármacos descubiertos y aprobados por la FDA desde finales de los años ochenta o sintetizar y desarrollar nuevos fármacos que puedan hacerles frente a estos microorganismos que causan muchas muertes cada año en el Planeta (Durand et al., 2019; Porras et al., 2021).

En la búsqueda de nuevos antibióticos, el cribado de compuestos sintéticos no ha cumplido las expectativas y, en consecuencia, ha demostrado la necesidad de explorar los productos naturales (Harvey et al., 2015; Payne et al., 2007) que, a diferencia de la mayoría de los compuestos sintéticos, interactúan con los sistemas biológicos de una manera más eficiente, además debido a su enorme diversidad química y estructural los convierten en potenciales fármacos (Shen, 2015). Históricamente, el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 se realizó a partir del cultivo del hongo *Penicillium notatum* (Singh and Barrett, 2006). En la actualidad, de los más de 162 agentes antimicrobianos aprobados por la FDA entre 1981 – 2019, alrededor del 50% son derivados de un producto natural (Newman and Cragg, 2020).

Las plantas son especialmente interesantes como fuentes de antibióticos porque han desarrollado complejos mecanismos de acción contra los mismos, como el uso de defensas químicas que implican una amplia gama de metabolitos secundarios estructuralmente únicos (Zaynab et al., 2018). Las plantas también poseen otras características distintivas prometedoras para el descubrimiento de fármacos, como su rica quimiodiversidad. De las más de 374.000 especies de plantas que han sido descubiertas solo un pequeño porcentaje ha sido estudiado, por lo que todavía existe una amplia variedad de las mismas sin estudiar (Christenhusz and Byng, 2016). A lo anterior se debe sumar, la eficacia clínica asociada a los extractos de plantas (Gurib-Fakim, 2006), su fácil acceso y el potencial de interacciones sinérgicas entre los fitoquímicos y otros compuestos bioactivos (Caesar and Cech, 2019).

2.4.1. Métodos de control de patógenos multirresistentes

Para el control del crecimiento microbiano se han desarrollado varios métodos con el fin de destruir o inhibir su crecimiento. A continuación, se mencionarán los métodos actualizados utilizados como control (Elmaidomy et al., 2022).

2.4.1.1. Métodos de control de patógenos multirresistentes

La formación, transferencia y transmisión de plásmidos resistentes son mecanismos importantes que causan resistencia a los antibióticos, y que desempeñan un papel fundamental en la diseminación de genes de resistencia (Poirel et al., 2018). En consecuencia, uno de los mecanismos eficaces para reducir la resistencia a los antibióticos es la inhibición de la transferencia de plásmidos resistentes o su eliminación.

2.4.1.2. Efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular

Dado que la membrana celular bacteriana impide el transporte de antibióticos y, en consecuencia, afecta a la eficacia del fármaco, la permeabilidad de la membrana celular bacteriana podría modificarse cambiando algunos canales iónicos. Mediante este método, la permeabilidad de las membranas celulares para transportar antibióticos al interior de la bacteria a través de la pared celular bacteriana podría ser incrementada, presentando un método eficaz contra patógenos multirresistentes (He et al., 2018).

2.4.1.3. Inhibición de la bomba de eflujo de bacterias resistentes a los antibióticos

Los antibióticos pueden inducir fácilmente la sobreexpresión de la bomba de eflujo bacteriana para forzar a las bacterias a bombear más antibacterianos para disminuir significativamente la concentración, exacerbando la infección bacteriana. El sistema de eflujo tanto en bacterias gram-positivas como gram-negativas regula al alza la expresión del gen *NorA* para aumentar la excreción del fármaco, por lo que los inhibidores de la bomba de eflujo de las bacterias podrían eliminar la resistencia a los antibióticos (Tanaka et al., 2016).

2.4.1.4. Cambios en las dianas farmacológicas

El peptidoglicano es el principal componente de la envoltura celular de la mayoría de las bacterias. En la síntesis del peptidoglicano, varias proteínas, como las enzimas Mur y las PBPs, son los objetivos de los antibióticos. Sin embargo, los cambios en la estructura y la cantidad de PBPs por parte de las bacterias desempeñan un papel importante en la resistencia bacteriana a los fármacos (Shiota et al., 2004). Tales cambios implican diversos mecanismos, especialmente subunidades ribosómicas a través de mutaciones ribosómicas y metilación de las subunidades ribosómicas, que suelen implicar a los genes *erm* que interfieren en la capacidad de los fármacos para unirse a las PBPs. con la capacidad de los fármacos para unirse al ribosoma. Además, en el caso de los fármacos dirigidos a la síntesis de ácidos nucleicos, la resistencia se produce a través de modificaciones en la ADN girasa o la topoisomerasa IV. Para los fármacos que inhiben las vías metabólicas, la resistencia se produce a través de mutaciones en enzimas (DHPS-dihidropteroato sintasa, DHFR-

dihidrofolato reductasa) implicadas en la vía de biosíntesis del folato y/o la sobreproducción de enzimas DHPS y DHFR resistentes (C Reygaert, 2018).

2.4.1.5. Inhibición de la formación de Biopelículas

La colonización bacteriana se identifica como la formación de una biopelícula por una comunidad bacteriana. Para los organismos patógenos, la formación de una biopelícula protege a las bacterias del sistema inmunitario del huésped, además de proporcionarles protección frente a los agentes antimicrobianos. La consistencia espesa y pegajosa de la matriz de la biopelícula, que contiene polisacáridos, proteínas y ADN de las bacterias residentes, dificulta que los agentes antimicrobianos lleguen a las bacterias. Además, las células bacterianas de la biopelícula tienden a ser sésiles (metabolismo lento, división celular lenta), por lo que los agentes antimicrobianos no pueden alcanzarlas, provocando que los antimicrobianos que se dirigen a las células bacterianas en crecimiento, que se dividen tengan poco efecto. El resultado es genes de resistencia a los antimicrobianos entre comunidades bacterianas (C Reygaert, 2018).

2.4.1.6. Inactivación de fármacos inhibidores

Las bacterias pueden inactivar los antibióticos de dos formas principales, Por degradación del fármaco, o bien por modificación del fármaco mediante la transferencia de un grupo químico a la estructura química del fármaco. Para la inactivación de fármacos por transferencia de un grupo químico se suele utilizar la transferencia de grupos acetilo, fosforilo y adenilo (C Reygaert, 2018).

2.4.1.7. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por casi todas las especies bacterianas y tienen un mecanismo de acción y un espectro de actividad variados. Debido a sus principales propiedades, tales como, su alta estabilidad, baja toxicidad y amplio espectro de actividad, las bacteriocinas se han convertido en una excelente alternativa a los antibióticos (Vivas et al., 2019).

2.4.1.8. Aceites esenciales

Otra herramienta alternativa para controlar los patógenos multirresistentes son los aceites esenciales (AE). Cuando los AE se mezclan con agentes antimicrobianos, sus constituyentes podrían desbloquear los canales de la membrana celular, abriendo el paso de los agentes antimicrobianos para alcanzar sus objetivos internos. Esta es una gran estrategia para evitar la selección de cepas resistentes en el futuro. Sin embargo, la baja solubilidad en agua y la alta presión de vapor son características que limitan la utilización de los mismos (Vivas et al., 2019).

2.4.1.9. Inhibición de la comunicación bacteriana (Quorum-sensing, QS)

La detección del quórum (QS) es una comunicación bacteriana intercelular para coordinar comportamientos celulares. A altas concentraciones, los patógenos pueden cambiar su transcripción prole a un fenotipo invasivo, incluidos los genes relacionados con la tolerancia a los antibióticos y los determinantes de virulencia, y provocar enfermedades, ya que regulan la expresión de varios genes de virulencia simultáneamente. Los QSI actúan

inhibiendo las comunicaciones célula-célula y, en consecuencia, la evolución de la enfermedad, permitiendo al sistema inmunitario prevenir la colonización bacteriana y/o eliminar una infección establecida. Este control antimicrobiano se basa en la reducción de la carga de virulencia más que en la eliminación de la infección en lugar de matar a las bacterias. En las dos últimas décadas, se han caracterizado varias QSI de plantas animales y microorganismos, y los modelos de infección animales y vegetales han demostrado su eficacia antibacteriana contra patógenos QS. Así pues, las QSI podrían ser una buena alternativa para tratar infecciones causadas por patógenos multirresistentes. Sin embargo, su aplicación clínica aún requiere más investigación (Vivas et al., 2019).

2.4.2. Investigaciones de ramas alternativas sobre desarrollo de nuevos fármacos contra patógenos multirresistentes.

Además de los productos naturales, se han investigado varios remedios como prebióticos, probióticos, simbióticos, bacteriófagos, nanopartículas, péptidos antimicrobianos, péptidos reguladores de las defensas innatas, péptidos miméticos, vacunas y la estimulación inmunitaria, etc., cada uno con sus propias ventajas y limitaciones (Elmaidomy et al., 2022).

3 Antecedentes

3.1 Plantas endémicas del Norte de Chile y su uso medicinal

La medicina ancestral de los pueblos originarios está enraizada en la experiencia misma del hombre con su entorno, en su cultura. Se ocupa de las enfermedades cuyo foco era la mayoría de las veces desconocido y cuyo agente causal se debía a la acción de fuerzas invisibles. Las tradiciones curativas ancestrales se remontan a cientos y miles de años y sus prácticas variaron ampliamente involucrando rituales, ceremonias y una riqueza inmensa de conocimientos. Las plantas y otros productos naturales utilizados en los tratamientos, generalmente se recolectaron en el entorno inmediato, lo que permitió una amplia variedad de curas a las principales dolencias del grupo. Aprendieron que usando o combinando ciertas hierbas, raíces y plantas (a menudo consideradas profundamente sagradas), era posible la sanación (Vega Cacabelos, 2020).

El pueblo Colla que habita la zona norte de Chile: parte del altiplano en la III Región. Como ocurre con la mayoría de los pueblos andinos su medicina tradicional se relaciona intrínsecamente con su cosmovisión y religión. Se manejan algunas hierbas como la chachacoma: *Escalonia resinosa* (empleada para el mal de altura: puna), la llareta: *Azorella compacta* (para el cáncer y leucemia), el bailahuén: *Haplopappus baylahuen* (para dolores estomacales), el parque negro: *Cestrum parqui* (cicatrizante de heridas) y la salvia: *Salvia officinalis* (para la tos y el resfrío) entre otras (Galvez Gomez, 2012). Esta información ha sido de gran ayuda para la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas con objetivos farmacológicos y conjuntamente con esto el desarrollo de proyectos que permitan el uso de manera controlado de estas plantas endémicas del Norte de Chile.

La región de Atacama tiene una superficie aproximada de 75.000 Km² (La cuarta región más grande de Chile) y se divide en tres provincias: Chañaral, Copiapó y Huasco. Esta región tiene cordilleras transversales que unen las montañas costeras con los Andes, y profundos valles formados por grandes ríos como el Salado, Copiapó y Huasco. De todos los paisajes notables de Atacama, el famoso desierto floreciente es el más espectacular. En su mejor momento, a principios y mediados de la primavera y cuando hay una combinación de lluvias abundantes y temperaturas adecuadas, especies vistosas como para de guanaco (*Cistanthe longiscapa*), ñañauca amarilla (*Zephyranthes bagnoldii*) y celestina (*Zephyra elegans*) ofrecen una impresionante exhibición de colores. La Región es conocida por sus cactus únicos, especialmente especies del género endémico Copiapoa, que prevalecen en la costa y son especialmente prominentes en los Parques Nacionales Llanos de Challe y Pan de Azúcar. En los Andes, el Parque Nacional Nevado de tres Cruces es uno de los mejores ejemplos de salares altoandinos e incluye parte del Salar de Maricunga (“Las plantas endémicas de Chile”) Actualmente se encuentran registradas 111 especies de plantas endémicas en la Región de Atacama, agrupadas en 50 géneros. En esta tesis, se estudiarán 4 plantas recolectadas en esta región pertenecientes a 4 familias diferentes.

3.2 Plantas de Chile pertenecientes a las familias: *Solanaceae*, *Zygophyllaceae*, *Krameriaceae* y *Apocynaceae*

3.2.1 *Solanaceae*

Las solanáceas son una familia de plantas herbáceas pertenecientes al orden Solanales, de las dicotiledóneas. Comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2700 especies, con una gran diversidad de hábito, morfología y ecología. La familia es cosmopolita, distribuyéndose por todo el globo con la excepción de la Antártida. La mayor diversidad de especies se encuentran en América del Sur y América Central. En esta familia se incluyen especies alimenticias tan importantes como la papa o patata (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y los chiles, ajíes o pimientos (*Capsicum*). Muchas plantas ornamentales muy populares pertenecen a las solanáceas, como *Petunia*, *Schizanthus*, *Salpiglossis* y *Datura* (Padmanabhan et al., 2016). Ciertas especies son mundialmente conocidas por sus usos medicinales, sus efectos psicotrópicos o por ser ponzoñosas. En Chile se han reportado 42 especies de esta familia, En este trabajo de investigación se estudiará la especie *Nolana albescens*.

N. albescens se encuentra distribuida entre el borde costero desde la Región de Antofagasta hasta la región de Coquimbo. Esta especie es conocida como “suspiro” y constituye una de las flores emblemáticas que aparecen durante el fenómeno del desierto florido. Es considerada una planta de poco valor ornamental (“Las plantas endémicas de Chile”).



Figura 1. *Nolana albescens*, planta endémica del Norte de Chile

3.2.2 *Zygophyllaceae*

Son plantas herbáceas o raramente leñosas, a menudo xerófilas y halófilas (plantas que crecen en ambientes salinos). Existen más de 280 especies en el mundo, de las cuales 9 han sido reportadas en Chile: *Bulnesia chilensis*, *Fagonia chilensis*, *Fagonia subaphylla*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Larrea nítida*, *Metharme lanata*, *Pintoa chilensis* y *Porlieria chilensis* (Sheahan, 2007). De las cuales, solo *Pintoa chilensis* es endémica de la región de Atacama (“Chileflora”).

P. chilensis es un arbusto de 1.5 m de altura, crece en áreas secas, donde el período sin precipitaciones dura de 6 – 10 meses. Su principal uso es ornamental (“Chileflora”). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la posible empleabilidad de *P. chilensis*,

específicamente su extracto etanólico, frente a la línea celular MCF-7. Los resultados preliminares son alentadores y se podría estar en presencia de metabolitos que presentarán actividad selectiva frente a algunos tipos de cáncer (Arrieche et al., 2024).



Figura 2. *Pintoa chilensis*, planta endémica del Norte de Chile.

3.2.3 Krameriaceae

Es una familia de plantas fanerógamas, distribuida en las regiones templadas y subtropicales. Cuenta con un solo género: *Krameria*, con unas 25 especies de arbustos o hierbas perennes. Para Chile se han reportado dos especies: *Krameria cistoidea* y *Krameria lappacea*. Para efectos de esta investigación nos enfocaremos en la especie *K. cistoidea* (“Las plantas endémicas de Chile”).

K. cistoidea conocida comúnmente como “Pacul”, es un arbusto de hasta 30-50 cm de altura cuyas raíces se utilizan para teñir. En Medicina popular se emplea en cuadros de diarrea y hemorragias. Esta especie tiene altos requerimientos en radiación y temperatura. Es propia del desierto florido en la región de Atacama (Pedrós-Alió, 2021).



Figura 3. *Krameria cistoidea*, planta endémica del Norte de Chile.

3.2.4 Apocynaceae

Es una familia que incluye árboles, arbustos, hierbas o lianas. Las especies de esta familia se distribuyen primordialmente en las regiones tropicales, dividida en 366 géneros que

incluyen unas 4500 – 5500 especies (Gonzalez-Rocha & Cerros Tlatipla, 2015). En Chile se conocen 19 especies nativas de esta familia, representados únicamente por dos géneros: *Elytropus* y *Skytanthus* el cual es endémico y solo crece en dunas y áreas relacionadas al Desierto en el Norte del país (Pedrós-Alió, 2021). En este trabajo de investigación nos enfocaremos en la especie *Skytanthus acutus*.

S. acutus conocido comúnmente como “cacho de cabra” o “cuerno de cabra”, es un arbusto de 1.2 m de altura cuya flor amarilla es conocida por sus 5 pétalos y sus frutos se enroscan en espiral al secarse. Tiene poco valor como ornamento (Pedrós-Alió, 2021).

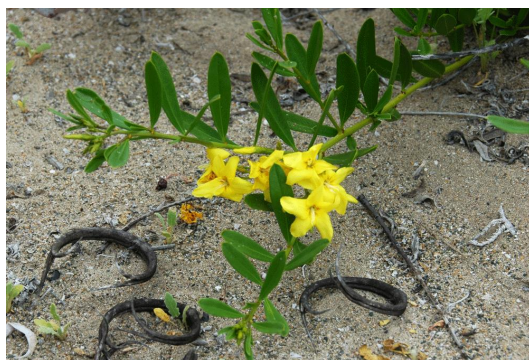


Figura 4. *Skytanthus acutus*, planta endémica del Norte de Chile.

3.3 Metabolitos secundarios aislados de plantas pertenecientes a las familias: *Solanaceae*, *Zygophyllaceae*, *Krameriaceae* y *Apocynaceae* recolectadas en Chile.

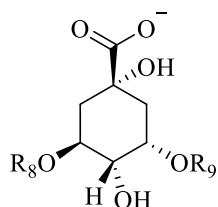
3.3.1. Solanaceae

En la actualidad la mayoría de los trabajos dedicados a la búsqueda de compuestos bioactivos de esta familia de plantas se han enfocado en el género *Solanum*, de las cuales se han aislado una importante cantidad de metabolitos secundarios en los cuales se incluyen: fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides (Zhao et al., 2018), acetogeninas, policétidos, terpenos, esteroides y carotenoides (Nirmal et al., 2012). Otras plantas pertenecientes al género *Physalis*, también han sido ampliamente estudiadas reportando interesantes actividades biológicas tales como: capacidad para bloquear compuestos antifisiológicos, repelente de insectos, hepatoprotector, inmunomodulador, antibacteriana (Gurnani et al., 2016), antiinflamatoria (Zimmer et al., 2012), antitumoral y citotóxica (Ceferino, Guzman et al., 2016; Ramadan, 2011).

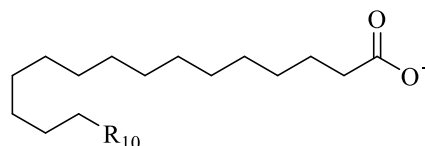
El género *Nolana* comprende 85 – 89 especies, de las cuales entre 42 – 47 son nativas de las zonas costeras de Chile y con gran presencia en el desierto de Atacama (Dillon 2007). Entre los grupos de metabolitos secundarios que se han aislado de las especies pertenecientes a este género tenemos: diterpenos tipo labdanos (Chamy et al., 1997) y sesquiterpenos principalmente (Cifuentes et al., 2020; Garbarino et al., 2007). A continuación, se mencionarán algunos trabajos de plantas pertenecientes al género *Nolana*

realizados en los últimos 10 años, ya que a la fecha no hay reportados trabajos de aislamiento de metabolitos secundarios para la especie *N. albescens*.

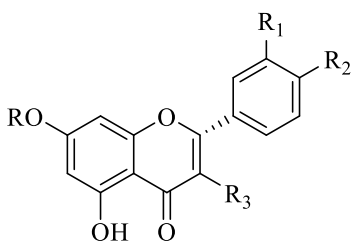
En el 2015 Simirgiotis y colaboradores reportaron el análisis químico de tres especies de plantas recolectadas en el Valle de Paposos (II Región): *N. leptophylla*, *N. aplocaryoides* y *N. ramosissima*. Así como la determinación de la capacidad antioxidante (DPPH, FRAP y SA). 30 compuestos fueron identificados incluidos: 3 ácidos grasos, 6 compuestos fenólicos, 6 flavonas y 5 flavanonas. Estos compuestos fueron determinados mediante HPLC-PDA-ESI-MS (Simirgiotis et al., 2015).



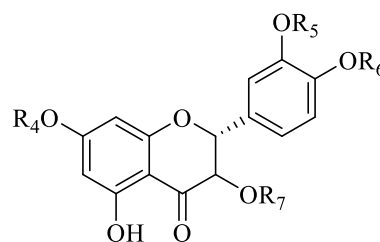
- 1, $R_8 = H, R_9 = H$
 6, $R_8 = \text{Acido Caféico}, R_9 = H$
 8, $R_8 = \text{Acido ferúlico}, R_9 = H$
 10, $R_8 = \text{Acido ferúlico}, R_9 = \text{Acido Caféico}$
 16, $R_8 = \text{Acido Caféico}, R_9 = \text{desconocido}$



- 13, $R_{10} = C_4H_9$
 18, $R_{10} = CH_3$
 23, $R_{10} = C_3H_7$



- 2, $R = \text{Rut}, R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3 = H$
 3, $R = H, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = \text{Glucosa-Pentosa}$
 4, $R = \text{Glucuronido}, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = \text{Glucosa-Pentosa}$
 5, $R = \text{Pentosa}, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = \text{Rut}$
 9, $R = H, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = \text{Rut}$
 11, $R = \text{Glu}, R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$
 12, $R = OCH_3, R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H$
 17, $R = OCH_3, R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OCH_3$
 22, $R = OCH_3, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$
 25, $R = H, R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$
 28, $R = H, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$
 30, $R = OCH_3, R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$



- 18, $R_4 = H, R_5 = H, R_6 = H$
 19, $R_4 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H$
 21, $R_4 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H$
 27, $R_4 = OCH_3, R_5 = OH, R_6 = OCH_3$
 29, $R_4 = OCH_3, R_5 = OCH_3, R_6 = OCH_3$

Figura 5. Estructuras de compuestos detectados en *Nolana leptophylla*, *N. aplocaryoides* y *N. ramosissima*, recolectadas en valle de Paposos, II región de Chile.

En el 2020 Cifuentes y colaboradores a partir de la planta *N. ramosissima* recolectada en el Valle de Paposo (II Región) lograron aislar cinco flavonoides del extracto metanólico utilizando cromatografía de contracorriente (HPCC) y detectados por UHPLC-Orbitrap-HESI-MS, (Cifuentes et al., 2020). El extracto metanólico mostró efecto relajante en ratas aorta independiente del endotelio. También fue posible identificar 61 compuestos en la infusión, principalmente flavonoides glicosilados, flavanonas y algunas oxilipinas (Simirgiotis et al., 2015).

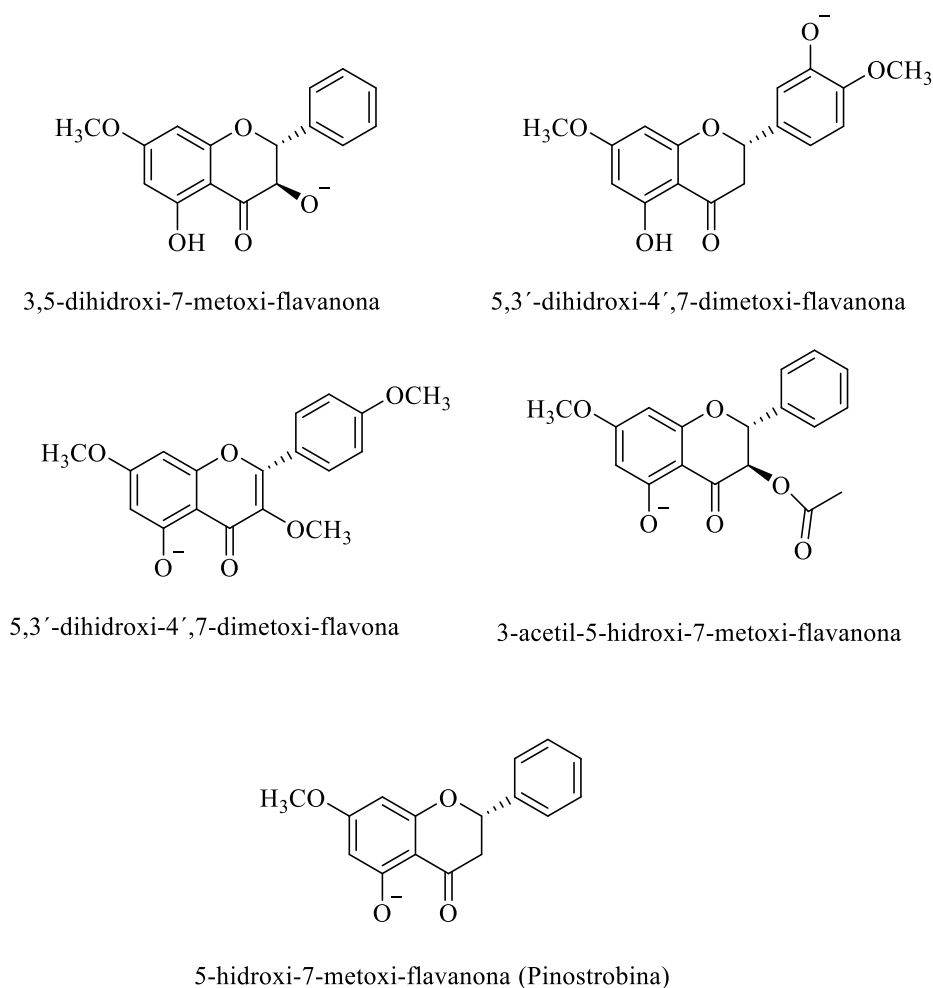


Figura 6. Estructuras de flavonoides aislados del extracto metanólico de *N. ramosissima*, recolectadas en valle de Paposo, II región de Chile.

3.3.2. Zygophyllaceae

Los compuestos fenólicos que incluyen flavonoides metilados y lignanos han sido aislados en esta familia. También se han aislado esteroides y triterpenos, incluyendo saponinas. La familia también produce alcaloides quinazolínicos y mucilagos (Sheahan, 2007).

En 2015 Jeong y colaboradores reportaron el aislamiento de cuatro nuevas Isoguiacinas (lignan tipo arilnaftaleno) de *Larrea nítida*, recolectada en Jarilla, Coquimbo (IV Región) en 2007, mediante un estudio bioguiado de la actividad estrogénica del extracto. Todos los compuestos presentaron una alta afinidad por el receptor humano de estrógeno, debido a que sus estructuras químicas se asemejan al 17 β -estradiol y pueden actuar como moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) (Jeong et al., 2015).

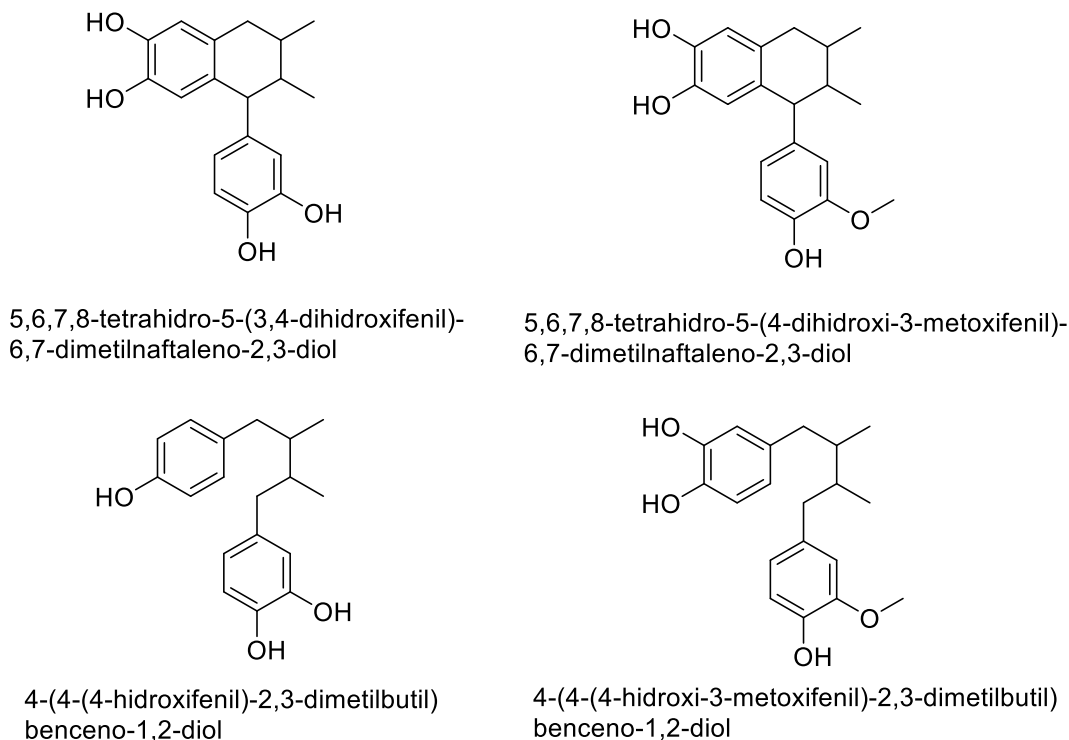
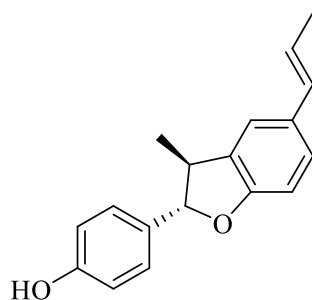


Figura 7. Estructuras de isoguiacinas aisladas de *L. nitida*, recolectadas en Jarilla, Chile.

3.3.3. Krameriaceae

Taninos y flavonoides tipo catequina, lignanos y neolignan han sido aislados de plantas pertenecientes a esta familia (Ortiz et al., 2019).

En 2019 Ortiz y colaboradores reportaron un estudio bioguiado para la identificación de compuestos bioactivos: triterpenos y neolignan, de plantas medicinales de la Comunidad de Atacama, incluida *Krameria lappacea*, recolectada en Ollagüe. En este estudio se observó que el extracto acetato de etilo de las raíces de *K. lappacea*, presentó una potente actividad antimicrobiana contra 33 cepas de bacterias Gram positivas, de las especies *Streptococcus* y *Enterococcus*. Mientras que el extracto metanólico presentó una moderada actividad contra estas bacterias. A partir del extracto de acetato de etilo se logró aislar el compuesto mayoritario conocido como conocarpano (Ortiz et al., 2019).



Conocarpano

Figura 8. Estructura del neolignano aislado de *K. lappacea*, recolectada en Ollagüe, Chile.

3.3.4. Apocynaceae

La familia Apocynaceae ha sido muy estudiada, un gran número de métodos espectroscópicos y cromatográficos han permitido el aislamiento y la elucidación estructural de alcaloides, flavonoides, terpenos, glicósidos, esteroides, compuestos fenólicos, lignanos, ácidos grasos, ésteres, vitaminas y glicoproteínas (Bhadane et al., 2018).

Djerassi y colaboradores en 1962 reportaron el aislamiento de un nuevo alcaloide monoterpénico, conocido como esquitantina, a partir de *Skytanthus acutus* (Djerassi et al., 1962), el cual simultáneamente se estudiaba en Roma por Casinovi, Garbarino y Marini-Bettolo, obteniéndose como una mezcla de estereoisómeros: α , β y δ -esquitantina. Por otro lado, Appel y Müller en el mismo año, aislaron a partir de una fracción no volátil derivados oxigenados de esquitantina: 4 y 7-hidroxiesquitantina (Adolphsen et al., 1967).

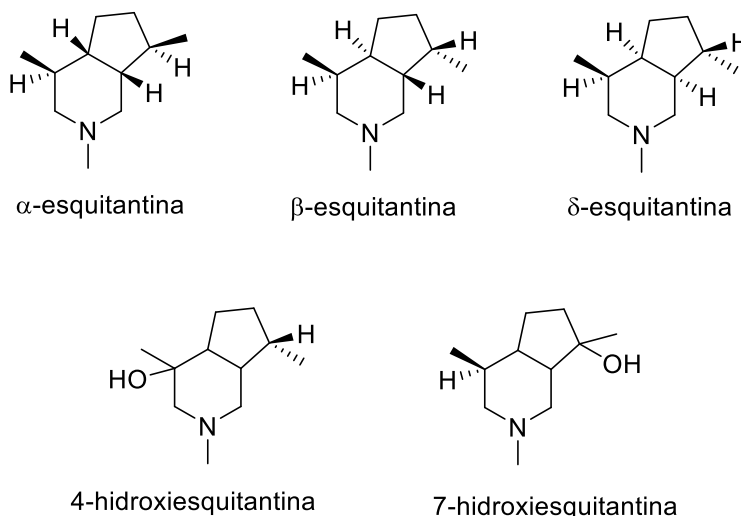


Figura 9. Estructuras de alcaloides monoterpénico aislados de *S. acutus*, recolectados en Chile.

4 Planteamiento del problema

Conociendo que las plantas pertenecientes a las familias *Solanaceae*, *Zygophyllaceae*, *Krameriaceae* y *Apocynaceae*, producen metabolitos secundarios con núcleos químicos diversos con promisorias actividades biológicas, en esta tesis se propone realizar un estudio bioguiado de las especies de plantas extremófilas: *Nolana albescens*, *Krameria cistoidea*, *Skytanthus acutus* y *Pintoa chilensis*, cuyas características químicas en su mayoría se desconocen.

4.1 Hipótesis

Las plantas nativas *Skytanthus acutus*, *Krameria cistoidea*, *Nolana albescens* y *Pintoa chilensis* obtenidas en el desierto de Atacama, poseen metabolitos secundarios activos y presentarán actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante.

4.2 Objetivo General

Realizar un estudio fitoquímico bioguiado de las plantas nativas *Skytanthus acutus*, *Krameria cistoidea*, *Nolana albescens* y *Pintoa chilensis* para aislar y caracterizar aquellos metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante.

4.2.1 Objetivos específicos

4.2.1.1. Obtener extractos etanólicos de las plantas *N. albescens*, *K. cistoidea*, *S. acutus*, *P. chilensis* para estudiar sus propiedades biológicas.

4.2.1.2. Realizar un estudio bioguiado de los diferentes extractos frente a sus actividades antimicrobiana, citotóxica y antioxidante para seleccionar las especies que poseen la actividad biológica más interesante.

4.2.1.3. Realizar un estudio bioguiado de las diferentes fracciones de las especies seleccionadas en el objetivo específico 2, a fin de seleccionar las fracciones bioactivas, que poseen los metabolitos responsables de la actividad biológica exhibida.

4.2.1.4. Purificar y caracterizar los metabolitos secundarios de las fracciones seleccionadas en el objetivo específico 3 a través de diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas con el fin de obtener la identidad química de los responsables de la actividad.

4.2.1.5. Evaluar la actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante de los compuestos aislados de acuerdo con los resultados de los estudios bioguiados.

5. Metodología

5.1. Sección Química

5.1.1. Solventes, reactivos y equipos

En la preparación de los extractos etanólicos se utilizaron los siguientes solventes: Agua (H₂O) destilada y etanol (EtOH) grado técnico destilado, en una mezcla EtOH:H₂O (7:3).

El fraccionamiento líquido-líquido de los extractos etanólicos fue realizado utilizando los siguientes solventes: Agua destilada y etanol en una mezcla (9:1), hexano, diclorometano (DCM) y acetato de etilo (AcOEt) de grado técnico destilados.

En cromatografía de capa fina (TLC) se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ de aluminio, tamaño 20x20 cm (Merck). Los cromatogramas fueron revelados con un revelador universal: ácido sulfúrico concentrado al 10% en agua y ácido fosfomolibdico en etanol (10%). También algunos se analizaron bajo lámpara UV a 254 nm.

En cromatografía de columna (CC), la fase estacionaria utilizada fue sílica gel 60 (Merck). También se realizaron separaciones en Sephadex LH-20 (Merck). En las separaciones desarrolladas con el sistema de purificación flash Gilson, se utilizaron cartuchos de sílica gel (80 g, 40 – 63 µm, 60 Å, Silicycle, Quebec, Canadá). Las fases móviles fueron preparadas mezclando solventes con grado técnico destilados en polaridad crecientes (hexano y AcOEt).

En cromatografía en fase reversa (RP-18), se utilizó sílica gel RP-18 (40-63 µM) (Merck). Las fases móviles fueron preparadas usando solventes polares: metanol (MeOH) y acetonitrilo (MeCN) grados HPLC y agua desionizada.

Para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó agua destilada, etanol absoluto, reactivo Folin-Ciocalteu, ácido gálico y carbonato de sodio (Na₂CO₃) y el contenido de Flavonoides Totales fue evaluado utilizando agua destilada, etanol absoluto, cloruro de aluminio (AlCl₃) y quercetina.

5.1.2. Recolección del material vegetal

Se recolectaron cuatro especies de plantas endémicas del Norte de Chile de diferentes familias: Apocynaceae, Krameriaceae, Zygophyllaceae y Solanaceae.

Skytanthus acutus Meyen fue recolectada en la localidad de Chañar Quemado, Provincia de Copiapó en la Región de Atacama (27° 22' 27,03'' y 70°50'48,09''), por la Srta. Nicol López durante el mes de noviembre del 2020 e identificada por la Dra. Gloria Rojas Villegas, depositado con número de voucher N° 170533 en el Museo de Historia Natural de Santiago de Chile.

Krameria cistoidea Hook & Arn. fue recolectada en el Vivero Biorestauración Consultores, Provincia de Copiapó en la Región de Atacama (27° 31' 35,55'' y 70°15'57,35''), por el Ing.

Javier Pardo Baeza durante el mes de noviembre del 2020 e identificada por la Dra. Gloria Rojas Villegas, depositado con número de voucher N° 170531 en el Museo de Historia Natural de Santiago de Chile.

Pintoa chilensis Gay fue recolectada en el Vivero Biorestauración Consultores, Provincia de Copiapó en la Región de Atacama (27° 31' 35,55'' y 70°15'57,35''), por el Ing. Javier Pardo Baeza durante el mes de noviembre del 2020 e identificada por la Dra. Gloria Rojas Villegas, depositado con número de voucher N° 170532 en el Museo de Historia Natural de Santiago de Chile.

Nolana albescens (Phil.) I.M. Johnst fue recolectada en la localidad de Paipote, Provincia de Copiapó en la Región de Atacama (27° 25' 15,90'' y 70°15'59,78''), por el Ing. Javier Pardo Baeza López durante el mes de noviembre del 2020 e identificada por la Dra. Gloria Rojas Villegas, depositado con número de voucher N° 170530 en el Museo de Historia Natural de Santiago de Chile.

5.1.3. Preparación del extracto etanólico

Las partes aéreas de las especies *S. acutus*, *K. cistoidea*, *P. chilensis* y *N. albescens*, así como los frutos de las especies *K. cistoidea* y *P. chilensis*, fueron seleccionados y puestos a secar en una estufa a 30°C por 96 horas. Posteriormente el material vegetal seco fue pulverizado, a través de un molino industrial para luego ser pesado. Inmediatamente, el material pulverizado fue puesto en contacto con una mezcla Etanol-Agua (7:3) y puesto a macerar en un shaker incubador a una temperatura entre 25 – 30°C y una velocidad controlada de 150 rpm, durante 96 horas. Una vez culminada la maceración se procedió a realizar una extracción exhaustiva por medio de un sonicador durante 1 hora a una temperatura de 45°C. Seguidamente la mezcla fue filtrada y el solvente eliminado a presión reducida obteniendo finalmente los extractos etanólicos de cada una de las plantas.

5.1.4. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico

Los extractos etanólicos obtenidos fueron resuspendidos en una mezcla de agua-etanol (9:1) para luego ser particionados en solventes de diferentes polaridades. Comenzando con hexano (apolar), seguido por diclorometano (apolar), acetato de etilo (medianamente polar), obteniéndose fracciones de diferentes polaridades (FH, FD, FA), así como la fracción residual de agua (FQ).

5.1.5. Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales de los extractos etanólicos y fracciones fue determinado mediante el método Folin-Ciocalteu utilizado por Jara y colaboradores (Singleton et al., 1999) y utilizando como referencia ácido gálico para la elaboración de la curva de calibración. El extracto (500 µL) fue mezclado con 2.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 con agua destilada) y neutralizado con 2 mL de solución de carbonato de sodio (7.6% m/v). la mezcla de reacción fue puesta en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. La absorbancia fue medida usando un espectrofotómetro de UV-Visible (UV Analyst-CT 8200) a 700 nm.

5.1.6. Contenido de Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides totales de los extractos etanólicos y fracciones fue determinado utilizando el procedimiento reportado por Madaan (Madaan et al., 2011). La quercetina fue utilizada como referencia para la construcción de la curva de calibración. El extracto (1 mL) fue mezclado con 1 mL de cloruro de aluminio al 2%. La mezcla fue puesta a incubar por 15 minutos a temperatura ambiente hasta completar la reacción. La absorbancia de la mezcla de reacción fue medida usando un espectrómetro de UV-Vis (UV Analyst-CT 8200) a 430 nm.

5.1.7. Purificación de las fracciones bioactivas

La purificación de las distintas fracciones se realizó mediante técnicas analíticas: cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en columna (CC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector DAD marca Agilent 2. También se utilizó un equipo de cromatografía líquida preparativa PLC-2250 marca Gilson, utilizando diferentes fases estacionarias: Sephadex LH-20, gel de sílice, fase inversa C18 y C8, hasta la obtención de los metabolitos secundarios puros. Las técnicas y las fases móviles que se emplearon fueron utilizadas de acuerdo con el comportamiento cromatográfico de los compuestos a aislar y la estrategia será diferente en cada caso en particular.

5.1.8. Caracterización de los metabolitos secundarios

Para la elucidación estructural de los compuestos aislados se emplearon principalmente métodos espectroscópicos. En particular RMN de 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) y 2D (COSY, HSQC, HMBC), 1D TOCSY y 1D NOESY selectivo, utilizando un equipo Bruker de 400 MHz del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María y un equipo Bruker de 600 MHz del Instituto Bioorgánico “Dr. Antonio González” de La Universidad de La Laguna, Tenerife, España. Espectrometría de masas realizado en un espectrómetro de Masas MALDI-TOF con movilidad iónica SYNAPT XS de Waters del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), Tenerife, España. Para el análisis IR se empleó un espectrómetro Perkin Elmer modelo Spectrum BX FT-IR del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), Tenerife, España. La Rotación óptica de uno de los compuestos fue medida en un polarímetro Anton Paar del Instituto Bioorgánico “Dr. Antonio González” de La Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

5.2. Sección biológica

5.2.1. Materiales

La actividad antioxidante fue evaluada utilizando etanol absoluto, agua destilada, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro), buffer fosfato salino, TROLOX® (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, ácido gálico, BHT (Butil hidroxitolueno), DPPH (2,2'-dinitrofenil-1-picrilhidracil), buffer acetato, FeCl_3 , TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triacina). La medida de la absorbancia se realizó en un espectrómetro de UV-Vis (UV Analyst-CT 8200), estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Bioensayos, Biología

Celular del Cáncer, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso (UV).

La actividad citotóxica fue realizada utilizando las líneas celulares MCF-7, HT-29 y MCF-10, medio de cultivo DMEM/Ham's F-12 1:1 (v/v), suero fetal bovino, placas de multipocillos, dióxido de carbono (CO₂), sulforrodamina B (SRB), ácido tricloroacético al 50%, agua destilada, ácido acético al 1%, base Tris sin tamponar, lector de placa de fluorescencia (540 nm), Rodamina-123, PBS, centrifugadora, BODIPY-C11, DCFH₂-DA (2,7-dicloro-dihidro-fluoresceína acetato), El marcador CaspACE FITC-VAD-FMK, y un Citómetro de Flujo, estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Bioensayos, Biología Celular del Cáncer, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso (UV).

La actividad antimicrobiana fue estudiada utilizando tres cepas de bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, medio de cultivo TSB, placas multipocillos (96 pocillos), buffer de lavado (PBS 1X más 1% TSB y agua estéril), etanol absoluto y agua destilada. Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Ciencias Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile (UA).

5.2.2. Capacidad antioxidante total - TRAP

Este método se basa en la capacidad de algunos antioxidantes en secuestrar un electrón desapareado del radical blanco. Utilizando un radical estable: ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Apak et al., 2013). La técnica consiste en preparar una solución 10mM de AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro) y mezclarla con una solución de 150 µM de ABTS, en un buffer fosfato salino 100 mM (pH 7,4). La mezcla es puesta a incubar a 45°C durante 30 minutos, resultando en la formación del radical ABTS[•] y se determinó la absorbancia en una cinética de 50 segundos a 734 nm. A partir de las absorbancias registradas para cada extracto, se obtuvo el porcentaje de inhibición del radical (IR). Luego los datos se extrapolaron en una curva de TROLOX® (Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico, antioxidante sintético mimético de la vitamina E) y se expresaron en milimol de capacidad antioxidante de equivalentes TROLOX® (TEAC mM). Los resultados TEAC obtenidos, fueron comparados con dos potentes antioxidantes puros: ácido gálico y BHT (Butil hidroxitolueno).

5.2.3. Ensayo de actividad secuestradora del radical DPPH[•]

Este método es utilizado para medir la capacidad reductora de algunos antioxidantes frente al radical DPPH[•] (2,2'-dinitrofenil-1-picrilhidracil), un radical estable en solución etanólica (Brand-Williams et al., 1995). Se mezclan 100 µL de extracto con 2,9 mL de una solución de DPPH[•] 50 µM en etanol. Luego, la mezcla es puesta en agitación en vórtex y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm. Este procedimiento se realizó para cada extracto en tres concentraciones: 1, 5 y 10 mg/mL. Una vez determinada la absorbancia de las tres concentraciones se determinó el porcentaje de secuestro del radical DPPH[•] (RSA%). Con este porcentaje y la concentración de los extractos se obtuvo el IC₅₀, que representa la concentración a la que el 50% del radical es neutralizado. Estos IC₅₀ son comparados con dos antioxidantes de referencia: TROLOX® y BHT.

5.2.4. Poder antioxidante reductor del Hierro - FRAP

Este es un método colorimétrico que se utiliza para determinar el poder reductor del ión férrico a ion ferroso de una muestra determinada. Se preparó una solución FRAP, que contiene 10 volúmenes de buffer acetato 300 mM, 1 volumen de FeCl₃ 20 mM y 1 volumen de TPTZ 10 mM (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triacina). Luego, se tomó 100 µL de extracto (1 mg/mL) y se mezcló con 300 µL de la solución FRAP, agitando por 15 segundos. Después, la mezcla fue incubada 30 minutos a 37°C en baño termostático. Finalmente se mide la TROLOX® y expresados como TEAC (mM) (Singleton et al., 1999).

5.2.5. Cultivo celular para determinar la actividad citotóxica

Para la determinación de la actividad citotóxica se emplearon dos líneas celulares humanas de cáncer: una línea de cáncer de mama MCF-7 (Adenocarcinoma humano de glándula mamaria) y una línea de cáncer de colon HT-29 (Adenocarcinoma humano colorrectal). Además, se usó una línea de control normal no cancerígena: MCF-10A (Célula epitelial mamaria). Todas las líneas celulares fueron obtenidas desde la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM/Ham's F-12 1:1 (v/v), complementado con 10% de suero fetal bovino. Antes de cada tratamiento, las células fueron sembradas en placas de multipocillos a 37°C en un incubador con atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5% con 95% de humedad (Mellado et al., 2019).

5.2.6. Ensayo de citotoxicidad de la sulforodamina B

El ensayo de sulforodamina B (SRB) es un método que permite medir citotoxicidad a través de la densidad celular, de acuerdo con la metodología reportada por Vichai y Kirtikara (Vichai and Kirtikara, 2006). Los extractos fueron solubilizados antes del experimento en etanol al 1%. Las células fueron sembradas a una densidad de 3x10³ células/pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen de 200 µL. Las células fueron incubadas a 37°C en un incubador con atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5% con 95% de humedad y se trataron con los extractos a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) durante 72 horas. Las células que recibieron solo el medio que contenía etanol al 1% fueron empleadas como grupo de control. Finalizada la exposición de las células con los extractos, las mismas se fijaron con ácido tricloroacético al 50% a 4°C. Después de lavar con agua, las células se tiñeron con sulforodamina B al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y seguidamente se disolvieron en ácido acético al 1% (50 µL/pocillo) durante 30 minutos y posteriormente, se lavaron con ácido acético al 1%, para eliminar la mancha suelta. La tinción unida a proteína se solubilizó con 100 µL de base Tris sin tamponar (10mM) y la densidad celular se determinó usando un lector de placa de fluorescencia (540 nm). Los valores mostrados como promedios ± Desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. El software SigmaPlot 11.0 fue utilizado para calcular los valores de IC₅₀.

5.2.7. Determinación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial por citometría de flujo

Para este ensayo se empleó Rodamina-123, una sonda catiónica sensible al voltaje que se acumula de forma reversible en las mitocondrias, para detectar cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. Las células se incubaron con extractos etanólicos (50, 100 y 200

mg/mL) durante 48 horas, y posteriormente se tiñeron con rodamina-123 (1 μ M) y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 1 hora. Luego, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y recolectadas por centrifugación (10 minutos a 1500 rpm). Se descartó el sobrenadante y los sedimentos de células se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando el filtro FL1. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células teñidas con rodamina-123 (Taborga et al., 2016).

5.2.8. Determinación de lipoperoxidación por citometría de flujo

Para este ensayo se empleó BODIPY-C11 como marcador para detectar ROS en células y membranas, la oxidación de la porción del butadienil poliinsaturada del colorante provoca un cambio en el pico de emisión de fluorescencia. Las células se incubaron con extractos etanólicos (50, 100 y 200 mg/mL) durante 48 horas, y posteriormente se tiñeron con BODIPY-C11 (2 μ M) y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 30 minutos. Luego, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y recolectadas por centrifugación (10 minutos a 1500 rpm). Se descartó el sobrenadante y los sedimentos de células se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando el filtro FL1. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células teñidas con BODIPY-C11 (Montenegro et al., 2020).

5.2.9. Determinación de ROS por citometría de flujo

DCFH₂-DA (2,7-dicloro-dihidro-fluoresceína acetato) es la sonda más común y sensible para detectar ROS intracelular. Las células se incubaron con extractos etanólicos (50, 100 y 200 mg/mL) durante 48 horas, y posteriormente se tiñeron con DCFH₂-DA (1 mM) y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 1 hora. Luego, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y recolectadas por centrifugación (10 minutos a 1500 rpm). Se descartó el sobrenadante y los sedimentos de células se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando el filtro FL1. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células teñidas con DCFH₂-DA (Montenegro et al., 2020).

5.2.10. Determinación de Caspasas activas por citometría de flujo

La actividad de las caspasas se determinó utilizando un inhibidor fluorescente de caspasas marcado con isotiacianato de fluoresceína, FITC-VAD-FMK. El marcador CaspACE FITC-VAD-FMK fue obtenido por Promega. Las células se incubaron con extractos etanólicos (50, 100 y 200 mg/mL) durante 48 horas, y posteriormente se tiñeron con El marcador CaspACE FITC-VAD-FMK (5 mM) y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 30 minutos. Luego, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y recolectadas por centrifugación (10 minutos a 1500 rpm). Se descartó el sobrenadante y los sedimentos de células se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando el filtro FL1. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células teñidas con CaspACE FITC-VAD-FMK (Taborga et al., 2016).

5.2.11. Determinación de la actividad antiproliferativa

Los extractos etanólicos secos ponderados se disolvieron en dimetilsulfóxido para preparar una solución madre de 50 mg/mL, a fin de evaluar la actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer A549 y SW1573 (pulmón no microcítico), HBL-100 y T-47D (mama), HeLa (cuello uterino) y WiDr (colon). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando el ensayo de la Sulforrodamina B (Puerta et al., 2022) con las siguientes especificaciones, Las densidades de siembra celular fueron de 2500 células/pocillo para A549, HBL-100, HeLa y SW1573, y de 5000 células/pocillo para T47D y WiDr. Los tiempos de incubación fueron de 48 h. La densidad óptica de cada pocillo se midió a 530 (primaria) y 620 (secundaria) nm. La actividad antiproliferativa se expresó como la inhibición del crecimiento del 50% de las células (GI_{50}) y se calculó según las fórmulas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (Monk et al., 2020) Estos ensayos se realizaron en BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Dr. Antonio González”, Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

5.2.12. Determinación de la actividad antimicrobiana

Para obtener la actividad antimicrobiana se determinará la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos y fracciones. Las bacterias utilizadas fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Inicialmente se realizó un cultivo ON de las bacterias en medio de cultivo TSB a 37°C y agitación. Seguidamente se realizó una dilución del cultivo bacteriano en TSB hasta alcanzar la fase exponencial a 37°C y agitación. Durante la incubación bacteriana se prepararon placas multipocillos (96 pocillos) con las fracciones y extractos a estudiar (prepararon stock previamente a una concentración definida): Se agregaron 50 μ L de medio TSB a la placa desde la columna 2-11. En la columna 12 se agregó el doble del volumen, el cual representó el control de la técnica. Luego se adicionaron 100 μ L del extracto en la columna 1 y se realizaron diluciones seriadas desde la columna 1 hasta la columna 10 y se eliminó 50 μ L de la columna 10. Una vez que el cultivo bacteriano alcanzó su fase exponencial ($OD = 0,3 - 0,7$; OD a 600nm), se tomó 1 mL de la solución de bacteria en fase exponencial y se lavó 2 veces con buffer de lavado (PBS 1X más 1% TSB y agua estéril), se resuspendió y se volvió a medir OD. Seguido de esto se ajustó la concentración de la suspensión de bacterias para obtener 2×10^5 ufc/mL en medio TSB. Luego se agregó 50 μ L de la suspensión bacteriana a la placa de 96 pocillos desde la columna 1 a la columna 11. Se colocó a incubar entre 12 – 16 horas a 37°C. Finalmente se observaron los resultados y las concentraciones mínima inhibitoria (MIC) se anotaron. Esta concentración se define como la concentración de antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible de la bacteria. Después de la determinación de la MIC, se sembraron alícuotas de 10 μ L de todos los pocillos que no mostraron crecimiento bacteriano visible, en placas de agar TSB y se incubaron durante 24 horas a 37°C, por duplicado para determinar la concentración bactericida mínima (CBM).

5.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de distribución para definir si correspondían a datos paramétricos o no paramétricos. En el caso de ser paramétricos, se realizó ANOVA one way y en el caso de ser no paramétricos, se realizó ANOVA Kruskal-Wallis. Se utilizó un nivel de significancia de valor de p de 0,05. Todos los análisis

estadísticos se realizaron con el software Statistica 7.0. Los datos se presentaron como promedios \pm desviación estándar en tablas y figuras.

6. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se discutirán de acuerdo con los objetivos específicos planteados.

6.1. Objetivo específico 1

Obtener extractos etanólicos de las plantas *N. albescens*, *K. cistoidea*, *S. acutus*, *P. chilensis* para estudiar sus propiedades biológicas.

6.1.1. Recolección del Material vegetal

Se recolectaron 4 especies de plantas endémicas del Norte de Chile: *Skytanthus acutus*, *Pintoa chilensis*, *Krameria cistoidea* y *Nolana albescens* (Figura 11). Todas fueron recolectadas en noviembre de 2020 en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile (Figura 10).







Figura 10. Región de recolección de las plantas: *S. acutus*, *P. chilensis*, *K. cistoidea* y *N. albescens*, en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile.



Figura 11. Material vegetal recolectado en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile.

La identificación taxonómica fue desarrollada por la Botánica Dra. Gloria Rojas Villegas, Investigadora botánica del Herbario de Santiago de Chile, perteneciente al Museo Nacional de Historia Natural. En la Tabla 1 se encuentra la información del testigo del herbario para cada especie de planta.

Tabla 1. Información de testigo del herbario de las plantas: *S. acutus*, *P. chilensis*, *K. cistoidea* y *N. albescens*, en la provincia de Copiapó, Región de Atacama, Chile.

Familia	Género	Lugar de recolección	Fecha de recolección	Coordenadas del lugar de Recolección	N° de Registro del Herbario
Solanaceae	<i>Nolana albescens</i> (Phil.) I.M. Johnst.	Sector de Paipote Provincia de Copiapó Región de Atacama 460 m n.s.m	14-11-2020	27°31'15,90'' 70°15'59,78''	170530
					
Krameriaceae	<i>Krameria cistoidea</i> Hook. & Arn.	Biorestauración consultores Provincia de Copiapó Región de Atacama 548 m n.s.m	15-11-2020	27°31'35,55'' 70°15'57,35''	170531
					
Zygophyllaceae	<i>Pintoa chilensis</i> Gay	Biorestauración consultores Provincia de Copiapó Región de Atacama 548 m n.s.m	15-11-2020	27°31'35,55'' 70°15'57,35''	170532
					
Apocynaceae	<i>Skytanthus acutus</i> Meyen	Sector de Chañar Quemado Provincia de Copiapó Región de Atacama 662 m n.s.m	15-11-2020	27°22'27,03'' 70°50'48,09''	170533
					

6.1.2. Obtención de los extractos etanólicos del material vegetal recolectado

La **Tabla 2** muestra los rendimientos obtenidos para cada uno de los extractos de las cuatro plantas estudiadas. El uso de dos técnicas de extracción: maceración y extracción asistida por sonicación, permitió la obtención de mejores rendimientos de extracción en comparación con los rendimientos de extracción reportados previamente para plantas pertenecientes a la misma familia (Soxhlet, maceración, hidrodestilación) (Akihisa et al., 2012; Rashid et al., 2013; Ziane et al., 2021).

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de las plantas *S. acutus*, *P. chilensis*, *K. cistoidea* y *N. albescens*.

Planta	Masa Inicial (g)	Masa Final (g)	% de rendimiento
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	50,20	22,39	44,70
<i>K. cistoidea</i> (f)	50,58	10,26	20,28
<i>N. albescens</i> (Pa)	50,27	21,62	43,00
<i>P. chilensis</i> (Pa)	50,07	21,92	43,80
<i>P. chilensis</i> (f)	50,08	15,25	30,45
<i>S. acutus</i> (Pa)	50,22	20,32	40,50

Pa: Partes aéreas, f: frutos

6.2. Objetivo específico 2

Realizar un estudio bioguiado de los diferentes extractos frente a sus actividades antimicrobiana, citotóxica y antioxidante para seleccionar las especies que poseen la actividad biológica más interesante.

6.2.1. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos

6.2.1.1. Contenido de fenoles totales

El contenido de polifenoles por espectrofotometría se puede obtener mediante la reacción del reactivo de Folin & Ciocalteu en un medio alcalino. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**, en ella se observa que el extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa) presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos ($84,96 \pm 0,58$). Los extractos etanólicos de *P. chilensis* (Pa) y *P. chilensis* (f), le siguen sin diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Seguidamente los extractos etanólicos de *K. cistoidea* (f) y *S. acutus* sin diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Mientras que el extracto etanólico de *N. albescens* (Pa) mostró el menor contenido de compuestos fenólicos ($3,65 \pm 0,15$).

6.2.1.2. Contenido de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales por espectrofotometría es posible a través de la reacción de este tipo de compuestos con $AlCl_3$, formando un quelato coloreado. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**. En este caso, el extracto etanólico de *P. chilensis* (f) presentó el mayor contenido de flavonoides totales ($19,43 \pm 0,25$). Los extractos etanólicos de *P. chilensis* (Pa) y *K. cistoidea* (Pa), le siguen sin diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Seguidamente los extractos etanólicos de *K. cistoidea* (f) y *S. acutus* sin diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Mientras que el extracto etanólico de *N. albescens* (Pa) mostró el menor contenido de flavonoides ($0,67 \pm 0,18$).

Tabla 3. Contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de las plantas *S. acutus*, *P. chilensis*, *K. cistoidea* y *N. albescens*.

Extracto etanólico	Fenoles totales (mg GAE/ g de planta seca)	Flavonoides totales (mg QE/ g de planta seca)
<i>P. chilensis</i> (Pa)	$63,17 \pm 3,55^a$	$12,12 \pm 0,48^a$
<i>P. chilensis</i> (f)	$39,77 \pm 0,24^a$	$19,43 \pm 0,25^b$
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	$84,96 \pm 0,58^b$	$12,22 \pm 1,60^a$
<i>K. cistoidea</i> (f)	$19,22 \pm 1,19^c$	$8,30 \pm 0,72^c$
<i>S. acutus</i> (Pa)	$23,40 \pm 0,20^c$	$4,78 \pm 0,25^c$
<i>N. albescens</i> (Pa)	$15,70 \pm 0,15^d$	$1,15 \pm 0,18^d$

^{a-d} las letras distintas corresponden a diferencias significativas entre los extractos por fitoconstituyentes ($p < 0,05$). Todos los datos están expresados en promedios \pm D.E. (n=3). (Pa): Partes aéreas, (f): frutos. El contenido de fenoles totales está expresado en mg/L de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo seco, el contenido de flavonoides totales está expresado como mg/L de equivalentes de quercetina (QE).

Los compuestos fenólicos son esenciales debido a sus importantes propiedades farmacológicas, incluyendo actividad anticancerígena (Gueboudji et al., 2022; Rahman et al., 2021). Se sabe que estos compuestos inhiben o interfieren en el proceso de iniciación y proliferación de células cancerígenas en animales *in vivo* e *in vitro*. El mecanismo celular por el cual actúan estos compuestos es multifacético e incluye la regulación de las interacciones del receptor del factor de crecimiento y las cascadas de señalización celular incluida las quinasas y los factores de transcripción, que determinan la expresión de los genes implicados en la de detención del complejo ciclo celular de las células cancerígenas, supervivencia celular y apoptosis o muerte celular programada. Muchos compuestos fenólicos son obtenidos a través de la alimentación, incluyendo la quercetina, epigenina, curcumina y el resveratrol, los cuales pueden bloquear el proceso de carcinogénesis induciendo la apoptosis. Así mismo, los extractos de plantas son ricos en compuestos fenólicos que están asociados con un extenso rango de beneficios fisiológicos y terapéuticos (E. Obrenovich et al., 2011). Al comparar los resultados obtenidos en la determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de *K. cistoidea* (Pa) y *P. chilensis*, los cuales mostraron el mayor contenido de estos fitoconstituyentes con otras especies de plantas de las familias Zygophyllaceae y Krameriaceae recolectadas en Chile, no hay reportes de la determinación de estos. Sin embargo, compuestos fenólicos y lignanos han sido reportados en *Porlieria chilensis* (Torres et al., 1989) y *Larrea nítida* (Jeong et al., 2017, 2015; Torres et al., 2003). Además, estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado que los flavonoides pueden ser los causantes de actividad inmunomodulatoria, antiinflamatoria y anticancerígena (Abotaleb et al., 2018; Amawi et al., 2017; Batra and Sharma, 2013; Gürlér et al., 2020; Kopustinskiene et al., 2020).

6.2.1.3. Capacidad antioxidante total

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos fue evaluada con una serie de pruebas *in vitro*, usando los ensayos DPPH, FRAP y TRAP. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

El extracto que presenta mayor capacidad antioxidante es el extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa) (TRAP, FRAP y DPPH), seguido del extracto de *P. chilensis* (f) (FRAP). Estos resultados se correlacionan con el contenido de fenoles totales y flavonoides, ya que está demostrado que estos compuestos tienen un importante efecto antioxidante (Huyut et al., 2017; Muflihah et al., 2021). Los resultados para la prueba TRAP, los cuales muestran el efecto antioxidante mediante el secuestro del radical estable ABTS^{•+}, indican que el extracto etanólico de *N. albescens* (Pa), mostró valores de $0,02 \pm 0,01$ mM TEAC, siendo el extracto con menor efecto antioxidante, mientras que el extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa) mostró valores de $0,53 \pm 0,01$ mM TEAC, siendo el extracto que mostró mayor efecto antioxidante, además este mostró diferencias significativas con respecto al resto de los extractos analizados ($p < 0,05$). En este ensayo ninguno de los extractos presentó mejor actividad que los compuestos antioxidantes de referencia (ácido gálico y BHT). El ensayo de DPPH permite evidenciar la capacidad antioxidante total a través del secuestro del radical DPPH y se expresa en concentración mínima inhibitoria media (IC₅₀). Por lo tanto, mientras menor es el valor del IC₅₀ mayor es la capacidad antioxidante. En este ensayo nuevamente el extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa), fue el que presentó un valor de IC₅₀ menor por lo que su capacidad antioxidante es mayor ($0,98 \pm 0,04$) y que a su vez mostró

diferencias significativas con respecto al resto de los extractos ($p < 0,05$). Los valores de IC_{50} para este ensayo van desde $0,98 \pm 0,04$ mg/mL hasta $8,43 \pm 0,18$ mg/mL mostrado por el extracto etanólico de *N. albescens*. Al igual que el ensayo anterior ninguno de los extractos presentó mejor actividad que los compuestos antioxidantes de referencia (Trolox® y BHT). Finalmente, a través del ensayo FRAP se evidencia la capacidad antioxidante como la habilidad de los compuestos presentes en la muestra de quelar metales, en el caso de este ensayo cationes de hierro. En este ensayo nuevamente el extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa), fue el que presentó una mayor capacidad antioxidante ($0,00108 \pm 0,00003$) y el extracto etanólico de *P. chilensis* (f) ($0,00107 \pm 0,00003$), siendo diferentes significativamente con respecto al resto de los extractos ($p < 0,05$). Los rangos de valores para FRAP van desde el más bajo encontrado en el extracto etanólico de *N. albescens* ($0,00044 \pm 0,00005$) mM TEAC y el valor más alto encontrado en el extracto etanólico de *P. chilensis* (f). Es importante destacar que todos los extractos estudiados mostraron valores de FRAP muy por debajo de los valores obtenidos por los compuestos antioxidantes de referencia (ácido gálico y BHT).

Tabla 4. Capacidad antioxidante total de los extractos etanólicos de las plantas *S. acutus*, *P. chilensis*, *K. cistoidea* y *N. albescens*, medida a través de los ensayos TRAP, DPPH y FRAP.

Extractos etanólicos	DPPH· (IC_{50} mg/mL)	FRAP (TEAC mM)	TRAP (TEAC mM)
<i>P. chilensis</i> (Pa)	$1,90 \pm 0,12^a$	$0,00087 \pm 0,00002^a$	$0,11 \pm 0,01^a$
<i>P. chilensis</i> (f)	$1,71 \pm 0,06^a$	$0,00107 \pm 0,00003^b$	$0,16 \pm 0,01^b$
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	$0,98 \pm 0,04^b$	$0,00108 \pm 0,00003^b$	$0,53 \pm 0,01^c$
<i>K. cistoidea</i> (f)	$2,12 \pm 0,14^a$	$0,00078 \pm 0,00003^c$	$0,14 \pm 0,02^b$
<i>S. acutus</i> (Pa)	$5,32 \pm 0,13^c$	$0,00063 \pm 0,00007^d$	$0,05 \pm 0,01^d$
<i>N. albescens</i> (Pa)	$8,43 \pm 0,18^d$	$0,00044 \pm 0,00005^e$	$0,02 \pm 0,01^e$
Trolox	$0,11 \pm 6,09$	N.A	N.A
Acido gálico	N.A	$1,72 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,01$
BHT	$0,06 \pm 2,31$	$1,52 \pm 0,07$	$1,06 \pm 0,02$

^{a-e} las letras distintas corresponden a diferencias significativas entre los extractos por fitoconstituyentes ($p < 0,05$). Todos los datos están expresados en promedios \pm D.E. (n=3). (Pa): Partes aéreas, (f): frutos. El secuestro del radical ABTS (TRAP) está expresado en mM de equivalentes de ácido Trolox® (TEAC) por gramo de peso seco, el secuestro del radical DPPH· está expresado en mg/mL por gramo de peso seco de concentración inhibitoria media (IC_{50}) y la capacidad reductora de hierro (FRAP) está expresado en mM de equivalente Trolox® (TEAC) por gramo de peso seco. BHT = Butilhidroxitolueno. N.A = No aplica. Resaltado en celeste los valores más altos por análisis de capacidad antioxidante total.

Como se mencionó anteriormente, los fenoles presentes en las plantas son potente antioxidantes y esta actividad está relacionada con la disminución en el riesgo de desarrollar cáncer (Gueboudji et al., 2022; Rahman et al., 2021). De allí la importancia de poder verificar si los extractos que mostraron mejor actividad antioxidante, muestran actividad citotóxica.

6.2.2. Actividad citotóxica de los extractos etanólicos

El grado de toxicidad de un compuesto o extracto sobre una línea celular determinada, puede evaluarse a través de la determinación *in vitro* de la viabilidad celular. Para esto, se suele utilizar una técnica colorimétrica conocida como ensayo de tinción de Sulforrodamina B (SRB). A través de este ensayo, se puede determinar la densidad celular basado en la habilidad de este compuesto para unirse a los residuos aminoacídicos básicos de las proteínas. En vista de que esta unión es estequiométrica, la cantidad del compuesto unido a

las proteínas de las células es directamente proporcional a la masa celular (Vichai and Kirtikara, 2006).

La viabilidad celular de los extractos etanólicos de *P. chilensis*, *K. cistoidea*, *N. albescens* y *S. acutus* fue evaluado *in vitro* contra dos líneas celulares de cáncer: MCF-7 (Adenocarcinoma humano de glándula mamaria) y HT-29 (Adenocarcinoma humano colorrectal). Además se utilizó la línea celular MCF-10A (Célula epitelial mamaria) como línea celular control no tumoral. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Valores de IC₅₀ (µg/mL) de los extractos etanólicos de *P. chilensis* (Pa y f), *K. cistoidea* (Pa y f), *S. acutus* (Pa) y *N. albescens* (Pa) contra dos líneas celulares cancerígenas: MCF-7 y HT29.

Extractos etanólicos	IC ₅₀ (µg/mL)		
	HT-29	MCF-7	MCF-10A
<i>P. chilensis</i> (Pa)	> 200	> 200	> 200
<i>P. chilensis</i> (f)*	> 200	111,25 ± 23,57	> 200
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	> 200	> 200	> 200
<i>K. cistoidea</i> (f)	> 200	> 200	> 200
<i>S. acutus</i> (Pa)*	99,50 ± 11,90	100,30 ± 11,00	> 200
<i>N. albescens</i> (Pa)	> 200	> 200	> 200

(Pa): Partes aéreas, (f): frutos. * Extractos con actividad citotóxica.

Una vez determinados los valores de IC₅₀ de los extractos etanólicos ensayados, se procedió a calcular el índice de selectividad (IS) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ de MCF} - 10A \text{ (Células no tumorales)}}{IC_{50} \text{ de MCF} - 7 \text{ (Células tumorales)}}$$

En la **Tabla 6** se muestran los valores de IS calculados para los extractos ensayados. Los extractos de *P. chilensis* (f) y *S. acutus* (Pa) mostraron valores mayores a 1, indicando que son más citotóxicos para las células tumorales (MCF-7) que para las células normales (MCF-10A). El resto de los extractos presentaron valores menores de 1 indicando que los extractos son más citotóxicos para las células normales que para las células tumorales. En el caso de los valores de IS para la célula tumoral HT-29 solo el extracto de *S. acutus* (Pa) mostró un valor de IS mayor a 2. Estos resultados nos permiten presumir que el extracto etanólico de *P. chilensis* (f) presenta cierta selectividad por las células tumorales de cáncer de mama por lo que resulta relevante poder estudiar este extracto debido a su baja citotoxicidad sobre la línea celular no tumoral y de esta forma poder aislar los metabolitos secundarios que posiblemente causan el efecto citotóxico. Por otro lado, el extracto de *S. acutus* (Pa) a pesar de mostrar selectividad contra la línea celular tumoral, no discrimina entre células tumorales distintas, por lo que fue descartado para continuar con los estudios de la búsqueda de compuestos anticancerígenos selectivos entre líneas tumorales.

Tabla 6. Valores de IS de los extractos etanólicos de *P. chilensis* (Pa y f), *K. cistoidea* (Pa y f), *S. acutus* (Pa) y *N. albescens* (Pa) contra dos líneas celulares cancerígenas: MCF-7 y HT29.

Extractos etanólicos	IS	
	HT29	MCF-7
<i>P. chilensis</i> (Pa)	<1	<1
<i>P. chilensis</i> (f)*	<1	>2
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	<1	<1
<i>K. cistoidea</i> (f)	<1	<1
<i>S. acutus</i> (Pa)*	>2	>2
<i>N. albescens</i> (Pa)	<1	<1

(Pa): Partes aéreas, (f): frutos. * Extractos que mostraron selectividad.

6.2.3. Actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos

La actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos fue evaluada contra seis líneas celulares (A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr), a una concentración máxima de 62,5 µg/mL. Los resultados se muestran en la **Tabla 7** y **Figura 12**. Los extractos de *S. acutus* (Pa) y *P. chilensis* (Pa) presentaron las concentraciones más bajas contra todas las líneas celulares estudiadas, con valores de IG₅₀ entre 2,8 – 36 µg/mL para el extracto de *P. chilensis* (Pa), mientras que los valores de IG₅₀ para el extracto de *S. acutus* (Pa) fueron entre 16 – 28 µg/mL. Seguidos por el extracto etanólico de *K. cistoidea* (f) cuyos valores de IG₅₀ fueron entre 0,62 – 16 µg/mL, excepto para la línea celular HBL-100 que sobrepasó la concentración máxima estudiada (62,5 µg/mL). El resto de los extractos etanólicos mostraron una concentración mayor a la concentración máxima estudiada para la mayoría de las líneas celulares estudiadas.

Tabla 7. Valores de IG₅₀ (µg/mL) de los extractos etanólicos, contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.

Extracto etanólico	IG ₅₀ (µg/mL)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
<i>Nolana albescens</i> (Pa)	63	63	63	63	63	63
<i>Skyanthus acutus</i> (Pa)*	20	22	22	16	28	25
<i>Krameria cistoidea</i> (Pa)	63	63	41	63	63	21
<i>Krameria cistoidea</i> (f)	7,2	63	16	0,62	10	2,3
<i>Pintoa chilensis</i> (Pa)*	24	36	33	2,8	32	3,6
<i>Pintoa chilensis</i> (f)	63	63	63	28	63	30

Concentración máxima estudiada: 62,5 µg/mL. * Extractos que mostraron actividad antiproliferativa contra todas las líneas celulares.

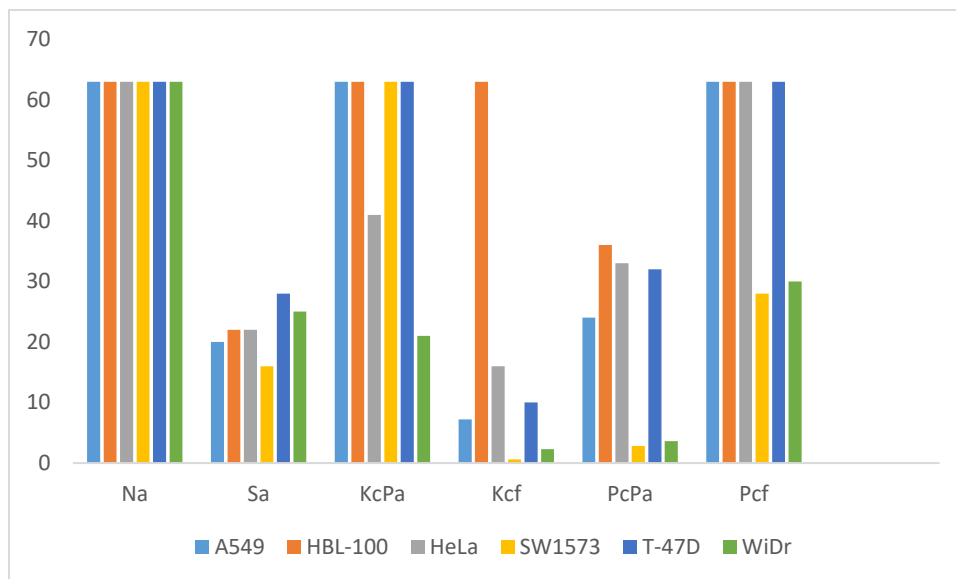


Figura 12. IG₅₀ (µg/mL) de los extractos etanólicos de Na (*Nolana albescens* partes aéreas), Sa (*Skytanthus acutus* partes aéreas), KcPa (*Krameria cistoidea* partes aéreas), Kcf (*Krameria cistoidea* frutos), PcPa (*Pintoa chilensis* Partes aéreas) y Pcf (*Pintoa chilensis* frutos).

6.2.4. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos

La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos se determinó calculando la concentración mínima inhibitoria (MIC), contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos fueron resuspendidos en EtOH 70% y DMSO 5% y las concentraciones evaluadas fueron desde 0,0020 mg/mL a 1mg/mL. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Solo el extracto de *K. cistoidea* (Pa) resuspendido en EtOH 70% produjo inhibición del crecimiento para la bacteria *S. aureus* a una concentración de 1 mg/mL. El resto de los extractos resuspendidos tanto en EtOH 70% como en DMSO 5%, no mostraron tener actividad antimicrobiana contra las bacterias estudiadas. El resultado se realizó en duplicado para cada bacteria como para cada extracto.

Tabla 8. Valores MIC de los extractos etanólicos de *P. chilensis*, *K. cistoidea*, *S. acutus* y *N. albescens* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Extractos disueltos en EtOH 70%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. chilensis</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A
<i>P. chilensis</i> (f)	S/A	S/A	S/A
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	S/A	1 mg/mL	S/A
<i>K. cistoidea</i> (f)	S/A	S/A	S/A
<i>S. acutus</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A
<i>N. albescens</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A

Extractos disueltos en DMSO 5%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. chilensis</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A
<i>P. chilensis</i> (f)	S/A	S/A	S/A
<i>K. cistoidea</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A
<i>K. cistoidea</i> (f)	S/A	S/A	S/A
<i>S. acutus</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A
<i>N. albescens</i> (Pa)	S/A	S/A	S/A

S/A: Sin actividad.

6.2.5. Selección de los extractos etanólicos más bioactivos.

Considerando los resultados obtenidos en el screening de actividad biológica, los extractos etanólicos de *K. cistoidea* (Pa) (Actividad antioxidante y antimicrobiana), *S. acutus* (Pa) (Actividad citotóxica) y *P. chilensis* (f) (Actividad antioxidante y citotóxica), fueron seleccionados para continuar con el resto de la investigación de esta manera poder aislar los compuestos bioactivos causantes de las actividades biológicas estudiadas.

6.3. Objetivo específico 3

Realizar un estudio bioguiado de las diferentes fracciones de las especies seleccionadas en el objetivo específico 2, a fin de seleccionar las fracciones bioactivas, que poseen los metabolitos responsables de la actividad biológica exhibida.

6.3.1. Extracto etanólico de *Pintoa chilensis* (f)

En vista de que el extracto mostró selectividad sobre la línea celular tumoral MCF-7 se procedió a realizar ensayos adicionales para poder determinar el posible mecanismo por el cual el extracto actúa sobre esta línea celular. Para ello se realizaron cuatro ensayos adicionales: Determinación de ROS, lipoperoxidación, permeabilidad de membrana mitocondrial y caspasas activas, todos por citometría de flujo. En todos los ensayos se estudiaron tres concentraciones: C1 = 50 $\mu\text{g/mL}$, C2 = 100 $\mu\text{g/mL}$ y C3 = 200 $\mu\text{g/mL}$. Además del control solvente (CS) y el control positivo (C^+).

6.3.1.1. Determinación de ROS por citometría de flujo

En células tumorales los niveles de ROS relativamente bajos juegan un papel esencial en la transferencia de señales, la proliferación celular y la revascularización. El aumento gradual de estos niveles también puede promover la proliferación celular, la difusión y la metástasis de los tumores. Por el contrario, los niveles elevados de ROS pueden ocasionar daño en el ADN de las células cancerosas, lo que provocará hasta cierto punto apoptosis y necrosis tumoral (Jia et al., 2020). La detección de ROS fue medida utilizando la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ($\text{DCFH}_2\text{-DA}$) que es muy sensible para la determinación de estrés oxidativo. $\text{DCFH}_2\text{-DA}$ no es fluorescente, pero puede atravesar fácilmente la membrana celular, allí es hidrolizada por enzimas esterasas citosólicas transformada en 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). En presencia de ROS o RNS DCFH es oxidada en diclorodihidrofluoresceína (DCF), compuesto fluorescente que tiene un máximo de absorción de 503 nm y un máximo de emisión de 523 nm. Por lo tanto, el nivel de ROS en la célula es proporcional a la intensidad de la fluorescencia (Jia et al., 2020).

Los niveles de ROS cuantificados por citometría de flujo (**Figura 13**), mostraron una mayor generación para las células de la línea celular MCF-7 a 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (C1 y C2, respectivamente), en comparación con el control positivo de daunorubicina (DNR). Por el contrario, para la línea celular no tumoral MCF-10A se observó una disminución. Por lo tanto, estos resultados indican que la producción de ROS inducida por el extracto etanólico de *Pintoa chilensis* (f) podría promover el mecanismo de muerte celular programada en la célula MCF-7. Por el contrario, en la célula no tumoral podría actuar como agente antioxidante, produciendo un equilibrio entre la oxidación celular (ROS) y el equilibrio antioxidante de la célula.

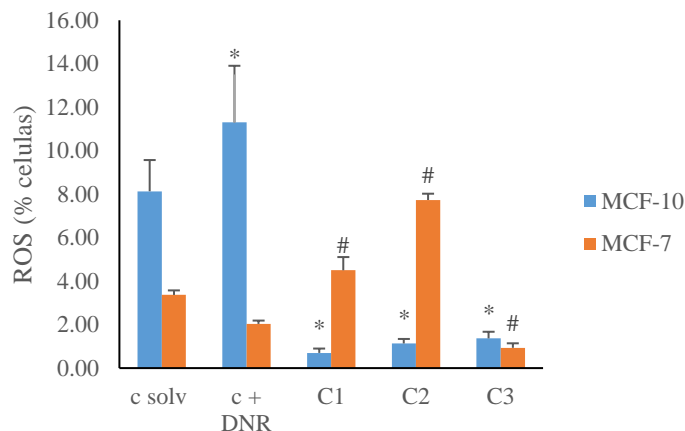


Figura 13. Efecto de la producción de ROS en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de *P. chilensis* (f). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 µg/mL, C2 = 100 µg/mL, C3 = 200 µg/mL. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.

6.3.1.2. Determinación de Lipoperoxidación por citometría de flujo

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación tiene relevancia en diferentes enfermedades humanas, como la inflamación, el cáncer y los procesos neurodegenerativos. Su oxidación por ROS genera productos nocivos, que pueden ser endoperóxidos o hidroperóxidos. Los endoperóxidos son intermediarios en la producción de aldehídos, mientras que los hidroperóxidos (LOOH y LOO \cdot) se han reconocido recientemente como mediadores cruciales de la enfermedad y muerte celular. Los lipoperóxidos tienen funciones esenciales en la viabilidad celular; un aumento en la peroxidación lipídica modifica el ensamblaje, la estructura y la dinámica de las membranas celulares, provocando la apoptosis celular (Gaschler and Stockwell, 2017). La detección de lipoperoxidación fue medida utilizando el reactivo BODIPY-C11 que es muy sensible para detectar daño oxidativo por citometría de flujo. La **Figura 14** mostró una mayor lipoperoxidación para las células tumorales MCF-7, en todas las concentraciones estudiadas (50, 100 y 200 µg/mL). En comparación con el mostrado por el control positivo de daunorubicina. Por el contrario, para la línea celular no tumoral MCF-10A se observó una disminución. Por lo tanto, estos resultados indican que el extracto etanólico de *P. chilensis* (f) indujo la producción de peroxidación lipídica, lo que podría promover el mecanismo de muerte celular programada en la línea MCF-7, posiblemente causado por un cambio en la membrana celular. Por el contrario, en la célula no tumoral MCF-10A podría actuar como agente antioxidante, protegiendo a la célula frente al daño peroxidativo.

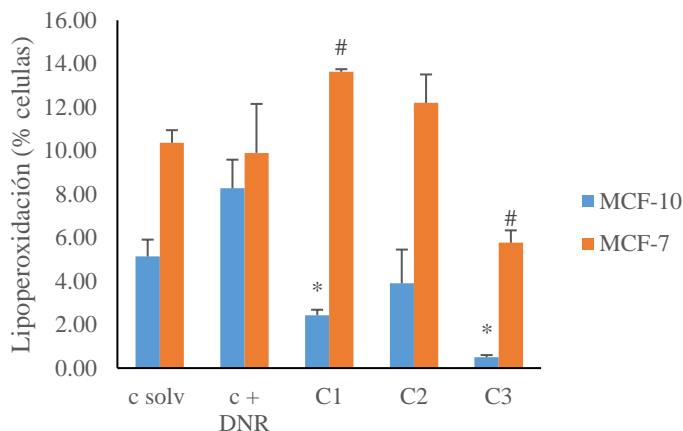


Figura 14. Efecto de la producción de lipoperoxidación en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de *P. chilensis* (s). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 $\mu\text{g/mL}$, C2 = 100 $\mu\text{g/mL}$, C3 = 200 $\mu\text{g/mL}$. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.

6.3.1.3. Determinación de permeabilidad de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mt}}$) por citometría de flujo

Las mitocondrias juegan un papel importante en el metabolismo energético y también son esenciales en el proceso de muerte celular; específicamente, la pérdida del potencial de membrana es un marcador distintivo de apoptosis temprana. Por lo tanto, es posible evaluar la apoptosis mediante la determinación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mt}}$) mediante citometría de flujo (Wallace et al., 2010). En este ensayo, las células fueron marcadas con rodamina 123 (Rh-123) para evidenciar el cambio en el potencial. Al generar cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, el Rh-123 escapa de la matriz mitocondrial, disminuyendo la fluorescencia (Baracca et al., 2003). En la **Figura 15** se observó una disminución del potencial de membrana mitocondrial en las células MCF-7 tratadas con el extracto etanólico de *P. chilensis* (f) en todas las concentraciones estudiadas en comparación con el control solvente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas y el control positivo. Para la célula no tumoral MCF-10A, se observa que la membrana mitocondrial permanece intacta, por lo que su permeabilidad no se ve afectada. Este resultado nos permite inferir que la función mitocondrial se ha visto afectada en las células MCF-7, induciendo la muerte celular programada. Esta propuesta es consistente con la reportada para el efecto de daunorubicina en células tumorales.

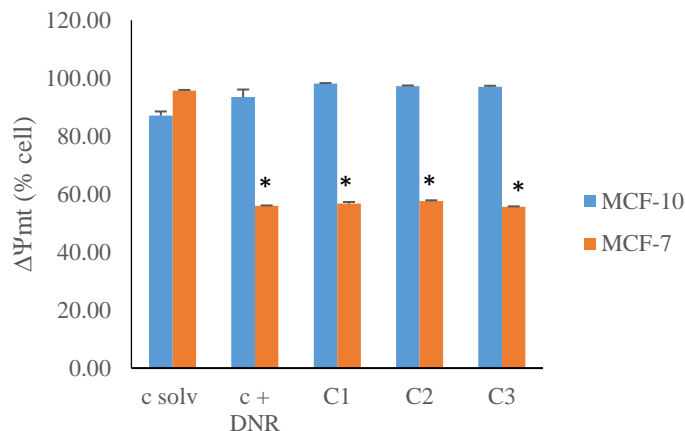


Figura 15. Efecto de la permeabilidad de la membrana celular en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de *P. chilensis* (s). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 $\mu\text{g/mL}$, C2 = 100 $\mu\text{g/mL}$, C3 = 200 $\mu\text{g/mL}$. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.

6.3.1.4. Determinación de Caspasas activas por citometría de flujo

Las caspasas son proteínas vitales en la transducción y ejecución de la señal apoptótica de las células tumorales. Este ensayo se realizó utilizando un marcador de apoptosis ampliamente utilizado: FITC-VAD-FMK. La **Figura 16** muestra una disminución en la activación de caspasas en todas las concentraciones estudiadas en la línea celular MCF-7 en comparación con el control positivo. Por otro lado, para la célula no tumoral se observa un aumento en la activación de caspasas a la mayor concentración estudiada (200 mL) respecto al control positivo, lo que sugiere que quizás está ocurriendo un aumento de producción de caspasas distintas a las que promueven la muerte celular programada (caspasas inflamatorias por ejemplo). Los resultados obtenidos en estas pruebas permiten inferir que quizás el proceso de muerte celular programada ocurre por una vía distinta a la apoptosis. Recientemente se ha estudiado otras formas de muerte celular programada como la necroptosis, autofagia, piroptosis, que podrían explicar estos resultados (Green and Llambi, 2015; Shen et al., 2023; Yan et al., 2020). Para confirmar esta apreciación, es necesario llevar a cabo otros experimentos para determinar cómo se produce la muerte celular de manera consistente, quizás a través de la técnica inmunohistoquímica.

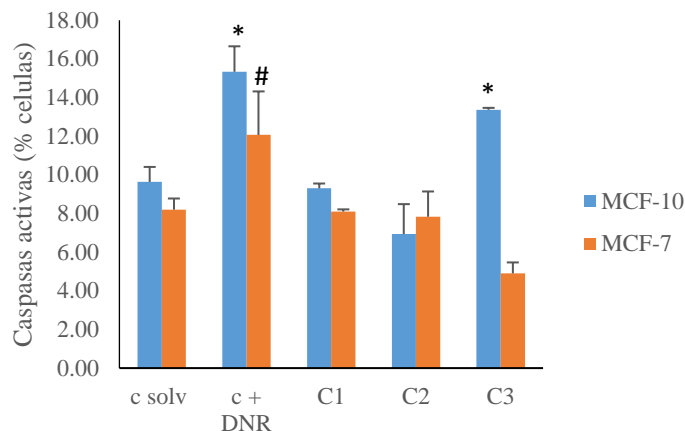
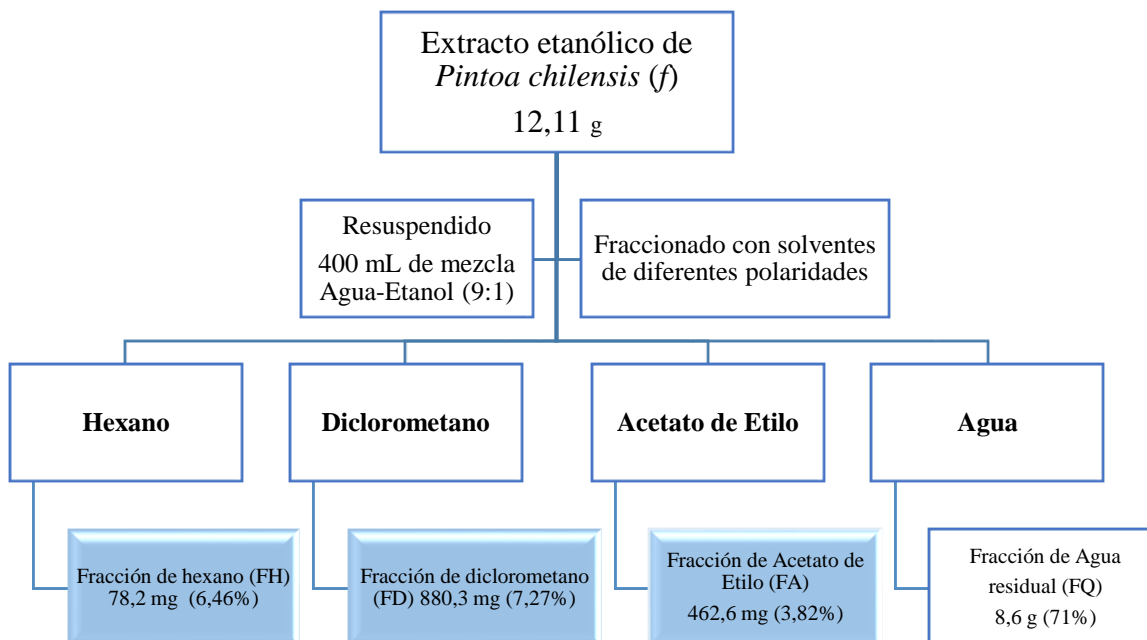


Figura 16. Producción de caspasas activas en las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A inducido por el extracto etanólico de *P. chilensis* (f). C Solv = control solvente (EtOH), C+ = Daunorubicina, C1 = 50 µg/mL, C2 = 100 µg/mL, C3 = 200 µg/mL. *,# Diferencias significativas con respecto al control solvente.

A la fecha no hay reportes de estudios del efecto citotóxico de extractos o compuestos bioactivos aislados de *P. chilensis*. Sin embargo, algunas especies de la familia Zygophyllaceae han reportado un efecto citotóxico, tal es el caso de *Peganum harmala* (Lamchouri et al., 2000) y *Tribulus terrestris* (Akbaba et al., 2021; Pourali et al., 2016). Por otro lado, la selectividad para las líneas celulares de cáncer es una característica fundamental que se debe considerar para desarrollar nuevos medicamentos que reemplacen la quimioterapia tradicional para reducir los efectos secundarios indeseables. El índice de selectividad es esencial para identificar una sustancia con una actividad biológica interesante y una citotoxicidad baja (Çelik, 2018). Tomando esto en consideración y en vista de los resultados obtenidos de viabilidad celular y la determinación de biomarcadores por citometría de flujo, el extracto de *P. chilensis* (f) se presenta como un candidato potencial para la búsqueda de compuestos bioactivos contra el cáncer, por su baja actividad citotóxica contra la línea celular no tumoral. Por lo tanto, se continuará con los estudios para poder aislar los metabolitos secundarios que posiblemente sean los responsables de la actividad citotóxica.

6.3.1.5. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *P. chilensis* (f)

El extracto etanólico de *P. chilensis* (f) fue secuencialmente fraccionado con solventes de diferentes polaridades. El extracto fue resuspendido en una mezcla de agua-etanol (9:1) y fraccionado con hexano, diclorometano y acetato de etilo, obteniéndose adicionalmente la fracción residual de agua. Los resultados obtenidos se muestran en el **Esquema 1**.



Esquema 1. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *P. chilensis* (f) con solventes de diferentes polaridades, junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos. Resaltado en azul las fracciones activas.

6.3.1.6. Viabilidad celular de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *P. chilensis* (f)

Una vez obtenidas las diferentes fracciones, se procedió a determinar la viabilidad celular de las mismas utilizando el método colorimétrico de sulforrodamina B (SRB) contra la línea celular tumoral MCF-7 y empleando como control la línea celular no tumoral MCF-10A, obteniendo de esta manera los valores de IC_{50} . Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**, todas las fracciones disminuyeron la viabilidad celular en ambas líneas celulares, comparados con los valores de IC_{50} obtenidos para el extracto etanólico, excepto por las fracciones metanólica (FM) y la fracción acuosa (FQ) cuyos valores superan los 350 $\mu\text{g/mL}$. La fracción de hexano (FH) mostró una alta citotoxicidad en ambas líneas celulares, con valores de IC_{50} entre 35 y 45 $\mu\text{g/mL}$, pero sin mostrar selectividad por una de las líneas celulares (**Tabla 10**). Sin embargo, la fracción de diclorometano (FD) fue más selectiva contra la línea celular cancerígena con valores de IC_{50} semejantes a los obtenidos por el extracto etanólico.

Tabla 9. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *P. chilensis* (f), contra la línea celular cancerígena MCF-7 y utilizando como control positivo la línea celular no tumoral MCF-10A.

Fracciones	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	MCF-7	MCF-10A
Fracción de hexano (FH)*	35,3 \pm 1,5	45,0 \pm 3,5
Fracción de diclorometano (FD)*	107,1 \pm 3,4	232,5 \pm 36,6
Fracción de acetato de etilo (FA)*	105,0 \pm 4,4	133,7 \pm 4,4
Fracción de methanol (FM)	> 350	> 350
Fracción acuosa (FQ)	> 350	> 350

* Fracciones más activas.

El índice de selectividad (IS) de las fracciones, fue determinado utilizando el valor de IC₅₀ obtenido sobre la línea celular no tumoral (MCF-10A) dividido por el valor de IC₅₀ obtenido sobre la línea celular tumoral (MCF-7). Los resultados se muestran en la **Tabla 11**. Para la fracción de hexano (FH) y acetato de etilo (FA), el IS fue mayor a 1,3. Para la fracción de diclorometano (FD), el IS fue mayor de 2,2 para la línea celular MCF-7 y las fracciones de metanol (FM) y acuosa (FQ), el IS fue menor a 1. Considerando estos resultados la fracción de diclorometano se seleccionará para continuar con el resto de la investigación, con el fin de obtener los compuestos bioactivos responsables de la actividad citotóxica.

Tabla 10. Valores de IS de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *P. chilensis* (f), contra la línea celular cancerígena MCF-7.

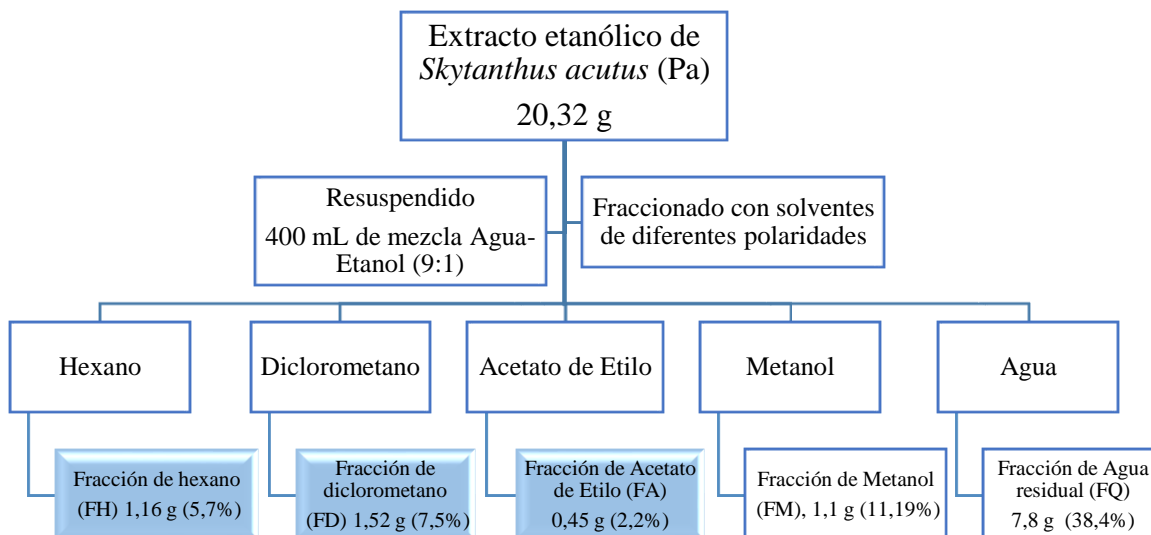
Fracciones	IS MCF-7
Fracción de hexano (FH)	1,3
Fracción de diclorometano (FD)*	>2
Fracción de acetato de etilo (FA)	1,3
Fracción de methanol (FM)	<1
Fracción acuosa (FQ)	<1

* Fracción selectiva

6.3.2. Extracto etanólico de *Skytanthus acutus* (Pa)

6.3.2.1. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *S. acutus* (Pa)

Tomando en cuenta los resultados mostrados en la **Tabla 7** y **Figura 12**, se procedió a realizar un fraccionamiento líquido-líquido del extracto con solventes de diferentes polaridades (**Esquema 2**). Esto con el fin de obtener subfracciones y determinar la actividad antiproliferativa de los mismos.



Esquema 2. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *S. acutus* (Pa) con solventes de diferentes polaridades, junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos. Resaltado en azul las fracciones activas.

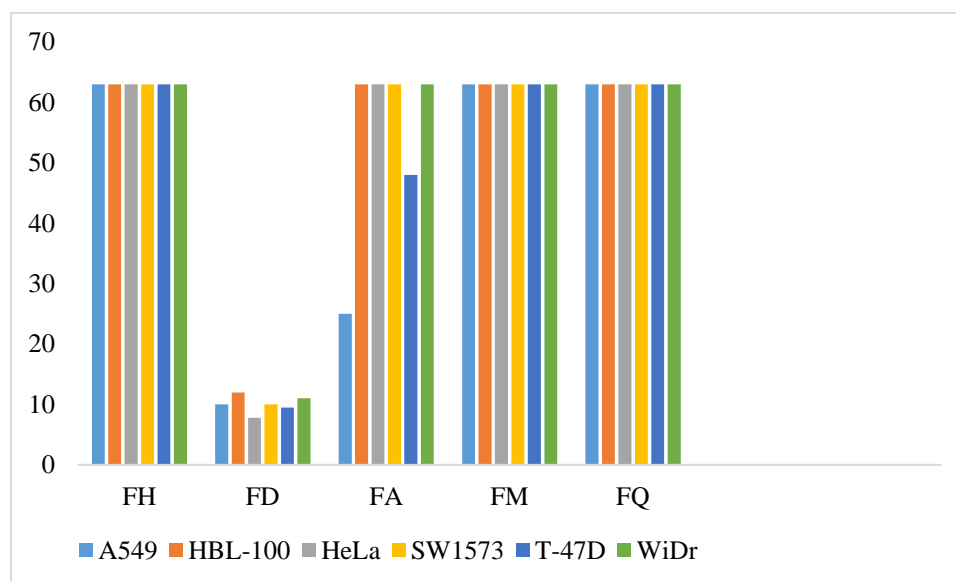
6.3.2.2. Actividad antiproliferativa de las fracciones de *S. acutus* (Pa)

Una vez obtenidas las fracciones del extracto etanólico de *S. acutus* (Pa), se evaluó la actividad antiproliferativa. Los resultados se muestran en la **Tabla 11**. La fracción de diclorometano (FD) mostró los mejores resultados antiproliferativos contra todas las líneas celulares estudiadas con valores de IG_{50} entre 2,1 – 3,0 $\mu\text{g/mL}$ a una concentración máxima estudiada de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, seguido por la fracción de acetato de etilo (FA) con valores de IG_{50} entre 3,5 – 19,0 $\mu\text{g/mL}$ y la fracción de hexano (FH) con valores de IG_{50} entre 18,0 – 29,0 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al observar los valores de TGI ($\mu\text{g/mL}$) (**Tabla 12**), solo la fracción de diclorometano mostró valores bajos en todas las líneas celulares estudiadas: 7,8 – 12 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados nos permitieron seleccionar esta fracción para continuar con el siguiente paso en la investigación: la obtención de los metabolitos secundarios puros causantes de la actividad antiproliferativa.

Tabla 11. Valores de IG₅₀ (μg/mL) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *S. acutus* (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.

Fracciones	IG ₅₀ (μg/mL)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
Fracción de hexano (FH)*	20	29	18	26	20	25
Fracción de diclorometano (FD)*	2,1	2,5	2,3	3,0	2,1	2,5
Fracción de acetato de etilo (FA)*	3,5	20	7,8	15	14	19
Fracción de metanol (FM)	63	63	63	63	63	63
Fracción Acuosa (FQ)	30	63	34	63	40	63

Concentración máxima estudiada: 62,5 μg/mL. * Fracciones más activas.

**Figura 17.** IG₅₀ (μg/mL) de las fracciones de *S. acutus* (Pa) contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr. FH: Fracción de hexano, FD: Fracción de diclorometano, FA: Fracción de acetato de etilo, FM: Fracción de metanol, FQ: Fracción acuosa.**Tabla 12.** Valores de TGI (μg/mL) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *S. acutus* (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.

Fracciones	TGI (μg/mL)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
Fracción de hexano (FH)	63	63	63	63	63	63
Fracción de diclorometano (FD)*	10	12	7,8	10	9,5	11
Fracción de acetato de etilo (FA)	25	63	63	63	48	63
Fracción de metanol (FM)	63	63	63	63	63	63
Fracción Acuosa (FQ)	63	63	63	63	63	63

Concentración máxima estudiada: 62,5 μg/mL. * Fracción más activa.

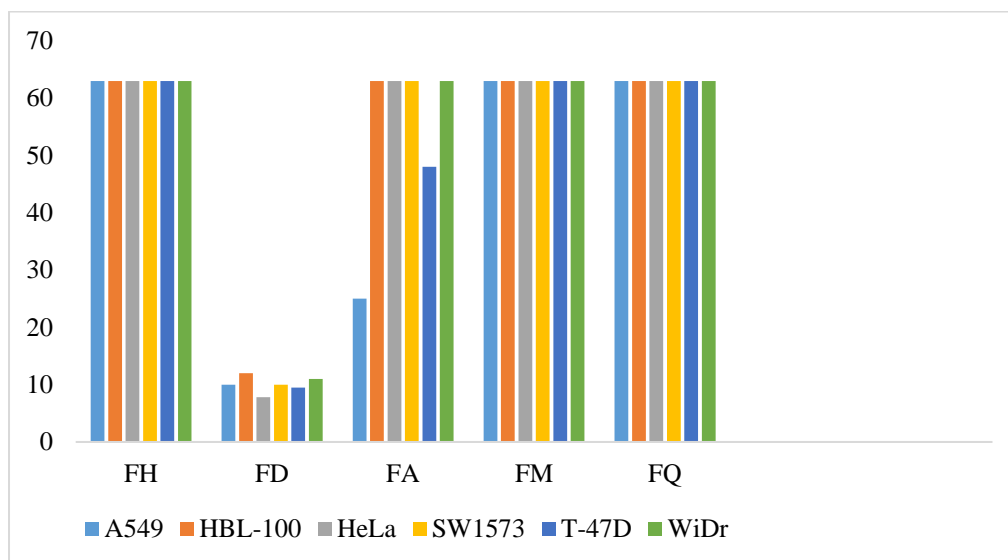


Figura 18. TGI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *S. acutus* (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr. FH: Fracción de hexano, FD: Fracción de diclorometano, FA: Fracción de acetato de etilo, FM: Fracción de metanol, FQ: Fracción acuosa.

6.3.3. Extracto etanólico de *Krameria cistoidea* (Pa)

Dado que el extracto etanólico de *K. cistoidea* (pa) mostró una fuerte actividad antioxidante, una débil citotoxicidad y actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, se decidió evaluar la actividad citotóxica frente a la célula HaCaT, que es una línea de queratinocitos humanos espontáneamente inmortalizados que se ha utilizado ampliamente para estudios de biología y diferenciación de la piel (Wilson, 2013). Los resultados de la actividad citotóxica contra HaCaT se evaluaron a seis concentraciones (0, 13, 30, 75, 150 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **Figura 19**). Los resultados mostraron que sólo en la concentración más alta evaluada (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se presentó una disminución de la viabilidad superior al 60%, demostrando que el extracto no es citotóxico.

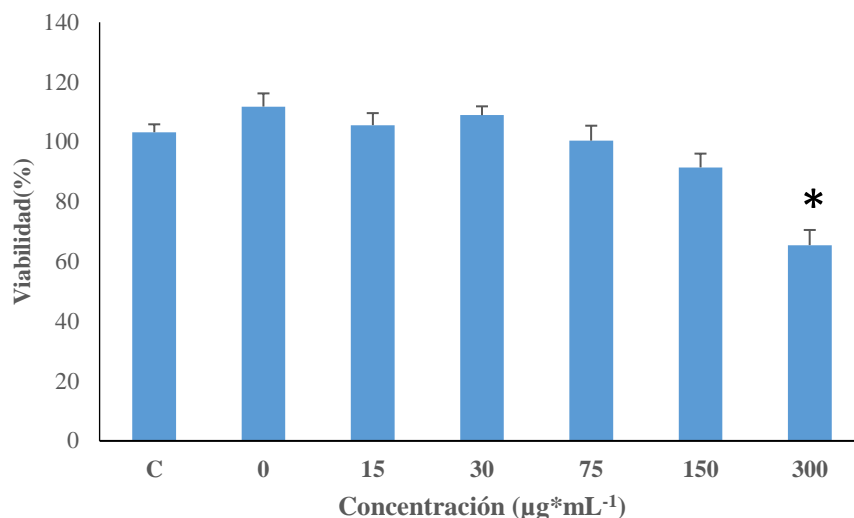
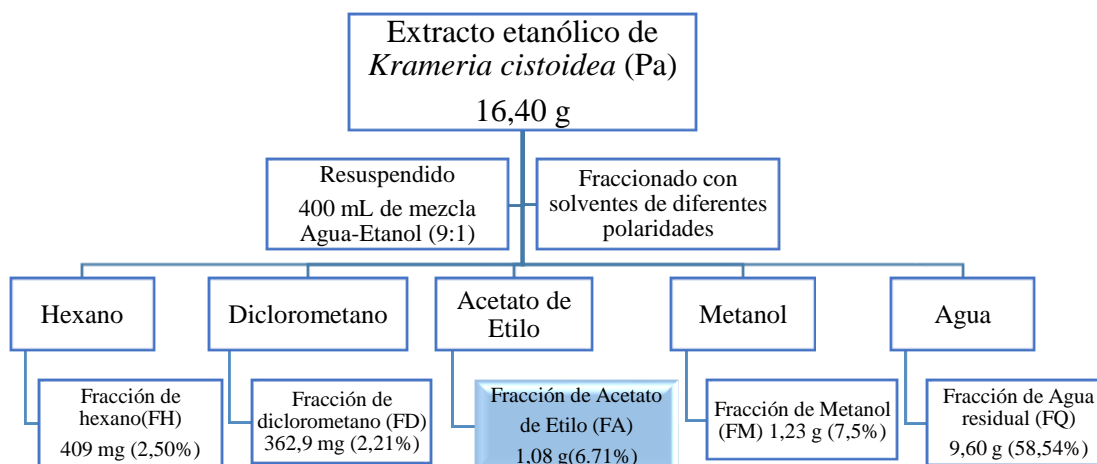


Figura 19. Efecto del extracto etanólico sobre la viabilidad de las células HaCaT. * Diferencias significativas entre concentración.

6.3.3.1. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa)

El extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa) fue secuencialmente fraccionado con solventes de diferentes polaridades. El extracto fue resuspendido en una mezcla de agua-etanol (9:1) y fraccionado con hexano, diclorometano y acetato de etilo, obteniéndose adicionalmente la fracción residual de agua. Los resultados obtenidos se muestran en el **Esquema 3**.



Esquema 3. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico de *K. cistoidea* (Pa) con solventes de diferentes polaridades, junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos. Resaltado en azul la fracción activa.

6.3.3.2. Actividad antimicrobiana de las fracciones de *K. cistoidea* (Pa)

La actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas se determinó calculando la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las fracciones contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las fracciones fueron resuspendidos en EtOH 70% y las concentraciones evaluadas fueron desde 0,0020 mg/mL a 1mg/mL. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Valores MIC de las fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Fracciones disueltas en EtOH 70%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fracción de hexano (FH)	S/A	S/A	S/A
Fracción de diclorometano (FD)	S/A	S/A	S/A
Fracción de acetato de etilo (FA)	S/A	S/A	S/A
Fracción de metanol (FM)	S/A	S/A	S/A
Fracción residual de Agua (FQ)	S/A	S/A	S/A

S/A: Sin actividad.

Como se puede observar en la **Tabla 13**, las fracciones por sí sola no mostraron tener actividad antimicrobiana contra las bacterias estudiadas. El resultado se realizó en duplicado para cada bacteria como para cada extracto. Por lo que se procedió a realizar mezclas de las fracciones y medir nuevamente la actividad de estas, debido a la pérdida de la actividad antimicrobiana durante el fraccionamiento.

6.3.3.3. Actividad antimicrobiana de las mezclas binarias de las fracciones de *K. cistoidea* (Pa)

La actividad antimicrobiana de las mezclas de fracciones obtenidas se determinó calculando la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las fracciones fueron resuspendidos en EtOH 70% y las concentraciones evaluadas fueron desde 0,0020 mg/mL a 1mg/mL. Las mezclas evaluadas son las siguientes:

- FD + FA (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo)
- FD + FH (Fracción de diclorometano + Fracción de hexano)
- FD + FM (Fracción de diclorometano + Fracción de metanol)
- FD + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción acuosa)
- FA + FH (Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano)
- FA + FM (Fracción de acetato de etilo + Fracción de metanol)
- FA + FQ (Fracción de acetato de etilo + Fracción acuosa)
- FH + FM (Fracción de hexano + Fracción de metanol)
- FH + FQ (Fracción de hexano + Fracción acuosa)
- FM + FQ (Fracción de metanol + Fracción acuosa)

Los resultados se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Valores MIC de las fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Fracciones disueltas en EtOH 70%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FD + FA	S/A	S/A	1 mg/mL
FD + FH	S/A	S/A	S/A
FD + FM	S/A	S/A	S/A
FD + FQ	S/A	S/A	S/A
FA + FH	S/A	S/A	S/A
FA + FM*	S/A	S/A	1 mg/mL
FA + FQ*	S/A	1 mg/mL	1 mg/mL
FH + FM	S/A	S/A	S/A
FH + FQ	S/A	S/A	S/A
FM + FQ	S/A	S/A	S/A

S/A: Sin actividad. * Mezclas activas.

Como se puede observar en la **Tabla 14**, la mezcla de las fracciones FA + FQ probada frente a *S. aureus*, presentó una MIC a 1 mg/mL. Al determinar la CMB se observó crecimiento de la bacteria (6×10^3 UFC/mL). Por otro lado, las mezclas de fracciones FD + FA, FA + FM y FA + FQ, mostraron actividad frente a *P. aeruginosa* a 1 mg/mL, la CMB fue determinada y se observó crecimiento de la bacteria: FD + FA (50 UFC/mL), FA + FM (580 UFC/mL) y FA + FQ (50 UFC/mL).

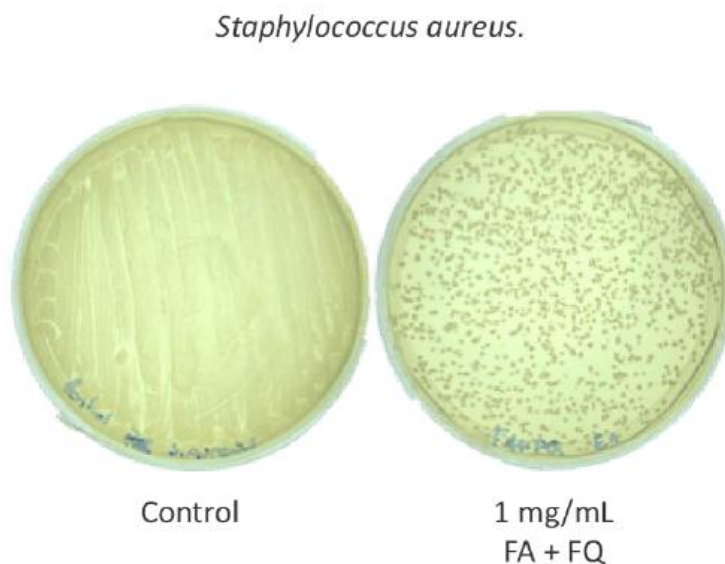


Figura 20. Determinación del valor de CBM de la mezcla de fracciones FA + FQ para la cepa *S. aureus* después de 24 horas de incubación a 37°C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y la placa mostrando CBM de la concentración de 2 fracciones a 1 mg/mL.

Pseudomona aeruginosa.

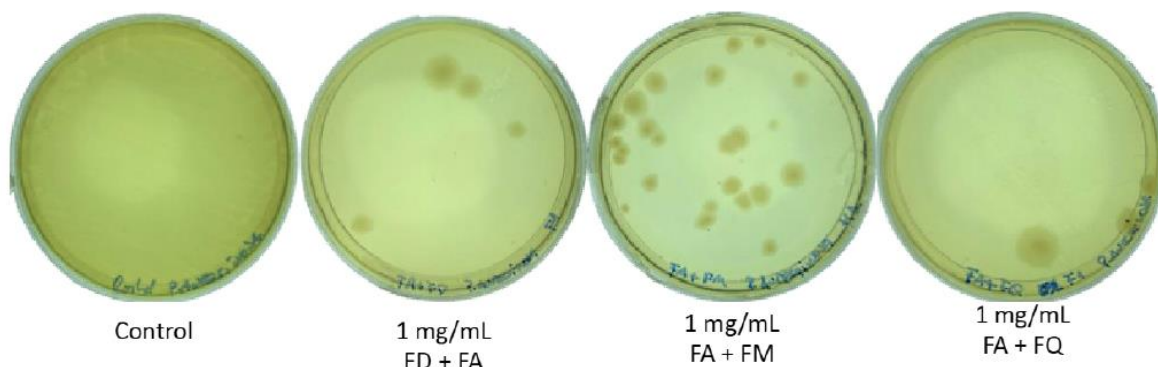


Figura 21. Determinación del valor de CBM de la mezcla de fracciones FD + FA, FA + FM y FA + FQ para la cepa *P. aeruginosa* después de 24 horas de incubación a 37 °C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y las placas mostrando CBM de la combinación de 2 fracciones a 1 mg/mL.

6.3.3.4. Actividad antimicrobiana de las mezclas de tres fracciones de *K. cistoidea* (Pa)

La actividad antimicrobiana de las mezclas de fracciones obtenidas se determinó calculando la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las fracciones fueron resuspendidos en EtOH 70% y las concentraciones evaluadas fueron desde 0,0020 mg/mL a 1mg/mL. Las mezclas evaluadas son las siguientes:

- FD + FA + FH (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano)
- FD + FA + FM (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo + Fracción de metanol)
- FD + FA + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo + Fracción acuosa)
- FD + FH + FM (Fracción de diclorometano + Fracción de hexano + Fracción de metanol)
- FD + FH + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción de hexano + Fracción acuosa)
- FD + FM + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción de metanol + Fracción acuosa)
- FA + FH + FM (Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano + Fracción de metanol)
- FA + FH + FQ (Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano + Fracción acuosa)
- FA + FM + FQ (Fracción de acetato de etilo + Fracción de metanol + Fracción acuosa)
- FH + FM + FQ (Fracción de hexano + Fracción de metanol + Fracción acuosa)

Los resultados se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Valores MIC de las fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Fracciones disueltas en EtOH 70%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FD + FA + FH	S/A	S/A	S/A
FD + FA + FM*	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FA + FQ*	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FH + FM	S/A	S/A	S/A
FD + FH + FQ	S/A	S/A	S/A
FD + FM + FQ*	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FH + FM*	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FH + FQ*	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FM + FQ*	S/A	0.5 mg/mL y 1 mg/mL	S/A
FH + FM + FQ*	S/A	1 mg/mL	S/A

S/A: Sin actividad. * Mezclas activas.

Como se puede observar en la **Tabla 15**, solo una de la mezcla de las fracciones mostró actividad frente a *S. aureus* a 0.5 mg/mL y 7 mezclas a 1 mg/mL. La mezcla de tres fracciones no mostró actividad contra *E. coli* ni *P. aeruginosa*. En la **Tabla 16** se muestran los resultados de la determinación de MBC de la mezcla de fracciones.

Tabla 16. Valores MBC de las fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Mezcla de fracciones	0.5 mg/mL	1 mg/mL
	Determinación de MBC	
FD + FA + FH	S/A	S/A
FD + FA + FM	S/A	2x10 ⁴ UFC/mL
FD + FA + FQ	S/A	8,3x10 ³ UFC/mL
FD + FH + FM	S/A	S/A
FD + FH + FQ	S/A	S/A
FD + FM + FQ	S/A	2x10 ⁴ UFC/mL
FA + FH + FM	S/A	5,7x10 ³ UFC/mL
FA + FH + FQ	S/A	5,9x10 ³ UFC/mL
FA + FM + FQ	8x10 ³ UFC/mL	2,5x10 ³ UFC/mL
FH + FM + FQ	S/A	2x10 ⁴ UFC/mL

S/A: Sin actividad.

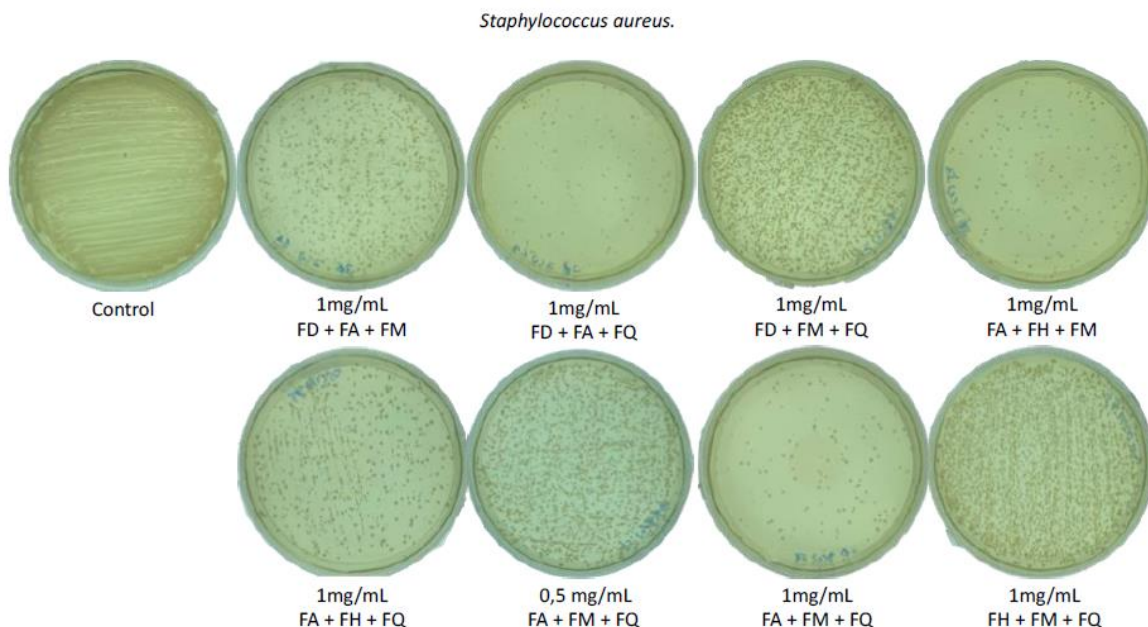


Figura 22. Determinación del valor de CBM de la mezcla de tres fracciones para la cepa *S. aureus* después de 24 horas de incubación a 37°C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y las placas mostrando CBM de la combinación de 3 fracciones a 0,5 y 1 mg/mL.

6.3.3.5. Actividad antimicrobiana de las mezclas de cuatro fracciones de *K. cistoidea* (Pa)

La actividad antimicrobiana de las mezclas de fracciones obtenidas se determinó calculando la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las fracciones fueron resuspendidos en EtOH 70% y las concentraciones evaluadas fueron desde 0,0020 mg/mL a 1mg/mL. Las mezclas evaluadas son las siguientes:

- FD + FA + FH +FM (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano + Fracción de metanol)
- FD + FA + FH + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano + Fracción acuosa)
- FD + FA + FM + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción de acetato de etilo + Fracción de metanol + Fracción acuosa)
- FD + FH + FM + FQ (Fracción de diclorometano + Fracción de hexano + Fracción de metanol + Fracción acuosa)
- FA + FH + FM + FQ (Fracción de acetato de etilo + Fracción de hexano + Fracción de metanol + Fracción acuosa).

Los resultados se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Valores MIC de las fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Fracciones disueltas en EtOH 70%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FD + FA + FH + FM*	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FA + FH + FQ*	S/A	0,5 y 1 mg/mL	S/A
FD + FA + FM + FQ*	S/A	0,5 y 1 mg/mL	S/A
FD + FH + FM + FQ*	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FH + FM + FQ*	S/A	0,5 y 1 mg/mL	S/A

S/A: Sin actividad. * Mezclas activas.

Como se puede observar en la **Tabla 17**, cuatro de las mezclas de las fracciones mostraron actividad frente a *S. aureus* a 0.5 mg/mL y 5 mezclas a 1 mg/mL. La mezcla de cuatro fracciones no mostró actividad contra *E. coli* ni *P. aeruginosa*. En la **Tabla 18** se muestran los resultados de la determinación de MBC de la mezcla de fracciones.

Tabla 18. Valores MBC de las fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Mezcla de fracciones	0.5 mg/mL	1 mg/mL
	Determinación de MBC	
FD + FA + FH + FM	S/A	2 UFC/mL
FD + FA + FH + FQ	1x10 ⁴ UFC/mL	1 UFC/mL
FD + FA + FM + FQ	1x10 ⁴ UFC/mL	0,5 UFC/mL
FD + FH + FM + FQ	S/A	1 UFC/mL
FA + FH + FM + FQ	4,9x10 ³ UFC/mL	0 UFC/mL

S/A: Sin actividad.

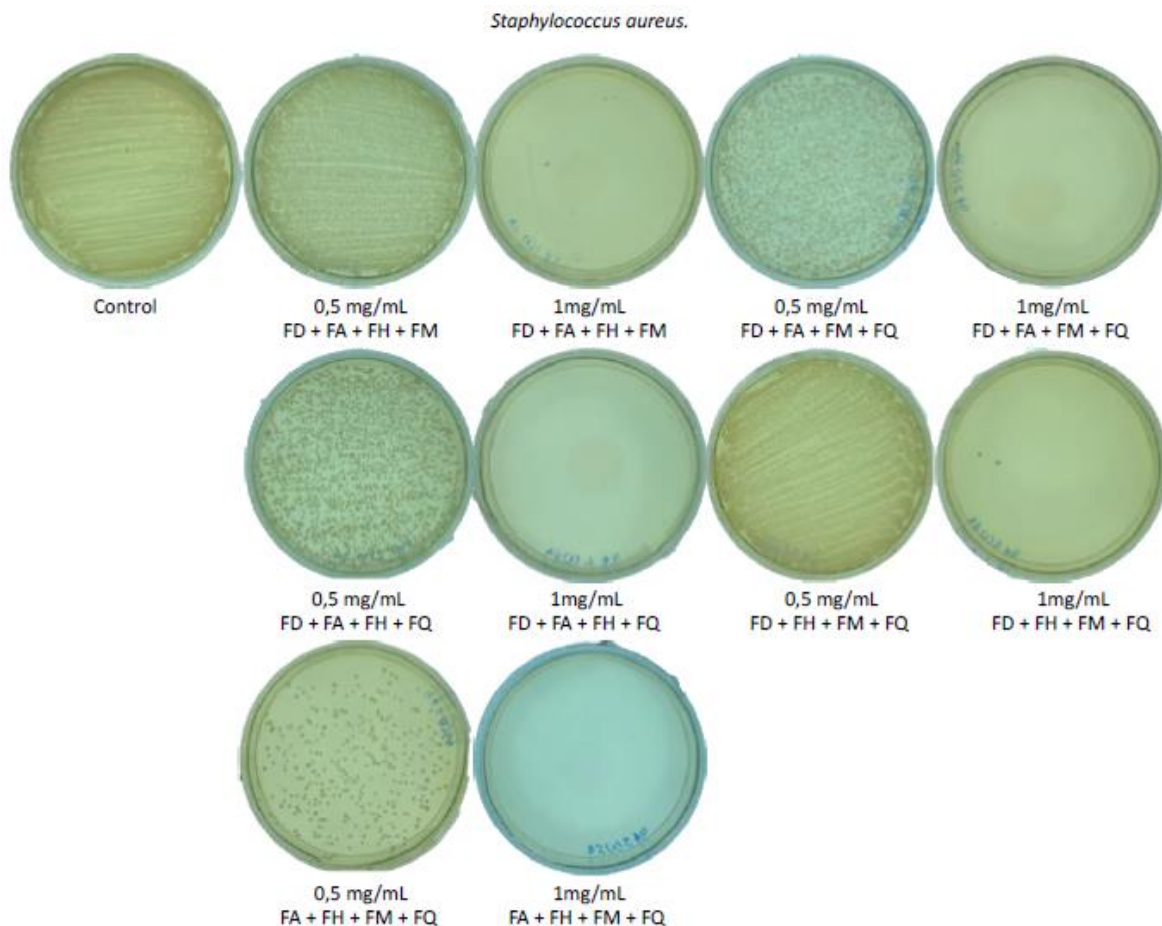


Figura 23. Determinación del valor de CBM de la mezcla de cuatro fracciones para la cepa *S. aureus* después de 24 horas de incubación a 37°C. En la imagen se observa el control positivo (crecimiento de la bacteria sin tratamiento) y las placas mostrando CBM de la combinación de 4 fracciones a 0,5 y 1 mg/mL.

A pesar de que las fracciones por si solas no presentaron actividad antimicrobiana contra las tres cepas estudiadas, al mezclarlas se pudo observar inhibición en algunas de las cepas estudiadas (*S. aureus* y *P. aeruginosa*). Al observar detalladamente las mezclas (**Tabla 19**) se puede notar que en aquellas donde estaban presentes alguna de las fracciones polares: Fracción de acetato de etilo (FA), Fracción de metanol (FM) y la Fracción acuosa (FQ) o mezcla de ellas se produjo inhibición contra la cepa *S. aureus*, sobre la cual el extracto etanólico de donde obtuvieron las fracciones, mostró actividad inicialmente. Por lo que para continuar con el estudio del aislamiento de los posibles metabolitos secundarios causantes de la actividad antimicrobiana se utilizarán las fracciones polares: FA, FM y FQ.

Tabla 19. Tabla resumen con los valores MIC de las fracciones y las mezclas de fracciones obtenidas de *K. cistoidea* contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Extracto etanólico y Fracciones disueltas en EtOH 70%	MIC mg/mL		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>K. cistoidea</i> (Pa) (Extracto etanólico)	S/A	1 mg/mL	S/A
FH	S/A	S/A	S/A
FD	S/A	S/A	S/A
FA	S/A	S/A	S/A
FM	S/A	S/A	S/A
FQ	S/A	S/A	S/A
FD + FA	S/A	S/A	1 mg/mL
FA + FM	S/A	S/A	1 mg/mL
FA + FQ	S/A	1 mg/mL	1 mg/mL
FD + FA + FM	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FA + FQ	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FM + FQ	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FH + FM	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FH + FQ	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FM + FQ	S/A	0.5 mg/mL y 1 mg/mL	S/A
FH + FM + FQ	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FA + FH + FM	S/A	1 mg/mL	S/A
FD + FA + FH + FQ	S/A	0,5 y 1 mg/mL	S/A
FD + FA + FM + FQ	S/A	0,5 y 1 mg/mL	S/A
FD + FH + FM + FQ	S/A	1 mg/mL	S/A
FA + FH + FM + FQ	S/A	0,5 y 1 mg/mL	S/A

S/A: Sin actividad.

6.4. Objetivo específico 4

Purificar y caracterizar los metabolitos secundarios de las fracciones seleccionadas en el objetivo específico 3 a través de diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas con el fin de obtener la identidad química de los responsables de la actividad.

6.4.1. Análisis del perfil cromatográfico de la fracción de diclorometano (FD) de *P. chilensis* (f) mediante Cromatografía de Gases acoplado a masas (GC-MS).

La fracción más activa y selectiva (FD) de *P. chilensis* (f) contra el cáncer de mama (MCF-7) se analizó mediante GC-MS y los resultados se muestran en la **Tabla 20 y Figura 28**. En esta fracción se encontraron tres grupos de compuestos, principalmente ácidos grasos: ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido mirístico y 2-monoestearina con un 8,76% de la composición. Azúcares como la sacarosa y la β -D-alopiranososa con un 2,21% de la composición, y polioles incluyendo el 1,3-propanodiol, el D-pinitol y el mioinositol, con un 8,76% de la composición total de la fracción. El análisis GC-MS de la fracción de diclorometano (FD) de *P. chilensis* mostró la presencia de ácidos grasos que han sido identificados en otras plantas pertenecientes a la familia Zygophyllaceae: *Zygophyllum fabago*, *Z. album*, *Z. luntii*, *Tribulus terrestris*, *Peganum harmala* y *Nitraria sibirica* (Asilbekova et al., 2010; Erdemoglu and Kusmenoglu, 2003; Hashim et al., n.d.; Moustafa et al., 2007; Shah et al., 2020; Xu et al., 2018).

Tabla 20. Compuestos mayoritarios identificados mediante analisis de GC-MS de la fraccion de diclorometano de *P. chilensis* (f).

No.	Tr (Min)	Componentes Principales	IR ^a	IR Ref ^b	Match	Fórmula Molecular	% Area
1	9,4669	1,3-propanodiol	1053	1073	928	C ₃ H ₈ O ₂	0,48
2	14,125	Urea	1169	1243	899	CH ₄ N ₂ O	0,19
3	27,92	D-pinitol	1762	1815	894	C ₇ H ₁₄ O ₆	7,11
4	29,002	Mioinositol	1819	1930	913	C ₆ H ₁₂ O ₆	1,17
5	30,701	β -D-allopiranososa	1912	1829	902	C ₆ H ₁₂ O ₆	1,32
6	31,176	Acido hexadecanoico	1939	2039	940	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0,88
7	34,512	Acido octadecanoico	2235	2236	926	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0,87
8	37,104	Acido Miristico	2399	2424	899	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0,31
9	41,43	Sucrosa	2696	2610	950	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0,89
10	42,168	2-monostearino	2751	2775	895	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	1,31

IR^a: Indices de retención relativos a los *n*-alcanos C₇-C₄₀ en la columna capilar BP-5MS. IR^b Indices de retención reportados.

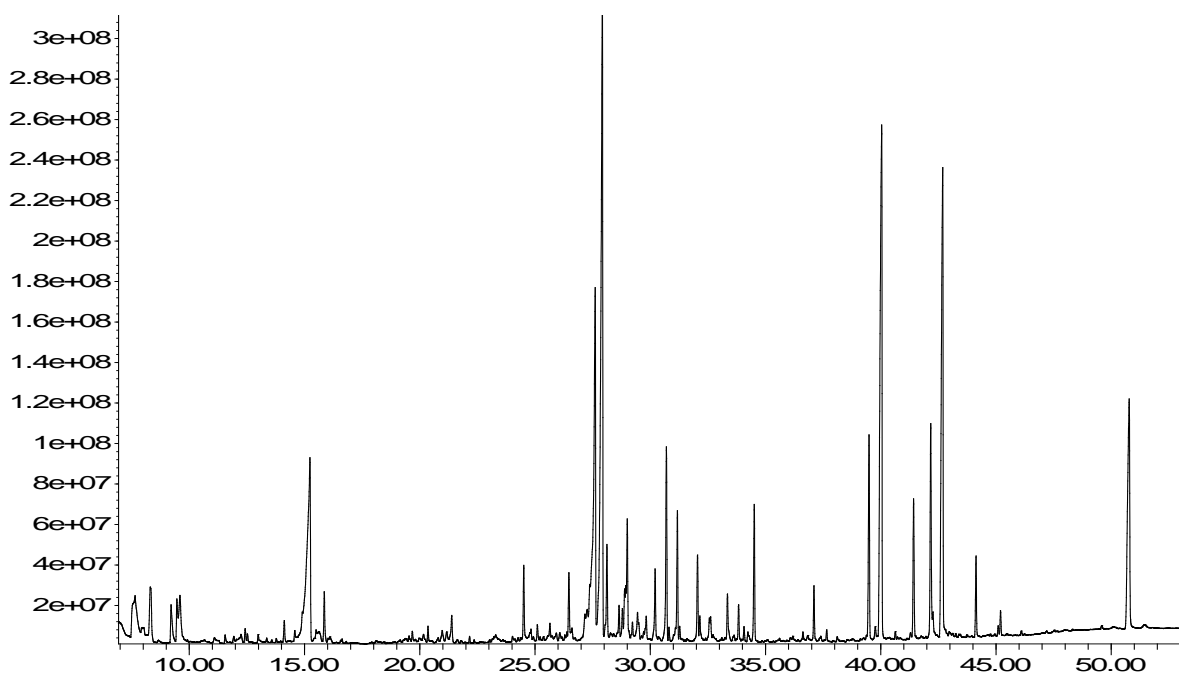


Figura 24. Cromatograma del perfil cromatográfico de la fracción de diclorometano (FD) de la planta *Pintoa chilensis*.

Se ha descrito que la actividad anticancerígena del ácido hexadecanoico (ácido palmítico) induce la detención del ciclo celular promoviendo la apoptosis del neuroblastoma humano y el cáncer de mama (Hardy et al., 2000; Hsiao et al., 2014; Pereira et al., 2013; Sangpairroj et al., 2022). También puede inhibir la proliferación de células de hepatoma modificando la fluidez de la membrana y bloqueando el metabolismo de la glucosa (Lin et al., 2017). El ácido palmítico suprime significativamente el crecimiento de células de cáncer de próstata *in vitro* e *in vivo* al inducir la detención de la fase G1. Además, podría inhibir la metástasis de las células de cáncer de próstata (Zhu et al., 2021), convirtiéndose en un componente prometedor en la inhibición del cáncer de colon mediante la inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular (Bharath et al., 2021). Asimismo, el ácido palmítico puede promover la metástasis pulmonar de los melanomas al inducir la migración y la invasión celular (Zhang et al., 2022). También se ha descrito el efecto del ácido palmítico (AP) en múltiples líneas celulares de cáncer gástrico humano (Yu et al., 2023). El ácido esteárico (estearato o ácido octadecanoico) es un ácido graso saturado de 18 carbonos que ha demostrado inhibir la invasión y la proliferación e inducir la apoptosis en varios tipos de células humanas, preferentemente en células de cáncer de mama, e implica a la proteína quinasa C en la cascada de señalización (Evans et al., 2009).

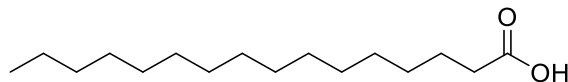


Figura 25. Estructura química del ácido palmítico, identificado en la fracción de diclorometano de *Pintoa chilensis* (f).

La β -D-alopiranososa (D-alosa) es un azúcar poco frecuente en la naturaleza y, debido a su cantidad muy limitada y al elevado coste de su síntesis, sus funciones fisiológicas son muy limitadas, este azúcar inhibe el crecimiento de células de carcinoma de ovario (OVCAR-3) *in vitro* (Sui et al., 2005). Además, la D-alosa tiene un efecto inhibitorio dependiente de la dosis en células cancerosas (HepG52) reduciendo el crecimiento celular e induciendo la muerte celular (Sui et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008). Además, se ha informado del mecanismo del efecto antiproliferativo de la D-alosa en líneas celulares de cáncer de próstata (HRPC) que implica la inducción de la muerte celular programada, la apoptosis (Jeong et al., 2011). Además, se ha informado de que la D-alosa muestra cierta eficacia en otros tipos de cáncer, como el cáncer de páncreas, el cáncer de vejiga y el cáncer de cuello de útero (Naha et al., 2008; Tohi et al., 2022; Yokohira et al., 2008; Zheng et al., 2022).

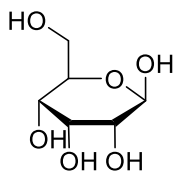


Figura 26. Estructura química de la β -D-alopiranososa, identificada en la fracción de diclorometano de *Pintoa chilensis* (f).

El D-pinitol es un poliol que se ha encontrado en más de 20 fuentes vegetales, y su contenido más alto se encuentra en las vainas de algarrobo, con un 5,5% (Azab, 2022; Brassesco et al., 2021; Pandi et al., 2022), un componente importante de la medicina ayurvédica; las propiedades medicinales y de otro tipo del D-pinitol han sido ampliamente estudiadas y publicadas, incluida la actividad anticancerígena (Azab, 2022; Pandi et al., 2022; Tiwari et al., 2020). El D-pinitol suprime la activación del NF- κ B (complejo proteico que controla la transcripción del ADN) inducida por la estimulación inflamatoria y carcinogénica utilizando células mieloides humanas KBM-5 (Sethi et al., 2008). El efecto del D-pinitol en células humanas de cáncer de próstata (PC3 y DU145) a concentraciones no citotóxicas se evaluó reduciendo la expresión del ARNm y de la superficie celular de la integrina α v β 3. Además, el D-pinitol ejerció sus efectos inhibidores reduciendo la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK), la actividad de la quinasa c-*Src* y la activación de NF- κ B (Lin 2013), inhibe significativamente la proliferación de células MCF-7 de forma dependiente de la concentración e induce la apoptosis celular (Rengarajan et al., 2014). Asimismo, el D-pinitol redujo la invasión inducida por TNF- α de las células LNCaP de cáncer de próstata suprimiendo la actividad de NF- κ B (Jayasooriya et al., 2015). El D-pinitol induce la apoptosis, inhibe la transición epitelio-mesénquima (EMT) e inhibe la metástasis mesenquimal (EMT) y la detención del ciclo celular en células epiteliales escamosas (OSCC). Además, induce la apoptosis en células leucémicas humanas mediante la generación de ROS intracelulares y la modulación de la expresión de proteínas apoptóticas (Yao et al., 2020). Por otro lado, el D-pinitol tiene una excelente actividad

antioxidante que puede deberse a su capacidad para eliminar los radicales estables DPPH, superóxido, óxidos nítricos y radicales libres inducidos por DMBA (Rengarajan et al., 2014). También se destaca el aislamiento e identificación de D-pinitol en otras plantas pertenecientes a la familia Zygophyllacea, como *Tribulus cistoides* (Achenbach et al., 1994, 1996).

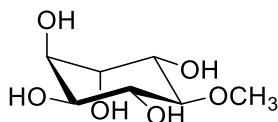


Figura 27. Estructura química del D-pinitol, identificado en la fracción de diclorometano de *Pintoa chilensis* (f).

Los inositoles son una familia de polioles presentes en las membranas plasmáticas. Se conocen nueve formas de inositol; el mio-inositol (MI) es la forma dominante de inositoles en el contenido intracelular (Facchinetti et al., 2015). En los últimos años, el MI se ha recomendado ampliamente como posible agente quimiopreventivo (Lam et al., 2006), ya que desempeña numerosas funciones biológicas, incluida la modulación de la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación (Amabile et al., 2021; Bizzarri et al., 2018, 2016; Chhetri, 2019; Roh and Lee, 2018; Yang et al., 2023). Por último, a pesar de la discusión anterior sobre el efecto citotóxico de los principales componentes identificados en la fracción de diclorometano, no se descarta el efecto sinérgico entre ellos.

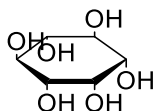
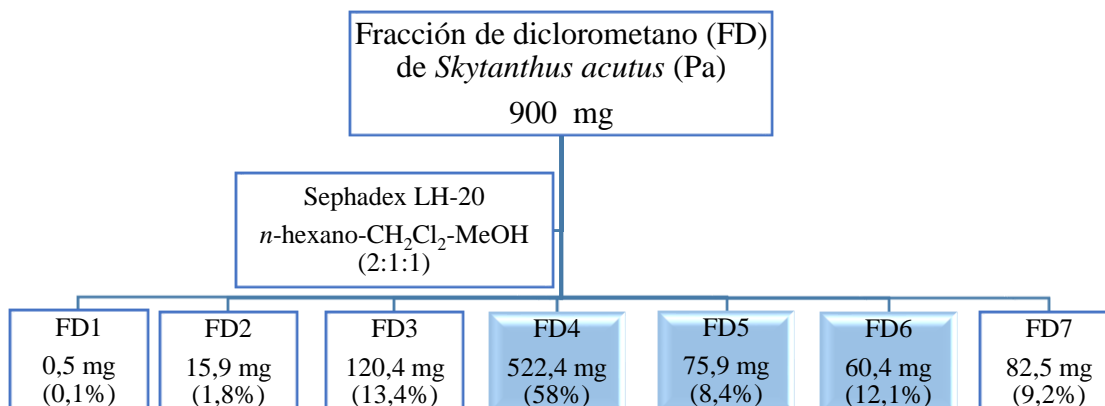


Figura 28. Estructura química del mio-inositol, identificado en la fracción de diclorometano de *Pintoa chilensis* (f).

6.4.2. Fraccionamiento de la fracción de diclorometano (FD) y purificación de moléculas de *S. acutus* (Pa).

La fracción de diclorometano (FD) fue sometida a una separación en columna empleando Sephadex LH-20 y utilizando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano-CH₂Cl₂-MeOH (2:1:1). Obteniendo 50 subfracciones reagrupadas en 7.



Esquema 4. Fraccionamiento de la fracción de Diclorometano (FD), obtenida del extracto etanólico de *S. acutus* (f).

Seguidamente se evaluó la actividad antiproliferativa de las mismas (**Tabla 21** y **Figura 29**). Las subfracciones FD3 – FD7 mostraron excelente actividad antiproliferativa, con valores de IG_{50} entre 1 – 36 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 29). Sin embargo, las subfracciones FD5 y FD6 mostraron valores de $IG_{50} < 0,625 \mu\text{g/mL}$ para 4 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573) y 5 (A549, HBL-100, HeLa, SW1573 y T-47D) líneas celulares estudiadas, respectivamente. Considerando estos resultados, se seleccionaron estas subfracciones junto con la subfracción FD4 para poder aislar y caracterizar los compuestos causantes de la actividad antiproliferativa.

Tabla 21. Valores de IG_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de las subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa), contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.

Subfracciones	IG_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
FD1	62	62	62	62	62	62
FD2	62	62	62	62	62	62
FD3	19	20	18	19	24	30
FD4*	6,3	15	13	11	30	21
FD5*	<0,625	<0,625	<0,625	<0,625	1,4	2,0
FD6*	<0,625	<0,625	<0,625	<0,625	<0,625	0,64
FD7	25	36	23	26	33	36

Concentración máxima estudiada: 62,5 $\mu\text{g/mL}$. * Fracciones activas.

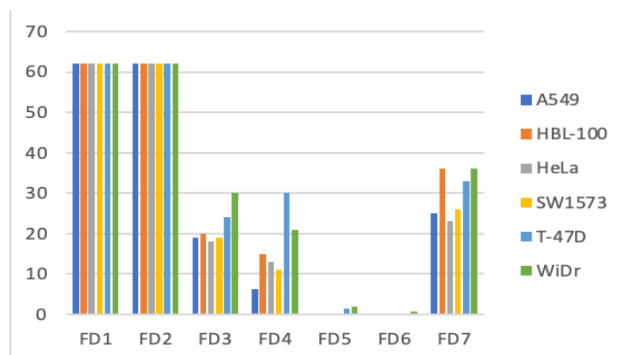
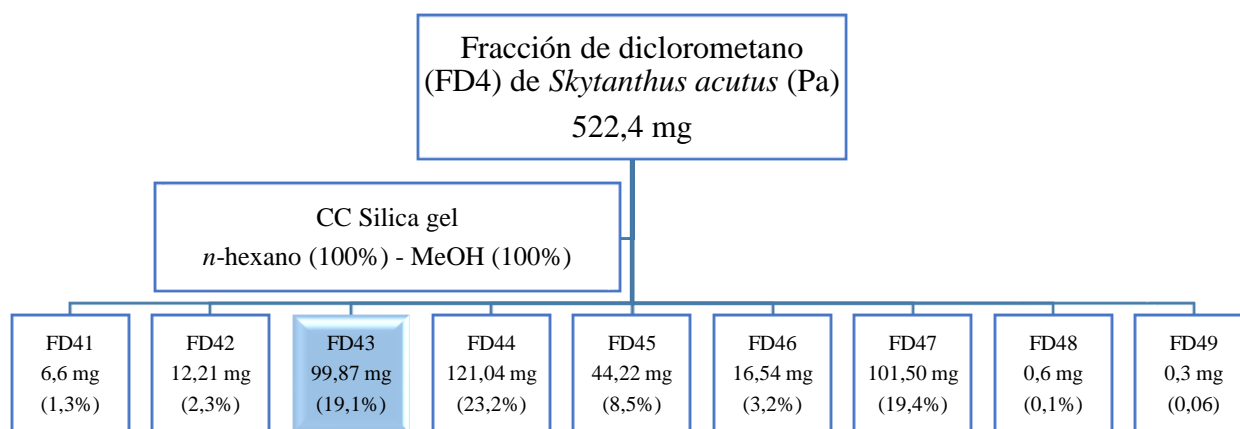


Figura 29. IG_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de las subfracciones de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa) contra seis líneas celulares tumorales humanas: A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.

6.4.2.1. Purificación de la subfracción FD4 obtenida a partir de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

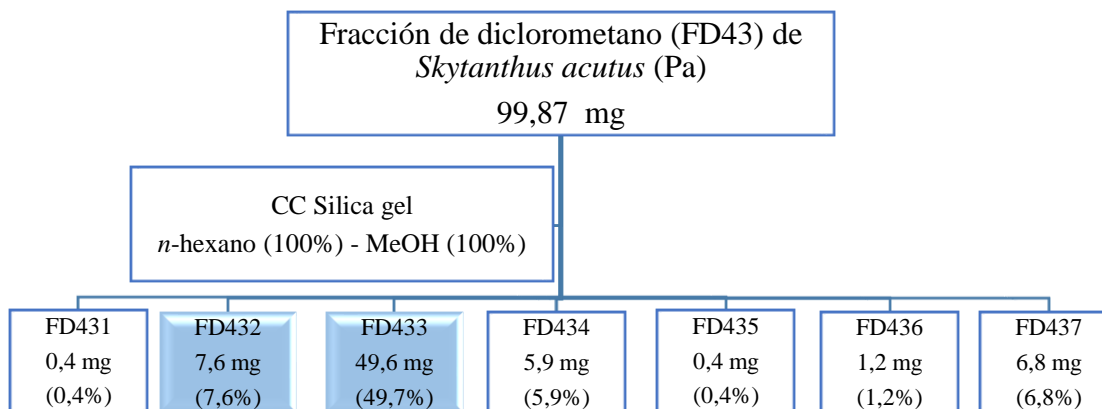
La subfracción FD4 fue purificada mediante una separación en columna flash de Sílica gel. La fase móvil fue una mezcla de solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (100%) – MeOH (100%), obteniendo 35 subfracciones reagrupadas en 9 (**Esquema 6**). Las fracciones mayoritarias (FD43, FD44 y FD47) fueron purificadas mediante cromatografía de columna.



Esquema 5. Separación de la fracción FD4 de diclorometano de *S. acutus* (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.

6.4.2.1.1 Purificación de la subfracción FD43 obtenida a partir de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

La subfracción FD43 fue purificada mediante una separación en columna flash de Sílica gel. La fase móvil fue una mezcla de solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (100%) – MeOH (100%), obteniendo 7 subfracciones (**Esquema 7**). Las fracciones mayoritarias (FD432 y FD433) fueron analizadas por espectroscopía de ¹H-RMN.



Esquema 6. Separación de la fracción FD43 de diclorometano de *S. acutus* (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.

6.4.2.1.1.1. Elucidación estructural de las subfracciones mayoritarias obtenidas de FD43.

Al analizar el espectro de ^1H -RMN de las subfracciones mayoritarias FD432 y FD433 se observó una mezcla de compuestos con señales características de triterpénicos con núcleo esteroidal (**Figura 30**).

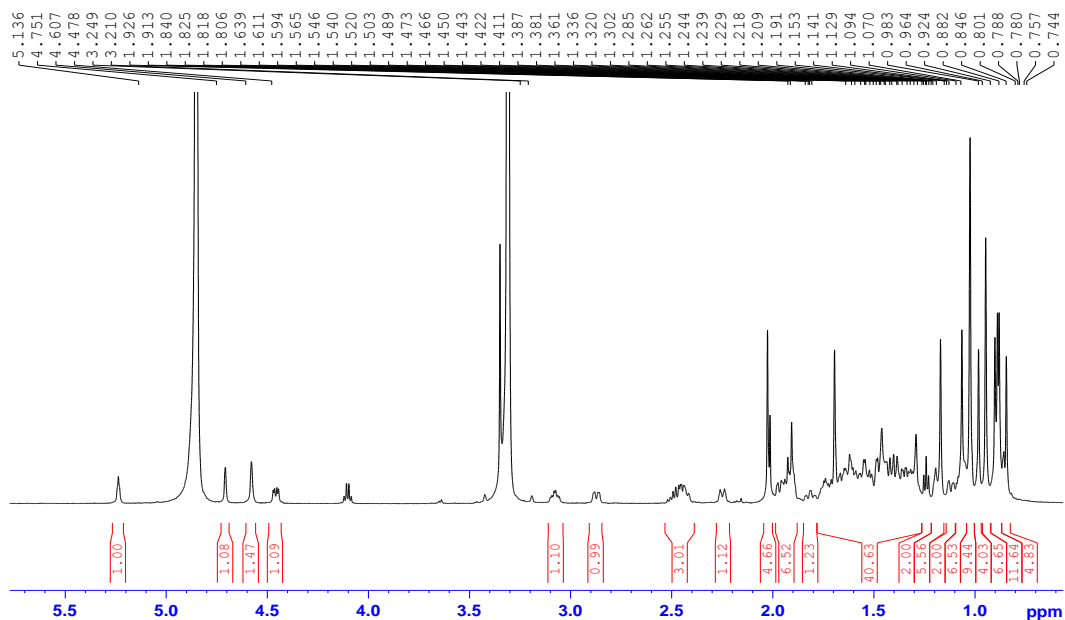
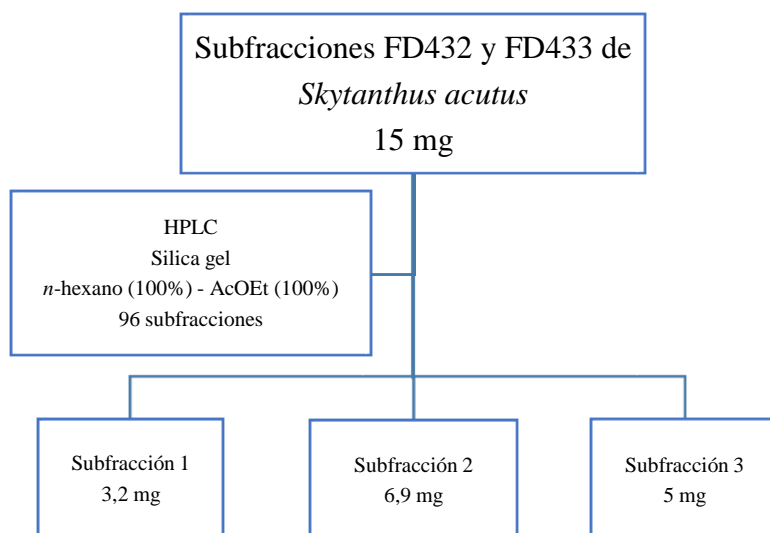


Figura 30. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CD_3OD) de la mezcla de compuestos triterpénicos.

Considerando lo observado en el espectro de ^1H -RMN de la mezcla, se decidió separar los compuestos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando una columna semipreparativa de sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de solventes de polaridad creciente desde *n*-hexano (100%) – AcOEt (100%) en modo gradiente, obteniendo 98 subfracciones reagrupados en 3 subfracciones al analizar la cromatografía de capa fina (**Esquema 8, Figura 31 y Figura 32**).



Esquema 7. Separación de las subfracciones FD432 y FD433 de *S. acutus* (Pa), utilizando HPLC preparativo.

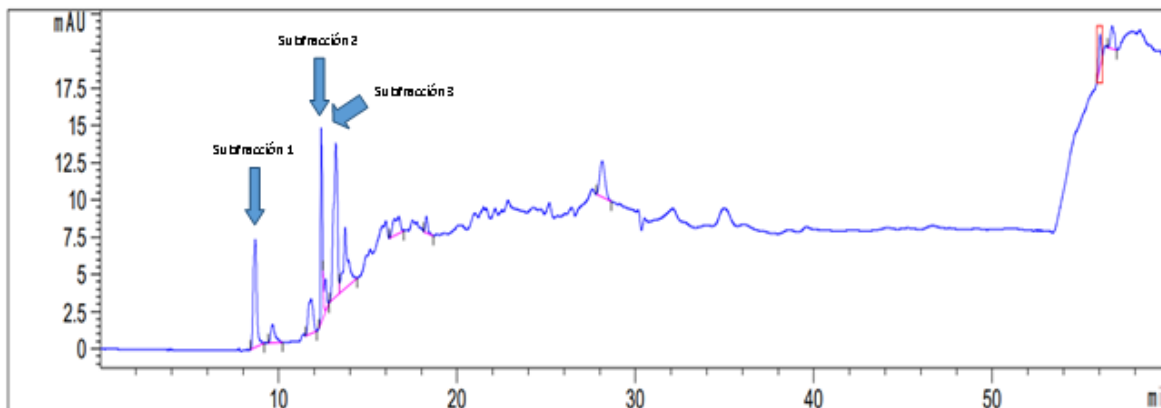


Figura 31. Cromatograma de las subfracciones obtenidas a través de la separación de la mezcla mediante HPLC preparativo.

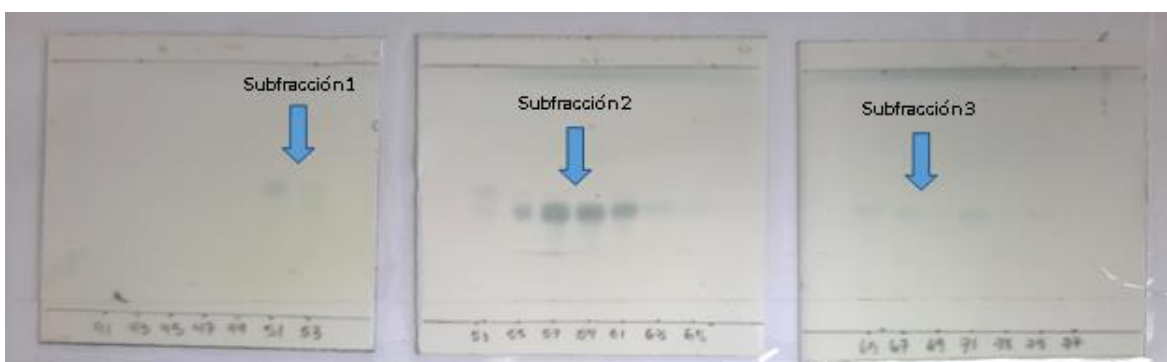


Figura 32. Cromatografía de capa fina de las subfracciones obtenidas a través de la separación de la mezcla mediante HPLC preparativo.

Las tres subfracciones fueron analizadas por RMN de ^1H y ^{13}C para su elucidación estructural. La elucidación estructural de la subfracción 1 (**compuesto 1**) se realizó utilizando técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas. El espectro de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra el ion $[\text{M} - 1]^+$ a m/z 455,3525 que se corresponde con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (456,36) (**Figura 34**).

La estructura de naturaleza triterpénica del compuesto se dedujo de manera inequívoca al analizar los espectros de ^1H -RMN en CD_3OD (**Tabla 22**). El espectro mostró dos señales a δ_{H} 4,67 y 4,55 ppm, correspondiente a dos protones vinílicos exocíclicos. También se observó una señal a δ_{H} 3,10 ppm, correspondiente a un protón carbinólico. Otra señal a δ_{H} 3,00 ppm, correspondiente a un protón α a un sistema vinílico. Finalmente se observaron seis grupos metilos a δ_{H} 1,65; 0,97; 0,93; 0,91; 0,82 y 0,71 ppm.

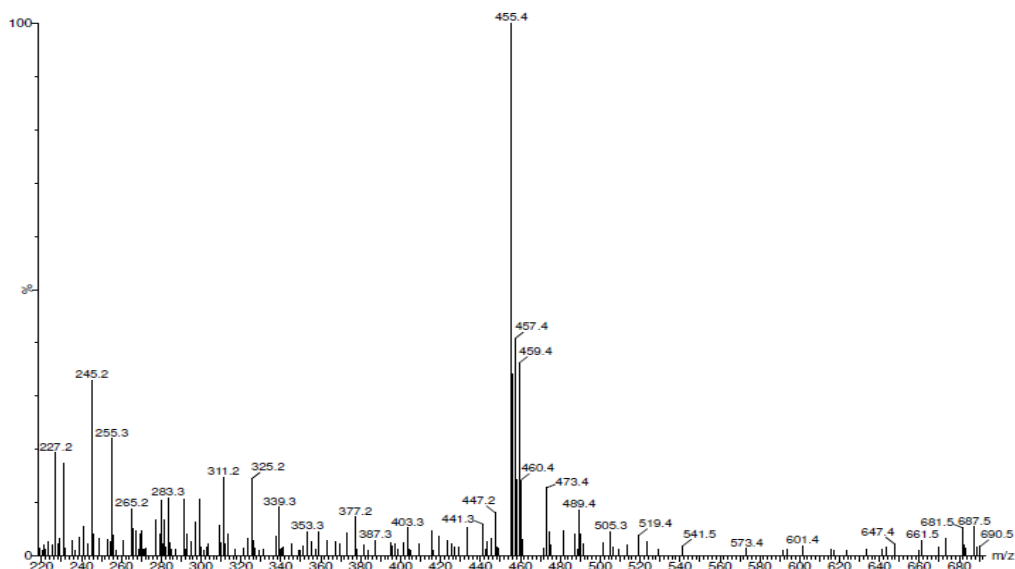


Figura 33. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 1.

Tabla 22. Datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 1: ácido betulínico (600 MHz, CD_3OD).

Asignación	δ_{C}	δ_{H}	DEPT-135
1	40,1	2,30 (td, $J = 1,2; 2,4; 8,2$ Hz, 1H) 0,91 (m, 1H)	CH_2
2	28,1	1,58 (m, 11H)	CH_2
3	79,7	3,09 (dd, $J = 3,2$ y $7,6$ Hz)	CH
4	38,2	-	C
5	56,9	0,67 (m, 1H)	CH
6	19,6	1,65 (m, 2H)	CH_2
7	35,6	1,31 (m, 11H)	CH_2
8	43,6	-	C
9	50,5	1,58 (m, 3H)	CH
10	42,0	-	C
11	22,1	1,31 (m, 11H)	CH_2
12	26,9	1,65 (m, 2H)	CH_2
13	40,0	1,65 (m, 2H)	CH
14	40,1	-	C
15	30,9	1,31 y 1,13 (m, 1H)	CH_2
16	31,8	1,88 y 1,31 (m, 1H)	CH_2
17	57,6	-	C
18	52,0	1,31 – 1,33 (m, 11H)	CH
19	52,0	3,05 – 3,01 (m, 1H)	CH
20	152,1	-	C
21	33,5	2,20 (dt, $J = 2,0; 6,4$ Hz, 1H)	CH_2
22	38,3	1,88 y 1,31 (m, 1H)	CH_2
23	28,6	0,93 (s, 3H)	CH_3
24	16,1	0,71 (s, 3H)	CH_3
25	17,6	0,82 (s, 3H)	CH_3
26	17,6	0,97 (s, 3H)	CH_3
27	15,1	0,91 (s, 3H)	CH_3
28	185,8	-	C
29	110,1	4,67 y 4,55 (s, 1H)	CH_2
30	19,4	1,65 (s, 3H)	CH_3

El análisis del espectro de ^{13}C -RMN (**Tabla 22**), muestra la presencia de 30 carbonos. Una señal a δ_{C} 185,8 ppm asignado a un carbonilo de ácido. Dos señales a δ_{C} 152,1 y 110,1 ppm atribuibles a carbonos vinílicos. Una señal a δ_{C} 79,7 ppm atribuible a un carbono carbinólico. Otra señal a δ_{C} 50,6 ppm atribuible a un carbono α a un carbono vinílico. También se observaron seis señales a δ_{C} 28,6; 19,4; 17,6; 16,10 y 15,1 ppm atribuibles a carbonos metílicos. El estudio de los experimentos de RMN 2D realizados incluyeron ^1H - ^1H -COSY, HMBC y HSQC los cuales permitieron establecer la estructura del compuesto como un triterpeno pentacíclico conocido como ácido betulínico (**Figura 34**), previamente reportado (Noviany and Osman, 2021) (**Tabla 23**). Sin embargo, es la primera vez que se reporta este compuesto para esta especie de planta.

Tabla 23. Comparación de los datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 1: ácido betulínico (600 MHz, CD3OD), junto con lo reportado por Noviany 2021 (400 MHz, DMSO- d_6).

Asignación	δ_{C}	δ_{H}	Referencia Noviany 2021 δ_{C}	Referencia Noviany 2021 δ_{H}
1	40,1	2,30 (td, $J = 1,2; 2,4; 8,2$ Hz, 1H) 0,91 (m, 1H)	40,2	1,52, dd (11,2; 9,4) y 1,57 – 1,58, m
2	28,1	1,58 (m, 11H)	28,2	1,43 – 1,45, m
3	79,7	3,09 (dd, $J = 3,2$ y 7,6 Hz)	79,8	2,95 – 2,98, m
4	38,2	-	39,9	-
5	56,9	0,67 (m, 1H)	57,63	0,61 – 0,63, m
6	19,6	1,65 (m, 2H)	19,6	1,48 – 1,50, m 1,31 – 1,33, m
7	35,6	1,31 (m, 11H)	35,7	1,31 – 1,33, m y 1,45 – 1,47, m
8	43,6	-	43,7	-
9	50,5	1,58 (m, 3H)	50,6	1,58 – 1,60, m
10	42,0	-	42,1	-
11	22,1	1,31 (m, 11H)	22,2	1,23, s
12	26,9	1,65 (m, 2H)	27,0	0,97 – 0,99, m y 1,63 – 1,65, m
13	40,0	1,65 (m, 2H)	39,8	2,21 – 2,24, m
14	40,1	-	40,2	-
15	30,9	1,31 y 1,13 (m, 1H)	30,9	1,17 – 1,19, m y 1,23 – 1,25, m
16	31,8	1,88 y 1,31 (m, 1H)	31,9	1,36 – 1,38, m y 2,13, dd (11,3; 9)
17	57,6	-	49,7	-
18	52,0	1,31 – 1,33 (m, 11H)	49,6	1,52 – 1,54, m
19	52,0	3,05 – 3,01 (m, 1H)	49,7	2,91 – 2,94, m
20	152,1	-	152,1	-
21	33,5	2,20 (dt, $J = 2,0; 6,4$ Hz, 1H)	31,8	1,77, d (6,9; 7,5) y 1,36 – 1,38, m
22	38,3	1,88 y 1,31 (m, 1H)	38,2	1,83, d (6,9; 4,3) y 1,42 – 1,44, m
23	28,6	0,93 (s, 3H)	28,1	0,87, s
24	16,1	0,71 (s, 3H)	16,3	0,65, s
25	17,6	0,82 (s, 3H)	16,7	0,70, s
26	17,6	0,97 (s, 3H)	16,9	0,93, s
27	15,1	0,91 (s, 3H)	15,3	0,87, s
28	185,8	-	180,2	-
29	110,1	4,67 y 4,55 (s, 1H)	110,3	4,56 y 4,69, s
30	19,4	1,65 (s, 3H)	19,6	1,64, s

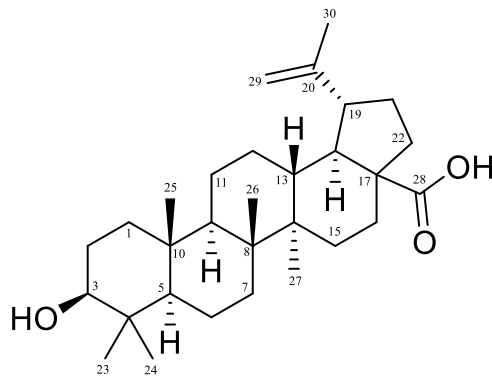


Figura 34. Estructura química del compuesto 1: ácido betulínico.

El análisis de ^1H -RMN de la subfracción 2 mostró una mezcla de compuestos triterpénicos, isómeros del compuesto 1, cuya elucidación fue discutida anteriormente. Esta mezcla fue verificada debido a la presencia de dos tripletes solapados en δ_{H} 5,24 y 5,23 ppm (Figura 35 y 36) que integran para dos protones, posiblemente protón vinílico del ácido oleanólico. Además, en el espectro de ^{13}C -RMN se observan 60 carbonos (Figura 37), lo que confirma la presencia de la mezcla. Por otro lado, se confirma que ambos compuestos son isómeros del compuesto 1 ya que en el espectro de masas de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra el ion $[\text{M} - 1]^+$ a m/z 455,4 y el ion molecular a m/z 456,4 que se corresponde con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (456,36) (Figura 38).

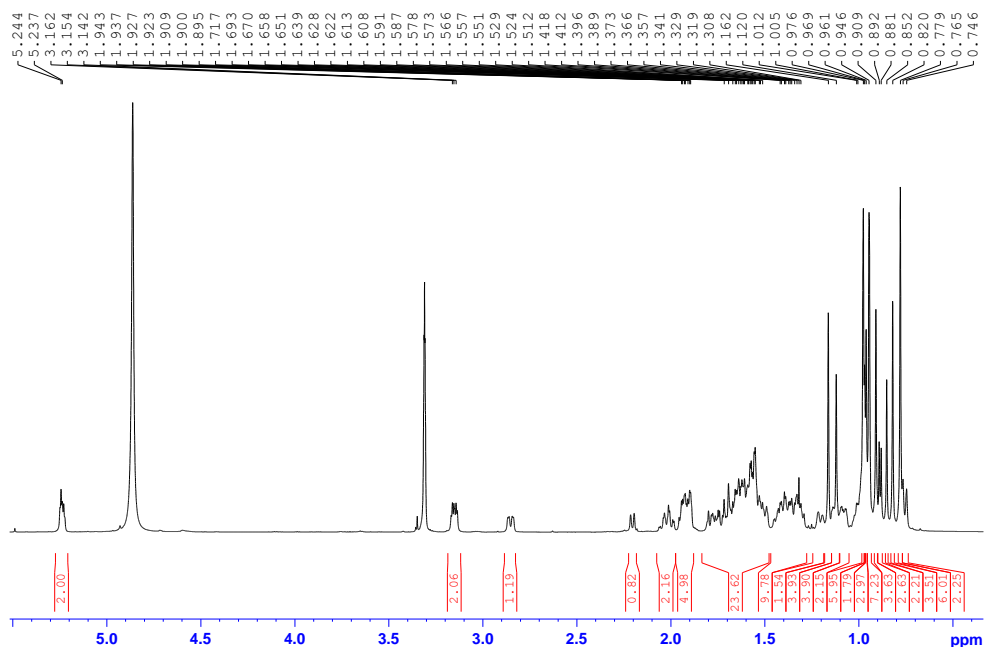


Figura 35. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CD_3OD) de la subfracción 2: mezcla de compuestos triterpénicos.

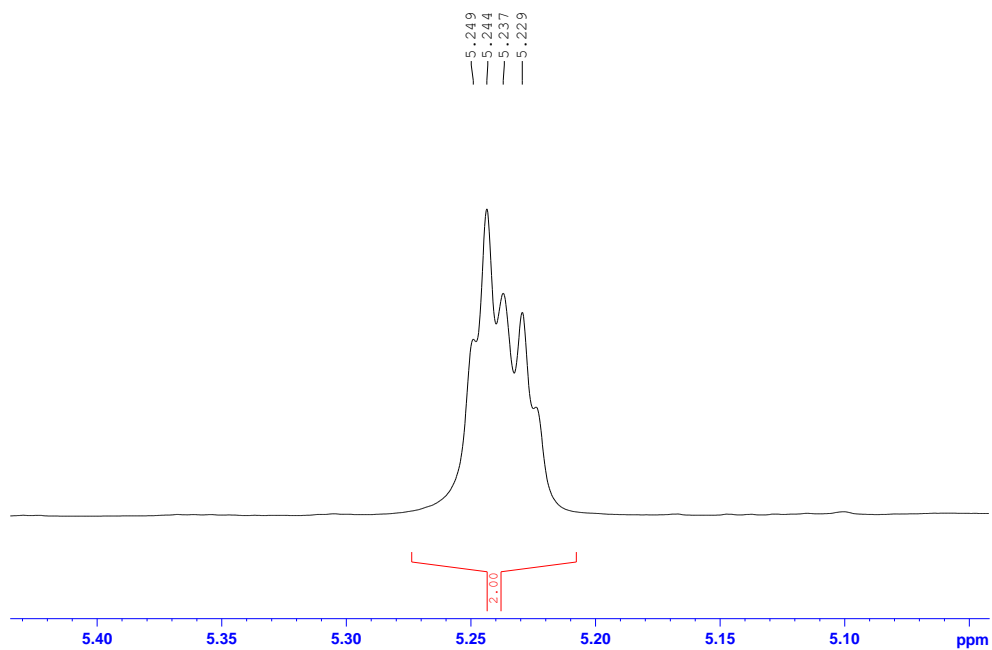


Figura 36. Ampliación del espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CD_3OD) de la subfracción 2: mezcla de compuestos triterpénicos.

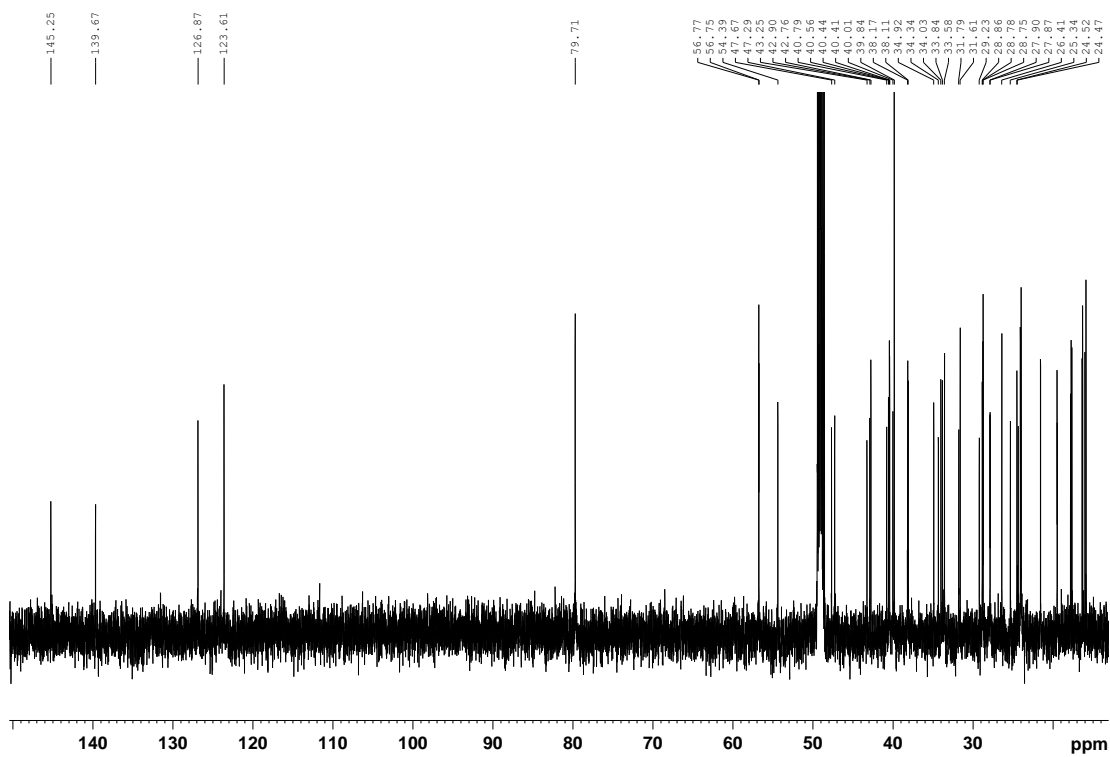


Figura 37. Espectro de ^{13}C -RMN (600 MHz, CD_3OD) de la subfracción 2: mezcla de compuestos triterpénicos.

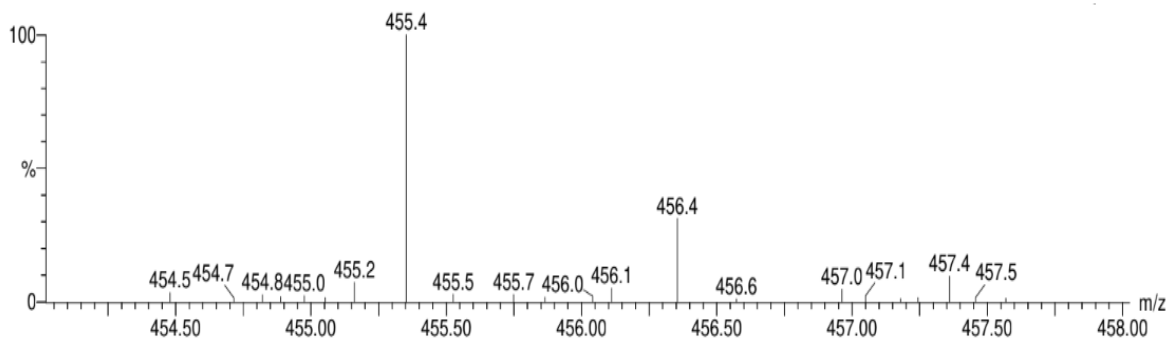


Figura 38. Espectro de masas de alta resolución de la subfracción 2: Mezcla de compuestos triterpénicos.

Se procedió a la separación de la mezcla de isómeros mediante una reacción de metilación con diazometano del ácido carboxílico presente en la estructura (**Figura 39**). Seguidamente se intentó la separación del producto de la reacción mediante cromatografía flash en cartuchos de sílica gel (Si_{60}), utilizando una mezcla de hexano/ AcOEt. Al analizar el espectro de 1H -RMN (**Figura 40**), se observó la mezcla de compuesto, pero a diferencia del espectro de 1H -RMN (**Figura 36**) se observa una mejora en la resolución de los tripletes en δ_H 5,24 y 5,23 ppm (**Figura 41** y **Figura 42**). También se intentó la separación de la mezcla utilizando una columna semipreparativa quiral, pero no se logró la separación de estos.

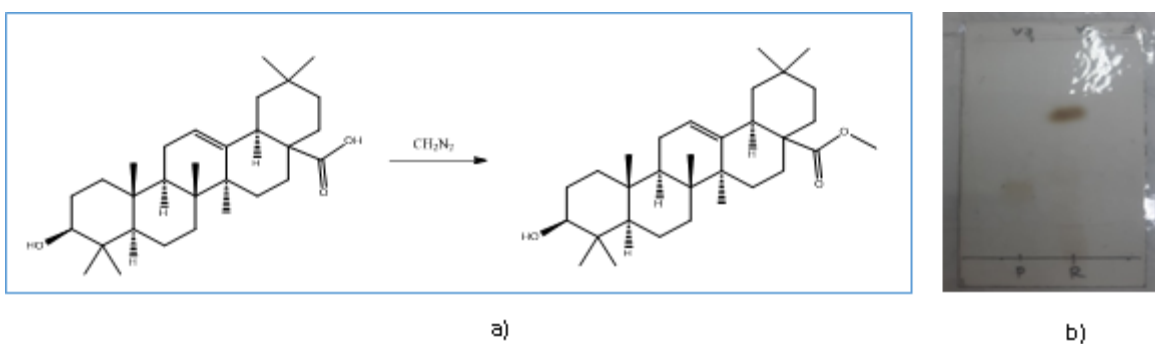


Figura 39. a) Reacción de metilación del ácido carboxílico con diazometano (CH_2N_2). b) TLC de la reacción.

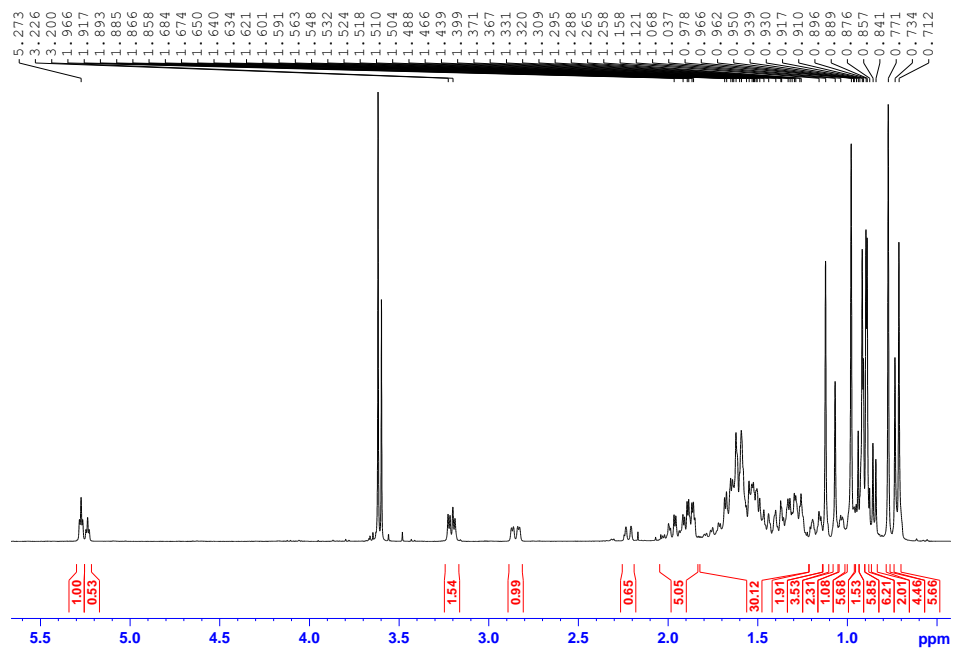


Figura 40. Espectro de $^1\text{HRMN}$ (400 MHz, CDCl_3) de la subfracción 2 metilada: mezcla de compuestos triterpénicos metilados.

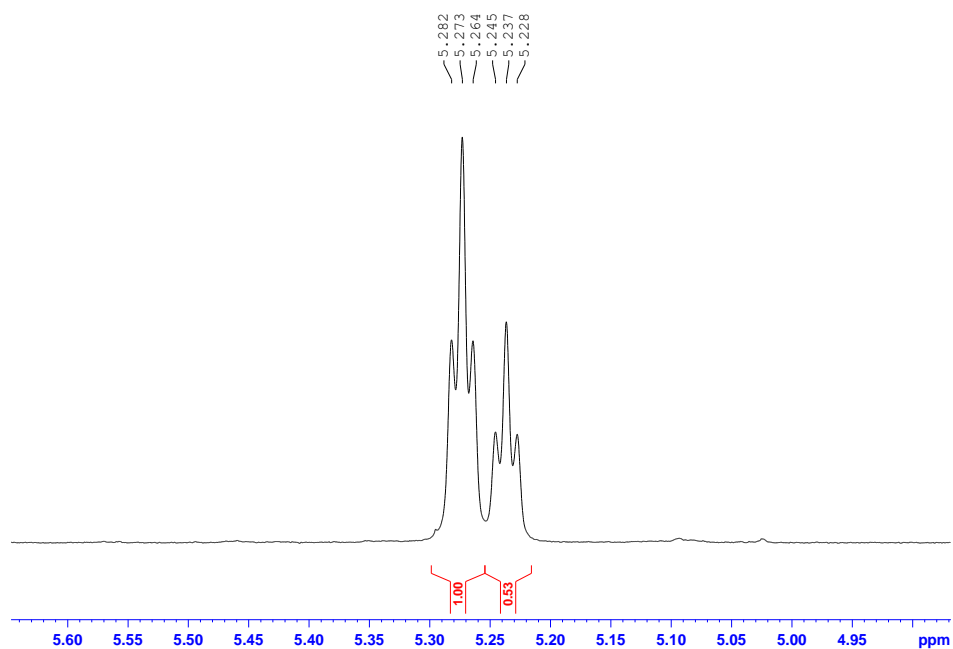


Figura 41. Ampliación del espectro de $^1\text{HRMN}$ (400 MHz, CDCl_3) de la subfracción 2 metilada: mezcla de compuestos triterpénicos metilados.

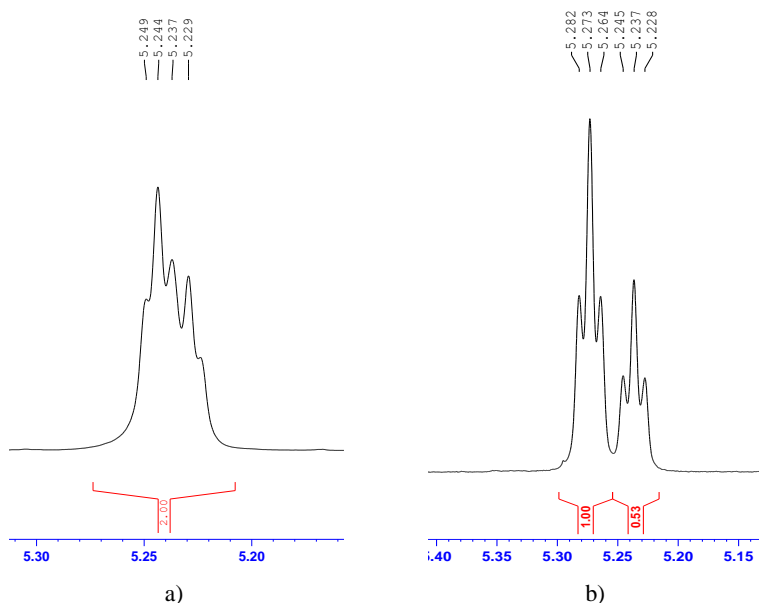


Figura 42. Comparación de las ampliaciones del espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) de la subfracción 2 sin metilar (a) y metilada (b).

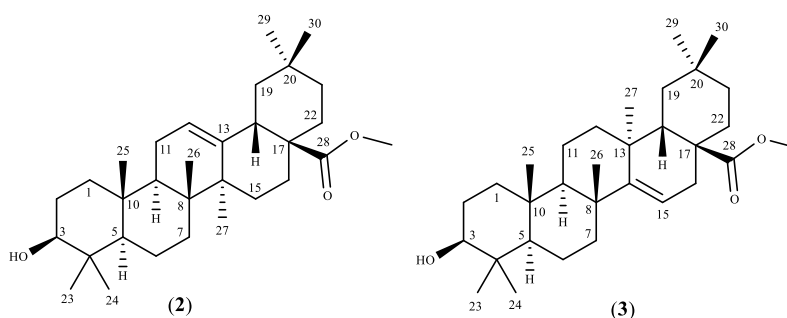
Finalmente, no se pudo realizar la separación de la mezcla de isómeros (relación 2:1) de la subfracción 2. Sin embargo, por medio del análisis de RMN se pudo asignar la posible estructura del isómero del ácido oleanólico metilado (Compuesto 3), así como el ácido oleanólico metilado (Compuesto 2).

La estructura de naturaleza triterpénica del compuesto 2 se dedujo al analizar los espectros de $^1\text{H-RMN}$ en CD_3OD (Tabla 24). El espectro mostró dos señales a δ_{H} 5,27 y 5,24 ppm, correspondiente a dos protones vinílicos. También se observaron dos señales a δ_{H} 3,62 y 3,60 ppm, correspondiente a protones metoxílicos. Otra señal a δ_{H} 3,21 ppm, correspondientes a protones carbinólicos y dos señales a δ_{H} 2,85 y 2,22 ppm, correspondientes a protones alifáticos cabeza de puente. Finalmente se observaron once grupos metilos a δ_{H} 0,98; 0,94; 0,92; 0,91; 0,90; 0,89; 0,86; 0,84; 0,77; 0,72 y 0,71 ppm.

El análisis del espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (Tabla 24), muestra la presencia de 60 carbonos. Dos señales a δ_{C} 178,3 y 178,1 ppm asignados a carbonilos de ésteres. Dos señales a δ_{C} 143,8 y 138,1 ppm atribuibles a carbonos vinílicos. Dos señales a δ_{C} 79,1 y 79,0 ppm atribuibles a carbonos carbinólicos. Dos señales a δ_{C} 51,5 y 51,4 ppm atribuibles a carbonos metoxílicos. También se observaron diez señales a δ_{C} 33,1; 32,4; 28,1; 26,0; 23,7; 21,2; 16,9; 15,6; 15,4 y 15,3 ppm atribuibles a carbonos metílicos. El estudio de los experimentos de RMN 2D realizados incluyeron $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HMBC y HSQC los cuales permitieron establecer las estructuras de los compuestos, así como su relación (2:1), ambos compuestos como triterpenos pentacíclicos metilados del ácido oleanólico y su isómero (Figura 39), el ácido oleanólico es un compuesto ampliamente reportado (Ayeleso et al., 2017; Castellano et al., 2022). Sin embargo, es la primera vez que se reporta este compuesto para esta especie de planta.

Tabla 24. Datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos 2: ácido oleanólico metilado y 3: isómero del ácido oleanólico metilado (400 MHz, CDCl_3).

Asignación	Compuesto 2		Compuesto 3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	38,4	1,60 (m)	38,6	160 (m)
2	24,2	1,10 – 1,00 (m)	23,4	1,90 (m)
3	79,0	3,20 (dd, $J = 4,78$ y 11 Hz)	79,1	3,20 (dd, $J = 4,78$ y 11 Hz)
4	37,0	-	38,8	-
5	55,2	0,72 (m)	52,9	1,32 (m)
6	18,3	1,53 (m)	17,04	0,85 (m)
7	32,4	1,68 (m)	27,71	1,60 (m)
8	39,5	-	39,3	-
9	47,6	1,52 (m)	47,6	1,52 (m)
10	36,7	-	41,6	-
11	23,3	1,90 (m)	22,7	1,60 (m)
12	125,6	5,24 (t, $J = 3,8$ y $7,6$ Hz)	33,9	1,18 (m)
13	138,2	-	37,0	-
14	46,7	-	143,8	-
15	27,2	1,60 (m)	122,4	5,27 (t, $J = 3,6$ y $7,5$ Hz)
16	23,1	1,60 (m)	30,7	1,25 (m)
17	39,0	-	48,10	-
18	41,5	2,85 (dd, $J = 4,4$ y 14 Hz)	39,9	2,22 (d, $J = 11$ Hz)
19	45,9	1,62 y 1,14 (m)	45,9	1,62 y 1,14 (m)
20	31,6	-	30,70	-
21	33,0	1,48 (m)	33,0	1,48 (m)
22	32,7	1,68 (m)	28,0	1,03 – 1,12 (m)
23	28,1	0,98 (s)	28,1	0,84 (s)
24	15,6	0,91 (s)	15,6	0,71 (s)
25	15,3	0,71 (s)	15,4	0,73 (s)
26	16,9	0,89 (s)	23,6	0,98 (s)
27	26,0	0,92 (s)	21,2	0,86 (s)
28	178,1	-	178,3	-
29	33,1	0,90 (s)	32,4	0,94 (s)
30	23,7	0,77 (s)	28,1	0,77 (s)
OMe	51,6	3,62 (s)	51,5	3,60 (s)

**Figura 43.** Estructuras químicas del compuesto 2: ácido oleanólico metilado y el compuesto 3: isómero del ácido oleanólico metilado.

La elucidación estructural de la subfracción 3 (**compuesto 4**) se realizó utilizando técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas. El espectro de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra el ion a m/z 456,4 que se corresponde con la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ (456,36) (**Figura 40**).

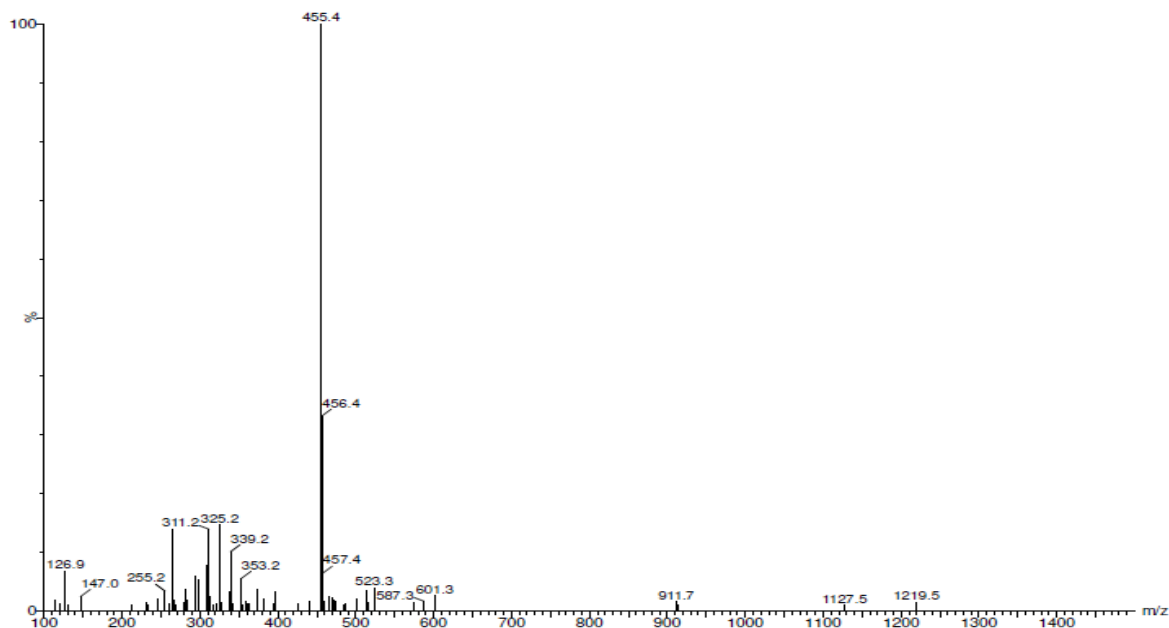


Figura 44. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 4.

La estructura de naturaleza triterpénica del compuesto (compuesto 4), isómero del ácido betulínico, se dedujo de manera inequívoca al analizar los espectros de 1H -RMN en CD_3OD (**Tabla 25**). El espectro mostró tres señales características a δ_H 5,28, correspondiente a un protón vinílico. También se observó una señal a δ_H 3,22 ppm, correspondiente a un protón carbinólico. Otra señal a δ_H 2,82 ppm, correspondiente a un protón alifático cabeza de puente. Finalmente se observaron siete grupos metilos a δ_H 1,13; 0,98; 0,92; 0,91; 0,90; 0,77 y 0,74 ppm.

El análisis del espectro de ^{13}C -RMN (**Tabla 25**), muestra la presencia de 30 carbonos. Una señal a δ_C 183,3 ppm asignado a un carbonilo de ácido. Dos señales a δ_C 143,6 y 122,6 ppm atribuibles a carbonos vinílicos. Una señal a δ_C 79,0 ppm atribuible a un carbono carbinólico. Otra señal a δ_C 41,6 ppm atribuible a un carbono α a un carbono vinílico. También se observaron siete señales a δ_C 33,0; 28,1; 25,9; 23,6; 17,10; 15,5 y 15,3 ppm atribuibles a carbonos metílicos. El estudio de los experimentos de RMN 2D realizados incluyeron HMBC y HSQC los cuales permitieron establecer la estructura del compuesto como un triterpeno pentacíclico conocido como ácido oleanólico (**Figura 41**), previamente reportado (Seebacher et al., 2003) (**Tabla 26**). Sin embargo, es la primera vez que se reporta este compuesto para esta especie de planta.

Tabla 25. Datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 4: ácido oleanólico (600 MHz, CD_3OD).

Asignación	δ_{C}	δ_{H}	DEPT-135
1	38,4	1,66 (m, 8H)	CH_2
2	27,2	1,66 (m, 8H)	CH_2
3	79,0	3,22 (dd, $J = 4,6; 11$ Hz, 1H)	CH
4	38,7	-	C
5	55,2	0,72 (s, 1H)	CH
6	18,3	1,30 (m, 6H)	CH_2
7	32,4	1,98 (m, 1H) y 1,66 (m, 8H)	CH_2
8	39,2	-	C
9	47,6	1,66 (m, 8H)	CH
10	37,1	-	C
11	23,4	1,96 (m, 1H) y 1,66 (m, 8H)	CH_2
12	122,6	5,28 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H)	CH
13	143,6	-	C
14	41,6	-	C
15	27,7	1,76 (m, 2H) y 1,10 (m, 1H)	CH_2
16	22,9	1,89 (m, 2H) y 1,66 (m, 8H)	CH_2
17	46,5	-	C
18	40,9	2,82 (dd, $J = 4,2; 13,6$ Hz, 1H)	CH
19	45,9	1,66 (m)	CH_2
20	30,7	-	C
21	33,8	1,30 (m, 6H)	CH_2
22	32,6	1,76 (m, 2H) y 1,66 (m, 8H)	CH_2
23	28,1	0,98 (s, 3H)	CH_3
24	15,5	0,92 (s, 3H)	CH_3
25	15,3	0,74 (s, 3H)	CH_3
26	17,1	0,77 (s, 3H)	CH_3
27	25,9	1,13 (s, 3H)	CH_3
28	183,3	-	$\text{C}=\text{O}$
29	33,0	0,91 (s, 3H)	CH_3
30	23,6	0,90 (s, 3H)	CH_3

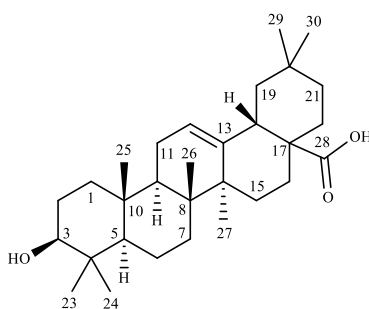
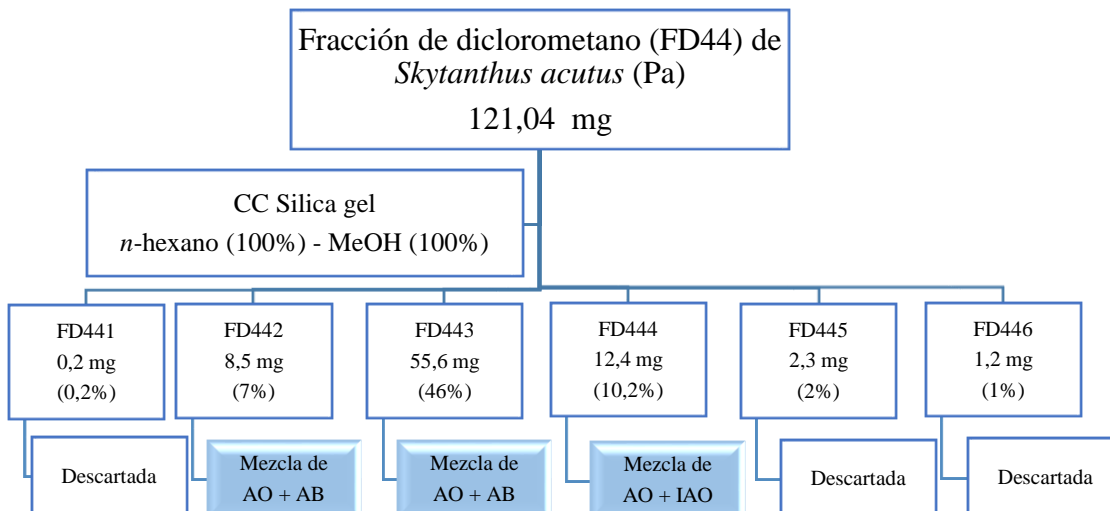
**Figura 45.** Estructura química del compuesto 4: ácido oleanólico.

Tabla 26. Comparación de los datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 4: ácido oleanólico (600 MHz, CD_3OD), junto con lo reportado por Seebacher 2003 (600 MHz, Pyridine- d_5).

Asignación	δ_{C}	δ_{H}	Referencia Seebacher 2003 δ_{C}	Referencia Seebacher 2003 δ_{H}
1	38,4	1,66 (m)	39,0	1,02 y 1,57
2	27,2	1,66 (m)	28,1	1,82
3	79,0	3,22 (dd)	78,2	3,44 (dd)
4	38,7	-	39,4	-
5	55,2	0,72 (s)	55,9	0,88 (d)
6	18,3	1,30 (m)	18,8	1,58 y 1,39
7	32,4	1,98 (m) y 1,66 (m)	33,4	1,53 y 1,36
8	39,2	-	39,8	-
9	47,6	1,66 (m)	48,2	1,71
10	37,1	-	37,4	-
11	23,4	1,96 (m) y 1,66 (m)	23,8	1,96
12	122,6	5,28 (t)	12,6	5,49 (s)
13	143,6	-	144,8	-
14	41,6	-	42,2	-
15	27,7	1,76 (m) y 1,10 (m)	28,4	1,22 y 2,19
16	22,9	1,98 (m) y 1,66 (m)	23,8	2,12 y 1,96
17	46,5	-	46,7	-
18	40,9	2,82 (dd)	42,1	3,30 (dd)
19	45,9	1,66 (m)	46,6	1,83 y 1,32
20	30,7	-	31,0	-
21	33,8	1,30 (m)	34,3	1,46 y 1,23
22	32,6	1,76 (m) y 1,66 (m)	33,2	1,82 y 2,04
23	28,1	0,98 (s)	28,8	1,24 (s)
24	15,5	0,92 (s)	16,5	1,02 (s)
25	15,3	0,74 (s)	15,6	0,93 (s)
26	17,1	0,77 (s)	17,5	1,04 (s)
27	25,9	1,13 (s)	26,2	1,30 (s)
28	183,3	-	180,0	-
29	33,0	0,91 (s)	33,4	0,97 (s)
30	23,6	0,90 (s)	23,8	1,02 (s)

6.4.2.2 Purificación de la subfracción FD44 obtenida a partir de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

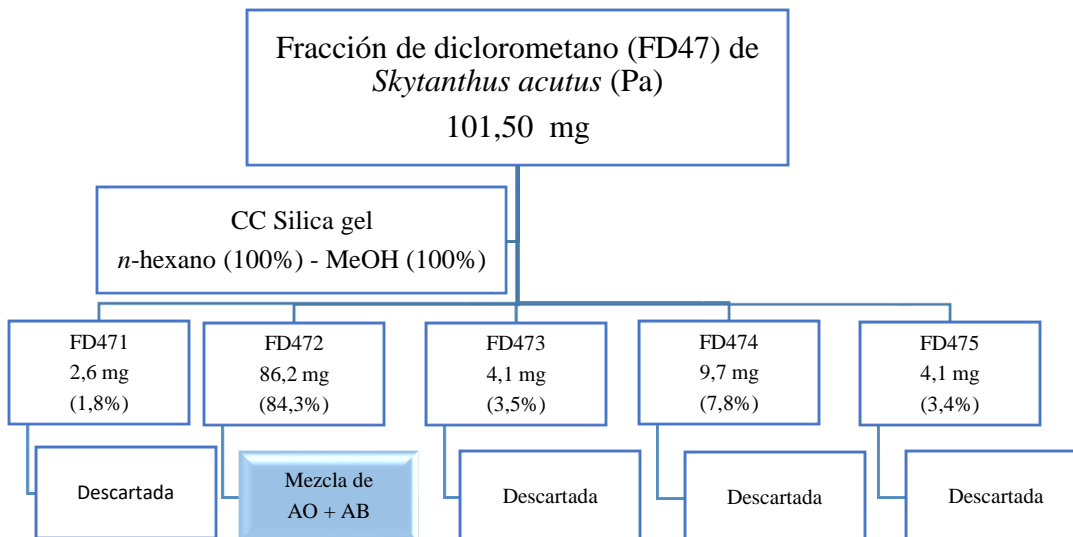
La subfracción FD44 fue purificada mediante una separación en columna flash de sílica gel. La fase móvil fue una mezcla de solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (100%) – MeOH (100%), obteniendo 6 subfracciones (**Esquema 9**). Las fracciones mayoritarias (FD442, FD443 y FD444) fueron analizadas por espectroscopía de ^1H -RMN, obteniendo los compuestos previamente analizados: ácido oleanólico (AO), ácido betulínico (AB) y el isómero del ácido oleanólico (IAO).



Esquema 8. Separación de la subfracción FD44 de *S. acutus* (Pa), utilizando cromatografía de columna flash. AO: ácido oleanólico (4), AB: ácido betulínico (1), IAO: Isómero del ácido oleanólico.

6.4.2.1.3 Purificación de la subfracción FD47 obtenida a partir de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

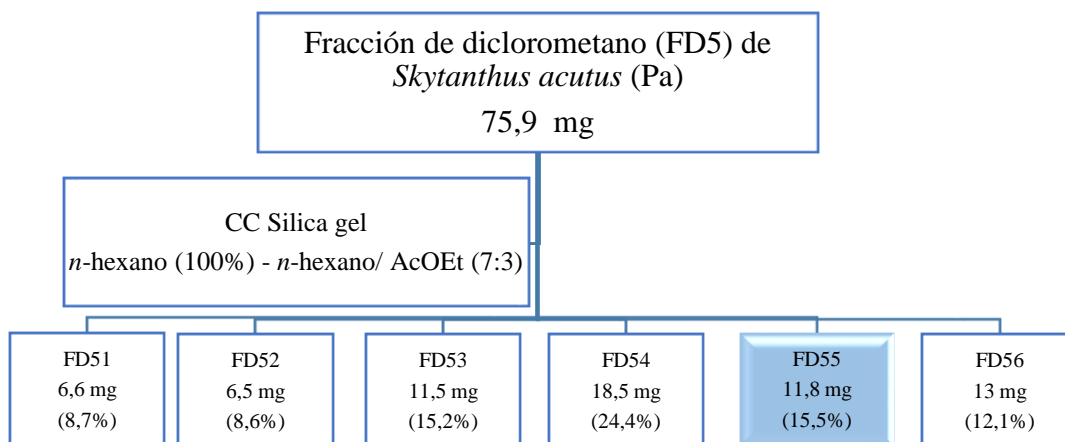
La subfracción FD47 fue purificada mediante una separación en columna flash de sílica gel. La fase móvil fue una mezcla de solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (100%) – MeOH (100%), obteniendo 5 subfracciones (**Esquema 10**). La fracción mayoritaria (FD472) fue analizada por espectroscopía de ¹H-RMN, obteniendo mezcla de dos compuestos previamente analizados: ácido oleanólico y ácido betulínico.



Esquema 9. Separación de la subfracción FD47 de *S. acutus* (Pa), utilizando cromatografía de columna flash. AO: ácido oleanólico (4) y AB: ácido betulínico (1).

6.4.2.2. Purificación de la subfracción FD5 obtenida a partir de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

La subfracción FD5 fue purificada mediante una separación en columna flash de sílica gel. La fase móvil fue una mezcla de solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (100%) – *n*-hexano/ AcOEt (7:3), obteniendo 14 subfracciones reagrupadas en 6 (**Esquema 11**). Una de las fracciones mayoritarias (FD55) fue analizada por RMN de ^1H y ^{13}C para su elucidación estructural.



Esquema 10. Separación de la fracción FD5 de diclorometano de *S. acutus* (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.

6.4.2.2.1 Elucidación estructural de la subfracción FD55 (Compuesto 5) de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

La elucidación estructural se realizó utilizando técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas. Adicionalmente se determinó la rotación óptica del mismo. El espectro de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra el ion $[M + H]^+$ a m/z 184,2 que se corresponde con la fórmula molecular $C_{11}H_{21}NO$ (183,16) (**Figura 46**).

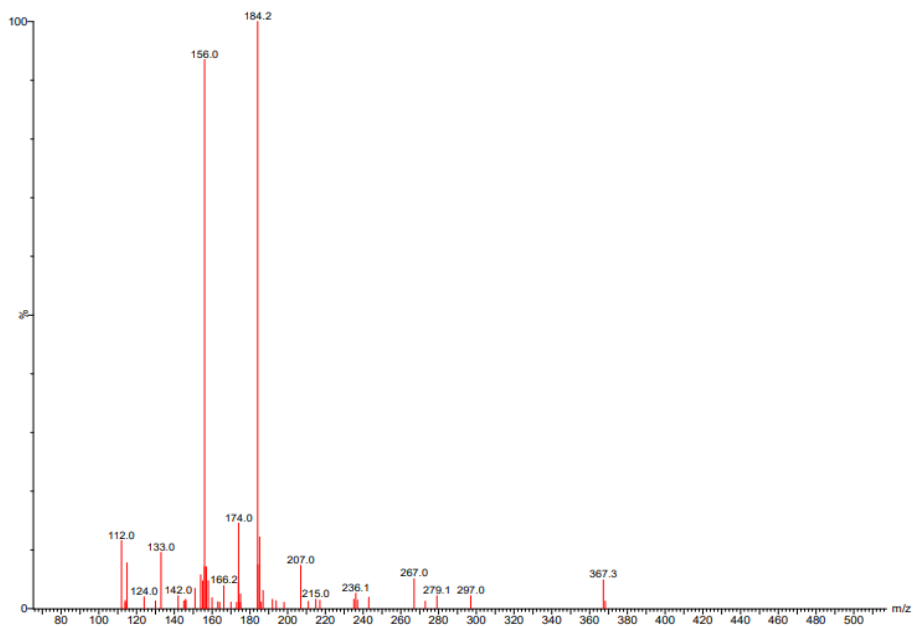


Figura 46. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 5.

La estructura de naturaleza alcaloidal del compuesto se dedujo de manera inequívoca al analizar los espectros de RMN en CD₃OD (**Tabla 27**). El espectro mostró tres señales a δ_H 3,36; 3,26; 3,21 y 3,17 ppm, correspondiente a siete protones α a átomos de Nitrógeno. También se observaron nueve señales en la región entre δ_H 2,50 – 1,40 ppm, característica de protones alifáticos (metinos y metilenos). Finalmente se observaron dos grupos metilos a δ_H 1,27 y 0,86 ppm.

Tabla 27. Datos de RMN del compuesto 5: N-óxido de β -esquitantina (600 MHz, CD₃OD).

Posición	δ_H	δ_C	DEPT	HMBC
1	3,36 (2H, m) 3,21 (1H, t, $J = 12$ Hz)	70,40	CH ₂	36,20 (2J), 42,68 (3J), 71,54 (3J).
2	-	-	-	-
3	3,37 (2H, m) 3,26 (1H, dt, $J = 2$ y 12 Hz)	71,54	CH ₂	14,23 (2J), 31,70 (2J), 42,68 (3J), 70,40 (3J).
4	2,22 (1H, m)	31,70	CH	14,23 (2J), 27,38 (3J), 42,68 (3J).
5	1,81 (1H, m)	42,68	CH	14,23 (2J), 36,20 (2J), 42,55 (3J).
6	1,69 (1H, m) 1,43 (1H, m)	27,38	CH ₂	33,20 (2J), 33,5 (2J), 36,20 (3J), 42,68 (3J), 31,70 (3J).
7	2,10 (1H, m) 1,28 (1H, m)	33,50	CH ₂	17,58 (2J), 42,68 (3J).
8	2,27 (1H, m)	33,20	CH	-
9	2,46 (1H, m)	36,20	CH	17,58 (2J), 70,40 (2J).
10	1,26 (3H, d, $J = 8$ Hz)	14,23	CH ₃	31,70 (2J), 42,68 (2J), 71,54 (3J).
11	0,86 (3H, d, $J = 8$ Hz)	17,58	CH ₃	33,20 (2J), 33,50 (2J), 36,20 (3J).
N-Me	3,17 (3H, s)	61,95	CH ₃	70,40 (2J), 71,54 (3J).

El análisis del espectro de ^{13}C (**Tabla 27**), muestra la presencia de cuatro señales entre δ_{C} 71,8 y 36,6 ppm atribuibles a carbonos α a átomos electronegativos (N y O) y una señal a δ_{C} 42,7 ppm atribuible a un metino cabeza de puente α a átomos electronegativos (N y O). También se observaron seis señales entre δ_{C} 33,7 y 14,6 ppm atribuibles a carbonos alifáticos incluidos dos metilos.

El estudio de los experimentos de RMN 2D realizados incluyeron ^1H - ^1H -COSY, HMBC y HSQC, los cuales permitieron establecer la estructura del compuesto como un óxido de alcaloide monoterpénico conocido como N-óxido de esquitantina (**Figura 47**), previamente reportado para esta misma planta (Lins and Felicio, 1993). Adicionalmente se determinó la rotación óptica del compuesto con un valor de $[\alpha]_{\text{D}} = -4,3^\circ$ (CHCl_3). También se confirmó la estereoquímica relativa del compuesto mediante el experimento de 1D NOESY, confirmando que el compuesto aislado es el N-óxido de β -esquitantina (**Figura 48**).

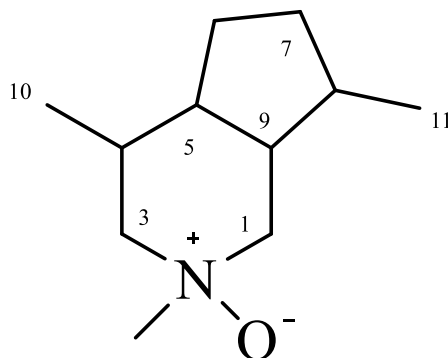


Figura 47. Estructura química del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.

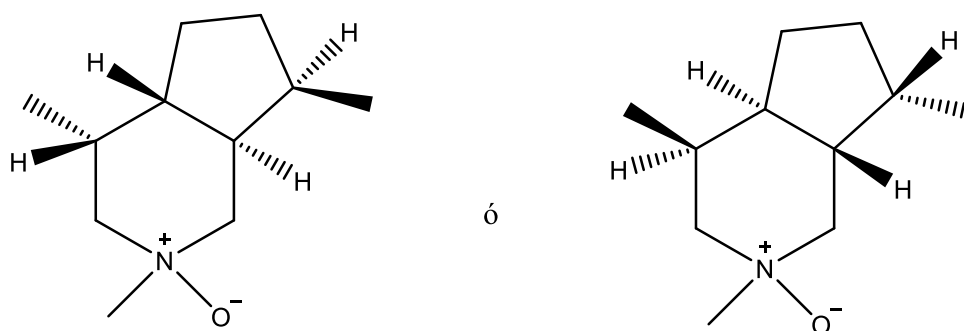


Figura 48. Estereoquímica relativa del compuesto 5: N-óxido de β -esquitantina

La estereoquímica relativa fue asignada mediante el análisis de experimentos de 1D NOESY selectivo. Al irradiar la señal en 2,46 ppm (H-9) se observa una correlación espacial con los protones metilénicos a 0,86 ppm (H-10) (**Figura 50**). Así mismo, al irradiar la señal en 1,81 ppm (H-5) se observan correlaciones con los protones en 2,22 ppm (H-4), 1,69 ppm (H-6) y los protones metílicos en 0,86 ppm (H-11) (**Figura 51**). Lo que nos lleva a sugerir que los protones cabeza de puente H-5 y H-9 se encuentran en posición trans. Esto se confirmó al irradiar la señal del proton metílico a 0,86 ppm (H-11), en donde se observan correlaciones con las señales a 2,22 ppm (H-5) y 1,81 ppm (H-4) (**Figura 52**). De esta forma la estereoquímica asignada para el compuesto es la reportada para el N-óxido de β -esquitantina (**Figura 48**), previamente reportado para esta planta (Appel and Streeter, 1970a, 1970b).

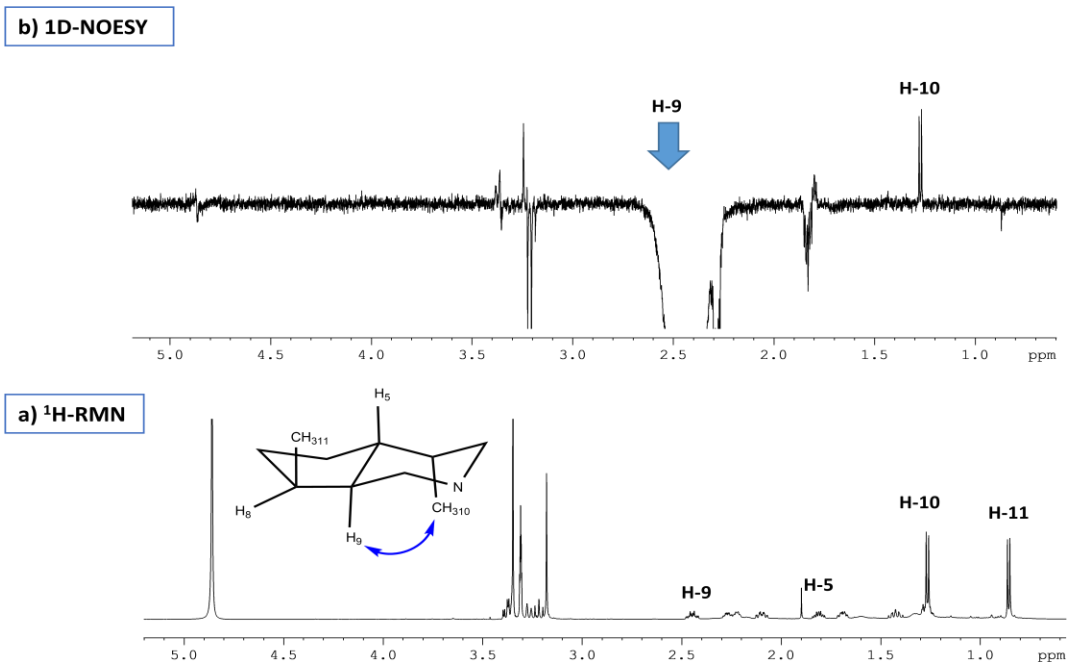


Figura 49. Parte inferior: Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5. Arriba: Experimento NOESY 1D ^1H , donde muestran las interacciones espaciales entre CH₃-10 y H-9.

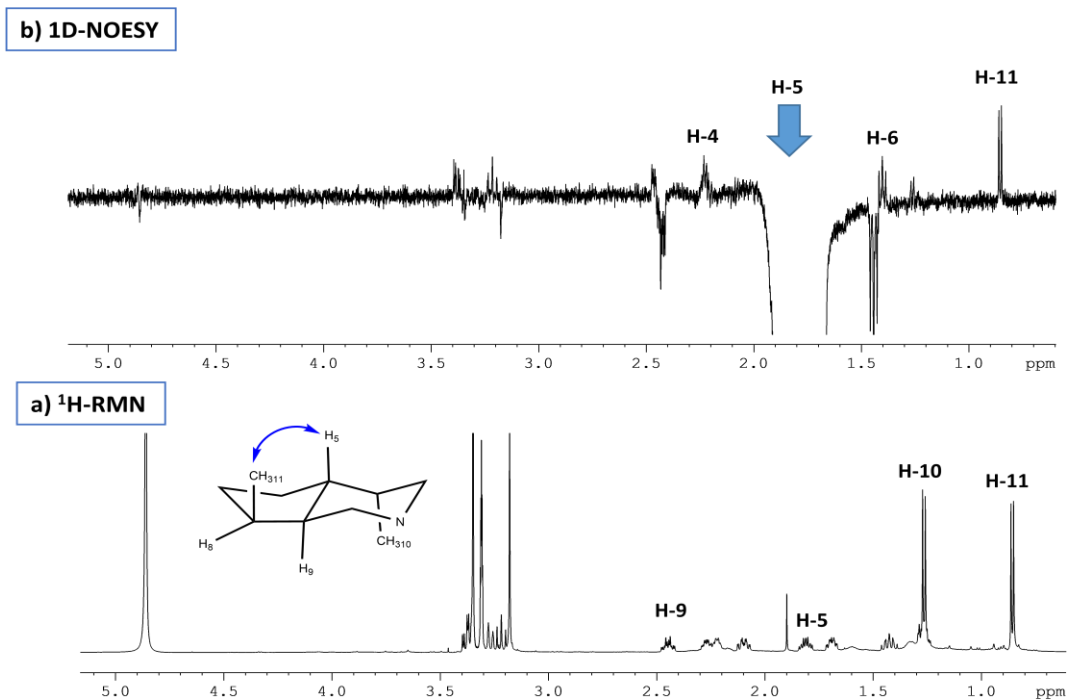


Figura 50. Parte inferior: Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5. Arriba: Experimento NOESY 1D ^1H , donde muestran las interacciones espaciales entre H-5, H-4, H-6 y H-9.

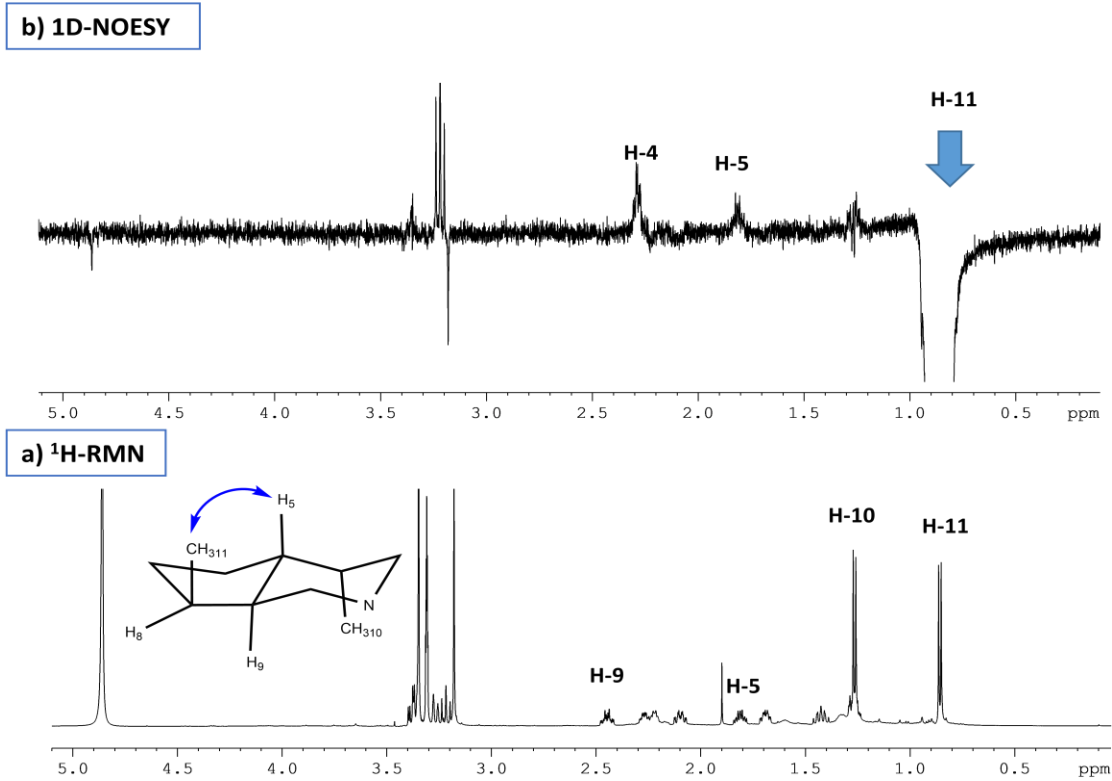
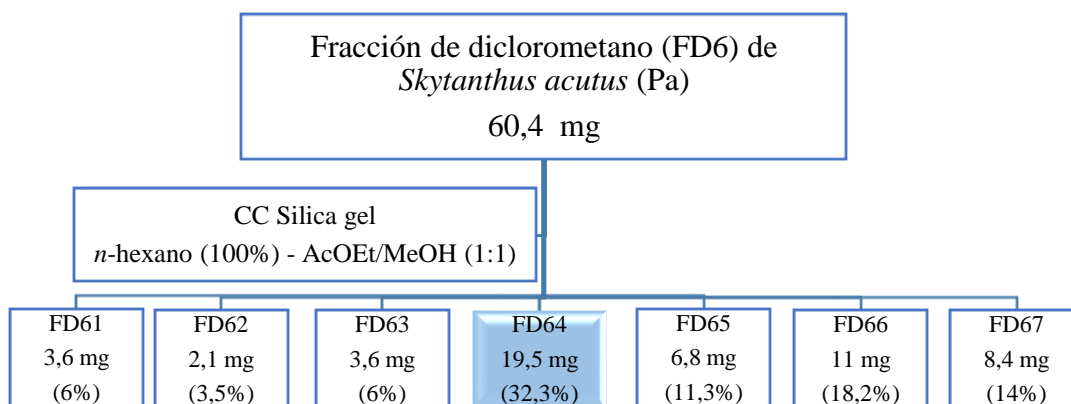


Figura 51. Parte inferior: Espectro de ^1H -RMN del compuesto 5. Arriba: Experimento NOESY 1D ^1H , donde muestran las interacciones espaciales entre H-5 y CH_3 -11.

6.4.2.3. Purificación de la subfracción FD6 obtenida a partir de la fracción de diclorometano de *S. acutus* (Pa).

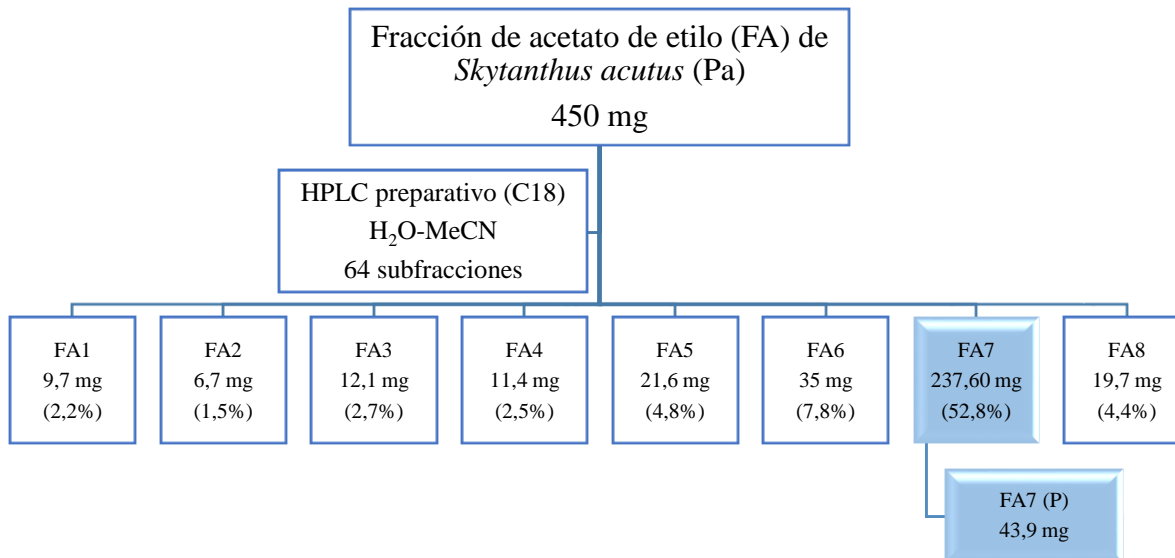
La subfracción FD6 fue purificada mediante una separación en columna flash de sílica gel. La fase móvil fue una mezcla de solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (100%) – AcOEt/MeOH (1:1), obteniendo 7 subfracciones (**Esquema 12**). Al estudiar la cromatografía de capa fina de las subfracciones se decidió analizar la subfracción FD64 mediante espectroscopía de ¹H-RMN, observando las mismas señales del compuesto 4: N-óxido de β-esquitantina.



Esquema 11. Purificación de la subfracción de diclorometano FD6 de *S. acutus* (Pa).

6.4.3. Fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo (FA) y purificación de moléculas de *S. acutus* (Pa).

La fracción de acetato de etilo (FA) fue sometida a una separación utilizando HPLC preparativo en una columna de fase inversa (C18), utilizando como fase móvil una mezcla de H₂O-MeCN en modo gradiente. Obteniendo 64 subfracciones reagrupadas en 8 (**Esquema 13**). Esto se realizó ya que la FA mostró interesante efecto antiproliferativo. La subfracción mayoritaria (FA7: 237,60 mg) fue seleccionada para realizar un análisis de esta a través de espectroscopía de ¹HRMN. Durante este procedimiento se obtuvo un precipitado en metanol de color amarillo, por lo que se procedió al lavado de este en MeOH en varias repeticiones. El sólido obtenido (43,9 mg) fue analizado mediante ¹HRMN observando señales características de un flavonoide glicosilado.



Esquema 12. Separación de la fracción de acetato de etilo de *S. acutus* (Pa), junto a los porcentajes de rendimiento obtenidos.

6.4.3.1. Elucidación estructural de la subfracción FA7 (P): Compuesto 6.

La elucidación estructural se realizó utilizando técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas. El espectro de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra el ion $[M + Na]^+$ a m/z 531,1115 que se corresponde con la fórmula molecular $C_{23}H_{24}O_{13}$ (508,12) (**Figura 53**).

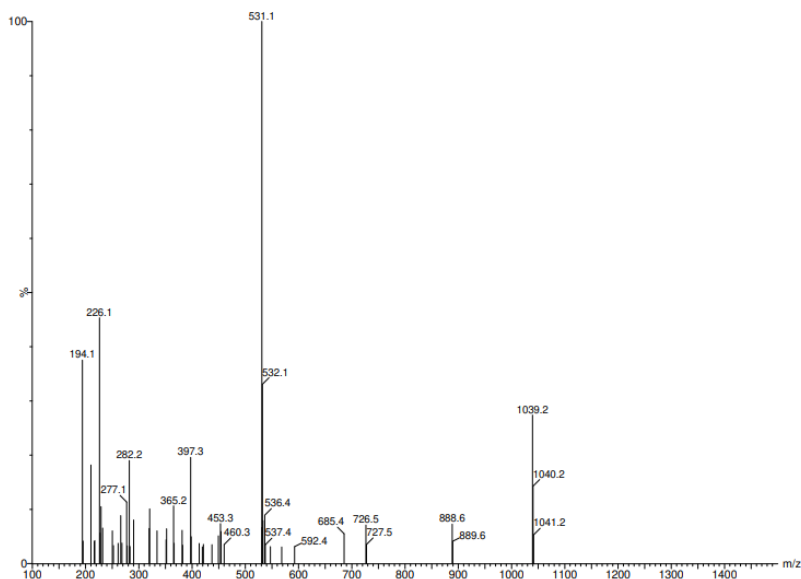


Figura 52. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 6.

La estructura de naturaleza flavonoidal del compuesto se dedujo de manera inequívoca al analizar los espectros de RMN en DMSO (**Tabla 28**). El espectro mostró una señal a δ_H 12,62 (1H, s) ppm, correspondiente a un protón hidroxílico (confirmado por el experimento HSQC). También se observaron tres señales en la región aromática a δ_H 7,54 (2H, s), 6,51 (1H, d, $J = 1,96$ Hz) y 6,22 (1H, d, $J = 1,79$ Hz) ppm, característica de protones aromáticos pertenecientes a dos anillos, uno donde los protones se encuentran en posición para (-*p*) y el otro anillo los protones se encuentran en posición orto (-*o*). Una señal a δ_H 5,55 (1H, d, $J = 8,90$ Hz) ppm, asignado a un protón anomérico (O-H-O). Otra señal a δ_H 3,85 (6H, s) ppm característica de protones metoxílicos. Finalmente se observaron señales entre δ_H 3,68 – 3,34 (20H, m) ppm asignados a protones carbinólicos. Así mismo se observaron señales a δ_H 9,20 (1H, s), 5,21 (1H, d, $J = 4,81$ Hz), 4,92 (1H, s), 4,56 – 4,54 (2H, m) ppm, asignados a protones hidroxílicos (confirmados por el experimento HSQC).

Tabla 28. Datos de RMN del compuesto 6 (400 MHz, DMSO).

Posición	δ_H	δ_C	DEPT	COSY	HMBC
1	-	-	-	-	-
2	-	156,3	C	-	-
3	-	133,4	C	-	-
4	-	177,4	C=O	-	-
5	-	161,2	C	-	-
6	6,22 (1H, d, $J = 1,79$ Hz)	93,9	CH	-	161,2 (2J), 104,1 (3J), 98,8 (3J)
7	-	164,3	C	-	-
8	6,51 (1H, d, $J = 1,96$ Hz)	98,8	CH	6,22 (3J)	164,3 (2J), 156,5 (2J), 104,1 (3J), 93,9 (3J)
9	-	156,5	C	-	-
10	-	104,1	C	-	-
11	5,55 (1H, s)	101,5	CH	3,58 (2J)	133,4 (3J)
12	3,58 (1H, m)	71,3	CH	3,41 (2J)	101,5 (2J)
13	3,41 (1H, m)	73,1	CH	-	67,9 (2J)
14	3,68 (1H, s)	67,9	CH	3,41 (2J)	71,3 (2J)
15	3,39 (1H, m)	75,9	CH	-	73,1 (2J)
16	3,51 y 3,39 (2H, m)	60,4	CH ₂	3,41 (2J)	-
1'	-	138,6	C	-	-
2'	-	156,3	C	-	-
3'	7,54 (1H, s)	106,9	CH	-	156,3 (2J), 156,3 (3J), 147,5 (2J), 138,6 (3J)
4'	-	147,5	C	-	-
4''	3,85 (3H, s)	56,4	CH ₃	-	147,5 (3J)
5'	-	156,3	C	-	-
5''	3,85 (3H, s)	56,1	CH ₃	-	-
6'	7,54 (1H, s)	106,9	CH	-	156,3 (2J), 156,3 (3J), 147,5 (2J), 138,6 (3J)
OH-5	12,62 (1H, s)	-	-	-	161,2 (2J), 104,1 (3J)
OH-7	10,90 (1H, s)	-	-	-	-
OH-2'	9,20 (1H, s)	-	-	-	-
OH-12	5,21 (1H, d, $J = 4,81$ Hz)	-	-	3,58 (3J)	-
OH-13	4,92 (1H, s)	-	-	3,41 (2J)	-
OH-14	4,55 (1H, m)	-	-	3,68 (3J), 3,51 (4J), 3,41 (2J)	-
OH-16	4,54 (1H, m)	-	-	-	-

El análisis del espectro de ^{13}C (**Tabla 28**), mostró la presencia de 21 carbonos. Una señal a δ_{C} 177,4 ppm atribuible a un carbonilo (-COOH). 12 señales entre la zona aromática y vinílica a δ_{C} 164,3; 161,2; 156,5; 156,3; 147,5; 138,6; 133,4; 119,8; 106,9; 104,1; 98,8 y 93,9 ppm. Una señal a δ_{C} 101,5 ppm, asignada al carbono anomérico (confirmada por el experimento HSQC). También se observaron cinco señales a δ_{C} 75,9; 73,1; 71,3; 67,9 y 60,4 ppm atribuibles a carbonos carbinólicos. Finalmente, dos señales a δ_{C} 56,4 y 56,1 ppm asignados a metoxilos.

El estudio de los experimentos de RMN 2D realizados incluyeron ^1H - ^1H -COSY, HMBC, H2BC y HSQC, los cuales permitieron establecer la estructura del compuesto como un flavonol glicosilado (**Figura 4**).

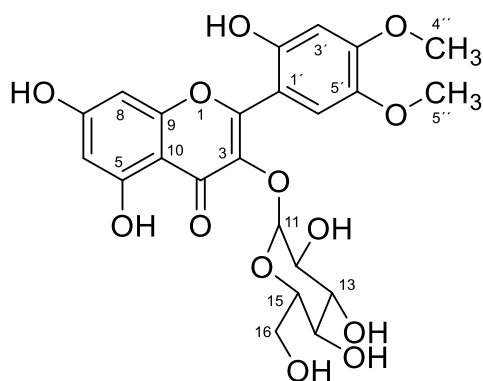


Figura 53. Estructura química del compuesto 6: Flavonol glicosilado.

6.4.4. Análisis del perfil cromatográfico de la fracción de acetato de etilo (FA) de *K. cistoidea* (Pa), mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar y de tiempo de vuelo (QTOF-MS).

La fracción más activa (FA) de *K. cistoidea* (Pa) contra la bacteria *S. aureus* se analizó mediante UHPLC-QTOF-MS en modo negativo. Los resultados se muestran en la **Tabla 29**. En esta fracción se encontraron cinco grupos de compuestos principales: ácidos carboxílicos (I), flavonoides (II), compuestos fenólicos (III), ácidos grasos (IV) y terpenos (V). El análisis LC-MS de la fracción de acetato de etilo (FA) de *K. cistoidea* mostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides que han sido identificados en otras plantas pertenecientes a la familia Kramiraceae: *Krameria paciflora* y *Krameria lappacea* (Baumgartner et al., 2011; Ortiz et al., 2019; Ramírez-Cisneros et al., 2012).

Tabla 29. Compuestos identificados por UHPL-QTOF-MS en modo negativo de la fracción de acetato de etilo de *K. cistoidea* (Pa).

Grupo	t_R (min)	Compuesto	Formula molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	(m/z) teórica	Error [ppm]
I	1,26	Acido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0563	192,0636	0,955
I	1,29	(S)-malato	C ₄ H ₆ O ₅	133,0155	134,02248	9,397
II	1,42	Isorhamnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315,0543	316,0616	10,317
III	3,44	Acido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0895	354,0968	4,796
II	6	Tilirosido	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	593,1340	594,1413	6,64
IV	9,97	Hexadecanoil-lisofosfatietanolamina	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	452,27935	453,28663	2,411
V	11,07	Canrenona	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	339,2020	340,2093	16,635
IV	12,58	Acido 2-hidroxiipalmitico	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	271,2291	272,2364	4,59
III	12,88	Acido 2-hidroxi-4-metoxi-3,5-bis(3-metilbut-2-enil)-6-pentilbenzoico	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	373,7430	374,2485	3,19

El ácido clorogénico es uno de los compuestos fenólicos con mayor frecuencia en la naturaleza, especialmente en el café y en el té (Meng et al., 2013; Venditti et al., 2015). Este compuesto es ampliamente conocido por su actividad antioxidante y antimicrobiana (Naveed et al., 2018). Se ha reportado la actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y *Bacillus subtilis* (Lou et al., 2011; Trivedi and Puranik, 2022; Wu et al., 2020). También ha mostrado inhibición contra varias cepas de bacterias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Sterotrophomas maltophilia*, *S. enteritidis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Helicobacter pylori*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *P. putida* (Cai et al., 2019; Chen et al., 2022; Kabir et al., 2014; Karunanidhi et al., 2013; Lou et al., 2011; Su et al., 2019; Sun et al., 2020; Trivedi and Puranik, 2022; Wang et al., 2023). Una investigación sobre modo de acción del ácido clorogénico contra *Shigella dysenteriae* indicó que el ácido clorogénico aumentaba significativamente la

permeabilidad de la membrana plasmática y externa, provocando la pérdida de la función de barrera e incluso induciendo una ligera fuga de nucleótidos (Lou et al., 2011).

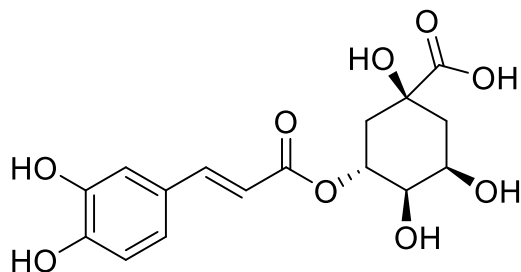


Figura 54. Estructura química del ácido clorogénico.

El ácido quínico, es un compuesto orgánico ampliamente identificado en muchas plantas, es un importante ácido orgánico con muchas actividades biológicas tales como antioxidante, antibacteriana (Cinkilic et al., 2013; Jang et al., 2017). Se ha evaluado la actividad de este compuesto contra cepas de bacterias gran-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus pyogenes* y *Enterococcus faecalis* (Bai et al., 2022, 2018a, 2018b, 2019; Ercan and Doğru, 2022; Zhang et al., 2013) y contra las bacterias gran-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Adamczak et al., 2019; Ercan and Doğru, 2022). Al igual que el ácido clorogénico, este compuesto afecta la membrana celular e interfiriendo en las funciones células, lo que provoca la muerte de la bacteria (Bai et al., 2018a).

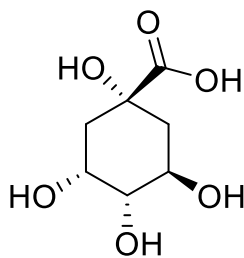


Figura 55. Estructura química del ácido quínico.

Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos polifenólicos con estructura de benzo- γ -pirona y están presentes en todas las plantas. Como componente de la dieta, se considera que los flavonoides tienen propiedades beneficiosas para la salud debido a su elevada capacidad antioxidante tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*. Los flavonoides tienen capacidad para inducir sistemas enzimáticos protectores humanos. Numerosos estudios han sugerido efectos protectores de los flavonoides contra muchas enfermedades infecciosas (bacterianas y víricas) y degenerativas, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras enfermedades relacionadas con la edad (Kumar and Pandey, 2013). La isorhamnetina es uno de los principios compuestos activos más importantes de los frutos de *Hippophae rhamnoides* L. y de las hojas de *Ginkgo biloba* L., y posee una amplia actividad farmacológica. Así se han reportado estudios de actividad antimicrobiana de flavonoides contra las cepas de bacterias gran-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), *Listeria monocytogenes* y

contra las cepas gran-negativas: *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* (Aruwa et al., 2022; Chauhan et al., 2019; Habtamu and Melaku, 2018; Majnooni et al., 2023) y de su poderosa actividad antioxidante (Aruwa et al., 2022; Habtamu and Melaku, 2018; Majnooni et al., 2023). Otro flavonoide que ha mostrado actividad antimicrobiana contra las cepas gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*, es el tilirosido (Hernández Tasco et al., 2020). Algunos estudios de los mecanismos de acción por los cuales actúan estos compuestos se encuentran la alteración de la membrana celular, inhibición de la síntesis de la envoltura celular, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la cadena de transporte de electrones y de la síntesis de ATP (Górniak et al., 2019).

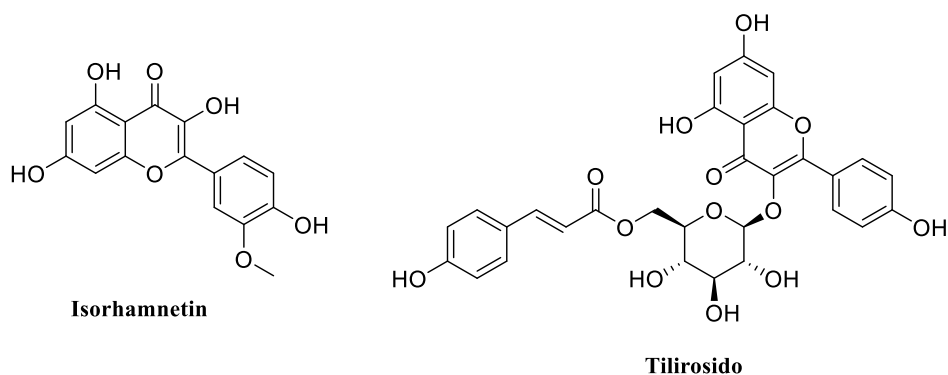


Figura 56. Estructuras químicas de isorhamnetin y tilirosido.

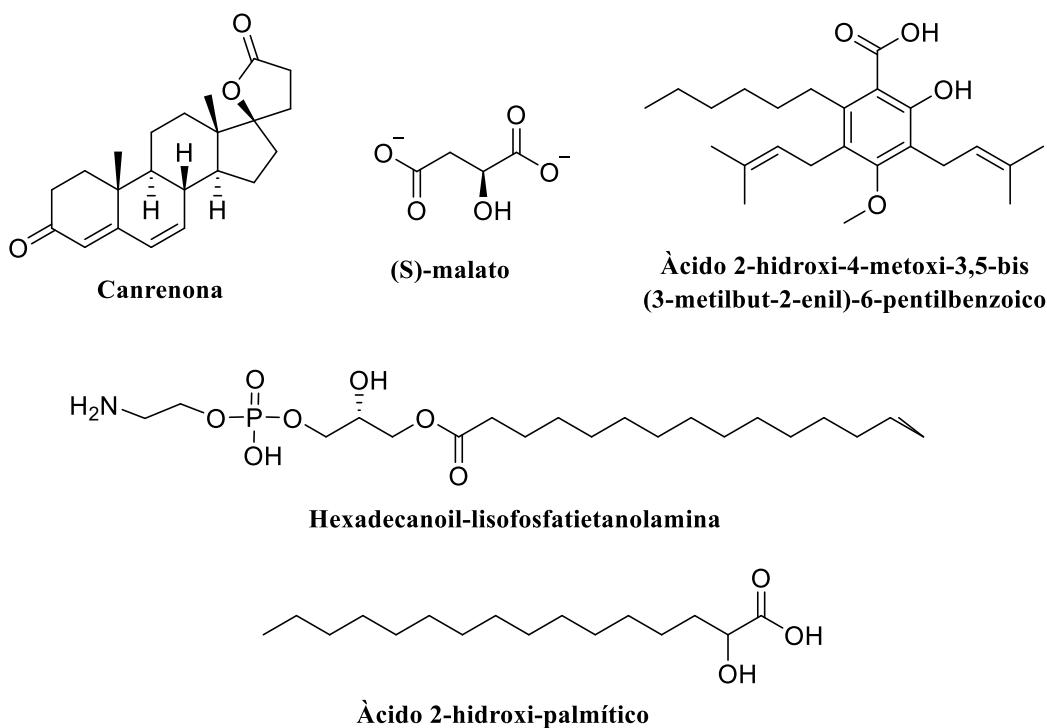


Figura 57. Otros compuestos identificados en la fracción activa de *K. cistoidea* (Pa)

La fracción más activa (FA) de *K. cistoidea* (Pa) contra la bacteria *S. aureus* se analizó también mediante UHPLC-QTOF-MS en modo positivo. Los resultados se muestran en la **Tabla 30**. En esta fracción se encontraron cinco grupos de compuestos principales: compuestos fenólicos (I), flavonoides (II), aminoácidos (III), terpenos (IV), ácidos grasos (V), fosfatos (VI) y derivados de compuestos fenólicos (VII).

Tabla 30. Compuestos identificados por UHPL-QTOF-MS en modo positivo de la fracción de acetato de etilo de *K. cistoidea* (Pa).

Grupo	t_R (min)	Compuesto	Formula molecular	[M-H] ⁺ (m/z)	(m/z) teórica	Error [ppm]
I	1,47	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355,1014	354,0942	-2,592
	1,55	Kaempferol-3-O-glucosido-6''-p-cumaril	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595,14581	594,13853	2,005
II	5,81	Tilirosido	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595,1414	594,1341	-5,46
II	5,98	5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-4H-4-cromona	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301,0697	300,0624	-3,199
II	6,27	2-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dihidro-4-cromona	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	303,0852	302,0779	-3,683
II	7,63	Sakuranetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	287,0904	286,0831	-3,471
II	8,44	Velutina	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315,0847	314,0774	-5,061
III	8,52	C17-Esfinganina	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	288,2808	287,2808	-5,636
V	9,31	Lisofosfatidilcolina 18:3	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	518,32058	517,3133	-6,83
V	9,85	Lisofosfatidiletanolamina 18:2	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	478,29041	477,28313	-5,034
V	10,14	2,3-dihidroxipropil hexadecanoato	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	331,2859	330,27734	4,868
V	10,3	1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	454,2901	453,28282	-5,987
V	10,65	Lisofosfatidiletanolamina 18:1	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	480,30551	479,29823	-6,16
VI	11,13	Tri(butoxietil)fosfato	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P	399,24796	398,24032	-6,653
V	12,08	Lisofosfatidilcolina 18:0 – SN1	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	524,36775	523,36047	-6,33
V	12,55	Acido gamma linoleico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279,23046	278,22298	-4,997
VII	12,98	Acido 2-acetoxi-4-pentadecil benzoico	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391,2821	390,2752	-4,275
IV	13,29	Kaurano	C ₂₀ H ₃₂	273,2562	272,2489	-5,422
V	13,51	Feoforbida A	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,27382	592,26737	-3,423
V	13,65	Erucamida	C ₂₂ H ₄₃ NO ₃	338,3399	337,332	-5,354

Entre los flavonoides que han sido identificados en esta fracción bioactiva y que han mostrado interesante actividad antimicrobiana (Donadio et al., 2021), han sido la sakuranetina, un flavonoide presente en muchos vegetales que ha demostrado actividad contra la bacteria gram negativa *Helicobacter pylori*, la bacteria gam-positiva *Mycobacterium tuberculosis* y contra la bacteria fitopatógica *Burholderia glumae* (Park et al., 2014; Stompor, 2020; Ticha et al., 2015). La velutina, una de las flavonas que más se ha reportado en las plantas, tiene diversas actividades beneficiosas, como el blanqueamiento de la piel, así como actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antioxidantes y antimicrobianas (Jung et al., 2021). Se aisló de la corteza del tallo de *D. arfakensis*, en este trabajo se demostró la primera vez que se probó contra la cepa de *S. aureus* (SARM) (Santoso et al., 2017).

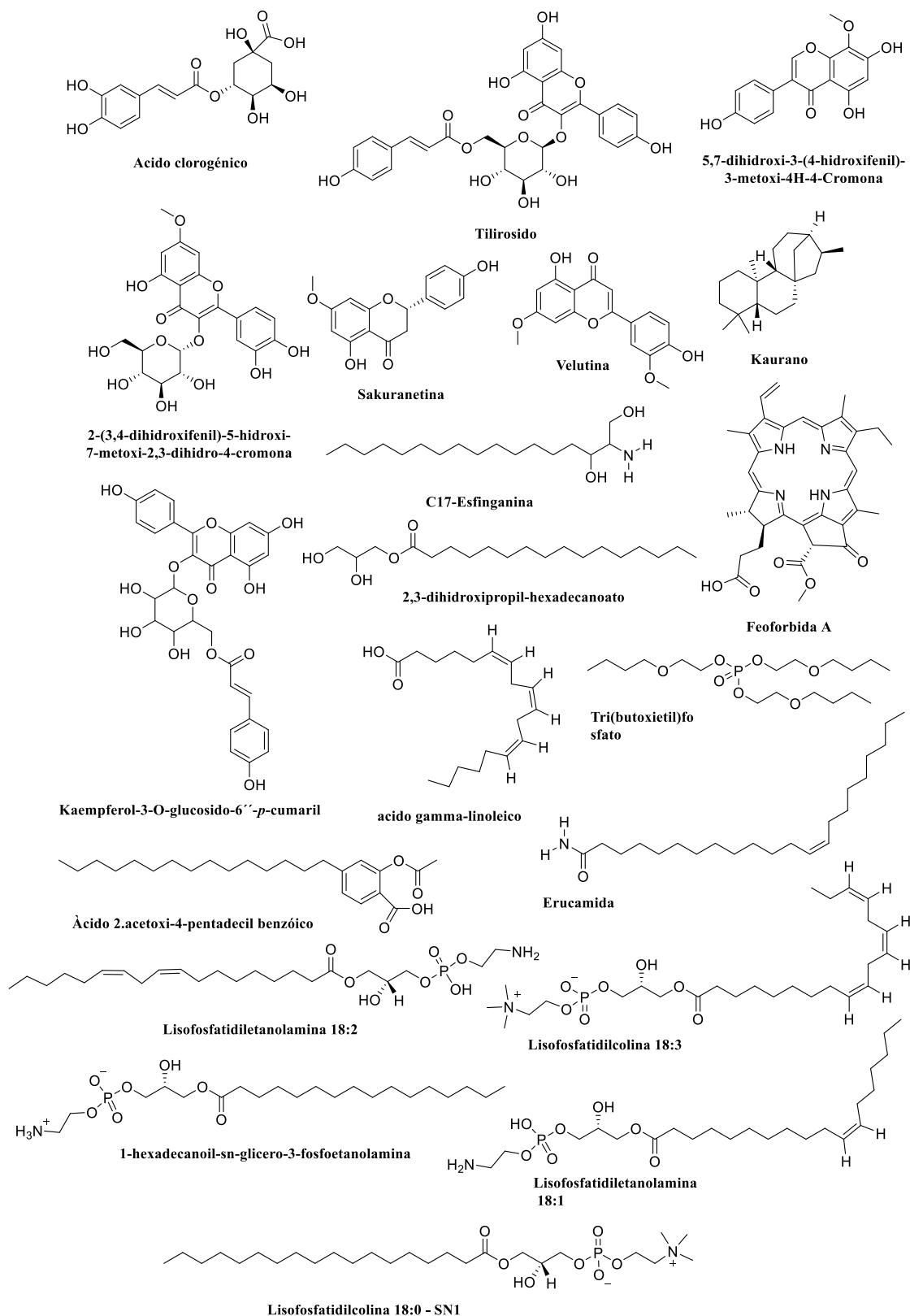


Figura 58. Estructuras químicas de los compuestos identificados en modo positivo en el extracto de acetato de etilo *K. cistoidea* (Pa), mediante análisis por UHPL-QTOF-MS.

6.5. Objetivo específico 5

Evaluar la actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante de los compuestos aislados de acuerdo con los resultados de los estudios bioguiados.

6.5.1. Evaluación de la actividad antiproliferativa de los compuestos aislados de *Skytanthus acutus* (Pa).

La actividad antiproliferativa *in vitro* del ácido betulínico (**1**), el ácido oleanólico (**4**) y el N-óxido de β -esquitantina (**5**), se estudió frente a un panel de líneas celulares representativas de tumores sólidos humanos según el protocolo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (Adrián et al., 2019). Así, los compuestos se ensayaron frente a las líneas celulares de cáncer A549 y SW1573 (pulmón no microcítico), HBL-100 y T-47D (mama), HeLa (cervix) y WiDr (colon). Los resultados de los valores de inhibición del crecimiento al 50% tras 48 horas de exposición (IG_{50}) se resumen en la **Tabla 31**. En conjunto, los resultados muestran que, en comparación con el fármaco anticancerígeno estándar cisplatino (CDDP), los compuestos **1** y **4** presentan efectos antiproliferativos modestos. El compuesto (**4**) mostró una mayor propiedad antiproliferativa contra todas las líneas celulares en comparación con el compuesto (**1**), con valores de IG_{50} en el rango de 7,2 – 36 y 14-84 μ M, respectivamente. Por otro lado, el compuesto (**5**) no mostró actividad significativa contra las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, mostró ligera actividad en las líneas celulares de cáncer de mama (T-47D).

Tabla 31. Actividad antiproliferativa (IG_{50}) frente a líneas celulares de tumores sólidos humanos.

Compuesto	Línea celular					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
Acido betulínico (1)	15 \pm 2,0	30 \pm 3,7	14 \pm 2,7	28 \pm 3,1	84 \pm 19	47 \pm 0,7
Acido oleanólico (4)	7,2 \pm 1,1	24 \pm 7,2	14 \pm 0,9	26 \pm 2,8	36 \pm 7,2	32 \pm 8,1
N-óxido de β -esquitantina (5)	100	100	100	100	41 \pm 9,0	64 \pm 16
Cisplatino (CDDP)	4,9 \pm 0,2	1,9 \pm 0,2	1,8 \pm 0,5	2,7 \pm 0,4	17 \pm 3,3	23 \pm 4,3

^a IG_{50} indicados en μ M. La desviación estándar se calculó a partir de dos a cuatro experimentos independientes. Se utilizó cisplatino (CDDP), como fármaco citotóxico de referencia.

6.5.1.1. Efecto citostáticos causados por los compuestos activos aislados de *Skytanthus acutus* (Pa).

Las imágenes en vivo han permitido observar los efectos citostáticos progresivos (Roldán-Peña et al., 2023) o la muerte celular de las células tratadas identificando varios sellos apoptóticos (Barrientos et al., 2022; Lacret et al., 2022; Padilla-Pérez et al., 2023; Puerta et al., 2022). Para caracterizar los efectos fenotípicos de **1** y **4** sobre las células cancerosas, se monitorió la evolución del cultivo cada 10 min mediante microscopía 3D holotomográfica sin marcadores. Así, las células HeLa se expusieron a **1** y **4** durante 20 h a 2 x IG_{50} (30 μ M). Las células HeLa no tratadas (control) se mueven libremente y se dividen durante todo el tiempo experimental. En cambio, en las muestras tratadas con **1** y **4**, la división celular se retrasó y se observaron algunas células muertas. Estas observaciones se

cuantificaron con el análisis tras segmentación de las células individuales sobre las imágenes de los 120 ciclos inferidos de las mediciones del índice de refracción (IR) para cada célula individual. Al considerar el recuento celular normalizado, todos mostraron un aumento con el tiempo de exposición (Figura 59A). Sin embargo, esta tendencia fue diferente en los tres ensayos. En las células tratadas, el número de células aumentó a un ritmo menor que en el control. Así pues, ambos compuestos afectan a la división celular, **1** mostró los mayores efectos antiproliferativos. De hecho, la confluencia disminuyó a lo largo del tiempo de exposición para las células HeLa tratadas con **1** (Figura 59B). El análisis de los datos con el ensayo de muerte celular LIVE confirmó que la disminución de la confluencia podía estar asociada a la muerte celular, como se deducía de los resultados de la fracción de muerte celular (Figura 59C). Además, el factor de forma, un parámetro relacionado con la forma de la célula aumentó para las células tratadas con **1** al inicio de la muerte celular (Figura 59D). En las células tratadas con **1**, la apoptosis comenzó aproximadamente 10 horas después de la adición del fármaco. Curiosamente, la muerte celular se produjo en células que entraron en mitosis. Este es un hallazgo relevante, ya que, respecto al modo de acción de **1**, se sabe poco sobre su mecanismo inductor de apoptosis (Fulda, 2008).

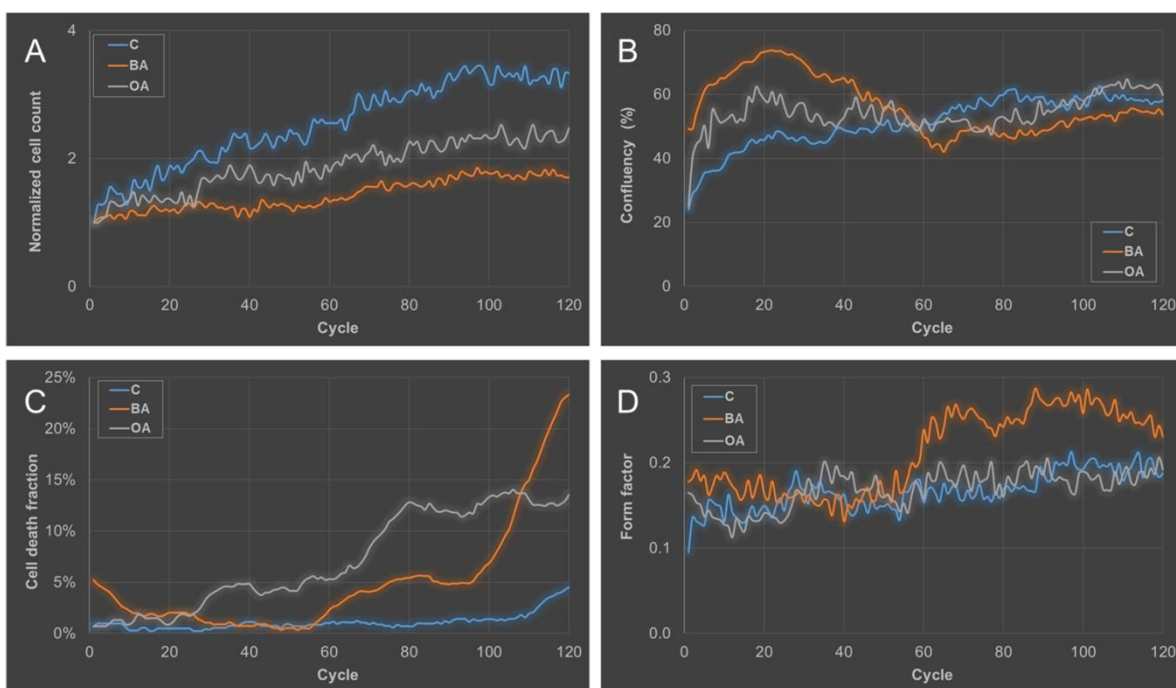


Figura 59. Efectos fenotípicos en células HeLa tratadas con 30 μM de ácido betulínico (**1**) y oleanólico (**4**) durante 20 h. (A) Recuento celular normalizado, (B) Confluencia, (C) Fracción de muerte celular y (D) Factor de forma obtenidos con el software EVE a partir de los índices de reflexión resultantes de la adquisición cada 10 min. C = control, BA = ácido betulínico (**1**), OA = ácido oleanólico (**4**).

7. Conclusiones

- El extracto etanólico de *P. chilensis* (f) se presenta como un candidato potencial para la búsqueda de compuestos bioactivos contra el cáncer, por su baja actividad citotóxica contra la línea celular no tumoral (MCF-10A) y su selectividad contra la línea celular tumoral. De las distintas fracciones obtenidas, la fracción de diclorometano fue la que mostró mayor efecto citotóxico y selectividad contra la línea celular MCF-7. Esta fracción fue analizada mediante GC-MS, en donde se encontraron tres grupos de compuestos que podrían explicar la actividad citotóxica encontrada. En este contexto se encontró, principalmente ácidos grasos como el ácido palmítico para el cual previamente se ha reportado que promueve la apoptosis del neuroblastoma humano y el cáncer de mama (Hardy et al., 2000; Hsiao et al., 2014; Pereira et al., 2013; Sangpairoj et al., 2022). Azúcares como la D-alosa que inhibe el crecimiento de células de carcinoma de ovario *in vitro* (Jeong et al., 2011; Sui et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008) y el D-pinitol que ha mostrado interesante actividad anticancerígena (Azab, 2022; Pandi et al., 2022; Tiwari et al., 2020). Así mismo, polioles como el mio-inositol que se ha recomendado ampliamente como posible agente quimiopreventivo (Amabile et al., 2021; Lam et al., 2006; Yang et al., 2023).

- Por otra parte, el extracto etanólico de *Krameria cistoidea* (Pa), mostró la mayor capacidad antioxidante en todos los ensayos analizados, también mostró actividad antimicrobiana contra la cepa de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, no mostró citotoxicidad contra las líneas celulares de keratinocitos, ni sobre las líneas celulares tumorales analizadas. La fracción de acetato de etilo (FA), que fue la más activa contra *S. aureus*, se analizó mediante UHPLC-QTOF-MS. El análisis LC-MS de la fracción mostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides que son ampliamente conocidos como compuestos antioxidantes y antimicrobianos (Chen et al., 2022; Lou et al., 2011; Naveed et al., 2018; Wang et al., 2023; Wu et al., 2020), y que posiblemente sean los causantes de la actividad antioxidante y antimicrobiana mostrada por el extracto etanólico.

- Por su parte, la fracción de diclorometano (FD) de *Skytanthus acutus* (pa), mostró los mejores resultados antiproliferativos contra todas las líneas celulares estudiadas con valores de IG₅₀ entre 2,1 – 3,0 µg/mL. Mediante un estudio bioguiado de esta fracción, se aislaron los triterpenos pentacíclicos: ácido betulínico (**1**) y ácido oleanólico (**4**), así como el alcaloide monoterpénico N-óxido de β-esquitantina (**5**). La actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos **1**, **4** y **5**, se evaluó frente a las líneas celulares de cáncer A549 y SW1573, HBL-100, T-47D, HeLa y WiDr. Los resultados mostraron que, en comparación con el fármaco anticancerígeno estándar cisplatino (CDDP), los compuestos **1** y **4** presentaron efectos antiproliferativos modestos. El compuesto **4** mostró una mayor actividad antiproliferativa contra todas las líneas celulares en comparación con el compuesto **1**. Por otro lado, el compuesto **5** no mostró actividad significativa contra las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, mostró ligera actividad en las líneas celulares de cáncer de mama (T-47D). Adicionalmente las imágenes *in vivo* permitieron observar los efectos citostáticos progresivos o la muerte celular de las células tratadas con los compuestos **1** y **4**. En las

muestras tratadas con **1** y **4**, la división celular se retrasó y se observaron algunas células muertas. En las células tratadas con **1**, la apoptosis comenzó aproximadamente 10 horas después de la adición del fármaco. Curiosamente, la muerte celular se produjo en células que entraron en mitosis. Este es un hallazgo relevante, ya que, respecto al modo de acción de **1**, se sabe poco sobre su mecanismo inductor de apoptosis. Adicionalmente, a partir de la fracción de acetato de etilo (FA) de *Skytanthus acutus* (pa) que mostró un moderado efecto antiproliferativo, se aisló un nuevo flavonol glicosilado, el compuesto **6**.

- El extracto etanólico de *Nolana albescens* (Pa), no mostró actividad antioxidante ni citotóxica para las líneas celulares estudiadas en esta tesis, así como tampoco mostró actividad antimicrobiana en las cepas analizadas. Sin embargo, es interesante resaltar que a pesar de estos resultados se pudiesen evaluar otras actividades, tales como: cardioprotectiva, hepatoprotectiva que han sido estudiadas en otras plantas pertenecientes al género *Nolana* de la familia Solanaceae (Gurnani et al., 2016). Sería interesante evaluar la actividad citotóxica contra otras líneas celulares (Ceferino, Guzman et al., 2016; Ramadan, 2011) y actividad antiinflamatoria (Zimmer et al., 2012).

- Con los resultados obtenidos en esta Tesis de grado se aprueba la hipótesis planteada inicialmente para las plantas nativas *Skytanthus acutus*, *Krameria cistoidea* y *Pintoa chilensis* obtenidas en el desierto de Atacama, poseen metabolitos secundarios activos y presentan actividad antimicrobiana (*K. cistoidea*), citotóxica (*S. acutus* y *P. chilensis*) o antioxidante (*K. cistoidea* y *P. chilensis*). Por el contrario, para el caso de la planta *Nolana albescens* que no mostró resultados relevantes en las actividades biológicas evaluadas en esta tesis de grado, no se aprueba la hipótesis.

8. Proyecciones

Las proyecciones que surgen de este trabajo son variadas y pueden ser enfocadas a diferentes líneas de investigaciones:

- Aun cuando el extracto etanólico de la Planta *Nolana albescens* no fue activo en el screening de actividad biológica analizadas en esta tesis, es interesante seguir explorando con otras actividades, líneas celulares, cepas bacterianas distintas a las estudiadas, ya que está ampliamente estudiado que las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae han mostrado actividad antimicrobiana, antifúngica y antiproliferativas.

- Continuar con el estudio del extracto de *Pintoa chilensis* (f) con el fin de profundizar en el mecanismo de acción por el cual está provocando la muerte celular programada en la línea celular MCF-7 y el efecto que provoca sobre la línea celular control MCF-10A, al aumentar la producción de caspasas a la concentración mas alta estudiada. Se pudiese comprobar si está ocurriendo muerte celular programada u otro tipo de muerte celular, mediante un análisis inmunohistoquímico. También se pudiese identificar el tipo de caspasas que se están produciendo en la línea celular no tumoral.

- A pesar de que las fracciones polares (metanólica y acuosa) del extracto de *Skytanthus acutus* (pa), no fueron estudiadas en este proyecto. Sería interesante trabajar en el aislamiento de metabolitos secundarios presentes debido a que en los ensayos de actividad antiproliferativo estos extractos mostraron ligera actividad contra algunas de las líneas celulares estudiadas, en particular la línea de cáncer de pulmón A549.

- El extracto de *K. cistoidea* (pa), mostró interesante actividad en dos de las tres actividades biológicas que fueron estudiadas: antioxidante y antimicrobiana. Además, se evaluó la actividad citotóxica contra líneas celulares humanas de piel (keratinocitos) sin ser citotóxica y tampoco mostró actividad hemolítica, lo que pudiese darnos un indicio que se podría utilizar este extracto para la preparación de productos de belleza o la preparación de productos antibacteriales, por lo que se requerirá de muchos más estudios para lograr este fin.

9. Abreviaturas

• NaCl	:	Cloruro de Sodio
• WCRF	:	Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer
• DT	:	Toxina diftérica
• PE	:	Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>
• PAP	:	Proteína antivírica de hierba carmín
• ROS	:	Especies reactivas de Oxígeno
• OH·	:	Radical hidroxilo
• O ₂ ·	:	Radical hidroperóxido
• H ₂ O ₂	:	Peróxido de hidrógeno
• TFD	:	Terapia fotodinámica
• PS	:	Fotosensibilizador
• GSH	:	Sistema redox del glutatión
• PEG	:	Polietilenglicol
• DOX	:	Doxorubicina
• PhA	:	Decolorante fotosensible
• IA	:	Inmunoterapia adoptiva
• FDA	:	Administración de Alimentos y Medicamentos
• DHPS	:	Dihidropteroato sintasa
• DHFR	:	Dihidrofolato reductasa
• AE	:	Aceites esenciales
• DPPH	:	2,2'-dinitrofenil-1-picrilhidracil
• FRAP	:	Poder antioxidante reductor del hierro (del inglés)
• SERM	:	Modulador selectivo del receptor de estrógeno (del inglés)
• HPLC	:	Cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés)
• PDA	:	Agar papa dextrosa (del inglés)
• ESI	:	Ionización por electroespray (del inglés)
• MS	:	Espectrometría de masas (del inglés)
• HPCC	:	Cromatografía de contracorriente (del inglés)
• H ₂ O	:	Agua

• EtOH	:	Etanol
• DCM	:	Diclorometano
• AcOEt	:	Acetato de etilo
• TLC	:	Cromatografía de capa fina (del inglés)
• CC	:	Cromatografía de columna
• RP-18	:	Fase reversa (del inglés)
• MeOH	:	Metanol
• MeCN	:	Acetonitrilo
• AlCl ₃	:	Cloruro de Aluminio
• FH	:	Fracción de hexano
• FD	:	Fracción de diclorometano
• FA	:	Fracción de acetato de etilo
• FQ	:	Fracción acuosa
• DAD	:	Detector de arreglo de diodos
• PLC	:	Cromatografía líquida preparativa (del inglés)
• DEPT	:	Mejora sin distorsión por transferencia de polarización (del inglés)
• ¹ H	:	Resonancia magnética de protones
• ¹³ C	:	Resonancia magnética de carbono
• COSY	:	Espectroscopía de correlación (del inglés)
• HSQC	:	Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple (del inglés)
• HMBC	:	Correlación Heteronuclear de enlaces múltiples (del inglés)
• TOCSY	:	Espectroscopía de Correlación Total (del inglés)
• NOESY	:	Espectroscopía Nuclear de Efecto Overhauser (del inglés)
• ABTS	:	2,2'-azinobis(3-etilbenotiazolina-6-ácido sulfónico)- sal de diamonio
• AAPH	:	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)-dihidrocloruro
• TROLOX	:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
• FeCl ₃	:	Cloruro férrico
• TPTZ	:	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
• MCF-7	:	Línea celular de cáncer de mama epitelial humano
• HT-29	:	Línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon

• MCF-10A	:	Línea celular epitelial no tumoral humano
• DMEM/Ham's F-12	:	Medio de cultivo
• CO ₂	:	Dióxido de carbono
• SRB	:	Sulforrodamina B (del inglés)
• PBS	:	Suero fisiológico
• BODIPY-C11	:	Sensor de peroxidación de lípidos
• DCFH ₂ -DA	:	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
• CaspACE FITC-VAD-MK	:	Kit para evaluar caspasas activas compuesto por isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con un inhibidor general de caspasas (VAD-MK)
• TSB	:	Caldo de soya trípico (del inglés)
• RSA%	:	Porcentaje de secuestro del radical (del inglés)
• IC ₅₀	:	Concentración inhibidora media máxima (del inglés)
• BHT	:	2,6-bis(1,1-dimetil)etil-4-metilfenol
• TEAC	:	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox
• ATCC	:	The American Type Culture Collection
• A549	:	Línea Celular de Carcinoma de Pulmón humano
• SW1573	:	Línea Celular Humana de Cáncer Epitelial Pulmonar
• HBL-100	:	Línea Celular Humana de Carcinoma de Mama
• T-47D	:	Línea Celular Humana de Cáncer de Mama
• HeLa	:	Línea Celular Humana de Cáncer Cervical
• WiDr	:	Línea Celular Humana de Cáncer de colon
• NCI	:	The National Cancer Institute
• GI ₅₀	:	Inhibición de Crecimiento Medio (del inglés)
• MIC	:	Concentración Mínima Inhibitoria (del inglés)
• OD	:	Desidad óptica (del inglés)
• µL	:	Microlitro
• ANOVA	:	Análisis de varianza
• (Pa)	:	Partes aéreas
• (f)	:	Frutos
• GAE	:	Equivalente de Ácido Gálico (del inglés)
• QE	:	Equivalente de Quercetina (del inglés)
• IS	:	Índice de Selectividad (del inglés)

• DMSO	:	Dimetilsulfóxido
• CS	:	Control Solvente
• C ⁺	:	Control Positivo
• C1	:	Concentración 1: 50 µg/mL del extracto
• C2	:	Concentración 2: 100 µg/mL del extracto
• C3	:	Concentración 3: 200 µg/mL del extracto
• DCFH	:	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
• DCF	:	2'-7'-diclorofluoresceína
• Rh-123	:	Rodamina 123
• $\Delta\Psi_{mt}$:	Potencial de membrana mitocondrial
• TGI	:	Inhibición del Crecimiento Total (del inglés)
• HaCaT	:	Línea Celular Humana de queratinocitos inmortales aneuploides (del inglés)
• CMB	:	Concentración mínima bactericida (del inglés)
• GC-MS	:	Cromatografía de Gases acoplada a masas (del inglés)
• HepG52	:	Línea Celular de Carcinoma hepatocelular humano
• OVCAR-3	:	Línea Celular humana de cáncer de ovario
• NF- κ B	:	Factor nuclear κ B
• KBM-5	:	Línea Celular de Leucemia mielógeno
• PC-3	:	Adenocarcinoma humano de próstata
• DU145	:	Línea Celular humano de cancer de próstata
• ARNm	:	Acido Ribonucleico mensajero
• FAK	:	Quinasa de adhesión focal (del inglés)
• C-Src	:	Proteína quinasa – Protooncogén tirosina (del inglés)
• TNF- α	:	Factor de necrosis tumoral (del inglés)
• EMT	:	Transición epitelio mesenquimal (del inglés)
• OSCC	:	Carcinoma oral de células escamosas (del inglés)
• DMBA	:	7,12-dimetilben[a]antraceno (del inglés)
• MI	:	Mioinositol
• CD ₃ OD	:	Metanol deuterado
• DMSO-d6	:	Dimetilsulfóxido deuterado
• CH ₂ N ₂	:	Diazometano

• CDCl ₃	:	Cloroformo deuterado
• CHCl ₃	:	Cloroformo
• CDDP	:	Cisplatino
• pH	:	Medida del grado de acidez o alcalinidad
• ADN	:	Acido Desoxirribonucleico
• PCR	:	Reaccion de cadena de polimerasa (del inglés)
• M	:	Molar
• MPa	:	Milipascal
• ATP	:	Adenosin trifosfato
• BCR-ABL	:	Proteína de fusión
• Akt	:	Proteína quinasa B
• mTOR	:	Diana de rapamicina celular de mamíferos (del inglés)
• PBPs	:	Proteínas fijadoras de proteínas

10. Bibliografía

- Abe, F., Horikoshi, K. The biotechnological potential of piezophiles. *Trends Biotechnol.* **2001**, 19, 102–108.
- Abotaleb, M., Samuel, S., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., Büsselberg, D. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers.* **2018**, 11, 28.
- Abrahamse, H., Hamblin, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* **2016**, 473, 347–364.
- Achenbach, H., Hobner, H., Reiter, M. Cholestane- and pregnane-type glycosides from the roots of *Tribulus cistoides*. *Phytochemistry.* **1996**, 41, 907 - 917.
- Achenbach, H., Hübner, H., Brandt, W., Reiter, M. Cardioactive steroid saponins and other constituents from the aerial parts of *Tribulus cistoides*. *Phytochemistry.* **1994**, 35, 1527–1543.
- Adamczak, A., Ożarowski, M., Karpiński, T.M. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *J Clin. Med.* **2019**, 9, 109.
- Adolphsen, G., Appel, H.H., Overton, K.H., Warnock, W.D.C. Hydroxyskylanthines I and II. *Tetrahedron.* **1967**, 23, 3147–3150.
- Adrian, L., Görisch, H. Microbial transformation of chlorinated benzenes under anaerobic conditions. *Microbiol. Res.* **2002**, 153, 131–137.
- Adrián, P., Alexis, R.G., Roderick, A., Kaylie, D., Miguel, X.F., Giovanna, B., José, M.P. Naphthol-derived Betti bases as potential SLC6A14 blockers. *J. Mol. Clin. Med.* **2019**, 2, 35.
- Akbaba, G.B., Öztürkkan, F.E., SertçeliK, M. Evaluation of the Cytotoxic Effects of Ultrasonic Extracts of *Tribulus terrestris* L. on MCF-7 Cell Line by MTT Assay. *Hittite J. Sci. Eng.* **2021**, 8, 307 - 312.
- Akihisa, T., Takeda, A., Akazawa, H., Kikuchi, T., Yokokawa, S., Ukiya, M., Fukatsu, M., Watanabe, K. Melanogenesis-Inhibitory and Cytotoxic Activities of Diarylheptanoids from *Acer nikoense* Bark and Their Derivatives. *Chem. Biodiversity.* **2012**, 9, 1475–1489.
- Alewine, C., Hassan, R., Pastan, I. Advances in Anticancer Immunotoxin Therapy. *The Oncologist.* **2015**, 20, 176–185.
- Alexieva, B., Tzvetanka, M., Nikolova, E., Aragane, Y., Higashino, H. Free radicals, antioxidants and cancer chemotherapy. *J. Acta Med. Kinki Univ.* **2010**, 35, 57–65.
- Alves-Silva, J.M., Romane, A., Efferth, T., Salgueiro, L. North African Medicinal Plants Traditionally Used in Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* **2017**, 8, 383.
- Amabile, M., De Luca, A., Tripodi, D., D’Alberty, E., Melcarne, R., Imbimbo, G., Picconi, O., D’Andrea, V., Vergine, M., Sorrenti, S., Molfino, A. Effects of Inositol Hexaphosphate and Myo-Inositol Administration in Breast Cancer Patients during Adjuvant Chemotherapy. *J. Pers. Med.* **2021**, 11, 756.
- Amawi, H., Ashby, C.R., Tiwari, A.K. Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what’s limiting?. *Chin J. Cancer.* **2017**, 36, 50.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85, 957–998.

- Appel, H.H., Streeter, M. β y α esquitantinas. Su identificación como productos de transformación de los Alcaloides genuinos del *Skytanthus acutus* Meyen. *Rev. Latinoam. de Química*. **1970**, *1*, 63-67.
- Appel, H.H., Streeter, M. β y α esquitantinas. Su identificación como productos de transformación de los Alcaloides genuinos del *Skytanthus acutus* Meyen. *Scientia*. **1970**, 105–109.
- Arrieche, D., Olea, A.F., Jara-Gutiérrez, C., Villena, J., Pardo-Baeza, J., García-Davis, S., Viteri, R., Taborga, L., Carrasco, H. Ethanolic Extract from Fruits of *Pintoa chilensis*, a Chilean Extremophile Plant. Assessment of Antioxidant Activity and *In Vitro* Cytotoxicity. *Plants*. **2024**, *13*, 1409.
- Aruwa, C.E., Amoo, S.O., Koorbanally, N., Kudanga, T. Laccase-mediated modification of isorhamnetin improves antioxidant and antibacterial activities. *Process Biochem*. **2022**, *112*, 53–61.
- Asilbekova, D.T., Glushenkova, A.I., Khushbaktova, Z.A., Syrov, V.N., Abdullaev, N.D. Composition of lipids from *Peganum harmala* and *Thermopsis alterniflora* processing wastes. *Chem. Nat. Compd*. **2010**, *46*, 285–286.
- Ayeleso, T., Matumba, M., Mukwevho, E. Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules*. **2017**, *22*, 1915.
- Azab, A. D-Pinitol—Active Natural Product from Carob with Notable Insulin Regulation. *Nutrients*. **2022**, *14*, 1453.
- Bai, J., Wu, Y., Bu, Q., Zhong, K., Gao, H. Comparative study on antibacterial mechanism of shikimic acid and quinic acid against *Staphylococcus aureus* through transcriptomic and metabolomic approaches. *LWT*. **2022**, *153*, 112441.
- Bai, J., Wu, Y., Wang, X., Liu, X., Zhong, K., Huang, Y., Chen, Y., Gao, H. *In vitro* and *in vivo* characterization of the antibacterial activity and membrane damage mechanism of quinic acid against *Staphylococcus aureus*. *J. Food Safety*. **2018**, *38*, e12416.
- Bai, J., Wu, Y., Zhong, K., Xiao, K., Liu, L., Huang, Y., Wang, Z., Gao, H. A Comparative Study on the Effects of Quinic Acid and Shikimic Acid on Cellular Functions of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Protect*. **2018**, *81*, 1187–1192.
- Bai, J.-R., Wu, Y.-P., Elena, G., Zhong, K., Gao, H. Insight into the effect of quinic acid on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv*. **2019**, *9*, 3938–3945.
- Baker-Austin, C., Dopson, M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol*. **2007**, *15*, 165–171.
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., Lenaz, G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*. **2003**, *1606*, 137–146.
- Barrientos, R.E., Ibáñez, E., Puerta, A., Padrón, J.M., Paredes, A., Cifuentes, F., Romero-Parra, J., Palacios, J., Bórquez, J., Simirgiotis, M.J. Phenolic Fingerprinting and Bioactivity Profiling of Extracts and Isolated Compounds from *Gypothamnium pinifolium* Phil. *Antioxidants*. **2022**, *11*, 2313.
- Batra, P., Sharma, A.K. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*. **2013**, *3*, 439–459.
- Baudino, T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov. Technol*. **2015**, *12*, 3–20.
- Baumgartner, L., Sosa, S., Atanasov, A.G., Bodensieck, A., Fakhrudin, N., Bauer, J., Favero, G.D., Ponti, C., Heiss, E.H., Schwaiger, S., Ladurner, A., Widowitz, U.,

- Loggia, R.D., Rollinger, J.M., Werz, O., Bauer, R., Dirsch, V.M., Tubaro, A., Stuppner, H. Lignan Derivatives from *Krameria lappacea* Roots Inhibit Acute Inflammation *in Vivo* and Pro-inflammatory Mediators *in Vitro*. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1779–1786.
- Bedard, K., Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2007**, 87, 245–313.
- Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., Ovidi, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Nat. Prod. Res.* **2018**, 32, 1926–1950.
- Bhadane, B.S., Patil, M.P., Maheshwari, V.L., Patil, R.H. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytother. Res.* **2018**, 32, 1181–1210.
- Bharath, B., Perinbam, K., Devanesan, S., AlSalhi, M.S., Saravanan, M. Evaluation of the anticancer potential of Hexadecanoic acid from brown algae *Turbinaria ornata* on HT–29 colon cancer cells. *J Mol. Struct.* **2021**, 1235, 130229.
- Bizzarri, M., Dinicola, S., Bevilacqua, A., Cucina, A. Broad Spectrum Anticancer Activity of Myo-Inositol and Inositol Hexakisphosphate. *Int. J. Endocrinol.* **2016**, 2016, 1–14.
- Bizzarri, M., Dinicola, S., Cucina, A., **2018**. Myoinositol and Inositol Hexakisphosphate in the Treatment of Breast Cancer: Molecular Mechanisms, in: Birkhaeuser, M., Genazzani, A.R. (Eds.), Pre-Menopause, Menopause and Beyond, ISGE Series. Springer International Publishing, Cham, pp. 233–241.
- Boulc'h, P.-N., Caullireau, E., Faucher, E., Gouerou, M., Guérin, A., Miray, R., Couée, I. Abiotic stress signalling in extremophile land plants. *J. Exp. Bot.* **2020**, 71, 5771–5785.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, 28, 25–30.
- Brassescio, M.E., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., Pintado, M. Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): A new perspective for functional food. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, 114, 310–322.
- Brim, H., Venkateswaran, A., Kostandarithes, H.M., Fredrickson, J.K., Daly, M.J. Engineering *Deinococcus geothermalis* for Bioremediation of High-Temperature Radioactive Waste Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 4575–4582.
- Broekgaarden, M., Weijer, R., Van Gulik, T.M., Hamblin, M.R., Heger, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev.* **2015**, 34, 643–690.
- C Reygaert, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, 4, 482–501.
- Caesar, L.K., Cech, N.B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, 36, 869–888.
- Cai, R., Miao, M., Yue, T., Zhang, Y., Cui, L., Wang, Z., Yuan, Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamic acid and chlorogenic acid against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in apple juice. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2019**, 54, 1697–1705.
- Castellano, J.M., Ramos-Romero, S., Perona, J.S. Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity. *Nutrients.* **2022**, 14, 623.

- Ceferino, Guzman, J., Contretas Ezquivel, J., Aguilar, Gonzalez, C., Lopes, Lopez, L., Solis, Salas, L., Sierra, Rivera, C., Mendoza, Duran, T., Silva Belmares, S. Bioactive compounds derived from metabolism of Solanaceae with medicinal effects. *Academia J. Med. Plants*. **2016**, 8, 036 - 047.
- Çelik, T.A., **2018**. Introductory Chapter: Cytotoxicity, in: Çelik, T.A. (Ed.), Cytotoxicity. InTech.
- Chamy, M.C., Garbarino, J.A., Piovano, M., López-Pérez, J.L., Nicoletti, M., Gandolfo, R., San Feliciano, A. 9-epi-labdane diterpenoids from *Nolana rostrata* var. *Rostrata*. *Phytochemistry*. **1997**, 45, 797–800.
- Chauhan, A.K., Kim, J., Lee, Y., Balasubramanian, P.K., Kim, Y. Isorhamnetin Has Potential for the Treatment of *Escherichia coli*-Induced Sepsis. *Molecules*. **2019**, 24, 3984.
- Chen, K., Peng, C., Chi, F., Yu, C., Yang, Q., Li, Z. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Chlorogenic Acid Against *Yersinia enterocolitica*. *Front. Microbiol.* **2022**, 13, 885092.
- Chhetri, D.R. Myo-Inositol and Its Derivatives: Their Emerging Role in the Treatment of Human Diseases. *Front. Pharmacol.* **2019**, 10, 1172.
- Chileflora.pdf [WWW Document], n.d. http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/PIC_FAMILIES_SIMPLE_Zygophyllaceae.php.
- Christenhusz, M.J.M., Byng, J.W. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. **2016**, 261, 201.
- Cifuentes, F., Palacios, J., Bórquez, J., Paredes, A., Parra, C., Bravo, A., Simirgiotis, M.J. Fast Isolation of Flavonoids from the Endemic Species *Nolana ramosissima* I.M. Johnst and Its Endothelium-Independent Relaxation Effect in Rat Aorta. *Molecules*. **2020**, 25, 520.
- Cinkilic, N., Cetintas, S.K., Zorlu, T., Vatan, O., Yilmaz, D., Cavas, T., Tunc, S., Ozkan, L., Bilaloglu, R. Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 53, 359–363.
- Conklin, K.A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integr Cancer Ther.* **2004**, 3, 294–300.
- Diorio, C., Salena, K., Ladas, E.J., Lam, C.G., Afungcwhi, G.M., Njuguna, F., Marjerrison, S. Traditional and complementary medicine used with curative intent in childhood cancer: A systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. **2017**, 64, e26501.
- Djerassi, C., Kutney, J.P., Shamma, M., 1962. Alkaloid studies XXXII. Studies on *Skytanthus acutus* meyen. The structure of the monoterpenoid alkaloid skytanthine. *Tetrahedron*. **1962**, 18, 183–188.
- Donadio, G., Mensitieri, F., Santoro, V., Parisi, V., Bellone, M.L., De Tommasi, N., Izzo, V., Dal Piaz, F. Interactions with Microbial Proteins Driving the Antibacterial Activity of Flavonoids. *Pharmaceutics*. **2021**, 13, 660.
- Drisko, J.A., Chapman, J., Hunter, V.J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* **2003**, 88, 434–439.
- Durand, G.A., Raoult, D., Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2019**, 53, 371–382.

- E. Obrenovich, M., Li, Y., Parvathaneni, K., B. Yendluri, B., H. Palacios, H., Leszek, J., Aliev, G. Antioxidants in Health, Disease and Aging. *CNS Neurol. Disord. Drug Target.* **2011**, 10, 192–207.
- Elmaidomy, A.H., Shady, N.H., Abdeljawad, K.M., Elzamkan, M.B., Helmy, H.H., Tarshan, E.A., Adly, A.N., Hussien, Y.H., Sayed, N.G., Zayed, A., Abdelmohsen, U.R. Antimicrobial potentials of natural products against multidrug resistance pathogens: a comprehensive review. *RSC Adv.* **2022**, 12, 29078–29102.
- Ercan, L., Dođru, M. Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Quinic Acid. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi.* **2022**, 11, 1018–1025.
- Erdemoglu, N., Kusmenoglu, S. Fatty Acid Composition of *Zygophyllum fabago* Seeds. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, 39, 595–596.
- Evans, L.M., Cowey, S.L., Siegal, G.P., Hardy, R.W. Stearate Preferentially Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Nutr. Cancer.* **2009**, 61, 746–753.
- Facchinetti, F., Bizzarri, M., Benvenega, S., D’Anna, R., Lanzone, A., Soulage, C., Di Renzo, G.C., Hod, M., Cavalli, P., Chiu, T.T., Kamenov, Z.A., Bevilacqua, A., Carlomagno, G., Gerli, S., Oliva, M.M., Devroey, P. Results from the International Consensus Conference on Myo-inositol and d-chiro-inositol in Obstetrics and Gynecology: the link between metabolic syndrome and PCOS. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2015**, 195, 72–76.
- Feller, G. Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica.* **2013**, 2013, 1–28.
- Fernández-Bertólez, N., Costa, C., Bessa, M.J., Park, M., Carriere, M., Dussert, F., Teixeira, J.P., Pásaro, E., Laffon, B., Valdiglesias, V. Assessment of oxidative damage induced by iron oxide nanoparticles on different nervous system cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2019**, 845, 402989.
- Forman, H.J., Ursini, F., Maiorino, M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, 73, 2–9.
- Fulda, S. Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, 9, 1096–1107.
- Galvez Gomez, C., **2012**. Conociendo la cultura colla, Santiago, Chile.
- Garbarino, J.A., Cardile, V., Lombardo, L., Chamy, M.C., Piovano, M., Russo, A. Demalonyl thrysiflorin A, a semisynthetic labdane-derived diterpenoid, induces apoptosis and necrosis in human epithelial cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **2007**, 169, 198–206.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, 482, 419–425.
- Gemmell, R.T., Knowles, C.J. Utilisation of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 192, 185–190.
- George, S., Abrahamse, H. Redox Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. *Antioxidants.* **2020**, 9, 1156.
- Gerber, D.E. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. Targeted Therapies. *Am. Fam. Physician.* **2008**, 77, 311 - 319.
- Giddings, L.-A., Newman, D.J., **2015**. Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles, SpringerBriefs in Microbiology. Springer International Publishing, Cham.

- Goh, J., Enns, L., Fatemie, S., Hopkins, H., Morton, J., Pettan-Brewer, C., Ladiges, W. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC Cancer*. **2011**, 11, 191.
- Golay, J., Introna, M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of *in vitro* and *in vivo* assays. *Archives Biochem Biophys*. **2012**, 526, 146–153.
- Gonzalez-Rocha, E., Cerros Tlatipla, R. La familia Apocynaceae (Apocynoideae y Rauvolfioideae) en el estado de Morelos, México. *Act. Bot. Mex*. **2015**, 110, 21–70.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev*. **2019**, 18, 241–272.
- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov*. **2013**, 12, 931–947.
- Green, D.R., Llambi, F., **2015**. Cell Death Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a006080.
- Gu, W., Zhang, A., Sun, H., Gu, Y., Chao, J., Tian, R., Duan, J.-A. Identifying resurrection genes through the differentially expressed genes between *Selaginella tamariscina* (Beauv.) spring and *Selaginella moellendorffii* Hieron under drought stress. *PLoS ONE*. **2019**, 14, e0224765.
- Gueboudji, Z., Addad, D., Kadi, K., Nagaz, K., Secrafi, M., Yahya, L.B., Lachehib, B., Abdelmalek, A. Biological activities and phenolic compounds of olive oil mill wastewater from Abani, endemic Algerian variety. *Sci Rep*. **2022**, 12, 6042.
- Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Asp. Med*. **2006**, 27, 1–93.
- Gürler, S.B., Kiraz, Y., Baran, Y., **2020**. Flavonoids in cancer therapy: current and future trends, in: Biodiversity and Biomedicine. Elsevier, pp. 403–440.
- Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D., Mehta, B.K. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *J. Taibah Univ. Sci*. **2016**, 10, 462–470.
- Habtamu, A., Melaku, Y. Antibacterial and Antioxidant Compounds from the Flower Extracts of *Vernonia amygdalina*. *Adv. Pharmacol. Sci*. **2018**, 2018, 1–6.
- Habtetsion, T., Ding, Z.-C., Pi, W., Li, T., Lu, C., Chen, T., Xi, C., Spartz, H., Liu, K., Hao, Z., Mivechi, N., Huo, Y., Blazar, B.R., Munn, D.H., Zhou, G. Alteration of Tumor Metabolism by CD4⁺ T Cells Leads to TNF- α -Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. *Cell Metabolism*. **2018**, 28, 228-242.e6.
- Hardy, S., Langelier, Y., Prentki, M. Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Promotes Proliferation and Reduces Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, Whereas Palmitate Has Opposite Effects. *Cancer Res*. **2000**, 60, 6353 - 6358.
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov*. **2015**, 14, 111–129.
- Hashim, S., Bakht, T., Marwat, K.B., Jan, A. Medicinal properties, Phytochemistry and Pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae). *Pak. J. Bot*. **2014**, 46, 399 - 404.
- He, X., Wang, S., Shi, J., Sun, Z., Lei, Z., Yin, Z., Qian, Z., Tang, H., Xie, H. Genotypic and Environmental Effects on the Volatile Chemotype of *Valeriana jatamansi* Jones. *Front. Plant Sci*. **2018**, 9, 1003.

- Hernández Tasco, A.J., Ramírez Rueda, R.Y., Alvarez, C.J., Sartori, F.T., Sacilotto, A.C.B.C., Ito, I.Y., Vichnewski, W., Salvador, M.J. Antibacterial and antifungal properties of crude extracts and isolated compounds from *Lychnophora markgravii*. *Nat. Prod. Res.* **2020**, 34, 863–867.
- Hmidi, D., Messedi, D., Corratgi¹/₂-Faillie, C., Marhuenda, T., Fizames, C., Zorrig, W., Abdelly, C., Sentenac, H., Viç¹/₂ry, A.-A. Investigation of Na⁺ and K⁺ Transport in Halophytes: Functional Analysis of the HmHKT2;1 Transporter from *Hordeum maritimum* and Expression under Saline Conditions. *Plant Cell Physiol.* **2019**, 60, 2423–2435.
- Holmström, K.M., Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, 15, 411–421.
- Hsiao, Y.-H., Lin, C.-I., Liao, H., Chen, Y.-H., Lin, S.-H. Palmitic Acid-Induced Neuron Cell Cycle G2/M Arrest and Endoplasmic Reticular Stress through Protein Palmitoylation in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 20876–20899.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem. Res. Int.* **2017**, 2017, 1–10.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Hatada, Y. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles.* **1998**, 2, 185–190.
- Jakus, J., Farkas, O. Photosensitizers and antioxidants: a way to new drugs?. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 694–698.
- Jang, S.-A., Park, D.W., Kwon, J.E., Song, H.S., Park, B., Jeon, H., Sohn, E.-H., Koo, H.J., Kang, S.C. Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96, 563–571.
- Jayasooriya, R., Kang, C.-H., Park, S., Choi, Y.-H., Kim, G.-Y. Pinitol suppresses tumor necrosis factor- α -induced invasion of prostate cancer LNCaP cells by inhibiting nuclear factor- κ B-Mediated matrix Metalloproteinase-9 expression. *Trop. J. Pharm. Res.* **2015**, 14, 1357.
- Jebbar, M., Franzetti, B., Girard, E., Oger, P. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles.* **2015**, 19, 721–740.
- Jeong, H., Kim, S., Lee, J., Park, J.Y., Zhou, W., Liu, X., Kim, S.D., Song, Y.S., Jang, C.-Y., Oh, S.-R., Choi, S., Chang, M. Characterization of Phase I and Phase II Hepatic Metabolism and Reactive Intermediates of *Larrea nitida* Cav. and Its Lignan Compounds: Hepatic Metabolism of *Larrea nitida* Cav. and its Lignan Compounds. *Phytother. Res.* **2017**, 31, 140–151.
- Jeong, R.U., Lim, S., Kim, M.O., Moon, M.H. Effect of d-allose on prostate cancer cell lines: phospholipid profiling by nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 689–698.
- Jeong, S.-Y., Ahn, H., Bae, G.-U., Chang, M., Liu, X., Rhee, H.-K., Lee, J., Chin, Y.-W., Oh, S.-R., Song, Y.S. Isoguaiacins, Arylnaphthalene Types Identified as Novel Potent Estrogenic Signaling Molecules from *Larrea nitida*: Estrogenic Properties of Isoguaiacins from *Larrea nitida*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2015**, 36, 2254–2259.
- Jia, P., Dai, C., Cao, P., Sun, D., Ouyang, R., Miao, Y. The role of reactive oxygen species in tumor treatment. *RSC Adv.* **2020**, 10, 7740–7750.

- Johnson D. B. Acidophilic Microbial Communities: Candidates for Bioremediation of Acidic Mine Effluents. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. **1995**, 35, 41 - 58.
- Joly, M., Attard, E., Sancelme, M., Deguillaume, L., Guilbaud, C., Morris, C.E., Amato, P., Delort, A.-M. Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water. *Atmospheric Environment*. **2013**, 70, 392–400.
- Joshi, P., Vishwakarma, R.A., Bharate, S.B. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. *Eur. J. Med. Chem*. **2017**, 138, 273–292.
- Jung, S.-H., Heo, H.-Y., Choe, J.-W., Kim, J., Lee, K. Anti-Melanogenic Properties of Velutin and Its Analogs. *Molecules*. **2021**, 26, 3033.
- Kabir, F., Katayama, S., Tanji, N., Nakamura, S. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. **2014**, 57, 359–365.
- Karunanidhi, A., Thomas, R., Van Belkum, A., Neela, V. *In Vitro* Antibacterial and Antibiofilm Activities of Chlorogenic Acid against Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistant Strain. *BioMed Res. Int*. **2013**, 2013, 1–7.
- Katz, L., Baltz, R.H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **2016**, 43, 155–176.
- Kim, Jongdoo, Kim, Jaehong, Bae, J.-S. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Exp. Mol. Med*. **2016**, 48, e269–e269.
- Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Savickas, A., Bernatoniene, J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. **2020**, 12, 457.
- Kotoku, N., Arai, M., Kobayashi, M. Search for Anti-angiogenic Substances from Natural Sources. *Chem. Pharm. Bull*. **2016**, 64, 128–134.
- Kreitman, R.J. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J*. **2006**, 8, E532 - E551.
- Kumar, R., Patel, D.D., Bansal, D.D., Mishra, S., Mohammed, A., Arora, R., Sharma, A., Sharma, R.K., Tripathi, R.P., **2010**. Extremophiles: Sustainable Resource of Natural Compounds-Extremolytes, in: Singh, O.V., Harvey, S.P. (Eds.), Sustainable Biotechnology. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 279–294.
- Kumar, S., Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J*. **2013**, 2013, 1–16.
- Lacret, R., Puerta, A., Granica, S., González-Bakker, A., Hevia, D., Teng, Y., Sánchez-Mateo, C., Pérez De Paz, P.L., Padrón, J. Bioactive Potential: A Pharmacognostic Definition through the Screening of Four Hypericum Species from the Canary Islands. *Molecules*. **2022**, 27, 6101.
- Lam, S., McWilliams, A., leRiche, J., MacAulay, C., Wattenberg, L., Szabo, E. A Phase I Study of *myo* -Inositol for Lung Cancer Chemoprevention. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. **2006**, 15, 1526–1531.
- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M., Zemzami, M., Atif, N., Nadori, E.B., Zaid, A., Lyoussi, B. *In vitro* cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*. **2000**, 71, 50–54.
- Las plantas endémicas de Chile. <https://chileanendemics.rbge.org.u>.
- Lin, L., Ding, Y., Wang, Y., Wang, Z., Yin, X., Yan, G., Zhang, L., Yang, P., Shen, H. Functional lipidomics: Palmitic acid impairs hepatocellular carcinoma development by modulating membrane fluidity and glucose metabolism. *Hepatology*. **2017**, 66, 432–448.
- Lins, A.P., Felicio, J.D. Monoterpene alkaloids from *Tecoma stans*. *Phytochemistry*. **1993**, 34, 876–878.

- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *J. Food Sci.* **2011**, 76.
- Madaan, R., Kumar, S., Bansal, G., Sharma, A., 2011. Estimation of total phenols and flavonoids in extracts of *Actaea spicata* roots and antioxidant activity studies. *Indian J. Pharm. Sci.* **73**, 666.
- Majnooni, M.B., Ghanadian, S.M., Mojarrab, M., Bahrami, G., Mansouri, K., Mirzaei, A., Farzaei, M.H. Antibacterial, Antibiofilm, Antiswarming, and Antioxidant Activities of Flavonoids Isolated from *Allium colchicifolium* Leaves. *J. Food Biochem.* **2023**, 2023, 1–14.
- Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A.L., Colla, R., Ciucis, C.D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N., Domenicotti, C. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxidative Med. Cell. Long.* **2016**, 2016, 1–16.
- Mellado, M., Soto, M., Madrid, A., Montenegro, I., Jara-Gutiérrez, C., Villena, J., Werner, E., Godoy, P., Aguilar, L.F. *In vitro* antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, 19, 53.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., Hu, Y. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2013**, 2013, 1–11.
- Mfouo Tynga, I., Abrahamse, H. Nano-Mediated Photodynamic Therapy for Cancer: Enhancement of Cancer Specificity and Therapeutic Effects. *Nanomaterials.* **2018**, 8, 923.
- Minton, K.W., Daly, M.J. A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. *Bioessays.* **1995**, 17, 457–464.
- Mishra, Verma, Rai, Awasthee, Arya, Maiti, Gupta. Curcuma raktakanda Induces Apoptosis and Suppresses Migration in Cancer Cells: Role of Reactive Oxygen Species. *Biomolecules.* **2019**, 9, 159.
- Monk, B.C., Sagatova, A.A., Hosseini, P., Ruma, Y.N., Wilson, R.K., Keniya, M.V. Fungal Lanosterol 14 α -demethylase: A target for next-generation antifungal design. *Biochim. Biophys Acta (BBA) - Proteins Proteom.* **2020**, 1868, 140206.
- Montenegro, I., Moreira, J., Ramírez, I., Dorta, F., Sánchez, E., Alfaro, J.F., Valenzuela, M., Jara-Gutiérrez, C., Muñoz, O., Alvear, M., Werner, E., Madrid, A., Villena, J., Seeger, M. Chemical Composition, Antioxidant and Anticancer Activities of *Leptocarpha rivularis* DC Flower Extracts. *Molecules.* **2020**, 26, 67.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., Thompson, B.M. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J.* **2008**, 2, 321–334.
- Moss, R.W. Do Antioxidants Interfere With Radiation Therapy for Cancer?. *Integr. Cancer Ther.* **2007**, 6, 281–292.
- Moustafa, A.M.Y., Khodair, A.I., Hammouda, F.M., Hussein, H.A. Phytochemical and Toxicological Studies of *Zygophyllum album* L.f. *J. Pharm. Toxicol.* **2007**, 2, 220–237.
- Muflihah, Y.M., Gollavelli, G., Ling, Y.-C. Correlation Study of Antioxidant Activity with Phenolic and Flavonoid Compounds in 12 Indonesian Indigenous Herbs. *Antioxidants* (Basel). **2021**, 10, 1530.

- Naha, N., Lee, H.Y., Jo, M.J., Chung, B.C., Kim, S.H., Kim, M.O. Rare sugar d-allose induces programmed cell death in hormone refractory prostate cancer cells. *Apoptosis*. **2008**, 13, 1121–1134.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 97, 67–74.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 770–803.
- Nies, D.H. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles*. **2000**, 4, 77–82.
- Nimse, S.B., Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **2015**, 5, 27986–28006.
- Ninfa Ramírez D., Serrano R. Juan Antonio, Sandoval T. Horacio. Microorganismos Extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2006**, 37(3), 56–71.
- Nirmal, S.A., Patel, A.P., Bhawar, S.B., Pattan, S.R. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. *J Ethnopharmacol.* **2012**, 142, 91–97.
- Norton, C.F., Grant, W.D. Survival of Halobacteria Within Fluid Inclusions in Salt Crystals. *Microbiology*. **1988**, 134, 1365–1373.
- Noviany, Osman, H. Structure Elucidation of Betulinic Acid from *Sesbania grandiflora* Root. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2021**, 1751, 012090.
- Oren, A., Gurevich, P., Gemmell, R.T., Teske, A. Halobaculum gomorrense gen. nov., sp. nov., a Novel Extremely Halophilic Archaeon from the Dead Sea. *Int. J. System. Bacteriol.* **1995**, 45, 747–754.
- Ortiz, S., Lecsö-Bornet, M., Bonnal, C., Houze, S., Michel, S., Grougnet, R., Boutefnouchet, S. Bioguided identification of triterpenoids and neolignans as bioactive compounds from anti-infectious medicinal plants of the Taira Atacama's community (Calama, Chile). *J. Ethnopharmacol.* **2019**, 231, 217–229.
- Padilla-Pérez, M.C., Sánchez-Fernández, E.M., González-Bakker, A., Puerta, A., Padrón, J.M., Martín-Loro, F., Arroba, A.I., García Fernández, J.M., Mellet, C.O. Fluoro-labelled sp²-iminoglycolipids with immunomodulatory properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 255, 115390.
- Padmanabhan, P., Cheema, A., Paliyath, G. **2016**. Solanaceous Fruits Including Tomato, Eggplant, and Peppers, in: Encyclopedia of Food and Health. Elsevier, pp. 24–32.
- Pandi, A., Sattu, K., Kalappan, V.M., Lal, V., Varikasuvu, S.R., Ganguly, A., Prasad, J. Pharmacological effects of D-PINITOL – A comprehensive review. *J. Food Biochem.* **2022**, 46.
- Park, H., Yoo, Y., Hahn, T.-R., Bhoo, S., Lee, S.-W., Cho, M.-H. Antimicrobial Activity of UV-Induced Phenylamides from Rice Leaves. *Molecules*. **2014**, 19, 18139–18151.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., Pompliano, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 29–40.
- Pedros-Alió, C. **2021**. Las plantas de atacama: el desierto cálido más árido del mundo. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.
- Pereira, D., Correia-da-Silva, G., Valentão, P., Teixeira, N., Andrade, P. Palmitic Acid and Ergosta-7,22-dien-3-ol Contribute to the Apoptotic Effect and Cell Cycle Arrest of

- an Extract from *Marthasterias glacialis* L. in Neuroblastoma Cells. *Mar Drugs*. **2013**, 12, 54–68.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., Migliaccio, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp. Mol. Med.* **2020**, 52, 192–203.
- Perumal, S.S., Shanthi, P., Sachdanandam, P. Combined efficacy of tamoxifen and coenzyme Q10 on the status of lipid peroxidation and antioxidants in DMBA induced breast cancer. *Mol. Cell Biochem.* **2005**, 273, 151–160.
- Pettit, R.K. Culturability and Secondary Metabolite Diversity of Extreme Microbes: Expanding Contribution of Deep Sea and Deep-Sea Vent Microbes to Natural Product Discovery. *Mar Biotechnol.* **2011**, 13, 1–11.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, 4, 89 - 96.
- Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M.M., Hu, Z., Huddleston, S.E., Zhao, Z., Leitch, A.M., Johnson, T.M., DeBerardinis, R.J., Morrison, S.J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*. **2015**, 527, 186–191.
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* **2018**, 6, 6.4.14.
- Polle, A., Chen, S. On the salty side of life: molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats: Salt tolerance in trees. *Plant Cell Environ.* **2015**, 38, 1794–1816.
- Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., Feron, O., Michiels, C., Gallez, B., Sonveaux, P. A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Reports*. **2014**, 8, 754–766.
- Porras, G., Chassagne, F., Lyles, J.T., Marquez, L., Dettweiler, M., Salam, A.M., Samarakoon, T., Shabih, S., Farrokhi, D.R., Quave, C.L. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chem. Rev.* **2021**, 121, 3495–3560.
- Pourali, M., Yaghoobi, M.M., Salehi Sormaghi, M.H. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of *Tribulus terrestris* L. Fruit Extract on Human Prostate Cancer Lncap and Colon Cancer HT-29 Cell Lines. *Jundishapur J Nat. Pharm. Prod.* **2016**, 12, e33561.
- Puerta, A., González-Bakker, A., Santos, G., Padrón, J.M. Early Pharmacological Profiling of Antiproliferative Compounds by Live Cell Imaging. *Molecules*. **2022**, 27, 5261.
- Rahman, Md.M., Rahaman, Md.S., Islam, Md.R., Rahman, F., Mithi, F.M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M.A., Alghamdi, S.Q., Alruwaili, A.S., Hossain, Md.S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T.B., Uddin, Md.S. Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*. **2021**, 27, 233.
- Raichel Nivetha, X., Jeslin Jeba Soundari, M., Muthukumar Nadar, M., Premnath, D., Mosae Selvakumar, P., Chang, R. An Insight into Cancer and Anticancer Drugs. *Acta Sci. Medic.* **2019**, 3, 32–43.
- Ramadan, M.F. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Res. Int.* **2011**, 44, 1830–1836.

- Ramírez-Cisneros, M., Rios, M., Ríos-Gómez, R., Aguilar-Guadarrama, A. Cycloartanes from *Krameria pauciflora* and Their *In Vitro* PLA2, COX-1, and COX-2 Enzyme Inhibitory Activities. *Planta Med.* **2012**, 78, 1942–1948.
- Rani, A., Souche, Y.S., Goel, R. Comparative assessment of in situ bioremediation potential of cadmium resistant acidophilic *Pseudomonas putida* 62BN and alkalophilic *Pseudomonas monteilli* 97AN strains on soybean. *Int. Biodeter. Biodegradat.* **2009**, 63, 62–66.
- Ranieri, G., Patruno, R., Ruggieri, E., Montemurro, S., Valerio, P., Ribatti, D. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Target of Bevacizumab in Cancer: From the Biology to the Clinic. *CMC.* **2006**, 13, 1845–1857.
- Rashid, U., Khan, M.R., Jan, S., Bokhari, J., Shah, N.A. Assessment of phytochemicals, antimicrobial and cytotoxic activities of extract and fractions from *Fagonia olivieri* (Zygophyllaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, 13, 167.
- Rayan, A., Raiyn, J., Falah, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLoS ONE.* **2017**, 12, e0187925.
- Rengarajan, T., Nandakumar, N., Rajendran, P., Haribabu, L., Nishigaki, I., Balasubramanian, M.P. D-Pinitol Promotes Apoptosis in MCF-7 Cells via Induction of p53 and Bax and Inhibition of Bcl-2 and NF-κB. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, 15, 1757–1762.
- Ritchie, M., Tchistiakova, L., Scott, N. Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *MAbs.* **2013**, 5, 13–21.
- Roh, J., Lee, H.-W. A myo-inositol diet for lung cancer prevention and beyond. *J. Thorac. Dis.* **2018**, 10, S3919–S3921.
- Rojas, J.L., Martín, J., Tormo, J.R., Vicente, F., Brunati, M., Ciciliato, I., Losi, D., Van Trappen, S., Mergaert, J., Swings, J., Marinelli, F., Genilloud, O. Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Mar. Genomics.* **2009**, 2, 33–41.
- Roldán-Peña, J.M., Puerta, A., Dinić, J., Jovanović Stojanov, S., González-Bakker, A., Hicke, F.J., Mishra, A., Piyasaengthong, A., Maya, I., Walton, J.W., Pešić, M., Padrón, J.M., Fernández-Bolaños, J.G., López, Ó. Biotinylated selenocyanates: Potent and selective cytostatic agents. *Bioorg. Chem.* **2023**, 133, 106410.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., HoRN, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **1988**, 239, 6.
- Sangpairoj, K., Settaomkul, R., Siangcham, T., Meemon, K., Niamnont, N., Sornkaew, N., Tamtin, M., Sobhon, P., Vivithanaporn, P. Hexadecanoic acid-enriched extract of *Halymenia durvillei* induces apoptotic and autophagic death of human triple-negative breast cancer cells by upregulating ER stress. *Asian Pac. J Trop. Biomed.* **2022**, 12, 132.
- Santoso, B.B., Hernandez, H.P., Rodriguez, E.B., Dalmacio, I.F. Two Antibacterial Compounds: Velutin and 4- (Hydroxy (Oxiran-2-yl)Methyl)-2-Methoxyphenol from the Stem Bark of *Drimys arfakensis* Gibbs. *KnE Life Sci.* **2017**, 3, 51.
- Seca, A.M.L. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 263.

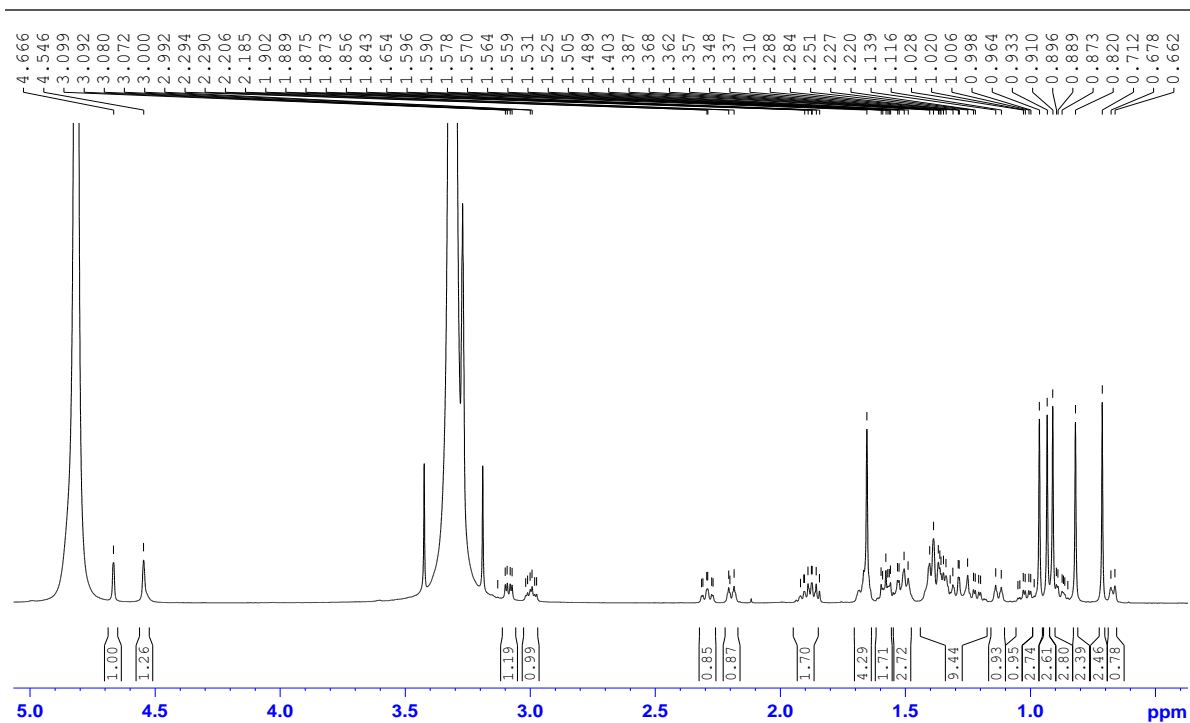
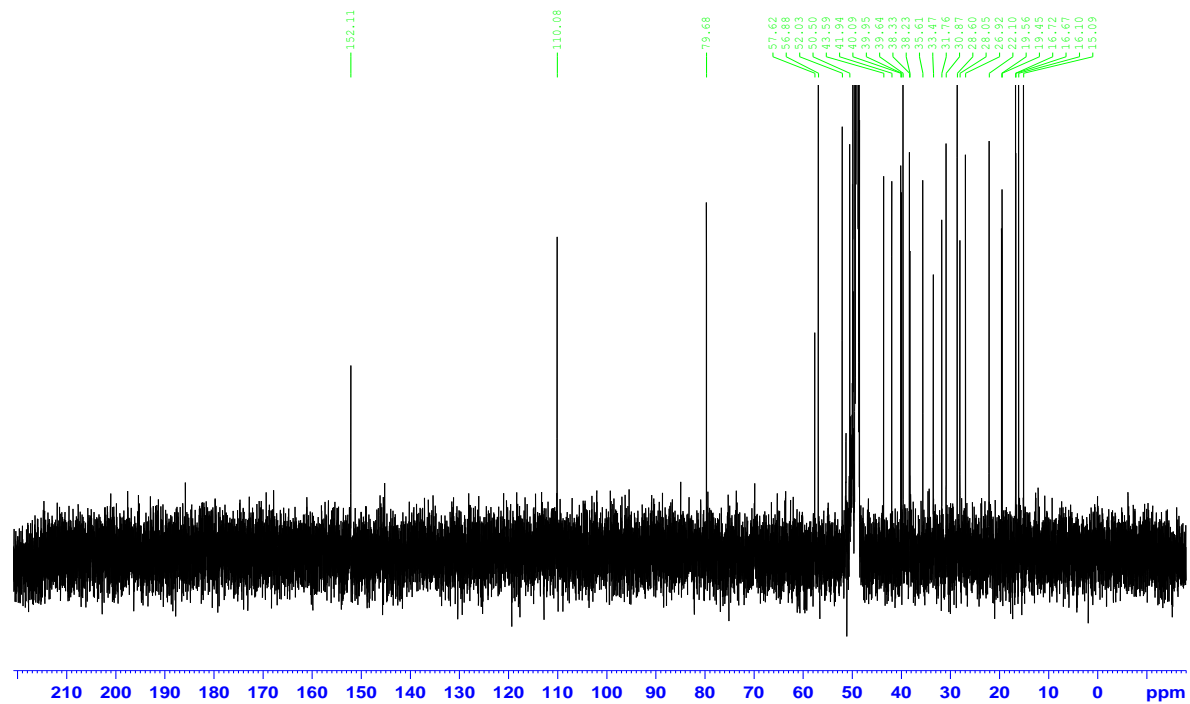
- Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18 β -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, 41, 636–638.
- Seelinger, M., Popescu, R., Giessrigl, B., Jarukamjorn, K., Unger, C., Wallnöfer, B., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Diaz, R., Jäger, W., Frisch, R., Kopp, B., Krupitza, G. Methanol extract of the ethnopharmaceutical remedy *Smilax spinosa* exhibits anti-neoplastic activity. *Int. J. Oncol.* **2012**, 41, 1164–1172.
- Sethi, G., Ahn, K.S., Sung, B., Aggarwal, B.B. Pinitol targets nuclear factor- κB activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 1604–1614.
- Shah, R., Alabri, S.J.A., Ashehi, A.S.M.A., Asiyabi, N.S.S.A., AlMamari, W.K.A.A., AlSabahi, J.N.A., Al-Ruqaishi, H. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Crude Extract and Oil of *Zygophyllum (Fagonia) luntii* (Baker) 1894 (Family Zygophyllaceae). *J. Agri. Mar. Scie.* **2020**, 25, 58.
- Sharma, A., Sharma, S. Reactive Oxygen species and antioxidants in periodontics: A review. *Int. J Dental Clin.* **2011**, 3, 44–47.
- Sheahan, M.C. **2007**. Zygophyllaceae: Zygophyllaceae R. Br., Flind. Voy. Bot. app. 3:545 (1814). Balanitaceae Endl. (1841)., in: Kubitzki, K. (Ed.), Flowering Plants · Eudicots. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 488–500.
- Shen, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell.* **2015**, 163, 1297–1300.
- Shen, S., Shao, Y., Li, C. Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell Death Discov.* **2023**, 9, 284.
- Shiota, S., Shimizu, M., Sugiyama, J., Morita, Y., Mizushima, T., Tsuchiya, T. Mechanisms of Action of Corilagin and Tellimagrandin I That Remarkably Potentiate the Activity of β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **2004**, 48, 67–73.
- Simirgiotis, M., Benites, J., Areche, C., Sepúlveda, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules.* **2015**, 20, 11490–11507.
- Singh, K., Bhorl, M., Kasu, Y.A., Bhat, G., Marar, T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm. J.* **2018**, 26, 177–190.
- Singh, S.B., Barrett, J.F. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 1006–1015.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 152–178. h
- Stefanatos, R., Sanz, A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett.* **2018**, 592, 743–758.
- Stompor, M. A Review on Sources and Pharmacological Aspects of Sakuranetin. *Nutrients.* **2020**, 12, 513.
- Su, M., Liu, F., Luo, Z., Wu, H., Zhang, X., Wang, D., Zhu, Y., Sun, Z., Xu, W., Miao, Y. The Antibacterial Activity and Mechanism of Chlorogenic Acid Against Foodborne Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, 16, 823–830.

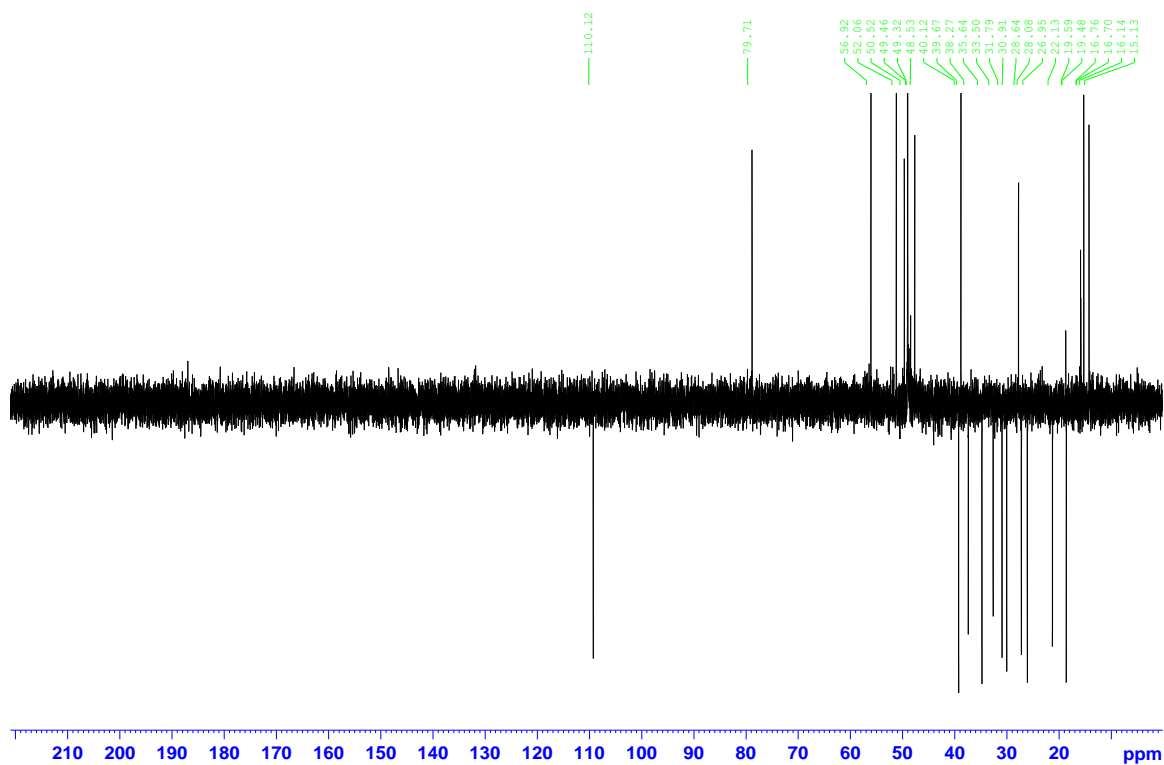
- Sui, L., Dong, Y., Watanabe, Y., Yamaguchi, F., Hatano, N., Izumori, K., Tokuda, M. Growth Inhibitory Effect of D-allose on Human Ovarian Carcinoma Cells *In Vitro*. *Anticancer Res.* **2005**, 25, 2639 - 2644.
- Sun, Z., Zhang, X., Wu, H., Wang, H., Bian, H., Zhu, Y., Xu, W., Liu, F., Wang, D., Fu, L. Antibacterial activity and action mode of chlorogenic acid against *Salmonella enteritidis*, a foodborne pathogen in chilled fresh chicken. *World J Microbiol Biotechnol.* **2020**, 36, 24.
- Taborga, L., Espinoza, L., Moller, A., Carrasco, H., Cuellar, M., Villena, J. Antiproliferative effect and apoptotic activity of linear geranylphenol derivatives from phloroglucinol and orcinol. *Chem. Biol. Interac.* **2016**, 247, 22–29.
- Tanaka, S.K., Steenbergen, J., Villano, S. Discovery, pharmacology, and clinical profile of omadacycline, a novel aminomethylcycline antibiotic. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 6409–6419.
- Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O.O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, Q., Ullah, R., Khan, S., Basnet, B.B., Kumar, B., Islam, R., Adnan, M. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants: Anti-cancer plants. *Phytother. Res.* **2017**, 31, 202–264.
- Teixeira, T.R., Santos, G.S. dos, Armstrong, L., Colepicolo, P., Debonsi, H.M. Antitumor Potential of Seaweed Derived-Endophytic Fungi. *Antibiotics.* **2019**, 8, 205.
- Terpe, K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2013**, 97, 10243–10254.
- The global cancer observatory 2021. gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf
- Ticha, L.A., Klaasen, J.A., Green, I.R., Naidoo, S., Baker, B., Pietersen, R.-D. Phytochemical and Antimicrobial Screening of Flavanones and Chalcones from *Galenia africana* and *Dicerotheramnus rhinocerotis*. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, 10, 1934578X1501000.
- Tindall, B.J., Ross, H.N.M., Grant, W.D. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., Two New Genera of Haloalkaliphilic Archaeobacteria. *System. Applied Microbiol.* **1984**, 5, 41–57.
- Tiwari, M., Dubey, Anarag, Dubey, Amubhav. D-Pinitol - A Natural Phytomolecule and its Pharmacological effect. *Int. J Pharm. Life Sci.* **2020**, 11, 6609–6623.
- Tohi, Y., Taoka, R., Zhang, X., Matsuoka, Y., Yoshihara, A., Ibuki, E., Haba, R., Akimitsu, K., Izumori, K., Kakehi, Y., Sugimoto, M. Antitumor Effects of Orally Administered Rare Sugar D-Allose in Bladder Cancer. *Int. J Mol. Sci.* **2022**, 23, 6771.
- Torres, R., Urbina, F., Morales, C., Modak, B., Monache, F.D. Antioxidant properties of lignans and ferulic acid from the resinous exudate of *Larrea nitida*. *J. Chil. Chem. Soc.* **2003**, 48.
- Torres, R., Urzua, A., Modak, B. Isopregomisin, a 1, 4-Bis(phenyl)-2, 3-dimethylbutane Lignan from *Porlieria chilensis*. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 402–403.
- Trivedi, H., Puranik, P.K. Antibacterial activity of chlorogenic acid phytovesicles against resistant bacteria: development, optimization and evaluation. *Int. J. App. Pharm.* **2022**, 83–92.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44–84.
- Vega Cacabelos. **2020**. Libro Medicina Ancestral, Punta Arenas - Chile.
- Venditti, A., Bianco, A., Frezza, C., Conti, F., Bini, L.M., Giuliani, C., Bramucci, M., Quassinti, L., Damiano, S., Lupidi, G., Beghelli, D., Caterbi, S., Petrelli, D., Vitali, L.A., Papa, F., Caprioli, G., Maggi, F. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. *Ind. Crops Prod.* **2015**, 77, 353–363.
- Vichai, V., Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1112–1116.
- Vile, G.F., Tyrrell, R.M. Uva radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18, 721–730.
- Vivas, R., Barbosa, A.A.T., Dolabela, S.S., Jain, S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microb. Drug Resist.* **2019**, 25, 890–908.
- Wallace, D.C., Fan, W., Procaccio, V. Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2010**, 5, 297–348.
- Wang, L., Cao, X., Pei, H., Liu, P., Song, Y., Wu, Y. Anti-Biofilm Activity of Chlorogenic Acid against *Pseudomonas* Using Quorum Sensing System. *Foods.* **2023**, 12, 3601.
- Wilson, V.G., **2013**. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes, in: Turksen, K. (Ed.), *Epidermal Cells, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 33–41.
- Worldwide cancer data – World Cancer Research Fund International. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/>.
- Wright, G.D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, 34, 694–701.
- Wu, Y., Liang, S., Zhang, M., Wang, Zhenhua, Wang, Ziyuan, Ren, X. The Effect of Chlorogenic Acid on *Bacillus subtilis* Based on Metabolomics. *Molecules.* **2020**, 25, 4038.
- Xu, B., Aitken, E.J., Baker, B., Turner, C., Harvey, J., Stott, M., Power, J.F., Harris, P.W., Keyzers, R., Brimble, M.A. Genome Mining, Isolation, Chemical Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Lanthipeptide, Tikitericin and N-Truncated Analogues, from the Extremophilic Microorganism *Thermogemmatispora* Strain T81. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 7311–7317.
- Yamaguchi, F., Kamitori, K., Sanada, K., Horii, M., Dong, Y., Sui, L., Tokuda, M. Rare sugar d-allose enhances anti-tumor effect of 5-fluorouracil on the human hepatocellular carcinoma cell line HuH-7. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, 106, 248–252.
- Yan, G., Elbadawi, M., Efferth, T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad Sci J.* **2020**, 39 - 48.
- Yan, Z., Lai, Z., Lin, J. Anticancer Properties of Traditional Chinese Medicine. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2017**, 20, 423 - 429.
- Yang, C., Chen, Y., Guo, W., Gao, Y., Song, C., Zhang, Q., Zheng, N., Han, X., Guo, C. Bismuth Ferrite-Based Nanoplatfrom Design: An Ablation Mechanism Study of Solid Tumor and NIR-Triggered Photothermal/Photodynamic Combination Cancer Therapy. *Adv. Funct. Materials.* **2018**, 28, 1706827.

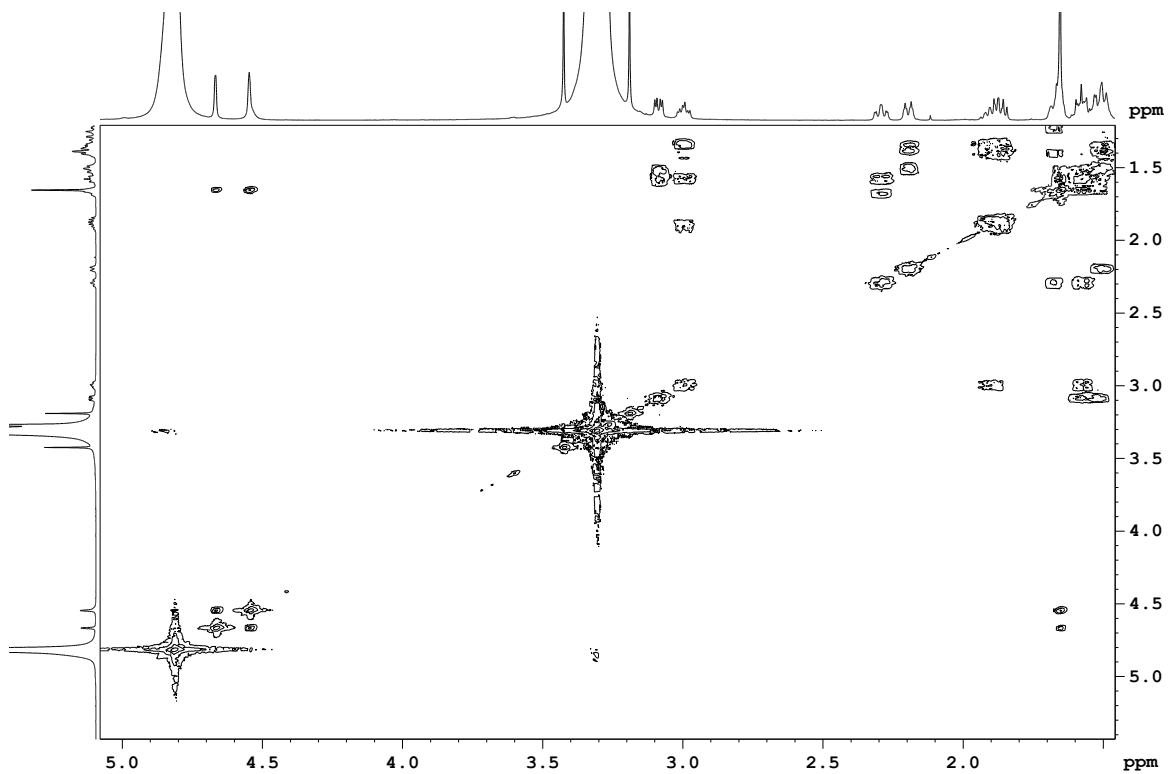
- Yang, L., Yang, M., Cui, C., Long, X., Li, Y., Lang, T., Zhou, Q. The myo-inositol biosynthesis rate-limiting enzyme ISYNA1 suppress the stemness of ovarian cancer. In Review. **2023**.
- Yao, H., Liu, J., Xu, S., Zhu, Z., Xu, J. The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, 12, 121–140.
- Yao, X., Shi, K., Yang, Y., Gu, X., Tan, W., Wang, Q., Gao, X., Priya Veeraraghavan, V., Mohan, S.K., Jin, S. D-Pinitol treatment induced the apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells by improved apoptotic signaling pathway. *Saudi J. Biolog. Sci.* **2020**, 27, 2134–2138.
- Yokohira, M., Hosokawa, K., Yamakawa, K., Saoo, K., Matsuda, Y., Zeng, Y., Kuno, T., Imaida, K. Potential inhibitory effects of d-allose, a rare sugar, on liver preneoplastic lesion development in F344 rat medium-term bioassay. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, 105, 545–553.
- Yu, X., Peng, W., Wang, Y., Xu, W., Chen, W., Huang, L., Xu, H., He, X., Wang, S., Sun, Q., Lu, W., Xu, Y. Palmitic Acid Inhibits the Growth and Metastasis of Gastric Cancer by Blocking the STAT3 Signaling Pathway. *Cancers.* **2023**, 15, 388.
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H., Bahadar, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, 124, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zhang, J., Yang, P.L., Gray, N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, 9, 28–39.
- Zhang, M., Liu, W.-X., Zheng, M.-F., Xu, Q.-L., Wan, F.-H., Wang, J., Lei, T., Zhou, Z.-Y., Tan, J.-W. Bioactive Quinic Acid Derivatives from *Ageratina adenophora*. *Molecules.* **2013**, 18, 14096–14104.
- Zhang, T., Guo, Z., Huo, X., Gong, Y., Li, C., Huang, J., Wang, Y., Feng, H., Ma, X., Jiang, C., Yin, Q., Xue, L. Dysregulated lipid metabolism blunts the sensitivity of cancer cells to EZH2 inhibitor. *eBioMedicine.* **2022**, 77, 103872.
- Zhao, L., Wang, L., Di, S., Xu, Q., Ren, Q., Chen, S., Huang, N., Jia, D., Shen, X. Steroidal alkaloid solanine A from *Solanum nigrum* Linn. exhibits anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide/interferon γ -activated murine macrophages and animal models of inflammation. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 105, 606–615.
- Zheng, L.-J., Guo, Q., Zhang, Y.-X., Liu, C.-Y., Fan, L.-H., Zheng, H.-D. Engineering of *Escherichia coli* for D-allose fermentative synthesis from D-glucose through izumoring cascade epimerization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, 10, 1050808.
- Zhu, S., Jiao, W., Xu, Y., Hou, L., Li, H., Shao, J., Zhang, X., Wang, R., Kong, D. Palmitic acid inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by suppressing the PI3K/Akt pathway. *Life Sci.* **2021**, 286, 120046.
- Zhuang, X., Han, Z., Bai, Z., Zhuang, G., Shim, H. Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. *Environ. Pollut.* **2010**, 158, 1119–1126.
- Ziane, L., Djellouli, M., Berghioua, A. Short Communication: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Fagonia longispina* (Zygophyllaceae) of Algerian. *Biodiversitas.* **2021**, 22, 3448 - 3453.
- Zimmer, A.R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., Oliveira, J.R. de, Gosmann, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, 139, 228–233.

11. Anexos

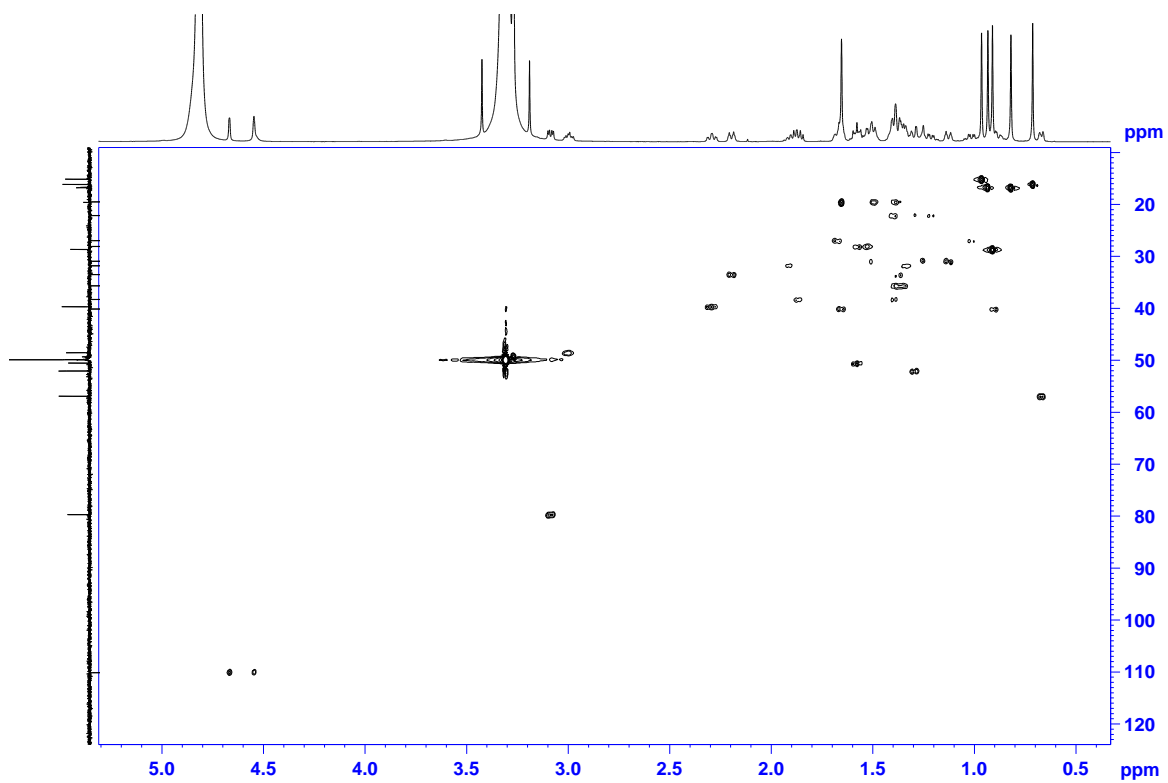
Anexo 1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 1: ácido betulínico.Anexo 2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 1: ácido betulínico.



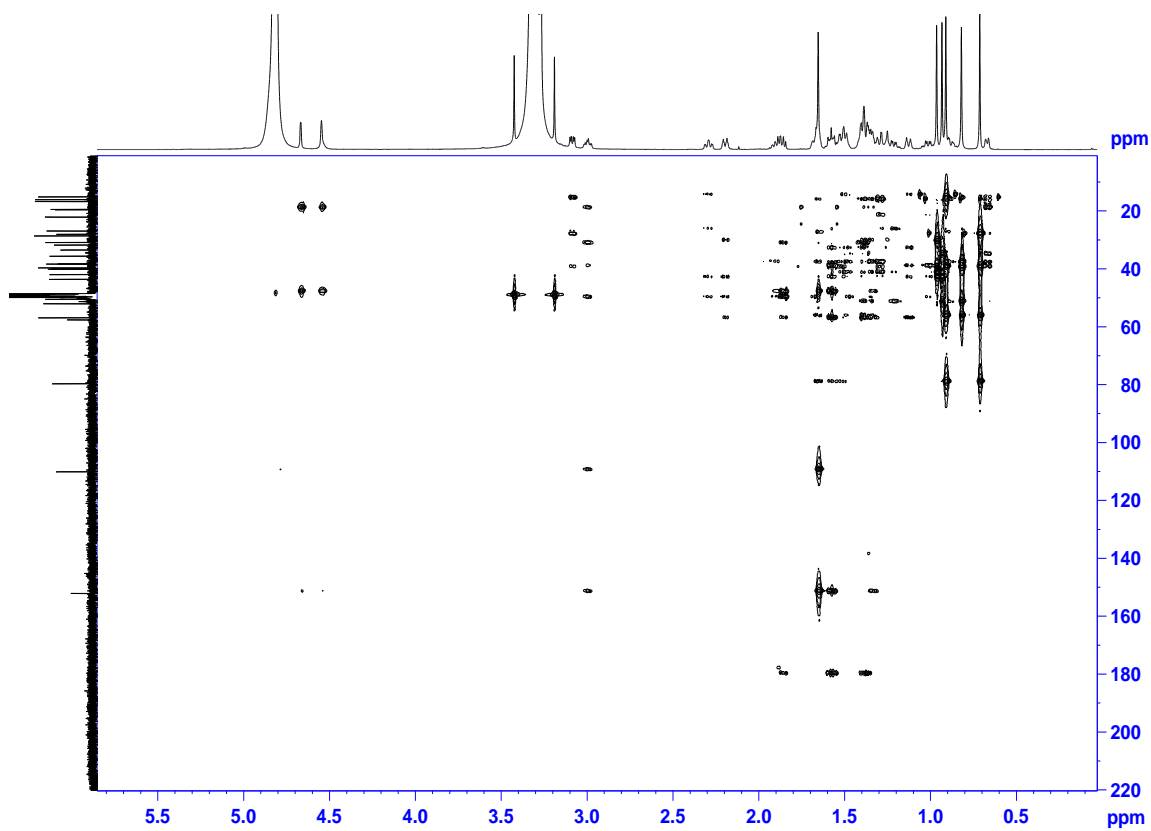
Anexo 3. Espectro de DEPT-135 del compuesto 1: ácido betulínico.



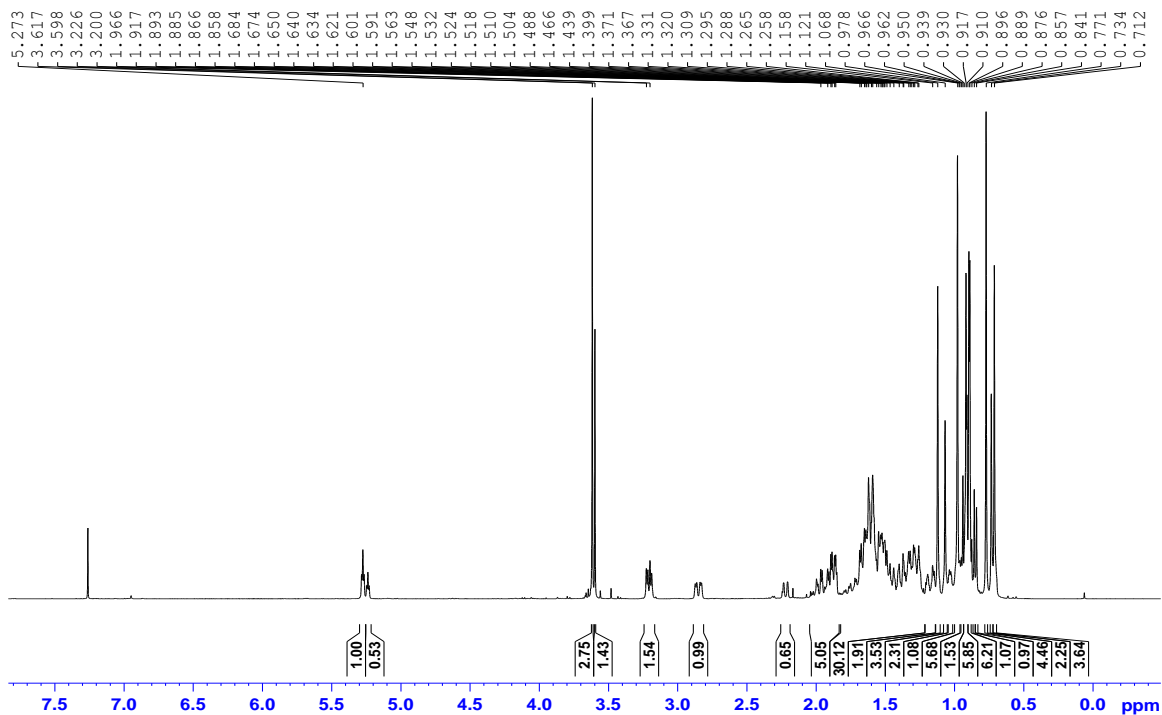
Anexo 4. Espectro de ^1H - ^1H -COSY del compuesto 1: ácido betulínico.



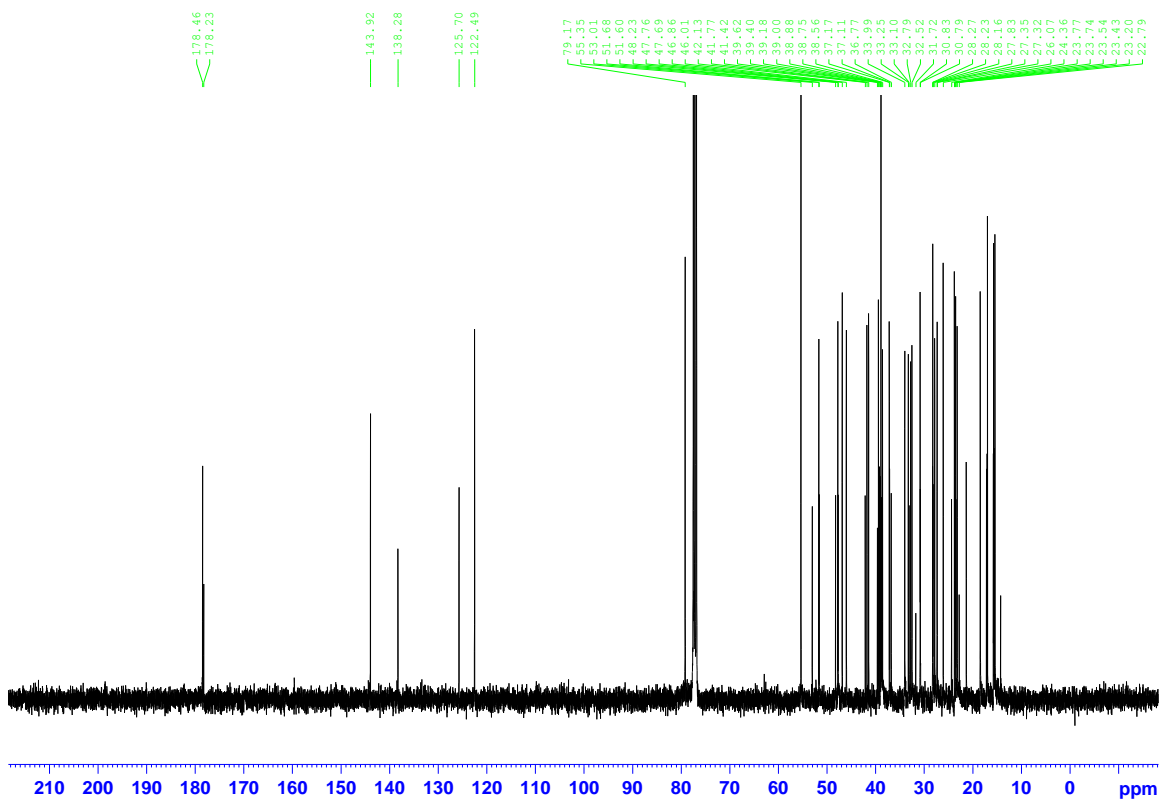
Anexo 5. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto 1: ácido betulínico.



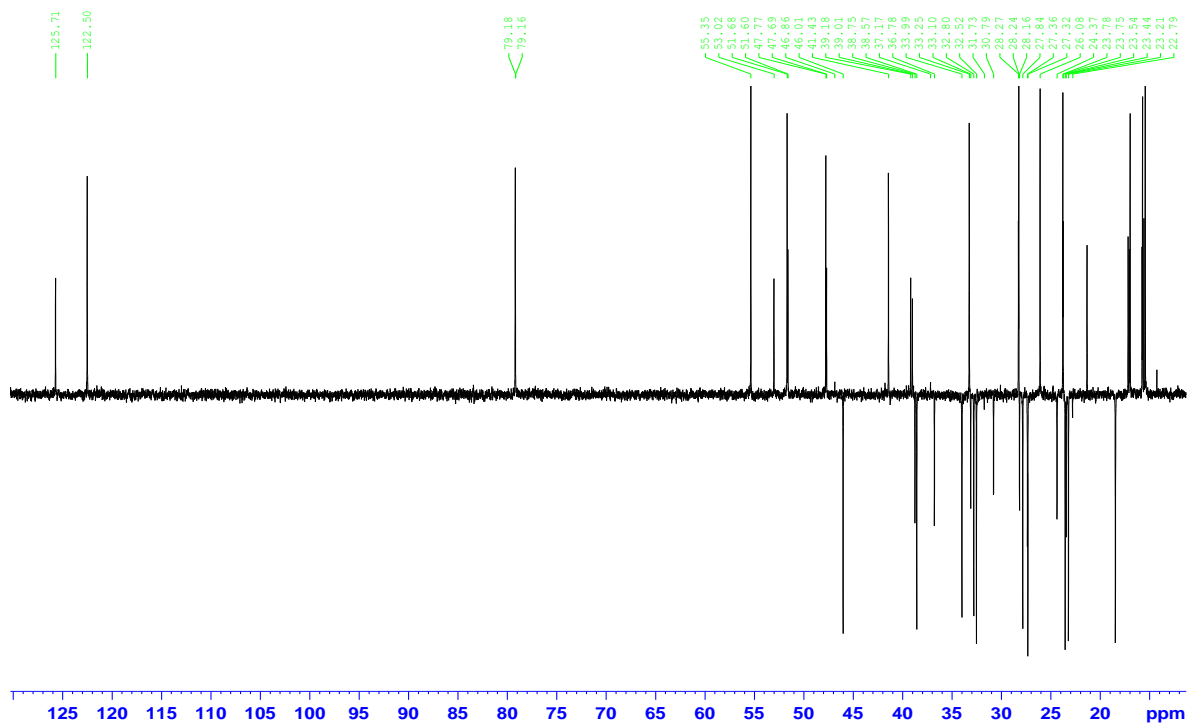
Anexo 6. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 1: ácido betulínico.



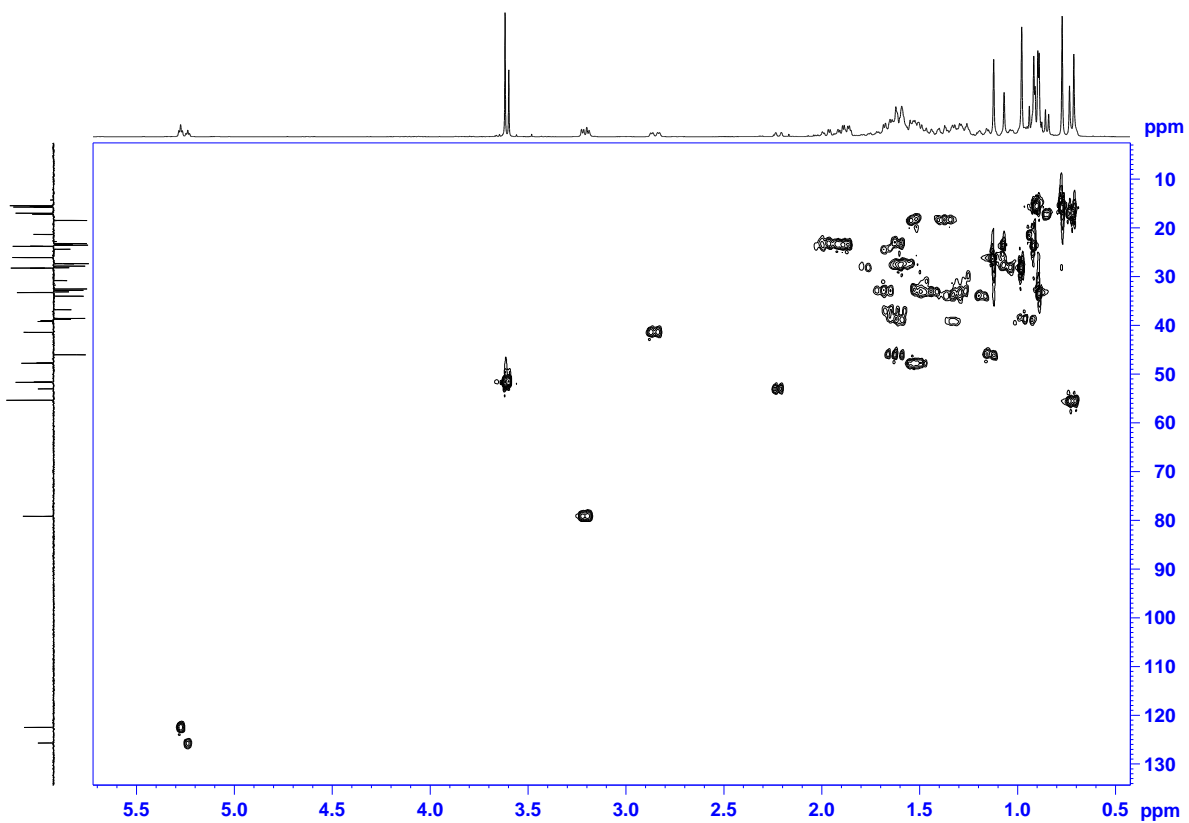
Anexo 7. Espectro de ^1H -RMN de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.



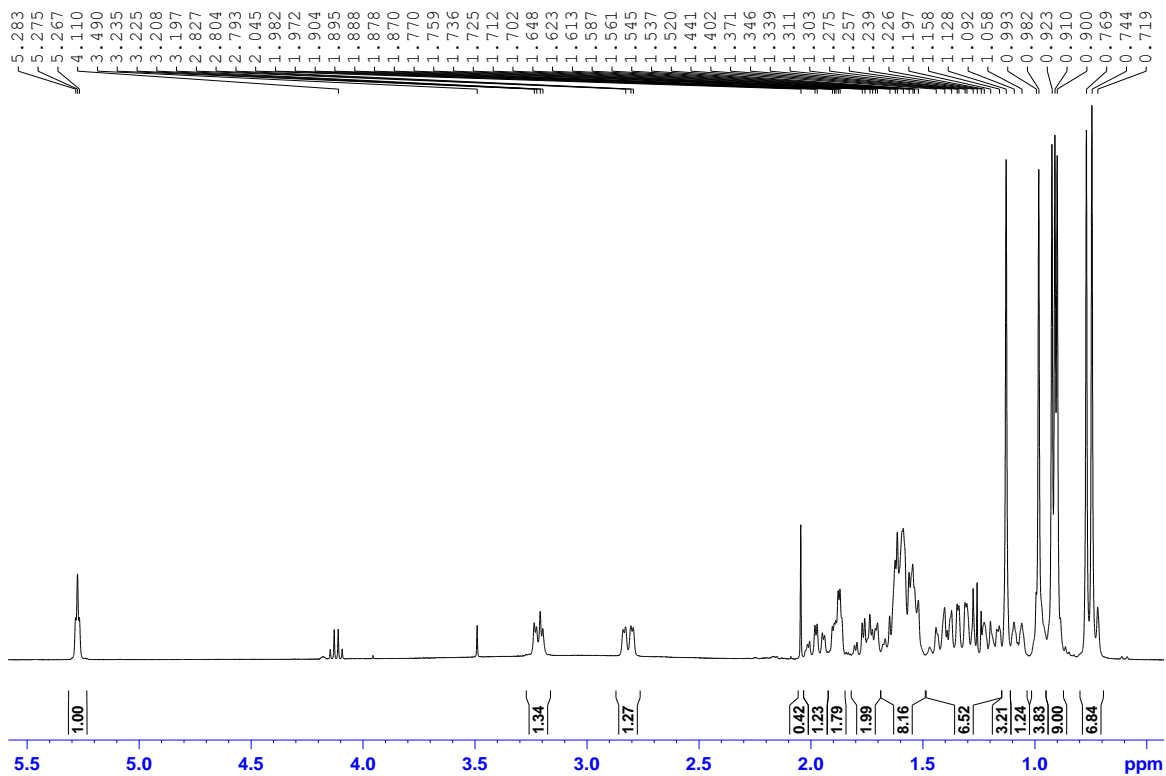
Anexo 8. Espectro de ^{13}C -RMN de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.



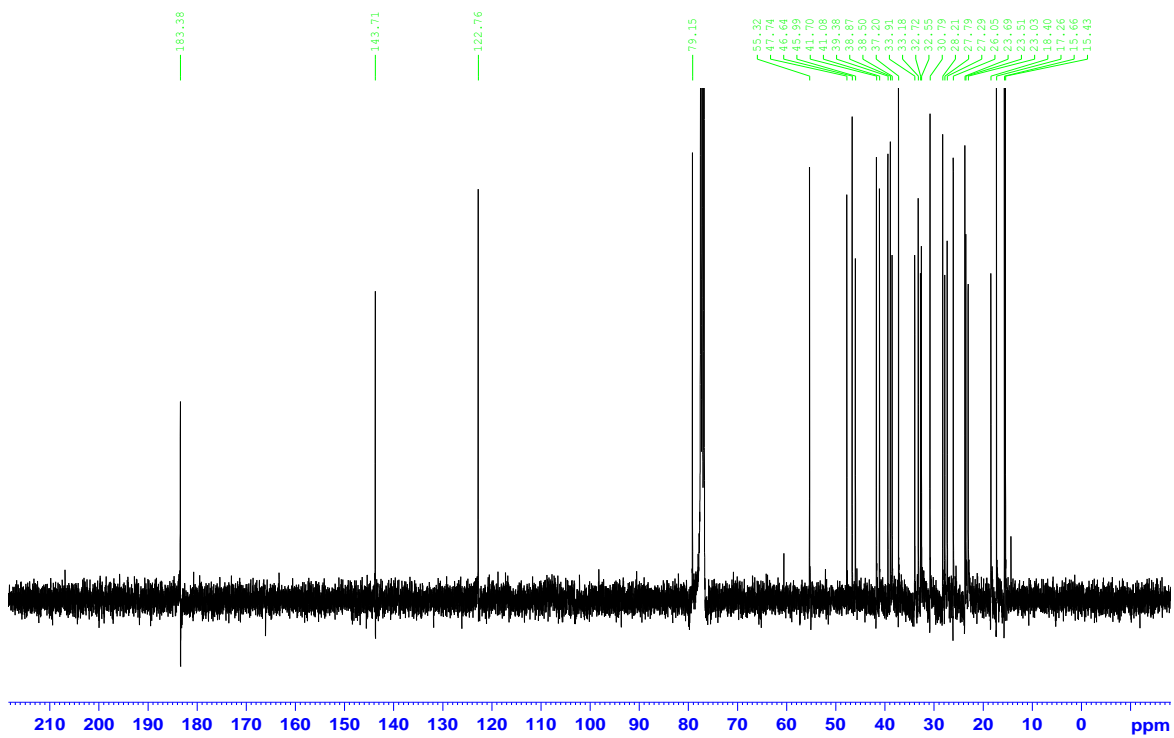
Anexo 9. Espectro de DEPT-135 de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.



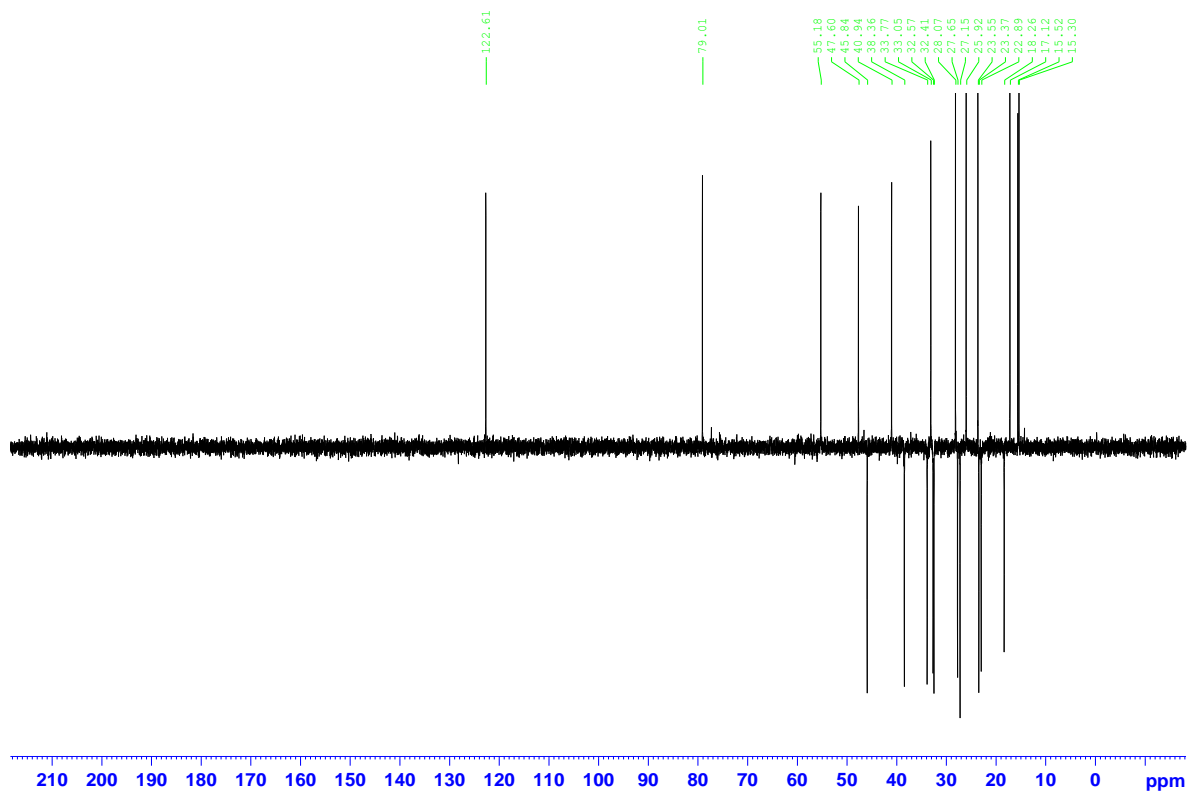
Anexo 10. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HSQC de mezcla de compuestos 2 y 3: ácido oleanólico metilado e isómero.



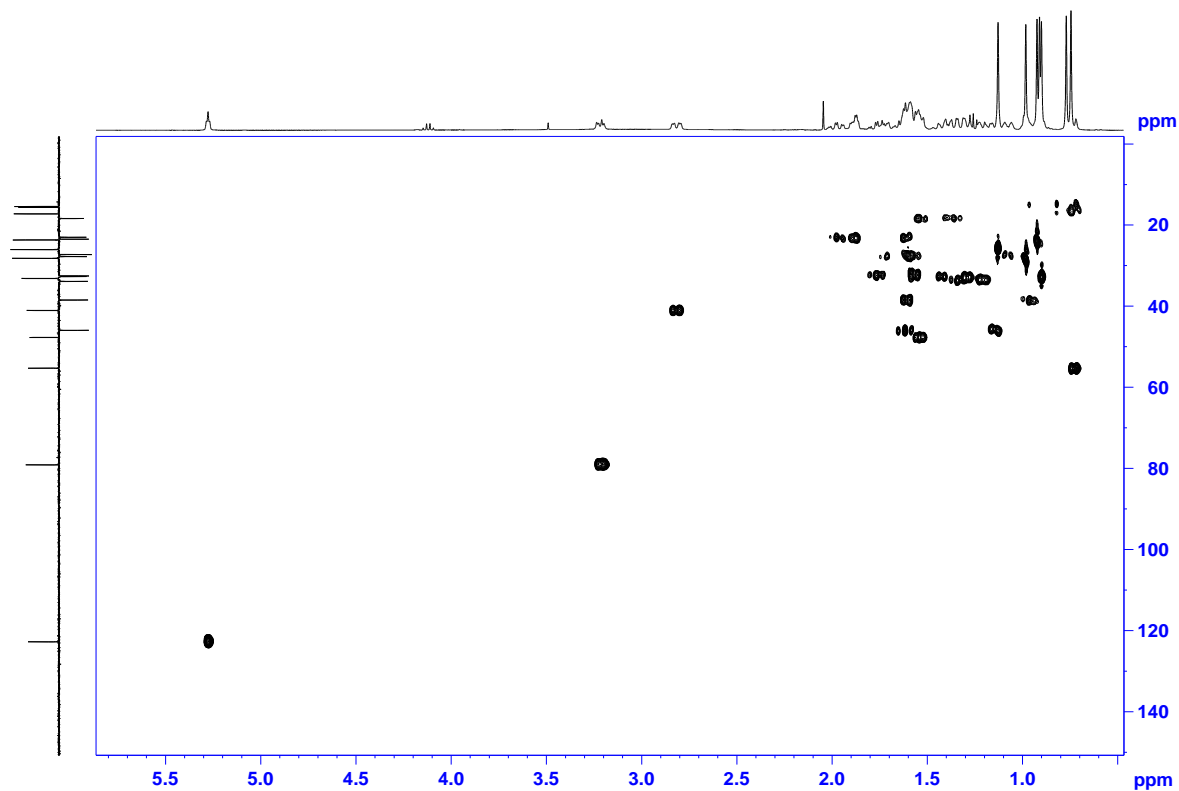
Anexo 11. Anexo 11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 4: ácido oleanólico.



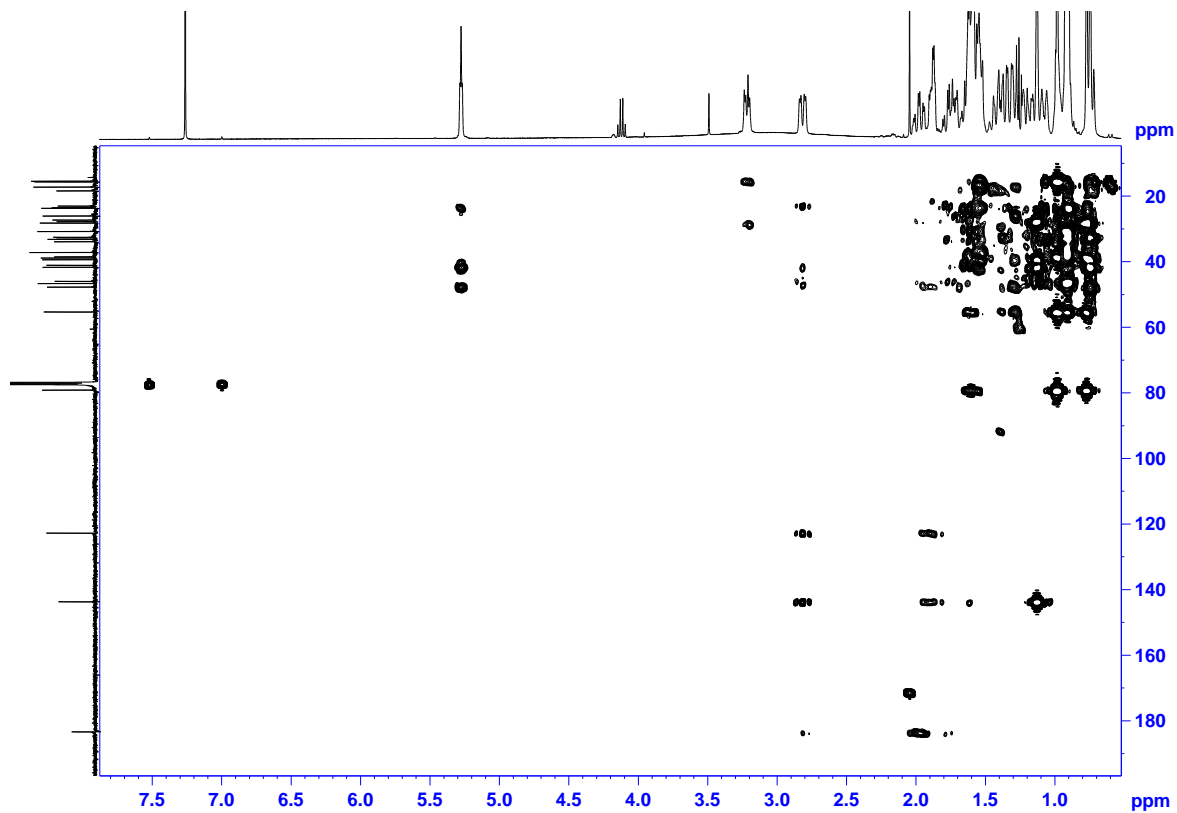
Anexo 12. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 4: ácido oleanólico.



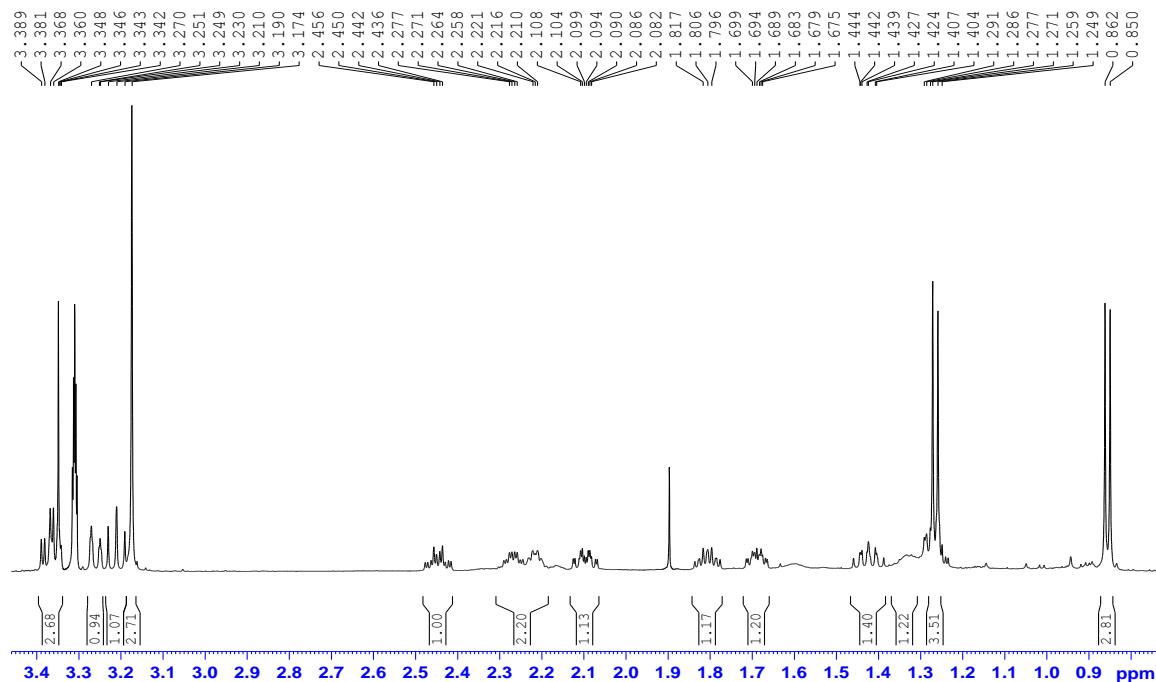
Anexo 13. Espectro de DEPT-135 del compuesto 4: ácido oleanólico.



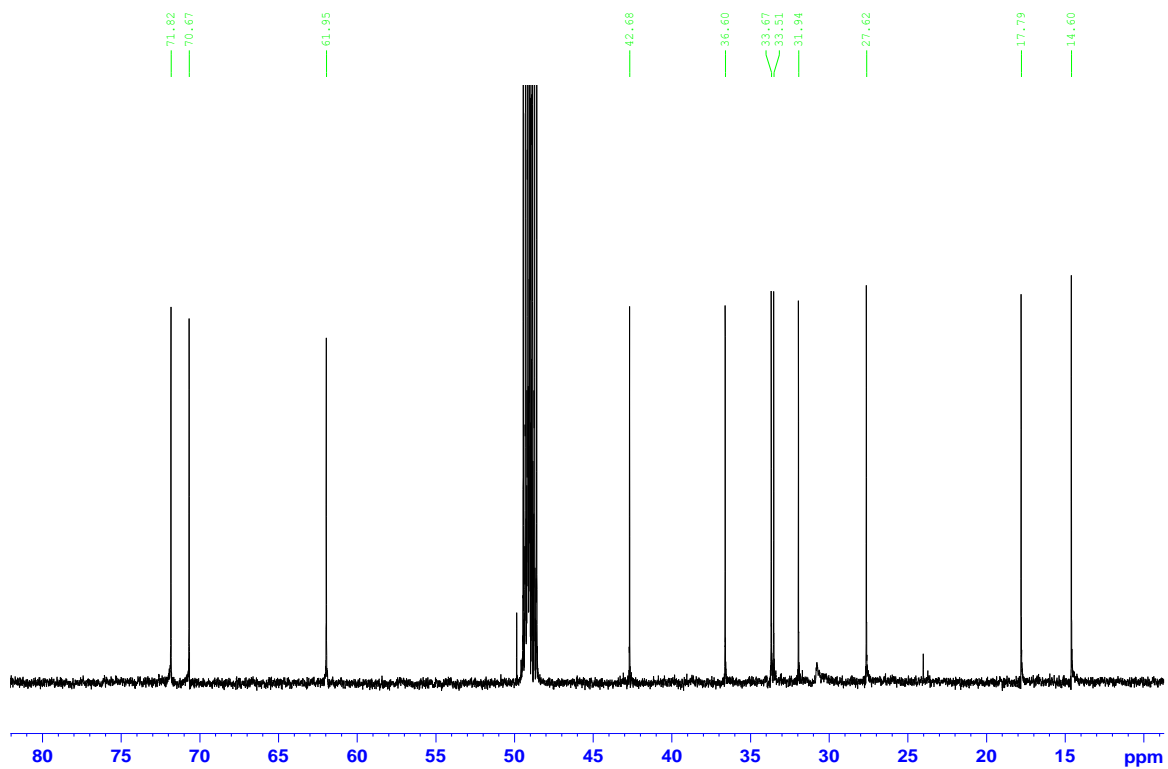
Anexo 14. Espectro de 2D 1H-13C-HSQC del compuesto 4: ácido oleanólico.



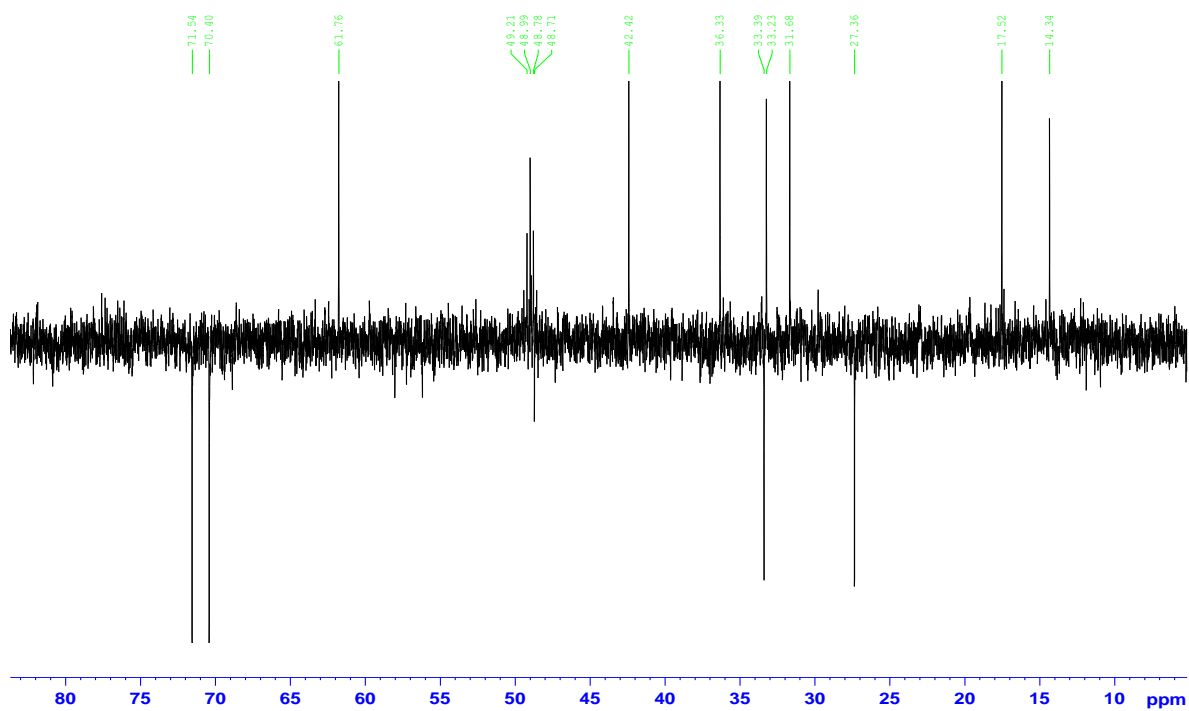
Anexo 15. Espectro de 2D 1H-13C-HMBC del compuesto 4: ácido oleanólico.



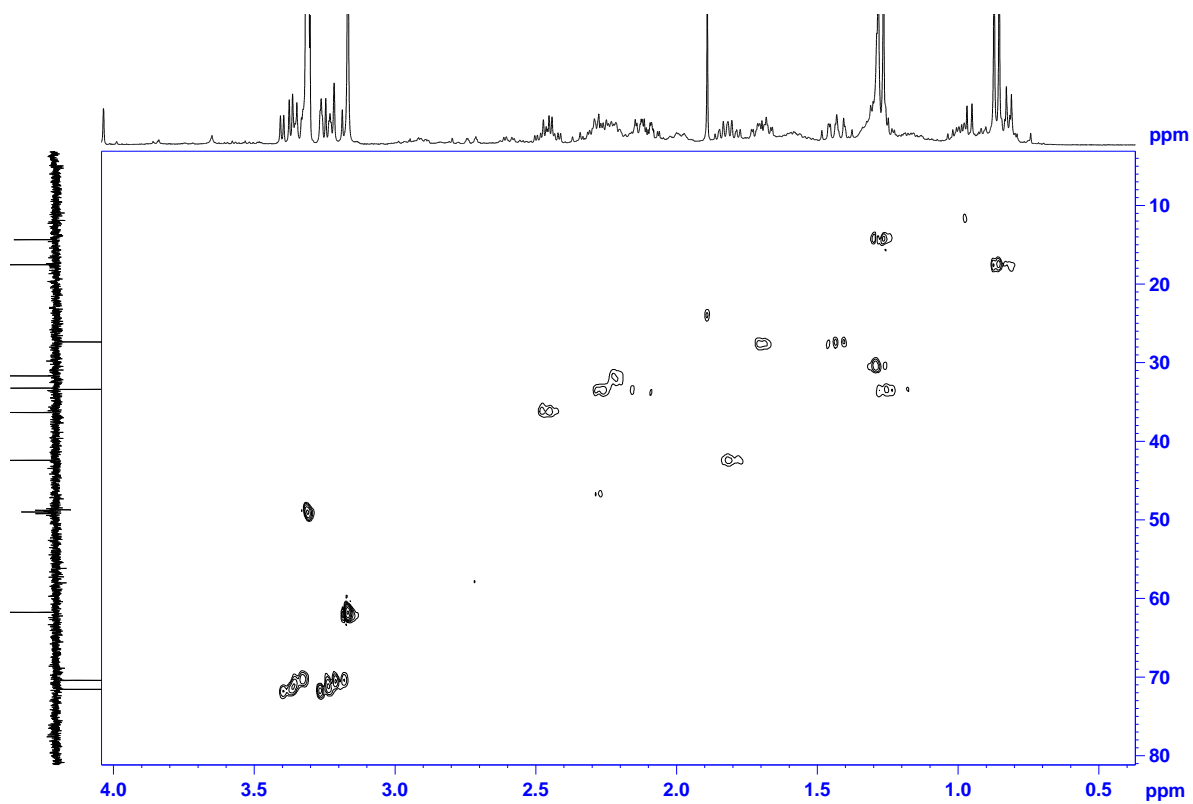
Anexo 16. Espectro de 1H-RMN del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.



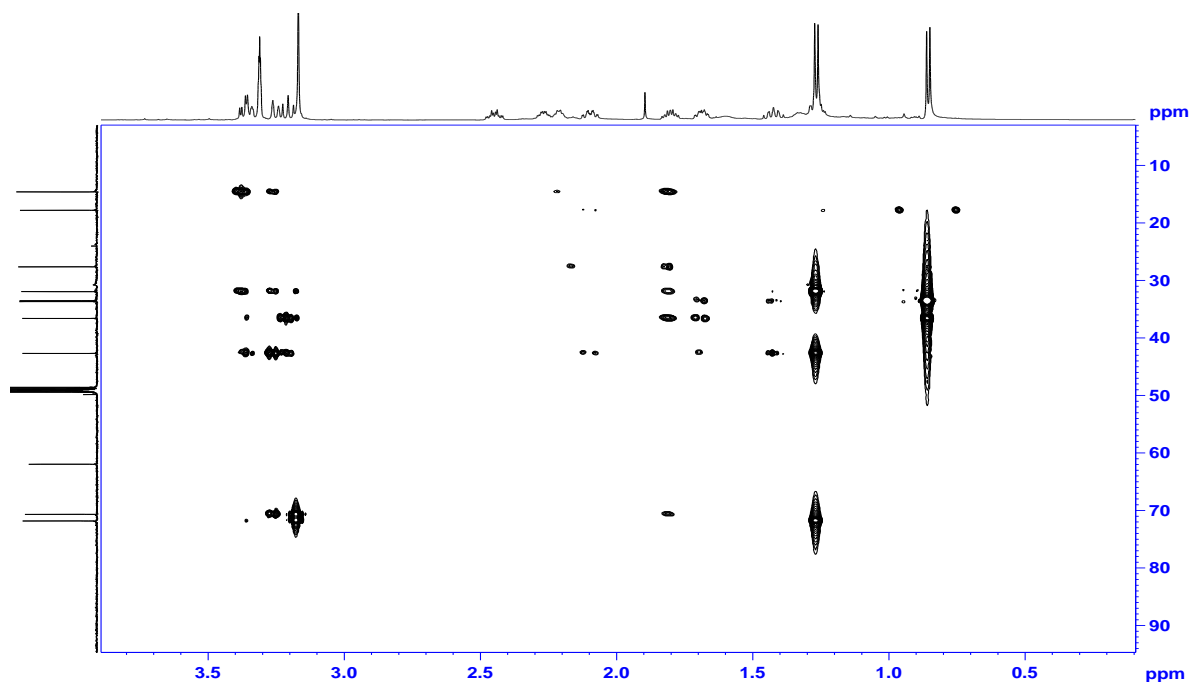
Anexo 17. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.



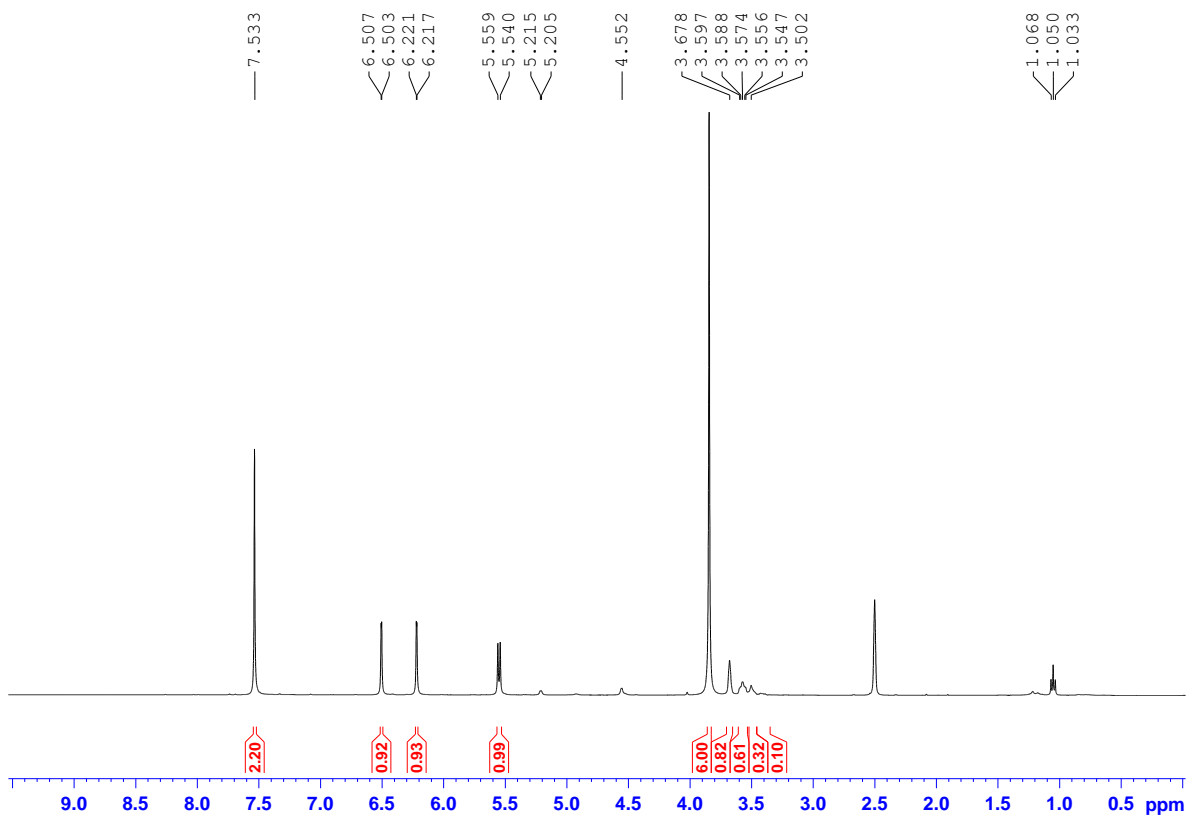
Anexo 18. Espectro de DEPT-135 del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.



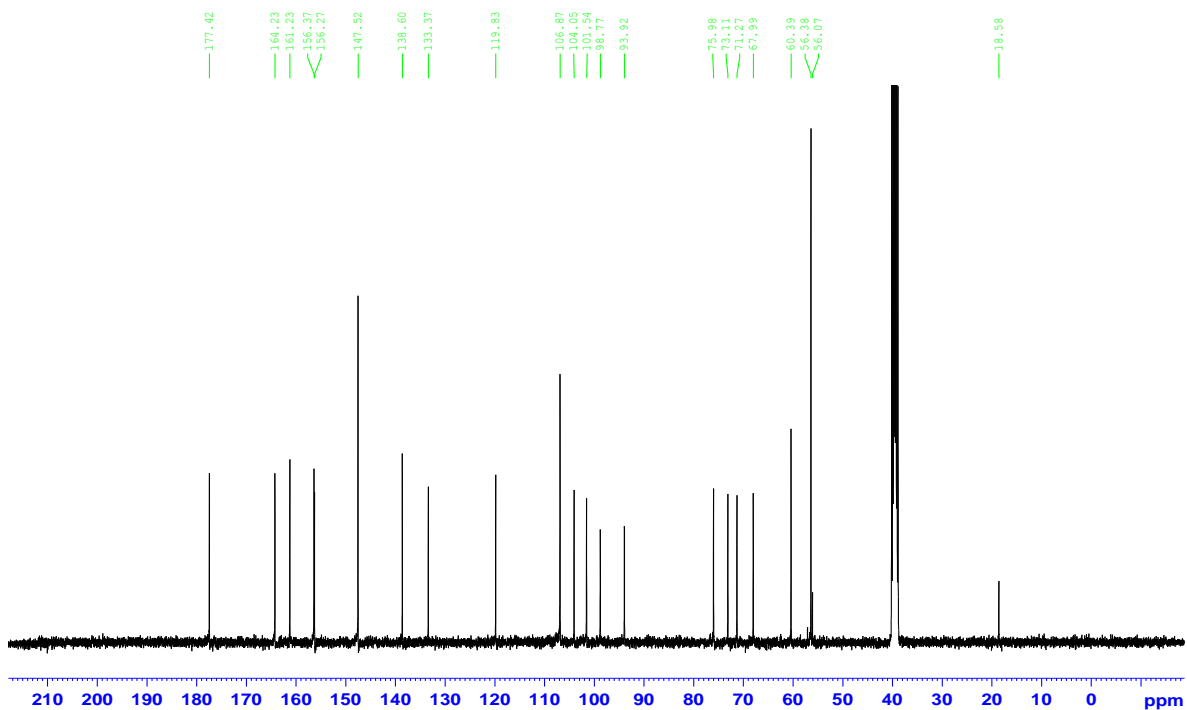
Anexo 19. Espectro de 2D ¹H-¹³C-HSQC del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.



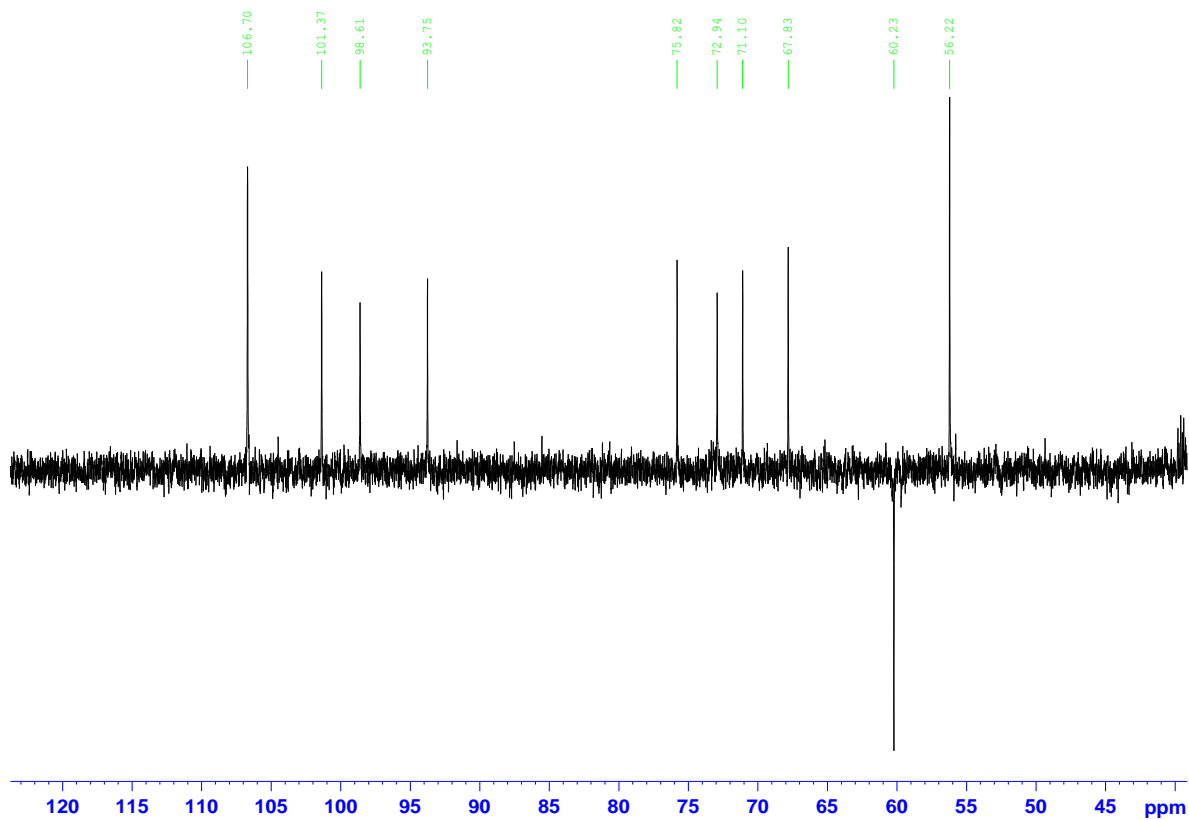
Anexo 20. Espectro de 2D ¹H-¹³C-HMBC del compuesto 5: N-óxido de esquitantina.



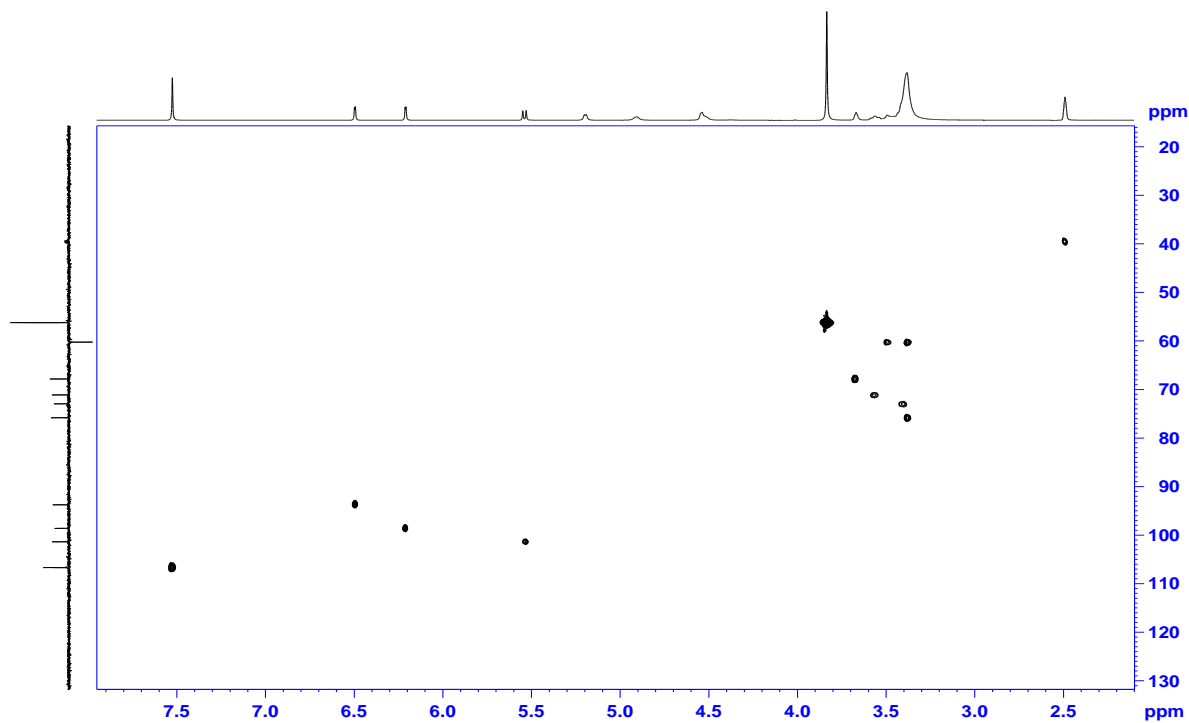
Anexo 21. Espectro de 1H-RMN del compuesto 6: Flavonol glicosilado.



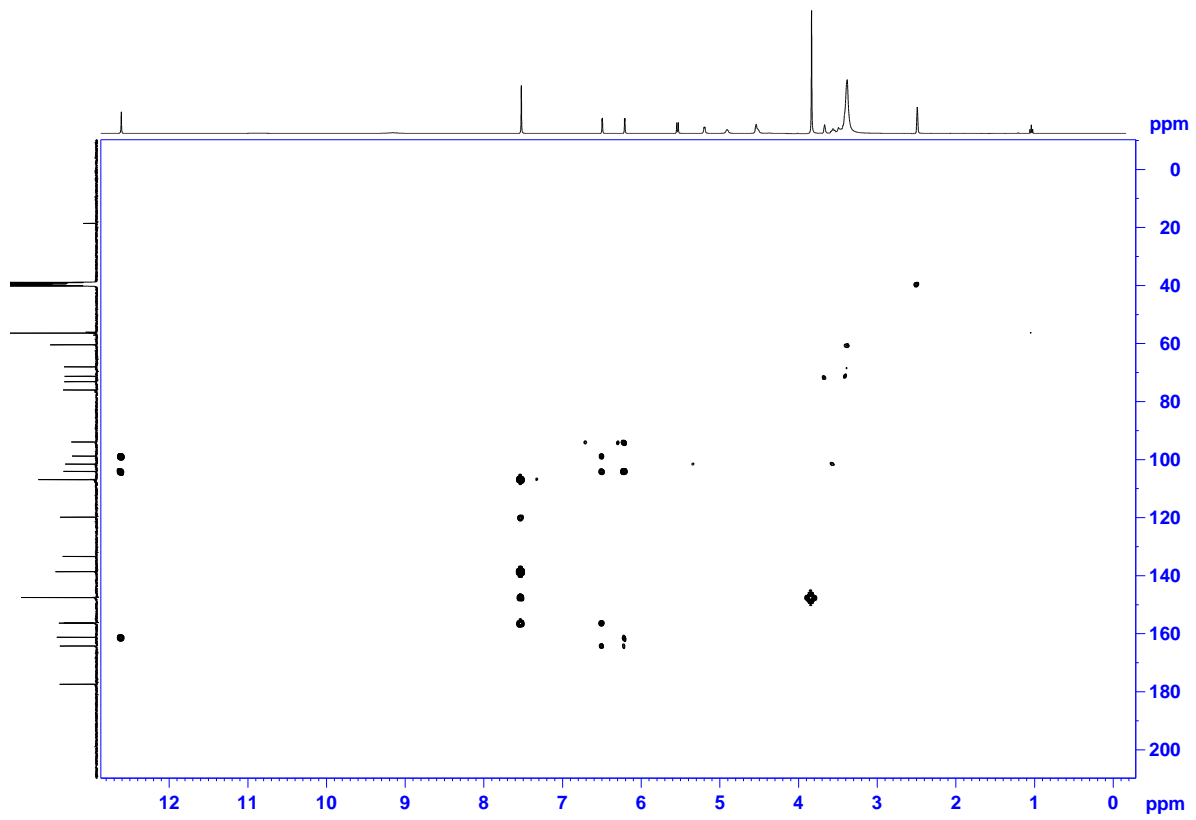
Anexo 22. Espectro de 13C-RMN del compuesto 6: Flavonol glicosilado.



Anexo 23. Espectro de DEPT-135 del compuesto 6: Flavonol glicosilado.



Anexo 24. Espectro de 2D 1H-13C-HSQC del compuesto 6: Flavonol glicosilado.



Anexo 25. Espectro de 2D ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 6: Flavonol glicosilado.