

*Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Obstetricia y Puericultura
Campus Central*

***Efecto de nanoemulsiones y extractos preparados a
partir de la flor de “Palo negro” (Leptocarpha
rivularis) sobre líneas celulares de cáncer
cervicouterino, de mama y de colon.***

Tesis para obtener el Grado de Licenciado/a en Obstetricia y Puericultura.

Profesores guía: Joan Villena García.

Iván Montenegro Venegas.

Estudiantes: Mariana Cárcamo Latuz.

Damaris León Órdenes.

Vivian Loyola Pinto.

Paz Meneses Meneses.

Francesca Prünster Homberger.

Karoline Vásquez Carvajal.

Reñaca, Viña del Mar, Enero, 2022.



***“Efecto de nanoemulsiones y extractos preparados a partir de la flor de “Palo negro”
(Leptocarpha rivularis) sobre líneas celulares de cáncer cervicouterino y de mama”.***

*Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Obstetricia y Puericultura
Campus Central*

J. Villena¹, I. Montenegro², M. Cárcamo³, D. León³, V. Loyola³, P. Meneses³, F. Prünster³, K. Vásquez³.

1. Doctor en Biología celular y molecular, Universidad Autónoma de Barcelona. Licenciado en Biología.

2. Doctor en Química, Universidad de Valparaíso UTFSM. Licenciado en Bioquímica. Bioquímico. Universidad Austral, Chile.

3. Estudiantes de Obstetricia y Puericultura, Universidad de Valparaíso, Chile.

Contactos

juan.villena@uv.cl	+56 9 8824 2891
--	-----------------

Agradecimientos

A nuestros directores de tesis, Doctores Juan Villena García e Iván Montenegro Venegas, por exponer un tema de interés para nuestra profesión y usuarios/as por enseñarnos y recibirnos con disposición y cariño durante todo el tiempo que fuimos parte del trabajo en laboratorio. Así mismo, quisiéramos destacar al Doctor Carlos Jara Gutiérrez, quien representó un gran aporte en la enseñanza del trabajo estadístico realizado en esta tesis.

Por supuesto, a nuestras familias y amigos/as, por acompañarnos durante el pregrado, por favorecer las instancias de aprendizaje, escucharnos, apoyarnos y motivarnos en la realización de esta tesis.

También quisiéramos agradecer a la Escuela de Obstetricia y Puericultura de la Universidad de Valparaíso, Casa Central, por permitirnos incursionar en un área poco explorada en la matronería, como lo es la investigación. Sin dudas fue una experiencia enriquecedora para todas nosotras.

Abreviaturas

5-FU: 5-Fluorouracilo.

AcOEt: Acetato de etilo.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AIRC: (del inglés) Agencia internacional para la investigación del cáncer.

AIO: Combinación farmacológica usada en el tratamiento de cáncer de colon. Se usa irinotecán (100mg/m²) y LV (50 mg/m²) administrado en una infusión de 2 horas el día 1, seguidos de 5- FU (2000 mg/m²) en bolo IV administrado cada semana por bomba ambulatoria durante 24 horas , 4 veces por año (52 semanas)

b RI: Índice de retención de la literatura.

BHE: Barrera hematoencefálica.

BI-RADS: (del inglés) Sistema de informes y registro de datos de imagen de la mama.

cc: Centímetro cúbico.

Co: Coelución con compuestos estándar disponibles en nuestro laboratorio.

Covid-19: SARS-CoV-2, coronavirus.

Ct: Control.

DCM: Diclorometano.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EtOH: Etanol.

FIGO: Federación internacional de ginecología y obstetricia.

GES: Garantías explícitas en salud.

GLOBOCAN: (del inglés) Observatorio global del cáncer.

HELA: Línea celular de cáncer cérvico uterino.

HER2: (del inglés) Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.



HT-29: Línea celular de cáncer de colon derivada de adenocarcinoma.

ISP: Instituto de Salud Pública.

MCF-10: Línea celular de mama no tumoral.

MCF-7: Línea celular de cáncer de mamas derivada de adenocarcinoma.

mcg: Microgramo.

mcl: Microlitro.

mg: Miligramos.

mL: Milímetro.

nm: Nanómetro.

NF-Kappa B: Complejo proteico que controla la transcripción de ADN.

°C: Grados Celsius.

OMS: Organización Mundial de la Salud.



PAP: Prueba de Papanicolau.

pH: Potencial de hidrógeno.

PIB: Producto interno bruto.

PNI: Programa nacional de inmunizaciones.

psi: Libras de pulgada cuadrada.

RES: Sistema reticuloendotelial.

Rpm: Revoluciones por minuto.

SRB: Sulforodamina B.

T-DM1: (del inglés) Trastuzumab emtansina.

UV: Ultravioleta.

VPH: Virus papiloma humano.

μm: Micrómetro.

PCS: (del inglés) Espectroscopía de correlación de fotones.

Índice de contenidos

1. Índice de figuras.	
2. Resumen.....	1
3. Abstract.....	2
4. Introducción.....	3
5. Marco teórico.....	5
5.1. Cáncer.....	5
5.1.1. Cáncer de mama.....	7
5.1.2. Cáncer cervicouterino.....	9
5.1.3. Cáncer de colon.....	11
5.1.4. Generalidades sobre los tratamientos en cáncer.....	14
5.2. Fitofarmacología.....	16
5.2.1. <i>Leptocarpha rivularis</i>	18
5.2.2. Leptocarpina.....	19
5.2.3. Estudios <i>in vitro</i>	20
5.3. Nanotecnología.....	20
5.3.1. Emulsión.....	21
5.3.2. Microemulsión.....	21
5.3.3. Nanoemulsión.....	21
6. Pregunta investigativa.....	24
6.1. Hipótesis.....	24
6.2. Objetivo general.....	24
6.3. Objetivos específicos.....	24
7. Materiales y métodos.....	25
7.1. Producción de extractos de flores de <i>L. rivularis</i>	25
7.1.1. Materiales.....	25
7.1.2. Metodología.....	26

7.2. Protocolo de trabajo para la producción de nanoemulsiones de flores de L.	
rivularis.....	37
7.2.1. Materiales.....	37
7.2.2. Metodología.....	38
7.3. Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales en líneas celulares	
humanas.....	41
7.3.1. Materiales.....	41
7.3.2. Metodología.....	42
8. Resultados.....	51
9. Discusión.....	69
10. Conclusiones.....	73
11. Proyecciones y consideraciones	74
12. Referencias.....	75

Índice de figuras

Figura	N° de página
Figura 1. Extractos de flores de <i>L. rivularis</i> en <i>n</i> -Hexano, DCM, AcOEt y EtOH respectivamente.	28
Figura 2. Composición de extracto de flores de <i>L. rivularis</i> en <i>n</i> - Hexano.	29, 30, 31
Figura 3. Composición de extracto de flores de <i>L. rivularis</i> en DCM.	32, 33, 34, 35
Figura 4. Composición de extracto de flores de <i>L. rivularis</i> en AcOEt.	35, 36
Figura 5. Ejemplo de formulación de nanoemulsiones.	38
Figura 6. Formulación de las nanoemulsiones de flor de <i>L. rivularis</i> .	39
Figura 7. Análisis potencial Z y tamaño de nanoemulsión.	40
Figura 8. Tratamiento de células.	43
Figura 9. Esquema de tratamientos de extractos en placa de cultivo celular.	44
Figura 10. Esquema de tratamientos de nanoemulsiones en placa de cultivo celular.	45
Figura 11. Células tratadas dentro del incubador.	46
Figura 12. Fijación de las células tratadas e incubadas.	47
Figura 13. Lavado de células.	48

Figura 14. Tinción de células.	49
Figura 15. Células tratadas para análisis de viabilidad celular	50
Figura 16. Concentración de tratamientos con extractos versus viabilidad celular en MCF-10.	51
Figura 17. Concentración de tratamientos con extractos versus viabilidad celular en MCF-7.	53
Figura 18. Concentración de tratamientos con extractos versus viabilidad celular en HELA.	54
Figura 19. Concentración de tratamientos con extractos versus viabilidad celular en HT-29.	56
Figura 20. Concentración de tratamientos con nanoemulsión versus viabilidad celular en MCF-10.	58
Figura 21. Concentración de tratamientos con nanoemulsión versus viabilidad celular en MCF-7.	60
Figura 22. Concentración de tratamientos con nanoemulsión versus viabilidad celular en HT-29.	62
Figura 23. Concentración de tratamientos con nanoemulsión versus viabilidad celular en HELA.	64
Figura 24. Tabla de comparación concentración/viabilidad de extracto vs nanoemulsión en MCF-10, MCF-7, HELA y HT-29.	67

2. RESUMEN.

Antecedentes: La planta endémica chilena *Leptocarpha rivularis* dentro de sus compuestos activos posee leptocarpina, la cual se ha propuesto como potencial agente terapéutico para el tratamiento del cáncer. Las nanoemulsiones son formulaciones portadoras de fármacos por las cuales se puede mejorar la administración de compuestos bioactivos a las células.

Hipótesis: Las nanoemulsiones formuladas a partir de extractos de palo negro, aumentan la actividad citotóxica a nivel *in vitro* en líneas celulares de cáncer cervicouterino, mamario y de colon.

Materiales y métodos: Se realizaron extractos a partir de flores de *L. rivularis* en DCM, AcOet, EtOH y *n*-Hexano.

En base a los mismos extractos, más aceite de coco y TWEEN 20 se formularon nanoemulsiones.

Se trataron líneas celulares de cáncer cérvicouterino (HELA), cáncer de mama (MCF-7), línea celular de mama no tumoral (MCF-10) y cáncer de colon (HT-29), con los extractos y nanoemulsiones a diferentes concentraciones.

Resultados: Las nanoemulsiones suponen un efecto positivo en la administración de compuestos bioactivos a las células, potencian el efecto del extracto y, en general, lograron mejores resultados de citotoxicidad con menor concentración de los extractos.

Conclusiones: Las nanoemulsiones con extractos de palo negro incrementan el efecto citotóxico de los extractos en las diferentes líneas celulares estudiadas reduciendo en forma significativa la concentración de extracto.

Palabras claves: *Leptocarpha rivularis*, palo negro, cáncer, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer de colon, fitofarmacología, extracto, nanoemulsión.

3. ABSTRACT.

Background: The endemic Chilean plant *Leptocarpha rivularis* has leptocarpine among its active compounds, which has been proposed as a potential therapeutic agent for the treatment of cancer. Nanoemulsions are drug carriers by which the delivery of bioactive compounds to cells is enhanced.

Hypothesis: Nanoemulsions formulated from palo negro extracts increase cytotoxic activity at the in vitro level in cervical and breast cancer cell lines.

Materials and methods: Extracts were made from *L. rivularis* flowers in DCM, AcOet, EtOH and *n*-Hexane.

Based on the same extracts, plus coconut oil and TWEEN 20 nanoemulsions were formulated.

Cervical uterine cancer cell lines (HELA), breast cancer (MCF-7), non-tumor breast cell line (MCF-10) and colon cancer (HT-29) were treated with the extracts and nanoemulsions at different concentrations.

Results: Nanoemulsions have a positive effect in the administration of bioactive compounds to cells, they enhance the effect of the extract and in general better cytotoxicity results were achieved with a lower concentration of the bioactive preparation.

Conclusions: Larger samples are required to be able to define a clear trend and add in vivo cell studies. Work should continue to improve nanoemulsions as they are an effective alternative to treat diseases such as breast cancer and cervical cancer.

Key words: *Leptocarpha rivularis*, palo negro, cancer, breast cancer, cervical cancer, phytopharmacology, extract, nanoemulsion.

4. INTRODUCCIÓN.

Durante el transcurso de la historia, en muchas culturas se han utilizado las plantas de forma medicinal, práctica que ha sido transmitida por generaciones; la ciencia ha buscado demostrar de forma empírica el uso de las plantas con fines terapéuticos. El estudio de las plantas medicinales ha sido perfeccionado a través del tiempo, esto debido a los avances tecnológicos que nos permiten utilizar las plantas ya no en su forma natural, sino que por medio de procesos químicos o físicos extraer los principios activos que demuestren su eficacia en la farmacología.

La fitomedicina ha sido definida como la “aplicación de principios activos de origen vegetal con fines terapéuticos, ya sea para prevenir, curar o atenuar un estado patológico, basándose en principios farmacológicos y de la terapéutica moderna como farmacodinamia y farmacocinética”. El origen etimológico de este término proviene del griego: “fito”: su significado es planta y “fármaco” cuyo significado es medicamento.

Se estima que una gran parte de la población utiliza fitoterapia de forma paralela a la medicina tradicional. Al existir amplio desconocimiento en cuanto a indicaciones, posología y efectos adversos, un número no menor de profesionales de salud opta por desechar la utilización de fitofármacos, por lo que resulta imperativo capacitar e investigar más profundamente estos conocimientos, con el objetivo de reforzar la prevención y tratamiento de enfermedades.

En Chile, los fitofármacos se rigen por el Reglamento del Sistema Nacional de Control de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano del Ministerio de Salud, el cual les exige demostrar calidad, seguridad y eficacia. Actualmente, el ISP tiene registro de 373 fitofármacos vigentes, obtenidos exclusivamente en farmacéuticas, de los cuales, más de

90 son comercializados bajo receta médica. (1) Este registro asegura que el producto comercializado resguarde posibles interacciones medicamentosas, además de exigir diagnóstico y seguimiento médico.

Una de las plantas utilizada como fitofármaco es el “Palo negro”, conocido científicamente como *Leptocarpha rivularis* originalmente llamado “Cudü- mamëll” en lengua mapudungún, el cual es un arbusto endémico del sur de Chile, que se extiende desde la región del Maule hasta la región de Los Lagos.

Ha sido usada por décadas, por personas pertenecientes a la cultura mapuche, como analgésico y antiinflamatorio para afecciones gastrointestinales (como úlceras), estomacales y más específicamente para el dolor de hígado. Dicho uso ha hecho de *Leptocarpha rivularis*, flora de interés para la comunidad científica debido a sus cualidades anticancerígenas.

5. MARCO TEÓRICO.

5.1. Cáncer.

La Organización Mundial de la Salud define el cáncer como “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células”, este se puede desarrollar en cualquier parte del cuerpo e incluso puede llegar a invadir los tejidos cercanos y generar metástasis. (2)

Esta patología es causada por cambios en los genes que controlan la forma como funcionan nuestras células, especialmente la forma en que crecen y se dividen. Esto puede tener diferentes orígenes, pueden heredarse de los padres (los que corresponden al 5-10% de los cánceres), producirse como resultado de errores que ocurren al dividirse las células o por el daño del ADN causado por algunas exposiciones del ambiente. (2)

El cáncer recibe nombres en general de los órganos o tejidos en donde se forman. También pueden clasificarse o describirse según el tipo de célula que afecta, células epiteliales o células escamosas, en este sentido el más común es el carcinoma, y se forma en las células epiteliales. A su vez los carcinomas que empiezan en diferentes tipos de células epiteliales tienen nombres específicos, por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, etcétera. (3)

La metástasis es el proceso por el cual la enfermedad se disemina a otras partes del cuerpo, es decir, las células cancerígenas se separan del sitio donde comenzaron (cáncer primario) y se desplazan a través del sistema vascular o linfático formando tumores secundarios. (4)

La neoplasia también llamada neoplasia o tumor es una masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se mueren cuando deberían. Las neoplasias pueden ser benignas (no cancerosas) o malignas (cancerosas). Las masas benignas a veces crecen mucho pero no se diseminan y tampoco invaden los tejidos cercanos ni otras partes del cuerpo. Las masas malignas suelen diseminarse o invadir los

tejidos cercanos, y también es posible que se diseminen a otras partes del cuerpo a través de la sangre y el sistema linfático. (5)

Durante los últimos 20 años, el cáncer se ha transformado en una las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En el año 2020, se diagnosticaron un total de 19,3 millones de personas con cáncer y 10,0 millones de personas murieron debido a esta causa, El cáncer de mama ha superado al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado, con se estima que hay 2,3 millones de casos nuevos (11,7%), seguidos de los cánceres de pulmón (11,4%), colorrectal (10,0%), de próstata (7,3%) y de estómago (5,6%). El cáncer de pulmón siguió siendo la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado de 1,8 millones de muertes (18%), seguido de los cánceres colorrectal (9,4%), de hígado (8,3%), de estómago (7,7%) y de mama femenino (6,9%). (6)

En Chile, las cifras se asemejan al panorama mundial. Las neoplasias de carácter maligno son de gran importancia en salud pública, ocupando el 2° lugar de causas de defunciones para el 201, en donde fallecieron 26.299 personas por dicha causa correspondiendo al 24,65% de defunciones de este año, mientras que, en la región de Valparaíso, la cifra alcanzaría 3.139, es decir un 24,95%. (7)

Dentro de dichas cifras es alarmante descubrir que el cáncer de mama y cervicouterino lideran dichos valores, ubicándose dentro de los 10 primeros tumores con más alta tasa de mortalidad, correspondiendo al 16,6 cada 100.000 habitantes y 6,8 cada 100.000 habitantes respectivamente. (7)

En 2012 se alcanzó una tasa de mortalidad debido al cáncer de mamas observada de 15,69 por 100.000 mujeres, con 1367 defunciones mujeres y 4 de varones. (7)

En los años posteriores se ha observado un alza, observado claramente en el año 2017 donde “entre los 8 tipos de tumores malignos más letales (...) se cuentan (...) el tumor de la mama, con 1519 casos (1504 de mujeres y 15 de hombres)”. (8)

Todo esto involucra que en Chile los costos económicos superen los 2100 millones de dólares anuales, correspondiente a casi el 1% del PIB, siendo, en el sector público, los cánceres de más relevancia el de estómago, mama y próstata. (9)

5.1.1. Cáncer de mama.

El cáncer de mama es una patología que se origina debido al crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios y que tiene la capacidad de diseminarse. Los tipos histológicos de mayor frecuencia son el carcinoma ductal y el carcinoma lobulillar, con menor frecuencia puede originarse en los tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama. Entre sus múltiples agentes causales se reconocen factores genéticos, familiares y conductuales. Así, cerca de 5-10% obedece a causas hereditarias y sobre un 85 % son esporádicos. (10)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, el más frecuente en la mujer en países desarrollados y en vías de desarrollo, Y en los últimos 25 años duplicó el número de casos nuevos anuales. En cambio, la mortalidad en los países desarrollados ha disminuido debido a la detección temprana y tratamientos efectivos. (10)

El tamizaje por elección es la mamografía, ya que el examen físico mamario y autoexamen mamario no ha presentado evidencia contundente de detectar la neoplasia de forma temprana, la mamografía se clasifica en un método utilizado para interpretar y comunicar de manera estandarizada los resultados denominado BI-RADS, sus resultados se clasifican en estadios con los números de 0 hasta 6, mientras más avanzado es el número mayor es

la gravedad del cáncer y según esto se toman diferentes conductas, como controles según indicación en mamografías normales o hasta controles con especialista en caso de mamografía que logre diagnosticar un cáncer de mama, aunque el diagnóstico confirmatorio de elección siempre será el informe histológico positivo (biopsia). (10)

El tratamiento dependerá tanto del equipo médico como del estadio de la mamografía, puesto que en estadios iniciales la cirugía puede ser resolutive. El objetivo es realizar una resección completa del tumor primario con márgenes negativos para reducir el riesgo de recurrencias locales. El tratamiento adyuvante será indicado para manejar la enfermedad y una posible metástasis. Dentro de estas estrategias se incluye la radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y algunos agentes biológicos, el uso de medicamentos puede ser indicado en pacientes pre o posmenopáusicas con elevado riesgo de desarrollar cáncer de mama. (Tamoxifeno 20 mg c/día por 5 años). Los factores de mal pronóstico son: número de ganglios afectados (más importante), grado histológico, edad sobre 35 años, invasión vascular, receptores estrogénicos negativos (mala respuesta a terapia hormonal), cáncer inflamatorio y compromiso cutáneo de la mama. (11)

Esta enfermedad es considerada como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, el cual, en los últimos 25 años duplicó el número de casos nuevos anuales, sin embargo, la mortalidad en los países desarrollados ha disminuido debido a la detección temprana y tratamientos efectivos. (12) “Según estimaciones de GLOBOCAN 2020, durante el año 2020 se diagnosticaron poco más de dos millones de nuevos casos de cáncer de mama a nivel mundial, con una tasa estandarizada de 47.8 por 100 mil mujeres y fallecieron 684. 996 mujeres por esta causa”. (13)

El seguimiento en mujeres que tienen antecedentes de cáncer de mamas es un chequeo con el especialista y en líneas generales se realiza anamnesis, examen físico y mamografía cada 6 meses por los primeros 6 años. Posteriormente chequeo anual. (14)

A pesar de que la detección temprana constituye la mejor alternativa para controlar, prevenir recurrencias y metástasis a otros órganos (4, 5), se evidencia que las prácticas de autocuidado, como el auto examen, el examen clínico y la mamografía no se hacen con la periodicidad recomendada (14).

5.1.2. Cáncer cervicouterino.

En cuanto al cáncer cervicouterino, corresponde a una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, siendo usualmente de progresión lenta. (15)

En el cuello uterino existen dos tipos de células, escamosas (exocérvix) y glandulares (endocérvix). La mayoría de los cánceres de cuello uterino son carcinomas de células escamosas, los casos restantes son adenocarcinomas, es decir, en células glandulares y con poca frecuencia se generan carcinomas mixtos, los que presentan características de ambas células ubicadas en el cérvix. (15)

El agente causal del cáncer cervicouterino más conocido es el virus del papiloma humano (VPH), el cual se transmite principalmente por contacto sexual. Este virus presenta más de 120 tipos, solo algunos de estos pueden provocar cáncer los que son clasificados como potencialmente oncogénicos esto debido a que han sido asociados al 99% de los cánceres cervicales, otras cepas de VPH pueden causar verrugas genitales e incluso pueden ser asintomáticos. (15)

La Organización Mundial de la Salud reconoce varios tipos histológicos, siendo el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma los dos principales responsables del cáncer

invasor. Otros tipos de carcinoma son, por ejemplo, carcinomas adenoescamosos, adenoidequístico, neuroendocrinos y carcinoma metastásico, los cuales constituyen el restante 3-5% de casos. Casi el 100% de los tumores indicados están relacionados con el virus papiloma humano. (15)

A nivel mundial esta patología es el cuarto tipo de cáncer más común en las mujeres, y el séptimo en general, estimándose 604.127 nuevos casos en el mundo en 2020. Alrededor del 85% de los casos se produce en las regiones menos desarrolladas, representando aproximadamente el 13.3% del total de cánceres femeninos. “Según datos de GLOBOCAN, durante 2020, hubo cerca de 341.831 muertes por cáncer cervical en todo el mundo, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer femenino”. (16)

En Chile el número de casos nuevos en el año 2020 fue de 54.227, con un número de muertos de 28.584, con una estimación en 5 años de 148.303 muertes totales. (17)

La toma de PAP es el método de tamizaje a elección, en salud pública cada 3 años desde los 25 años se realiza a todas las mujeres en edad reproductiva, el cual en caso de ser positivo le sigue la colposcopia y luego una biopsia, que será el método de confirmación diagnóstica para cáncer invasor. (18)

El desarrollo del cáncer cervical generalmente es lento, presenta una fase pre-maligna, la cual se puede detectar por medio de una prueba citológica de células del cérvix (PAP), este examen se presenta en estadios según la FIGO van del I al IV presentando divisiones en cada etapa dependiendo de la extensión de células afectadas, y así, a mayor número mayor será la gravedad de la enfermedad. (19)

Dependiendo de la etapificación del cáncer invasor se definen distintos tratamientos que incluyen la terapia farmacológica, radioterapia paliativa, braquiterapia exclusiva,

conización, radioterapia externa e intracavitaria, quimioterapia, histerectomía, y linfadenectomía. (19)

Además, se debe realizar seguimiento ya que aumenta el porcentaje de recurrencia a futuro, por lo que se recomienda control trimestral durante los primeros dos años, luego semestral hasta el quinto año y finalmente anual de forma vitalicia. (19)

Existen diversos estudios que asocian al cáncer cervicouterino con un bajo nivel socioeconómico y una escasa pesquisa y tratamiento oportuno. “Según la encuesta socioeconómica de 2015, la cobertura de PAP vigente entre mujeres de 30 a 54 años de edad fue de 80% en el sistema privado contra 60% en el sistema público” este es un dato importante para seguir realizando estrategias para obtener una mayor cobertura en la pesquisa y así un tratamiento oportuno. (19)

Actualmente se implementó como medida la incorporación de la vacuna de VPH en niñas chilenas entre 9 y 13 años de forma gratuita (dentro del PNI), lamentablemente este beneficio no cubre a mujeres mayores de 13 años y solo queda continuar con las medidas existentes como son el control con PAP cada 3 años luego de 1 año iniciada la actividad sexual. (20)

5. 1. 3. Cáncer de colon

El cáncer de colon, colorrectal o rectal, según sus distintas denominaciones, inicia en el intestino grueso, zona que corresponde a la porción final del tubo digestivo. (21)

Habitualmente inicia con la aparición de pólipos benignos que, con el tiempo, pueden llegar a convertirse en cáncer. (21)

Si bien, se presenta con mayor frecuencia en personas mayores de 50 años, en un 90%, puede desarrollarse a cualquier edad. (22)

Otros factores de riesgo de importancia son la alimentación con bajo aporte de fibra y elevado aporte de grasas, especialmente saturadas, consumo de tabaco y alcohol, y sedentarismo. (21)

El riesgo de desarrollar cáncer de colon se incrementa ante antecedentes familiares. “Este riesgo aumenta proporcionalmente al número de familiares afectados. Las familias que presentan poliposis adenomatosa desarrollan cáncer de colon con gran frecuencia”. (22)

Las enfermedades que prolongan períodos de inflamación como, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, también aumentarían la probabilidad. (22)

El cáncer de colon puede presentarse de las siguientes maneras:

- Tumores carcinoides: originados a partir de células especializadas productoras de hormonas en el intestino.
 - Tumores estromales gastrointestinales: originados a nivel de las células intersticiales de Cajal, pudiendo encontrarse en cualquier parte del tracto digestivo, aunque no son comunes en el colon.
 - Linfomas: tumores cancerosos en las células del sistema inmune. Se originan principalmente en ganglios linfáticos, pero también pueden comenzar en el colon, el recto u otros órganos.
 - Sarcomas: Se originan a nivel de vasos sanguíneos, capas musculares, u otros tejidos conectivos de la pared del colon y el recto. Este tipo en particular es poco frecuente.
- (23)

El diagnóstico clínico de esta patología se define a través de sangre en las heces, cambio en el ritmo de las deposiciones, estrechez en las heces a causa del tumor, dolor abdominal, mucosidad en las heces, sensación de evacuación incompleta y obstrucción intestinal,

siendo esta última una situación clínica de gravedad con necesidad de atención médica de urgencia. (24)

La confirmación diagnóstica se realiza principalmente mediante pruebas de materia fecal, sigmoidoscopia, colonoscopia y colonoscopia virtual. (25)

Las pruebas de materia fecal permiten detectar la presencia de sangre en las heces; si el resultado es positivo, se sugiere la realización de una colonoscopia. (25)

La sigmoidoscopia se realiza mediante un instrumento flexible en forma de tubo, el cual permite inflar el colon para observar mejor su revestimiento, con luz y un lente para observar el tejido del colon sigmoide, y una herramienta que permite la extracción de tejido para biopsia. La colonoscopia, en cambio, permite examinar recto y colon completo, y, a diferencia de la prueba anterior, requiere de un colon limpio y uso de sedantes. (25)

Existe una variación de la colonoscopia; la colonoscopia virtual. Esta prueba permite la obtención de imágenes detalladas del colon y recto, que en algunos casos permiten la visualización de pólipos y otras anomalías, los cuales, de presentarse, requerirán de una colonoscopia convencional para su posterior extracción. (25)

El cáncer colorrectal es el tercero más diagnosticado en Estados Unidos, excluyendo el cáncer de piel. Sus cifras en el año 2020, según la Sociedad Americana contra el cáncer, alcanzan los 104.6010 casos para cáncer de colon y 43.340 para cáncer de recto. (26)

El número de personas diagnosticadas con cáncer de colon o recto ha ido en disminución desde la mitad de la década de 1980; lo anterior, asociado a la modificación de factores de riesgo, como los mencionados anteriormente. “Desde 2007 hasta 2016, la tasa de incidencia

entre personas de 55 o más años disminuyó cada año un 3.6%, mientras que mostró un aumento del 2% cada año entre la población menor de 55 años”. (26)

En Chile, acorde a los datos proporcionados por GLOBOCAN, en 2020, se presentaron 6.210 casos nuevos de cáncer colorrectal, entre 2015-2020, representando un 11,5% del total de casos nuevos por cáncer en el país. De ese porcentaje, 10,8% corresponde a la población masculina y un 12,2% a la femenina, con 3114 y 3.105 casos respectivamente. (27)

5.1.4. Generalidades sobre los tratamientos en cáncer.

Actualmente se pueden encontrar múltiples alternativas de tratamiento para los diferentes tipos de cánceres, la elección de uno o la combinación de estos y, su orden de uso, dependerá de las decisiones que tomen los equipos médicos en conjunto a la mujer afectada y/o su familia, esto considerando factores personales como edad, condición socioeconómica, hábitos de vida, existencia de otras patologías, entre otros, y a su vez considerando las características propias de su tumor como sintomatología asociada, características moleculares, tamaño, invasión de otros tejidos, infiltración, extensión y metástasis a otros órganos entre otras. (28)

El objetivo del o los tratamientos es que se logre el mejor impacto posible en la tasa de curaciones de la enfermedad causando la menor cantidad de efectos adversos. (28)

En el caso del cáncer de mama las alternativas de tratamientos convencionales son:

- Tumorectomía (cirugía conservadora de la mama).
- Biopsia selectiva del ganglio centinela.
- Mastectomía (amputación de la mama).
- Linfadenectomía axilar (vaciamiento axilar).
- Radioterapia.

- Quimioterapia (aislada o en combinación con bevacizumab, un agente antiangiogénico).
- Tratamiento hormonal con medicamentos orales.
- Terapia anti HER2 en tumores HER2 positivos (algunos fármacos en el mercado son: trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, lapatinib).
- Hormonas orales si el tumor HER2 positivo expresa receptores de estrógenos.
- Cuidados paliativos (29).

En el caso del cáncer cervicouterino las alternativas de tratamiento convencionales son:

- Crioterapia.
- Conización.
- Histerectomía simple, radical modificada, radical, radical extendida. (Linfadenopatía pélvica completa bilateral).
- Manguito vaginal.
- Colpectomía.
- Quimioterapia (concomitante o neoadyuvante).
- Braquiterapia (endocavitaria) o Radioterapia interna.
- Radioquimioterapia con platino.
- Exenteración pélvica.
- Cuidados Paliativos. (30)

En el caso del cáncer de colon los tratamientos convencionales pueden ser:

- Tratamiento quirúrgico primario:
 - ❖ Resección quirúrgica amplia y anastomosis.
 - ❖ Colectomía laparoscópica.
 - ❖ Colectomía abierta.

- Quimioterapia adyuvante con: fluorouracilo, capecitabina, leucovorina, oxaliplatino, etc.
- Quimioterapia neoadyuvante con: leucovorina cálcica, fluorouracilo e irinotecán, entre otros.
- Ablación local.
- Regímenes de quimioterapia con: AIO, Capox, Douillard, Folfiri, etc.
- Terapia sistémica.
- Inmunoterapia.
- Radioterapia adyuvante con: 5- FU, levamisol, entre otros. (31)

En Chile los tratamientos que se entregan en salud pública, es decir, que están cubiertos por el plan GES, son sólo tres; cirugía para extirpar el tumor, radioterapia y quimioterapia para atacar a las células cancerígenas. Estas terapias son altamente invasivas y dejan grandes secuelas en el cuerpo generando desgaste físico y mental, y a su vez un importante impacto psicológico a la persona enferma y su familia. (32)

5.2. Fitofarmacología.

Desde los comienzos de la humanidad se han utilizado plantas con fines medicinales y nutritivos. A través de la observación y experimentación con ellas se le han atribuido propiedades tanto benéficas como tóxicas, por lo que durante siglos fueron la principal, y en ocasiones única, alternativa para combatir enfermedades y malestares. Posteriormente, el descubrimiento de fármacos sintéticos como las sulfas, penicilina y otros antibióticos declinó la popularidad de la fitoterapia. (33)

La fitomedicina ha sido definida por la OMS como la “aplicación de principios activos de origen vegetal en terapéutica, basándose en principios farmacológicos y de la terapéutica moderna como farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos y clínicos

reconocidos en plataformas de divulgación científica. El origen etimológico de este término proviene del griego: “fito” que es planta y “fármaco” es medicamento. (34)

La fitofarmacología se caracteriza por utilizar matrices vegetales complejas, constituidas por la planta entera, parte de ellas o productos de éstas, obtenidos mediante reacciones químicas, como en el caso de extractos. Cada matriz vegetal está compuesta por una amplia variedad de compuestos de diferente naturaleza química, a dicha mezcla se le conoce como fitocomplejo. (35)

Un fitocomplejo es “la mezcla de sustancias activas y otras acompañantes que actúan en conjunto para lograr un mismo fin terapéutico, que no sería el mismo si se administran por separado, o sea como mono sustancias. Las sustancias activas o metabolitos secundarios son un producto de la fotosíntesis de la planta y tienen principalmente un rol de defensa. Estas sustancias pueden ser biosintetizadas siguiendo la ruta metabólica en la que están insertas. (36)

Los fitofármacos son metabolitos secundarios, que “por su alta actividad, no necesitan la acción sinérgica de los componentes del fitocomplejo para ejercer una acción biológica y potente”. (37)

Se caracterizan, entre otras cosas, por poseer un estrecho margen terapéutico. Para su utilización deben ser aislados y purificados, lo cual permite manejar dosis exactas, evitando la potencial toxicidad que pudieran producir debido a su alta actividad. (37)

Se estima que actualmente una parte importante de la población mundial utiliza fitoterapia de forma paralela a la medicina tradicional. Al existir amplio desconocimiento en cuanto a indicaciones, posología y efectos adversos, un número no menor de profesionales de salud opta por desechar la utilización de fitofármacos, por lo que resulta imperativo capacitar e

investigar más profundamente estos conocimientos, con el objetivo de reforzar la prevención y tratamiento de enfermedades. (38)

En Chile, los fitofármacos se rigen por el Reglamento del Sistema Nacional de Control de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano del Ministerio de Salud, el cual les exige demostrar calidad, seguridad y eficacia. Actualmente, el ISP tiene registro de 373 fitofármacos vigentes, obtenidos exclusivamente en farmacéuticas, de los cuales, más de 90 son comercializados bajo receta médica. Este registro asegura que el producto comercializado resguarde posibles interacciones medicamentosas, además de exigir diagnóstico y seguimiento médico. (1)

Uno de estos fitofármacos es el “Palo negro”, conocido científicamente como *Leptocarpha rivularis* originalmente llamado “Cudü-mamëll” en lengua mapudungún, el cual es un arbusto endémico del sur de Chile, cuya distribución geográfica se extiende desde la región del Maule hasta la región de Los Lagos. (38)

5.2.1. *Leptocarpha rivularis*.

Leptocarpha rivularis pertenece a la familia Asteraceae del orden de los Asterales, posee flores amarillas características, compuestas por 7 a 14 pétalos. Crece en ambientes lluviosos, enraizada en cursos de agua permanentes como vegas, bordes de lagos y pantanos. Al tener vegetación poco espesa, requiere de protección contra la luz del sol de forma directa, por lo que se puede encontrar en laderas pronunciadas, quebradas profundas o bajo árboles frondosos. El arbusto tiene la capacidad de resistir hasta -5°C aproximadamente, no obstante, no es resistente a la nieve. Se caracteriza por sus propiedades antibacterianas, impidiendo la formación de biopelículas de *H.pylori*, y anticancerígenas. Ha sido usada por décadas, por personas pertenecientes a la cultura mapuche, como analgésico y antiinflamatorio para afecciones gastrointestinales (como úlceras), estomacales y más específicamente para el dolor de hígado. Dicho uso ha hecho

de *Leptocarpha rivularis*, flora de interés para la comunidad científica. Se han descrito 36 componentes entre los que destacan, sesquiterpenos, flavonoides, oxilipinas, ácidos orgánicos y ácidos fenólicos. (39)

Dentro de los principios activos de esta planta se encuentran distintos compuestos, tales como acetilénicos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas y sustancias lipofílicas. Los compuestos acetilénicos, son gases incoloros e inodoros en su forma pura, obtenidos a través de una reacción de agua con carburo de calcio. Es un compuesto exotérmico, lo que significa que libera calor en el proceso de obtención. (40)

Por otra parte, los sesquiterpenos son compuestos lipofílicos e incoloros, compuestos por 15 carbonos, dispuestos en forma alifática o cíclica. Son sintetizados por diversas plantas como mecanismo de defensa antimicrobiana, antialimentaria y como protección UV. (41)

Han sido utilizados durante años por sus propiedades antialérgicas, antiinflamatorias y sedantes, a ellas se añaden propiedades antisépticas, bactericidas, analgésicas y espasmolíticas. (41)

Dentro del grupo de los sesquiterpenos, se pueden encontrar las lactonas sesquiterpénicas, que corresponden a productos finales de la destilación del ácido láctico (32). Entre estas se encuentra la leptocarpina, presente en *Leptocarpha Rivularis*. (41)

5.2.2 Leptocarpina.

Dentro de todos estos componentes, presentes en el palo negro, el más estudiado y al cual se le ha atribuido mayor actividad farmacológica en este grupo es la leptocarpina, la que mediante variados estudios ha demostrado poseer una gran actividad citotóxica, proapoptótica y quimio-sensibilizadora sobre las células leucémicas y tumorales por ser inhibidor de NF-Kappa B. (42)

La composición con leptocarpina hizo que “ganaran gran atención para el diseño de nuevos nutraceuticos y fito-farmacéuticos, debido a sus importantes actividades biológicas como antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenos o antibacterianos que puede ser conveniente para producir medicamentos para contrarrestar las condiciones de estrés oxidativo del cuerpo humano y otras enfermedades relacionadas con la inflamación crónica”. (43)

En base a estos hallazgos la leptocarpina se ha propuesto como un agente terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer, pero los estudios se remiten sólo a su actividad *in vitro*. (44)

5.2.3. Estudios *in vitro*.

Un estudio *in vitro* es aquel que se realiza fuera de un organismo vivo, pudiendo utilizarse células, tejidos u órganos aislados. Dichos estudios pretenden asemejar las condiciones en las que se observó un fenómeno específico sobre un objeto de estudio para lograr comprender su mecanismo de acción; de este modo permiten “brindar información de cómo hacer manipulable o controlable el fenómeno” observado. No obstante, no asegura que el resultado sea el mismo, ni similar, en un estudio *in vivo*. (45)(46)

5.3. Nanotecnología.

La nanotecnología comprende la creación, manipulación y utilización de materiales en el orden nanométrico (10^{-9} μm) y su aplicación en los campos de la química, la biología, la física, la ingeniería y en especial la medicina, se ha traducido en trascendentales avances en la ciencia. La hoy denominada nanomedicina ha comportado significativos adelantos en la monitorización, la reparación de tejidos, el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de enfermedades mediante el uso de herramientas como nanosensores, nanopartículas y nanotubos, y en el futuro cercano nanorobots capaces de penetrar en el organismo humano

para repararlo. La nanotecnología se encuentra en una fase de crecimiento y ha capturado el interés de empresas, gobiernos e inversionistas que buscan desarrollar productos útiles para aplicarlos en diferentes esferas, especialmente en medicina. (47)

5.3.1. Emulsión.

Una emulsión es un sistema disperso, estabilizado mediante la adición de un emulsionante adecuado, de dos fases inmiscibles donde ambas, la fase interna y la externa, son líquidas. Estas son mezcladas usando cortadores mecánicos y surfactantes. Las moléculas anfifílicas de superficie activa son llamadas surfactantes, estas están encargadas de reducir las fuerzas naturales existentes en la forma de tensión superficial, permitiendo así estabilizar las emulsiones. (48)

Las emulsiones son sistemas inestables de por sí, ya que para su formación es necesario aportar energía, ya sea en forma de agitación o calor, y tienden a perderla en forma espontánea. (48)

5.3.2. Microemulsión.

Una microemulsión es una mezcla isotrópica líquida, translúcida y termodinámicamente estable. Está preparada usando aceite, agua, surfactante y co-surfactante. Esta incorpora partículas de tamaño muy reducido hasta tamaños nano a diferencia de las emulsiones convencionales. (48)

5.3.3. Nanoemulsión.

Las nanoemulsiones son emulsiones de tamaño submicrónico que se encuentran bajo una extensa investigación como portadores de fármacos para mejorar la administración de agentes terapéuticos. Son, por mucho, los sistemas de nanopartículas más avanzados para la administración sistémica de agentes biológicamente activos para la administración y el

direccionamiento controlados de fármacos. Las nanoemulsiones son un sistema isotrópico termodinámicamente estable en el que dos líquidos inmiscibles (agua y aceite) se mezclan para formar una sola fase por medio de un tensioactivo apropiado o su mezcla con un diámetro de gota aproximadamente en el rango de 0.5-100 μm . (49)

Se pueden usar nanopartículas magnéticas para mejorar la especificidad del sitio. Como sistema de administración de fármacos, mejoran la eficacia terapéutica del fármaco y minimizan los efectos adversos y las reacciones tóxicas. La aplicación principal incluye el tratamiento de la infección del sistema reticuloendotelial (RES), la terapia de reemplazo de enzimas en el hígado, el tratamiento del cáncer y la vacunación. (50)

Las nanoemulsiones son muy similares a las microemulsiones que son dispersiones de partículas de nanoescala pero obtenidas por fuerzas mecánicas a diferencia de las microemulsiones que se forman espontáneamente. Tienen diámetros de hasta 500 nm, este pequeño tamaño les otorga una gran estabilidad en suspensión. (51)

Son sistemas vesiculares en los cuales los compuestos activos son confinados a una cavidad que consiste en un núcleo interno líquido rodeado por una membrana interfacial formada por tensoactivos. Su tamaño las hace ser fácilmente absorbidas por los tejidos, por lo que son de gran interés para aplicaciones en la industria química, farmacéutica y alimentaria. (52)

Ventajas de usar nanoemulsiones:

- Puede ser usado como sustituto de liposomas y vesículas.
- Aumenta la biodisponibilidad de la droga o fármaco.
- No es tóxico ni irritante con la naturaleza.
- Aumenta la estabilidad del compuesto.

- Las nanoemulsiones tienen partículas de pequeño tamaño que tienen una mayor área de superficie que proporcionan una mayor absorción.
- Puede formularse en una variedad de presentaciones tales como espumas, cremas, líquidos y aerosoles.
- Ayuda a solubilizar el fármaco lipofílico. (52)

¿Los extractos de palo negro podrían mejorar su actividad citotóxica mediante la utilización de nanoemulsiones?

Hipótesis

Las nanoemulsiones formuladas a partir de extractos de palo negro, aumentan la actividad citotóxica a nivel *in vitro* en líneas celulares de cáncer cervicouterino, mamario y de colon.

Objetivo general

Comparar el efecto sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer cervicouterino, mama y colon, de diversos extractos de la flor de palo negro en nanoemulsión, respecto a los mismos extractos naturales no emulsionados.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de los diversos extractos no emulsionados de flor de palo negro sobre la viabilidad celular en células cancerígenas y no cancerígenas.
2. Estudiar el efecto de los diferentes extractos de palo negro preparados en nanoemulsión sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer cervicouterino y cáncer de mama.
3. Comparar el efecto de los extractos solos frente a los preparados en nanoemulsión.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para el análisis de productos naturales en líneas celulares humanas es necesario que cada etapa se realice con cautela y precisión. A continuación, se expondrán los materiales usados y pasos seguidos en la fase experimental de esta tesis en pos de responder nuestra pregunta investigativa.

7.1. Producción de extractos de flores de *L. rivularis*:

7.1.1. Materiales.

Solventes:

- Diclorometano.
- *n*-Hexano.
- Etanol.
- Acetato de etilo.

Elementos de protección personal:

- Guantes de procedimiento.
- Mascarilla.
- Delantal.

Equipos:

- Botella de vidrio con tapa capacidad de 1 Litro (Duran Shott®).
- Rotavapor (Dragonlab®).
- Baño termorregulado (Mettler®).
- Viales de vidrio de 20 mL.
- Balanza granataria.

- Espátula metálica.
- Sonicador (procesadores Vibra-Cell, Sonics).

7.1.2. Metodología.

- I. A partir de la planta palo negro recolectada en Caburgua 01875, Temuco, Chile, se seleccionaron las flores, obteniendo 500 gr de estas.
- II. Se reunieron 4 botellas de vidrio con tapa rosca con capacidad de 1 Litro marca Duran Shott® y se pusieron en cada una de ellas 100 gr de flor de palo negro.
- III. La primera maceración se realizó con 500 cc de *n*-hexano por cada botella, se dejó macerar por 21 días, se sonicaron las 4 botellas por 10 minutos, se filtró el contenido con papel filtro plegado y finalmente se pasó por rotavapor para la obtención del extracto, el baño para la evaporación del solvente fue a una temperatura de entre 40 y 50° C.
- IV. La segunda maceración se realizó con 500 cc de *n*-hexano por cada botella, se dejó macerar por 6 días, se sonicaron las 4 botellas por 10 minutos, se filtró el contenido con papel filtro plegado y finalmente se pasó por rotavapor para la obtención del extracto, el baño para la evaporación del solvente fue a una temperatura de entre 40 y 50° C.
- V. La tercera maceración se realizó con 500 cc de diclorometano por cada botella, se dejó macerar por 8 días, se sonicaron las 4 botellas por 10 minutos, se filtró el contenido con papel filtro plegado y finalmente se pasó por rotavapor para la obtención del extracto, el baño para la evaporación del solvente fue a una temperatura de entre 40 y 50° C.
- VI. La cuarta maceración se realizó con 500 cc de acetato de etilo por cada botella, se dejó macerar por 8 días, se sonicaron las 4 botellas por 10 minutos, se filtró el contenido con papel filtro plegado y finalmente se pasó por rotavapor para la

obtención del extracto, el baño para la evaporación del solvente fue a una temperatura de entre 40 y 50° C.

- VII.** La quinta maceración se realizó con 500 cc de acetato de etilo por cada frasco, se dejó macerar por 5 días, se sonicaron los 4 frascos por 10 minutos, se filtró el contenido con papel filtro plegado y finalmente se pasó por rotavapor para la obtención del extracto, el baño para la evaporación del solvente fue a una temperatura de entre 40 y 50° C.
- VIII.** La sexta y última maceración se realizó con 500 cc de etanol por cada botella, se dejó macerar por 8 días, se sonicaron las 4 botellas por 10 minutos, se filtró el contenido con papel filtro plegado y finalmente se pasó por rotavapor para la obtención del extracto, el baño para la evaporación del solvente fue a una temperatura de entre 40 y 50° C.
- IX.** Los extractos obtenidos fueron almacenados en frascos ámbar de vidrio y puestos bajo campana de extracción de gases sin tapa para terminar de evaporar algún remanente de solvente. Cabe mencionar que tanto las maceraciones como los extractos finales fueron siempre mantenidos en lugares frescos y protegidos de la luz ya que los productos naturales se pueden deteriorar con cambios de temperaturas y con la exposición a rayos UV finalmente perdiendo parte de su calidad y propiedades terapéuticas.

Aquellas maceraciones que se realizaron dos veces con el mismo solvente fueron en pos de conseguir más masa para poder realizar los extractos.



Figura 1. Extractos de flores de *L. rivularis* en *n*-Hexano, DCM, AcOEt y EtOH respectivamente.

En esta oportunidad el equipo encargado del laboratorio, mediante análisis cromatográfico (GS/MS), separó los extractos secuenciales más activos y selectivos contra las líneas celulares cancerosas a utilizar en este ensayo. Los extractos corresponden a *n*-Hexano, DCM y AcOEt para así identificar los diferentes componentes encontrados, los cuales se detallan a continuación.

N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI a	RIref b	%Área c	Coincidencia	Identificación
1	8,94	Óxido de cariofileno	1534	1534	0,37	940	RI, MS
2	10,01	Elemol	1539	1537	0,11	900	RI, MS
3	10,41	Epóxido de isoaromadendr eno	1580	1579	0,04	890	RI, MS
4	11,86	7-hidroxi farneseno	1582	1584	2,81	870	RI, MS
5	12,15	Paradisol	1624	1627	1,33	940	RI, MS
6	12,31	Epóxido de trans-Z-a- bisaboleno	1823	1820	0,31	850	RI, MS
7	13,64	Dehidrocostus lactona	1865	1866	0,06	870	RI, MS
8	16,86	2-metil-1- hexadecanol	1888	1890	0,29	880	RI, MS, Co
9	17,51	Escopoletina	1924	1924	0,90	870	RI, MS

10	18,32	Ácido tetradecanoico	1940	2000	0,04	900	RI, MS
11	22,07	Eicosano	2000	2000	0,63	920	RI, MS
12	22,24	Ácido α - linoléico	2100	2102	0,27	920	RI, MS
13	22,81	Grosheimin	2143	2143	1,58	850	RI, MS, Co
14	23,28	(Z)-18-Octadec- 9-enolida	2155	2158	0,52	950	RI, MS
15	25,67	Linolenato de glicerilo	2157	2161	0,05	880	RI, MS
16	26,46	Reynosina	2266	2266	1,35	900	RI, MS, Co
17	31,66	4,8,13- duvatrieno-1,3- diol	2397	2400	25,70	860	RI, MS
18	34,62	3-etil-5- (2- etilbutil) octadecano	2410	2413	3,89	930	RI, MS
19	34,81	Tetraneurina D	2490	2494	0,69	970	RI, MS
20	35,62	2- metilencolestán -3-ol	2650	2652	0,41	970	RI, MS

21	35,86	α -tocoferol	3149	3149	0,35	950	RI, MS, Co
22	37,69	Estigmasterol	3170	3170	0,70	940	RI, MS, Co
23	40,50	γ -sitosterol	3290	3290	0,33	930	RI, MS, Co
24	42,69	β -amirina	3330	3337	0,35	850	RI, MS
25	43,79	β -acetato de amirina	3333	3339	4,78	910	RI, MS
26	44,57	Acetato de lupeilo	3380	3380	10,96	850	RI, MS, Co
27	46,06	Betulinaldehído	3630	3629	0,13	820	RI, MS
28	46,62	1- heptatriacotan ol	3941	3942	0,46	900	RI, MS
		Total identificado			59,41		
		Desconocido			40,59		

Figura 2. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en *n*- Hexano.

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

N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI a	RIref b	%Área c	Coincidencia	Identificación
1	8,92	Éster metílico del ácido pirúlico	1210	1217	2,50	880	RI, MS
2	9,98	10-epi-Elemol	1549	1550	0,53	900	RI, MS
3	10,39	Óxido de cariofileno	1600	1606	0,24	910	RI, MS
4	12,13	Intermedeol	1660	1675	2,94	810	RI, MS
5	12,66	Ácido tetradecanoico	1765	1770	0,07	890	RI, MS
6	13,63	Ácido tetradecanoico, éster etílico	1783	1790	0,55	930	RI, MS
7	14,09	Desoxisereciala ctona	1825	NF	0,30	900	RI, MS
8	14,25	Neoftadieno	1835	1836	0,15	870	RI, MS, Co
9	15,91	6,10,14- trimetil-2- pentadecanona	1852	1855	0,20	900	RI, MS

10	16,03	Dehidrocostus lactona	1860	1866	2,76	890	RI, MS, Co
11	22,01	9-trans-metil trisporato C	2109	2100	0,51	890	RI, MS, Co
12	22,51	Linolenato de glicerilo	2174	2160	0,06	860	RI, MS
13	23,25	5 α , 6 α -Epoxi-3 β , 17-dihidroxi-16 α metilpregnan-20-ona	2189	2189	0,71	850	RI, MS
14	25,66	(Z) -18-Octadec-9-enolida	2190	2208	2,57	980	RI, MS
15	26,48	Reynosin	2260	2266	1,05	860	RI, MS, Co
16	29,10	9-tricoseno, (Z)	2270	2299	0,80	870	RI, MS
17	29,90	Tricoseno	2330	2300	3,85	970	RI, MS
18	31,68	2 - [(Z) -9-octadeceniloxi] etanol	2330	2336	0,36	870	RI, MS
19	32,67	3-etil-5- (2'-etilbutil) octadecano	2410	2413	0,34	940	RI, MS

20	33,95	Thunbergol	2500	2498	8,82	940	RI, MS
21	23,18	2- metilencolestán -3-ol	2650	2652	1,15	920	RI, MS
22	36,05	Triacotano	3000	3000	4,36	870	RI, MS
23	36,34	β -Amirina	3315	3337	0,43	940	RI, MS
24	36,96	α -Amirina	3360	3376	0,98	940	RI, MS
25	37,59	Tetratriacontano	3400	3400	6,39	860	RI, MS, Co
26	44,48	β -acetato de amirina	3430	3437	6,43	910	RI, MS
27	44,59	Lupeol	3494	3486	0,25	930	RI, MS, Co
28	45,43	Acetato de lupeilo	3530	3525	14,96	900	RI, MS
29	45,67	Betulinaldehído	3743	3760	0,70	900	RI, MS
30	46,62	1- heptatriacotanol	3940	3942	6,71	880	RI, MS, Co
31	46,62	Éster 3- (octadeciloxi) propílico del	4100	4149	0,76	850	RI, MS, Co

		ácido oleico					
		Total identificado			72,43		
		Desconocido			27,57		

Figura 3. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en DCM.

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

N° peak	RT (min)	Componentes principales	RI a	RIref b	%Área c	Coincidencia	Identificación
1	9,575	Tujona	1095	1089	6,46	927	RI, MS, Co
2	12,750	Acetato de isopentenilo	1196	1200	2,87	950	RI, MS
3	13,215	Acetato de trans-Sabinilo	1265	1264	4,01	934	RI, MS
4	18,110	Intermedeol	1660	1667	3,44	949	RI, MS
5	18,23	6-epi-	1883	1881	3,59	953	RI, MS

	4	Shyobunol					
6	18,45 0	Eicosano	2000	2000	2,87	989	RI, MS
7	18,61 0	Geraniol linalool	2040	2046	2,08	910	RI, MS
8	19,85	Leptocarpina	2050	2050	3,46	967	RI, Co
9	20,12 0	4,8,13- duvatrieno-1,3- diol	2395	2400	6,20	960	RI, MS
10	21,25 0	Linalol	2486	2491	2,26	899	RI, MS, Co
11	21,59 0	2- metilencolestán -3-ol	2651	2652	2,32	956	RI, MS
12	42,06	Estigmasterol	3140	3142	24,02	940	RI, MS, Co
13	42,70	Fenretinida	3290	3289	13,76	930	RI, MS, Co
14	43,86	1- heptatriacotan ol	3938	3942	8,49	900	RI, MS
		Total identificado			85,83		

		Desconocido			14,17		
--	--	-------------	--	--	-------	--	--

Figura 4. Composición de extracto de flores de *L. rivularis* en AcOEt.

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

7.2. Protocolo de trabajo para la producción de nanoemulsiones de flores de *L. rivularis*:

7.2.1. Materiales.

- Agua.
- Principio activo (exudado resinoso): extractos de flores de *L. rivularis*.
- TWEEN 20.
- Aceite de coco.

Elementos de protección personal:

- Guantes de procedimiento.
- Mascarilla.
- Delantal.

Equipos:

- Sonicador (procesadores Vibra-Cell, Sonics).
- Homogenizador a alta presión (EmulsiFlex-C3, AVESTIN).
- Analizador de estabilidad de nanoemulsiones (Zetasizer ZS 90, Malvern Instruments Ltd, UK).

- Medidor de pH.

7.2.2. Metodología.

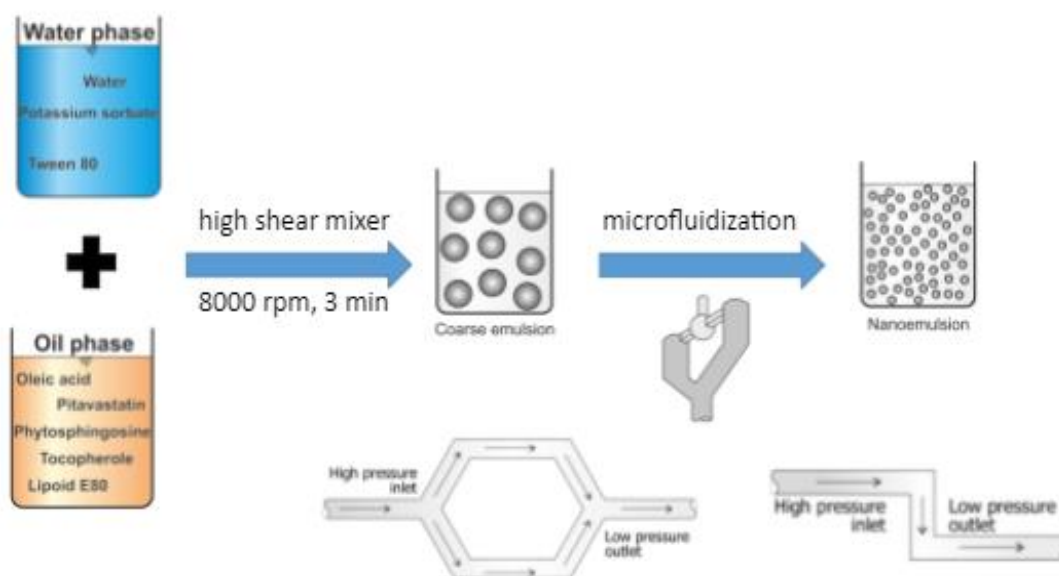


Figura 5. Ejemplo de formulación de nanoemulsiones.

Formulación de la nanoemulsión:

Las nanoemulsiones fueron producidas por medio de metodologías de alta energía. En una primera etapa, se forman emulsiones estables usando sonicación (procesadores Vibra-Cell™, Sonics) durante 6 minutos con una amplitud del 80% a intervalos de 1 minuto de sonicación y 10 segundos de descanso.

En una segunda etapa, las nanoemulsiones se formaron por homogeneización a alta presión (EmulsiFlex-C3, Avestin) a reflujo durante 50 minutos, a una presión de 20.000 psi, controlando la temperatura, por debajo de 40°C.

Formulación	Extracto (100mg)	Aceite (100mg)	Apariencia	Surfactante (Tween 20 5%) en H ₂ O
1	<i>L. rivularis</i> , <i>n-Hexano 1</i>	Coco	Claro- translúcido	100 mL
2	<i>L. rivularis</i> , <i>DCM 1</i>	Coco	Claro- translúcido	100 mL
	<i>L. rivularis</i> , <i>DCM 2</i>	Coco	Claro- translúcido	100 mL
3	<i>L. rivularis</i> , <i>ACOEt 1</i>	Coco	Claro- translúcido	100 mL
4	<i>L. rivularis</i> , <i>ETOH 1</i>	Coco	Claro- translúcido	100 mL
5 = ct	-	Coco	Claro- translúcido	100 mL

Figura 6. Formulación de las nanoemulsiones de flor de *L. rivularis*.

Ct= control .

Num. Muestra	SURFACTANTE (5%)	Temperatura	Z-average (d.nm)	PDI	pH	ZP (mV)
1	Tween 20	25º C	19,506	0,245	6.92	-3.25
2	Tween 20	25º C	88,204	1	6.89	-4.59
2a	mix	25º C	37,679	0,983	6.87	-4.53
3	Tween 20	25º C	44,301	0,505	6.86	-4.36
4	Tween 20	25º C	102,765	0,367	6.87	-4.45

Figura 7. Análisis potencial Z y tamaño de nanoemulsión.

Estabilidad de la nanoestructura:

La estabilidad de las nanoemulsiones se determinó mediante: medición del tamaño de partículas, polidispersidad y potencial zeta versus tiempo mediante espectroscopía de correlación de fotones (dispersión dinámica de luz), utilizando un analizador Zetasizer ZS 90.

Las nanoemulsiones fueron monitoreadas por dispersión dinámica de luz a tres temperaturas de almacenamiento, 4, 25 y 37°C. El potencial zeta se midió utilizando celdas zeta especializadas (Malvern) con electrodos en la misma dilución que se utiliza para la medición del tamaño.

Caracterización de las formulaciones de las nanoemulsiones:

El Zetasizer Nanoseries zs (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido) se utilizó para medir el tamaño y el potencial zeta de las nanoemulsiones. El Zetasizer emplea el principio de

espectroscopía de correlación de fotones (PCS) y mide con precisión el tamaño en el rango de 0,3 nm a 10 μm .

Se mezclan 40 μL de muestra de nanoemulsión con 1 mL de agua de grado HPLC en una cubeta y se calcula el promedio de tres lecturas. Se utilizan cubetas especializadas para medir el potencial zeta.

El pH se mide con un medidor de pH. El medidor de pH se calibra utilizando soluciones de pH 4 y pH 7, y luego se realizan las mediciones de cada muestra de nanoemulsión.

7.3. Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales en líneas celulares humanas.

7.3.1. Materiales.

Líneas celulares:

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: cáncer cérvico uterino (HELA), cáncer de mama (MCF-7), línea celular de mama no tumoral (MCF-10), cáncer de colon (HT-29).

Solventes:

- DMSO: utilizado para disolver los extractos de palo negro.

Reactivos:

- Ácido Tricloroacético.
- Sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).
- Ácido acético.
- Tris base no tamponado.

Elementos de protección personal:

- Guantes de procedimiento.

- Mascarilla.
- Delantal.

Equipos:

- Filtros Millipore.
- Cabina biológica de seguridad, modelo HR30-IIA2.
- Micropipetas para 0.5 - 10 μ L y para 100 - 1000 μ L.
- Puntas para micropipeta de 0.5 - 10 μ L y de 100 - 1000 μ L.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Agua bidestilada estéril.
- Placas de 96 pocillos de cultivo celular.
- Incubador Memmert.
- Lector de microplacas BIOTEK modelo EL808, a $\lambda=540$ nm.

7.3.2. Metodología.

- I. En primer lugar se recepcionó el producto natural, en este caso los extractos de flor de *L. rivularis*.
- II. Se disolvió el extracto en DMSO, obteniendo una primera solución a una concentración de 50 mg/mL que corresponde a la *solución madre*.
- III. Se realizó posteriormente el filtrado del producto a través de filtros *Millipore* para DMSO.
- IV. A partir de la solución madre obtuvimos una solución de 500 μ g/mL que corresponde a la *solución de trabajo*, la cual se prepara en fresco cada vez que debe ser utilizada.

- V. Durante esta etapa se mantuvo todo el preparado protegido de la luz y en fresco. Lo mismo con la mantención constante de temperatura donde se dejó la *Solución Madre* a -20°C y la *Solución de Trabajo* a 4°C .
- VI. Se trabajó con distintas concentraciones: 1.25 - 2.5 - 5 - 10 μL de la *solución de trabajo* por cada 100 μL de medio en los pocillos de cultivo.
- VII. La densidad celular de siembra en los pocillos esperada debe ser entre 3×10^3 cel/pocillo.
- VIII. La duración del ensayo es de 72 horas.



Figura 8. Tratamiento de células.

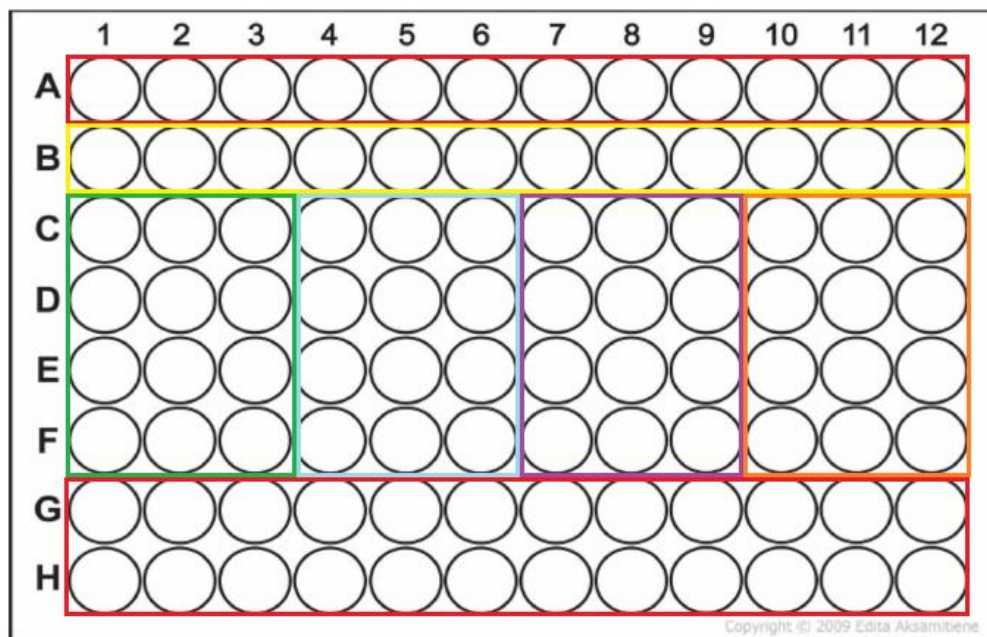


Figura 9. Orden de tratamientos de extractos en placa de cultivo celular.

Control negativo

Control solvente

n-Hexano

DCM

AcOet

EtOH

Fila C: 50 µg/mL (10 µL)

Fila D: 25 µg/mL (5 µL)

Fila E: 12,5 µg/mL (2,5 µL)

Fila F: 6,25 µg/mL (1,25 µL)

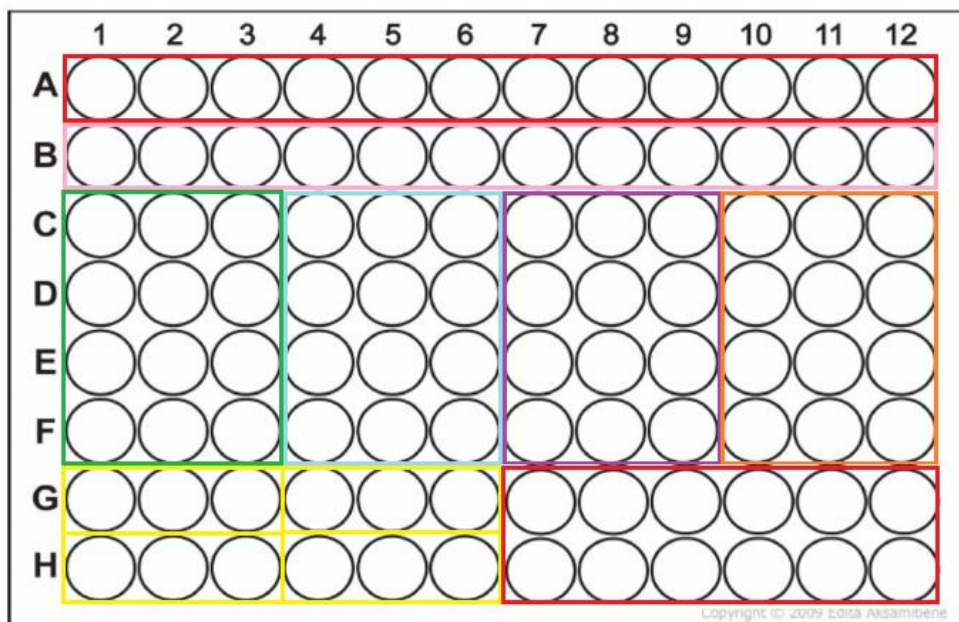


Figura 10. Orden de tratamientos de nanoemulsiones en placa de cultivo celular.

Control negativo

TWEEN

***n*-Hexano 1**

DCM 1

AcOET 1

EtOH 1

DCM2 [G1,2,3 = 2 µg/mL (10 µL), G4,5,6 1 µg/mL (5 µL) H1,2,3 = 0,5 µg/mL (2,5 µL), H4,5,6 = 0,25 µg/mL (1,25 µL)]

Fila C: 2 µg/mL (10 µL)

Fila D: 1 µg/mL (5 µL)

Fila E: 0,5 µg/mL (2,5 µL)

Fila F: 0,25 µg/mL (1,25 µL)

- IX. Las células fueron incubadas a 37°C en un incubador resguardando una atmósfera con 5% CO₂ / 95% O₂ y tratadas con los extractos a las concentraciones indicadas durante todo el análisis (72 horas).



Figura 11. Células tratadas dentro del incubador.

- X. Tras el tratamiento las células fueron fijadas con 50% de *Ácido Tricloroacético* (25 μ L/pocillo) a 4°C durante 1 hora.

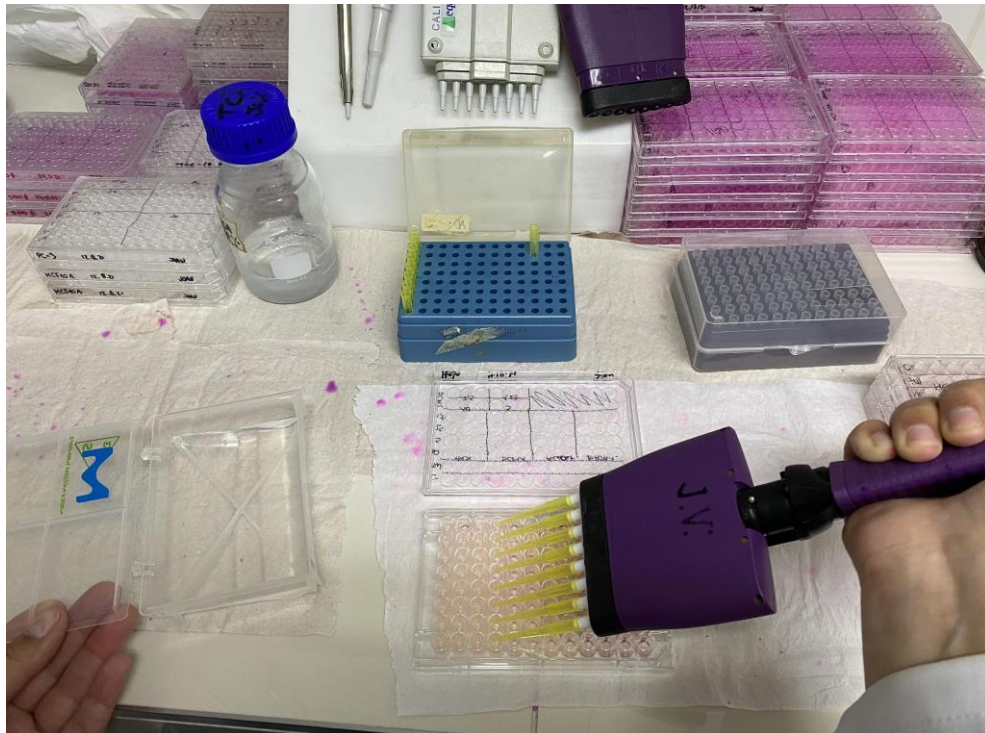


Figura 12. Fijación de las células tratadas e incubadas.

XI. Y lavadas con agua destilada, 3 veces por inmersión.



Figura 13. Lavado de células.

XI. Posteriormente se procedió a teñir con 0,1% de *Sulforodamina B* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en 1% de *Ácido Acético* (50 μ L/pocillo) durante 30 minutos.



Figura 14. Tinción de células.

- XII.** Y a lavarlas 3 veces con ácido acético a la concentración dada (150 μ L/pocillo) para así eliminar el colorante no unido. El colorante unido a proteínas se solubiliza con 100 μ L de 10 mM Tris base no tamponado.



Figura 15. Células tratadas para análisis de viabilidad celular.

La densidad celular finalmente fue analizada en un lector de placas a 540 nm. Los datos son expresados como media $\pm$ desviación estándar de tres o cuatro pocillos para tres experimentos independientes y deben ser tiempo cero (T0), control negativo (C-), control de solvente (DMSO) y diferentes concentraciones de compuesto.

$$\left(\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \right) \times 100$$

A partir de los resultados se calculó la inhibición del 50 % del crecimiento (IC₅₀) calculado como $[(Ti-T0)/(C-T0)] \times 100 = 50$, y que representa la concentración de compuesto que

provoca una reducción del 50% de la viabilidad celular (medida como tinción por SRB) en las células control tras el tratamiento.

8. RESULTADOS.

Tras realizar tratamientos con extracto de la flor de *Leptocarpus rivularis* disuelto en *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol en las líneas celulares MCF-10, MCF-7, HELA y HT-29 se obtuvieron los siguientes resultados:

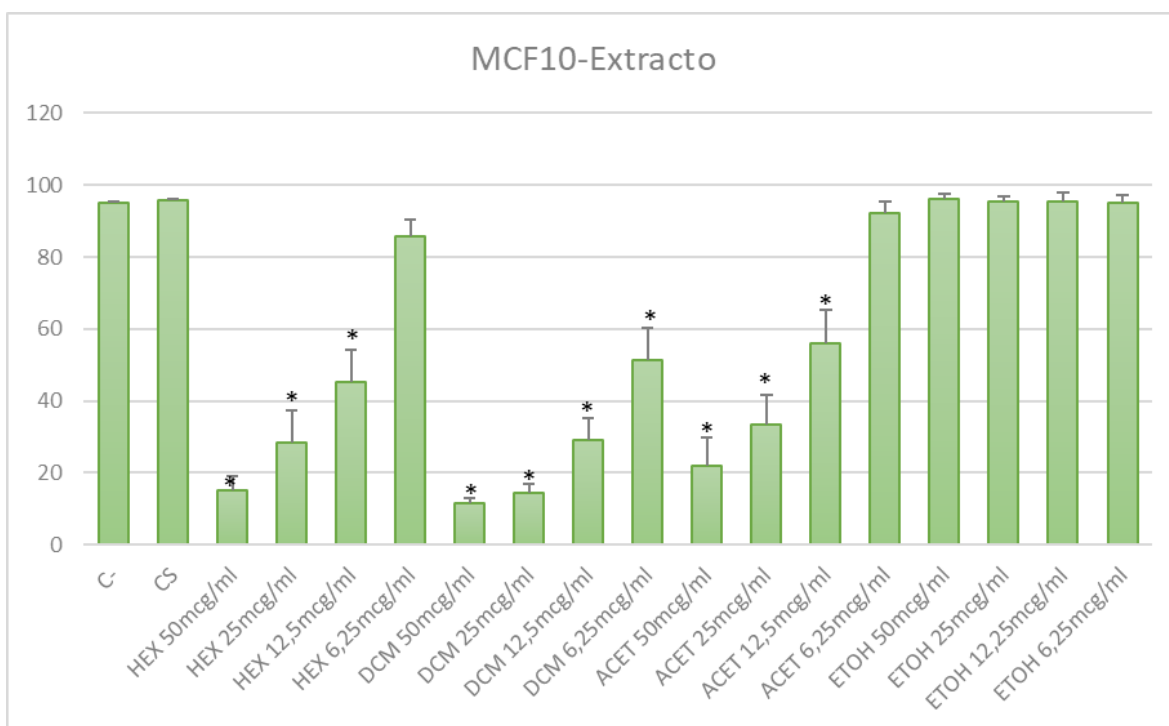


Figura 16. Tratamientos con los diferentes extractos de flor de palo negro (*Leptocarpus rivularis*) versus viabilidad celular en MCF-10.

En la figura 16 es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular no tumoral MCF -10 que:

- Con el extracto HEX se consigue el mayor efecto citotóxico a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ que logra una viabilidad del 20% y una diferencia significativa (post-hoc con $p < 0,05$) con los controles negativos y solventes. En cambio, el menor efecto se consigue a una concentración de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ que logra una viabilidad del 80% aproximadamente, y sin diferencia significativa con los controles negativos y solventes (post-hoc con $p = 0,86$ y $p = 0,81$ respectivamente).
- Para el extracto DCM, el mayor efecto citotóxico se logra a una concentración de 50 mcg/ml alcanzando una viabilidad del 10%, y el menor efecto es con una concentración del extracto de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ que alcanza el 50% de viabilidad celular. Por otro lado, todos los tratamientos presentaron una diferencia significativa con el control negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para el extracto ACET, el mayor efecto citotóxico se alcanza con 50 $\mu\text{g/ml}$ logrando 20% de viabilidad celular y diferencia significativa con los controles solvente y negativo (post-hoc con $p < 0,05$), en cambio el menor efecto es con 6.25 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando aproximadamente 95% de viabilidad celular, por lo tanto, ausencia de diferencia significativa con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p = 1,00$).
- Para el extracto ETOH, no hay efecto citotóxico, ya que la viabilidad más baja se logra a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ y supera el 94%, siendo estadísticamente no significativa la diferencia con los controles negativos y solventes (Kruskal-Wallis con $p = 0,76$).

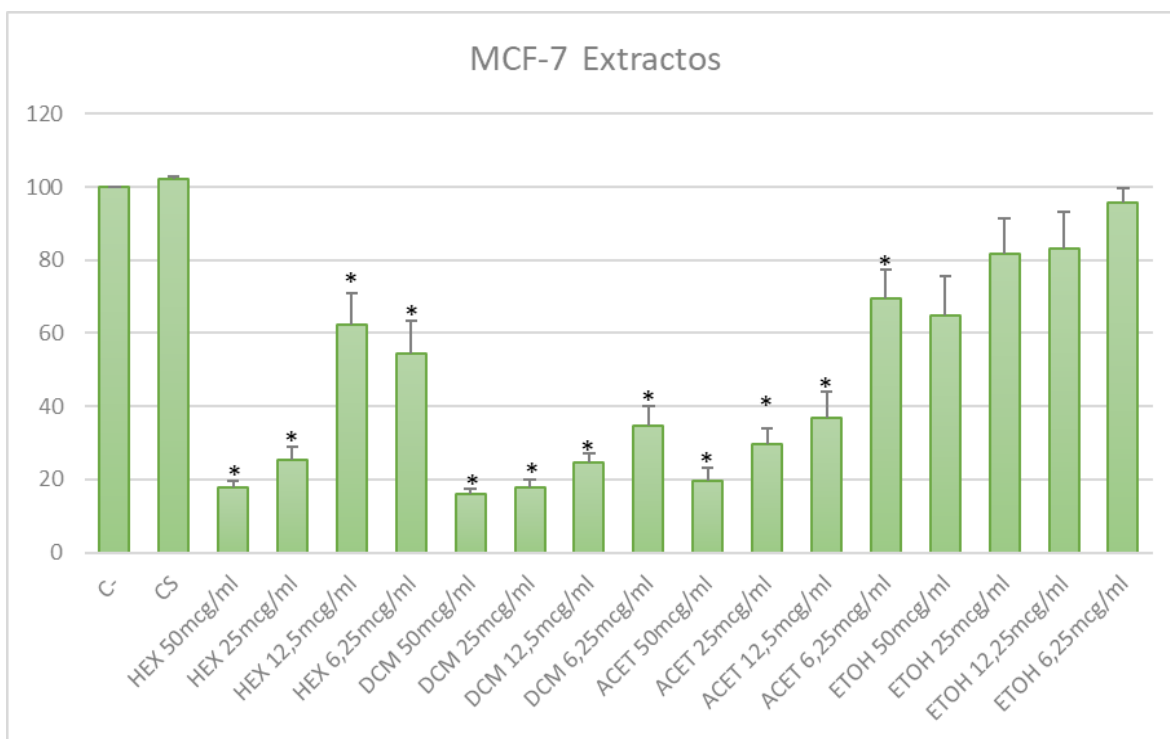


Figura 17. Tratamientos con los diferentes extractos de flor de palo negro (*Leptocarpus rivularis*) versus viabilidad celular en MCF-7.

En la figura 17 es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular tumoral MCF- 7 que:

- El extracto hexano (HEX) consigue el mayor efecto citotóxico a una concentración de 50 µg/ml, alcanzando una viabilidad aproximadamente del 20%. En cambio, el menor efecto citotóxico se logra con una concentración de 12.5 mcg/ml del extracto alcanzando una viabilidad del 60%.
- Para el extracto de diclorometano (DCM), el mayor efecto citotóxico se logra a una concentración de 50 mcg/ml alcanzando una viabilidad celular aproximadamente del 20%, y el menor efecto es con una concentración del extracto de 6.25 µg/ml que alcanza una viabilidad aproximada del 40%.

- Para el extracto de acetato de etilo (ACET), el mayor efecto citotóxico se alcanza con la concentración de 50 µg/ml logrando una viabilidad celular del 20% aproximado, en cambio el menor efecto es con 6.25 mcg/ml que logra una viabilidad del 70%.
- Se observa en estos tres tratamientos una diferencia significativa con los controles negativos y solvente para cada uno de ellos en las 4 concentraciones utilizadas (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para el extracto etanol (ETOH), el mayor efecto citotóxico se logra con una concentración de 50 mcg/ml alcanzando una viabilidad del 70% aproximadamente y el menor efecto se logra con 6.25 mcg/ml del extracto que alcanza un 100% de viabilidad celular, por lo que se observa, para todas las concentraciones de este extracto una ausencia de diferencia significativa con los controles negativos y solventes (Kruskal-Wallis con $p = 0,13$).

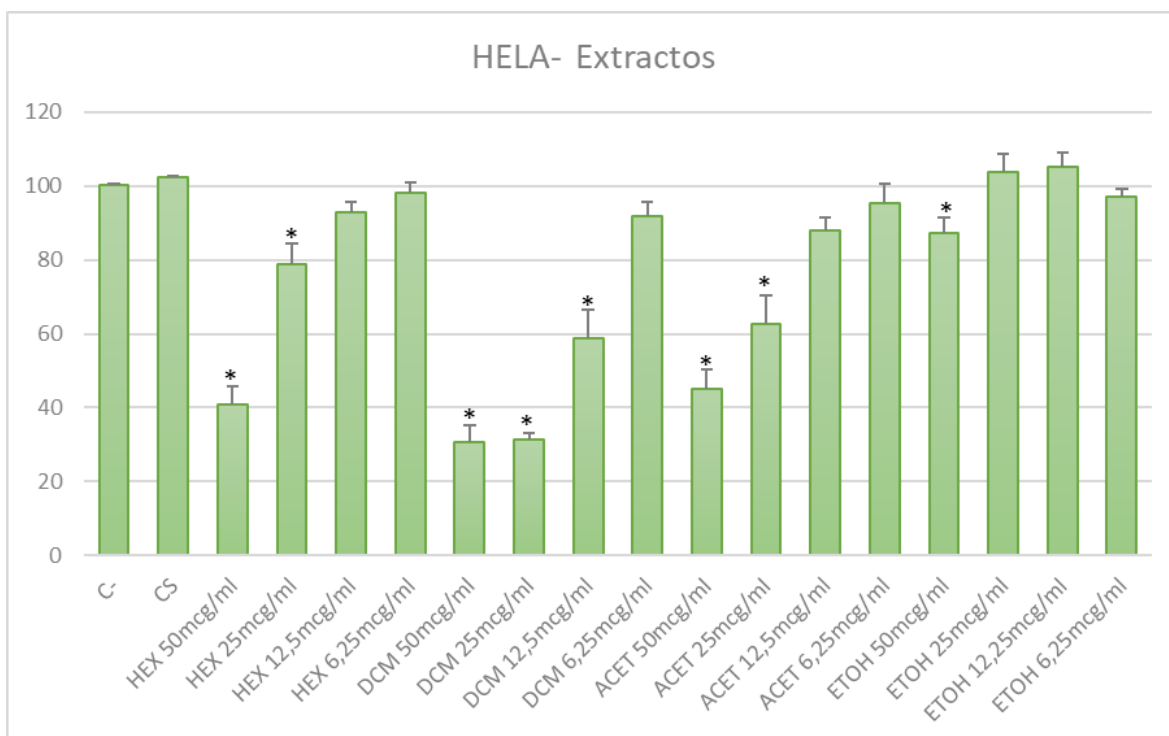


Figura 18. Tratamientos con los diferentes extractos de flor de palo negro (*Leptocarpus rivularis*) versus viabilidad celular en HELA.

En la figura 18 es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular tumoral HELA que:

- El extracto HEX consigue el mayor efecto citotóxico a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad del 40% y una diferencia significativa con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p < 0,05$), en cambio el menor efecto es con 6.25 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad cercana al 100%, por lo tanto sin diferencia significativa con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p = 1,00$ y $p = 0,96$ respectivamente).
- Para DCM, el mayor efecto citotóxico se logra a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad cercana al 30% y una diferencia significativa marcada (post-hoc con $p < 0,05$) respecto a los controles negativos y solvente, y el menor efecto es con una concentración del extracto de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad cercana al 100%, lo cual no representa diferencia significativa con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p = 0,73$ y $p = 0,51$ respectivamente).
- Para el extracto ACET, el mayor efecto citotóxico se logra con 50 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad del 40% y diferencia significativa con el control negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$), en cambio el menor efecto es con 6.25 $\mu\text{g/ml}$ que llega cercano al 100% de viabilidad celular, por lo tanto, sin diferencia significativa con el control negativo y solvente (post-hoc con $p = 0,98$ y $p = 0,90$ respectivamente).
- Para el extracto ETOH, el mayor efecto citotóxico se logra con 50 $\mu\text{g/ml}$ que alcanza aproximadamente un 80% de viabilidad celular con una diferencia significativa respecto al control solvente (post-hoc con $p = 0,02$). En cambio, el menor efecto se logra con 12.5 $\mu\text{g/ml}$ que supera el 100% de viabilidad celular, por lo tanto tiene ausencia de diferencia significativa de los controles negativo y solvente (post-hoc con $p = 0,98$ y $p = 0,85$ respectivamente).

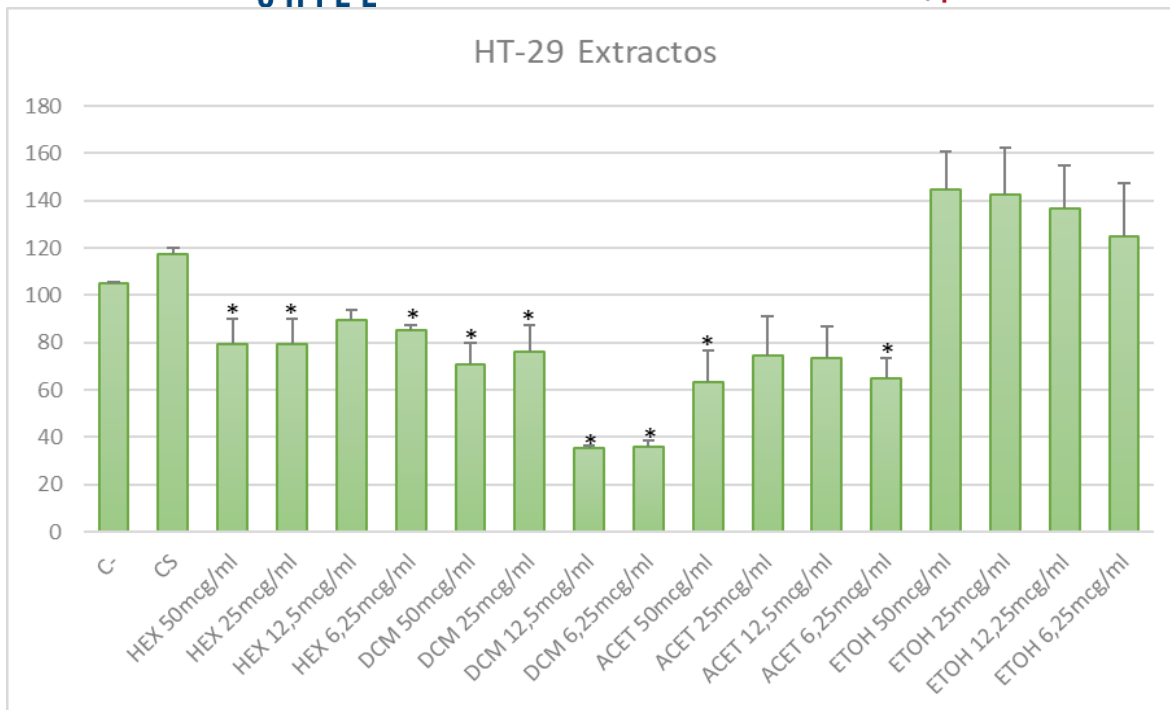


Figura 19. Tratamientos con los diferentes extractos de flor de palo negro (*Leptocarpus rivularis*) versus viabilidad celular en HT-29.

En la figura 19 es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular tumoral HT - 29 que:

- El extracto HEX consigue el mayor efecto citotóxico a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 25 mcg/ml alcanzando una viabilidad del 80%. En cambio, el menor efecto se logra con 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del extracto alcanzando 90% de viabilidad celular.
- Para DCM, el mayor efecto citotóxico se logra a una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ logrando una viabilidad cercana al 40% y el menor efecto se da con una concentración del extracto de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alcanzando una viabilidad cercana del 80%. Cabe destacar que
- Para el extracto ACET, el mayor efecto citotóxico se alcanza con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ logrando una viabilidad del 60% aproximadamente, en cambio el menor efecto es con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que alcanza una viabilidad cercana al 80%.

- Cabe destacar que, en estos tres tratamientos anteriores, todas las concentraciones presentan una diferencia significativa respecto a los controles negativos y solvente, con un post-hoc $p < 0,05$.
- Para el extracto ETOH, no hay efecto citotóxico, ya que las viabilidades alcanzadas van desde el 120%-140% para los tratamientos en sus distintas concentraciones, lo cual es respaldado de forma estadística (Kruskal-Wallis con $p = 0,13$), es decir, con ausencia de diferencias significativas con el control negativo y solvente.

En resumen, de los resultados se desprende que:

- El mayor efecto citotóxico se obtuvo con el extracto de diclorometano a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ en las líneas celulares MCF-10, MCF-7 y HELA, reduciendo la viabilidad a menos de 20% y una diferencia significativa en casi la totalidad de los tratamientos (prueba de Kruskal Wallis con $p = 0,00001$).
- Se observa una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto y la viabilidad celular en las líneas celulares MCF-10, MCF-7 y HELA, es decir a mayor concentración del extracto, menor es la viabilidad celular, por lo tanto, también se describe una relación directamente proporcional entre la concentración del extracto y la citotoxicidad.
- El menor efecto conseguido fue el del extracto de etanol, con una viabilidad cercana al 80% en todas sus concentraciones y en todas las líneas celulares y sin observarse diferencias significativas con el control y el resto de los tratamientos (prueba de Kruskal Wallis con p entre 0,13 y 0,76).

Tras realizar tratamientos con extracto de la flor de *Leptocarpha rivularis* disuelto en n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol y emulsionados en el detergente Tween 20 en las líneas celulares MCF-10, MCF-7, HELA y HT-29 en concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$, 1

$\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y 0,25 $\mu\text{g/ml}$, como se puede observar las concentraciones usadas son mucho menores a las usadas con los extractos sin emulsionar, obteniéndose los siguientes resultados:

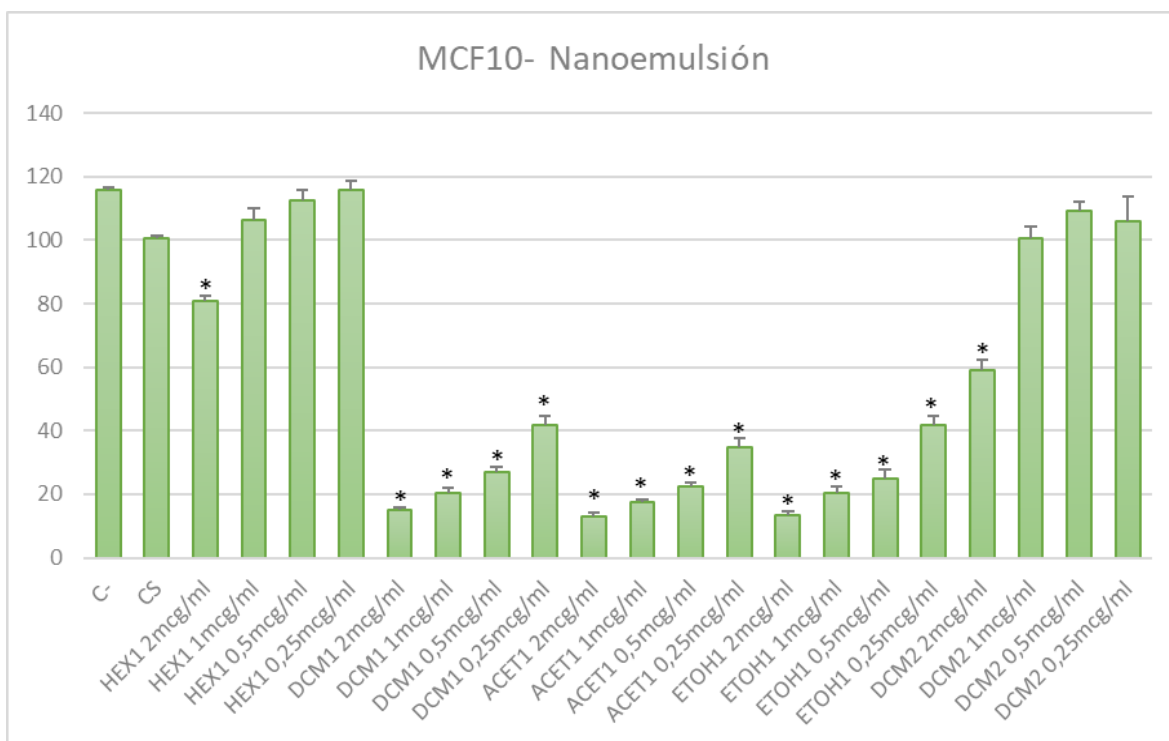


Figura 20. Tratamientos con las diferentes nanoemulsiones de flor de palo negro (*Leptocarpa rivularis*) versus viabilidad celular en MCF-10

En la figura 20 es posible observar el efecto en los extractos nanomulsionados sobre la viabilidad celular de la línea celular no tumoral MCF-10 que:

- Para el extracto HEX1 en nanoemulsión, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad del 80% y una diferencia significativa con los controles negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$). En cambio, el resto de concentraciones no presentan un efecto citotóxico estadísticamente considerable con respecto al control negativo (post-hoc con $p = 1,00$).

- Para DCM1 en nanoemulsión, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 mcg/ml alcanzando una viabilidad cercana al 20%. Por otro lado, la concentración 0.25 µg/ml alcanza una viabilidad celular del 34,32% lo que corresponde al menor efecto citotóxico. En todas las concentraciones de tratamiento con DCM1 se logró una diferencia significativa con el control negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para ACET1 en nanoemulsión, el mayor efecto citotóxico se consigue a la mayor concentración utilizada reduciendo la viabilidad por debajo del 20%. El resto de concentraciones presentaron una viabilidad por debajo del 40% con diferencia significativa con el control negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para ETOH 1, los resultados son similares, en todas las concentraciones, a los indicados para ACET 1. Además todas las concentraciones presentaron diferencia significativa con el control negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para DCM2, el mayor efecto citotóxico se logra con una concentración de 2 µg/ml alcanzando alrededor de un 60% de viabilidad y siendo la única concentración con diferencia significativa a los controles negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$). El resto de concentraciones presentaron viabilidad igual o superior al 100% de la viabilidad celular y no representan diferencia significativa con el control solvente y negativo (post-hoc con $p = 1,00$ y $p = 0,11$ respectivamente).

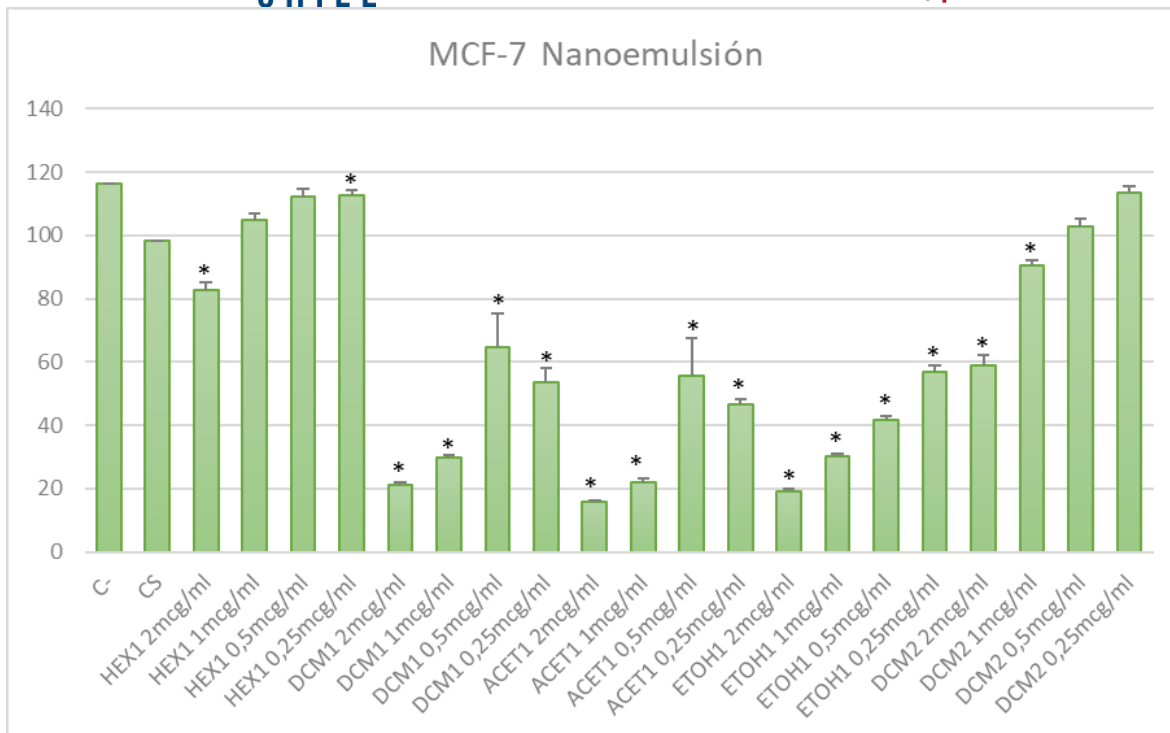


Figura 21. Tratamientos con las diferentes nanoemulsiones de flor de palo negro (*Leptocarpus rivularis*) versus viabilidad celular en MCF-7.

En la figura 21 es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular tumoral MCF - 7 que:

- Para el extracto hexano 1 (HEX1) en nanoemulsión, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alcanzando una viabilidad del 80% y una diferencia significativa con los controles negativo y solvente (anova one way con $p=0,00$ y $p=0,03$. El resto de concentraciones no disminuyen la viabilidad celular de forma significativa respecto el control solvente y negativo (post-hoc con $p=0,99$ y $p=0,05$ respectivamente)
- Se puede observar para el extracto diclorometano 1 (DCM1) en nanoemulsión, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alcanzando una viabilidad del 20% aproximadamente en comparación a la concentración de 0,5 mcg/ml la cual alcanza una viabilidad celular cercana al 60% correspondiendo al

menor efecto citotóxico. Todas las concentraciones de esta nanoemulsión presentan diferencias significativas con los controles negativo y solvente (post-hoc $p < 0,05$).

- Para acetato 1 (ACET1), la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ alcanza el mayor efecto citotóxico obteniendo una viabilidad celular cercana al 20%. POR OTRA PARTE, la concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ posee la menor citotoxicidad alcanzando una viabilidad cercana al 60%. Todas las concentraciones de esta nanoemulsión presentan diferencias significativas con los controles negativo y solvente (post-hoc $p < 0,05$).
- Para el extracto etanol 1 (ETOH 1), el mayor efecto citotóxico se obtuvo con una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ del emulsionado alcanzando una viabilidad celular del 20%. En cambio, el menor efecto citotóxico se consiguió a una concentración 0,25 mcg/ml alcanzando una viabilidad celular del 60%. Todos los tratamientos lograron una diferencia significativa con los controles negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para diclorometano 2 (DCM2), el mayor efecto citotóxico se obtuvo con una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ alcanzando una viabilidad celular del 60% con una diferencia significativa para los controles negativo y solvente (post-hoc con $p < 0,05$). En cambio, la menor citotoxicidad se consigue con una concentración de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ que muestra una viabilidad cercana al 120 y ausencia de diferencia significativa para los controles negativo y solvente (post-hoc con $p = 1,00$ y $p = 0,16$ respectivamente).

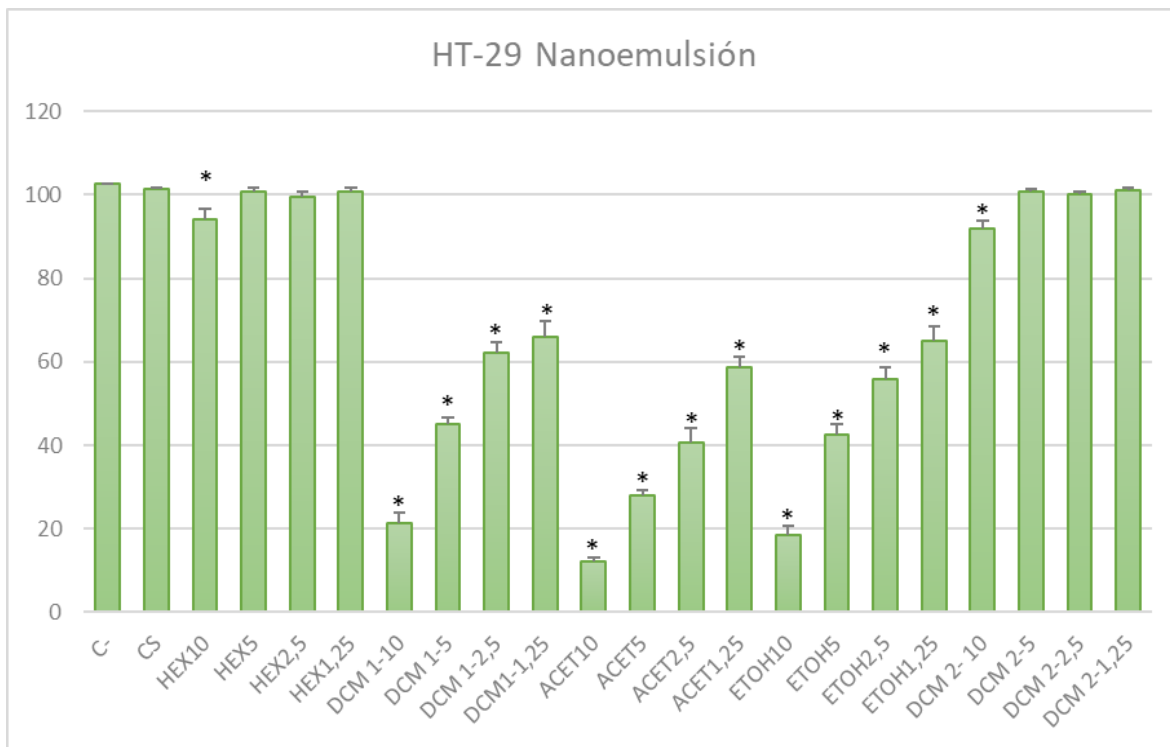


Figura 22. Tratamientos con las diferentes nanoemulsiones de flor de palo negro (*Leptocarpa rivularis*) versus viabilidad celular en HT-29.

En la figura 22 es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular tumoral HT-29 que:

- Para HEX1, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del emulsionado que significa una viabilidad celular del 90% aproximadamente. El resto de concentraciones no disminuyeron de forma estadísticamente significativa la viabilidad celular.
- Para DCM1, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 mcg/ml que alcanza una viabilidad del 20% aproximadamente. En cambio, con una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la viabilidad celular supera el 60% correspondiendo al

menor efecto citotóxico del emulsionado. Todas las concentraciones presentan diferencias significativas con los controles negativo y solvente (post-hoc $p < 0,05$).

- Para ACET1, la concentración 2 $\mu\text{g/ml}$ alcanza una viabilidad del 10% aproximadamente correspondiendo al mayor efecto citotóxico en comparación a la concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ que alcanza una viabilidad del 60%. Todas las concentraciones de esta nanoemulsión presentan diferencias significativas con los controles negativo y solvente (post-hoc $p < 0,05$).
- Para ETOH1, el mayor efecto citotóxico se consigue a la mayor concentración usada reduciendo hasta un 20% la viabilidad celular. Todas las concentraciones de esta nanoemulsión presentan diferencias significativas con los controles negativo y solvente (post-hoc $p < 0,05$) con una viabilidad no superior al 60%.
- Para DCM2 en nanoemulsión, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ que significa una viabilidad cercana al 90%. En cambio, la concentración de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ logra un 100% de viabilidad correspondiendo a la menor citotoxicidad del emulsionado.

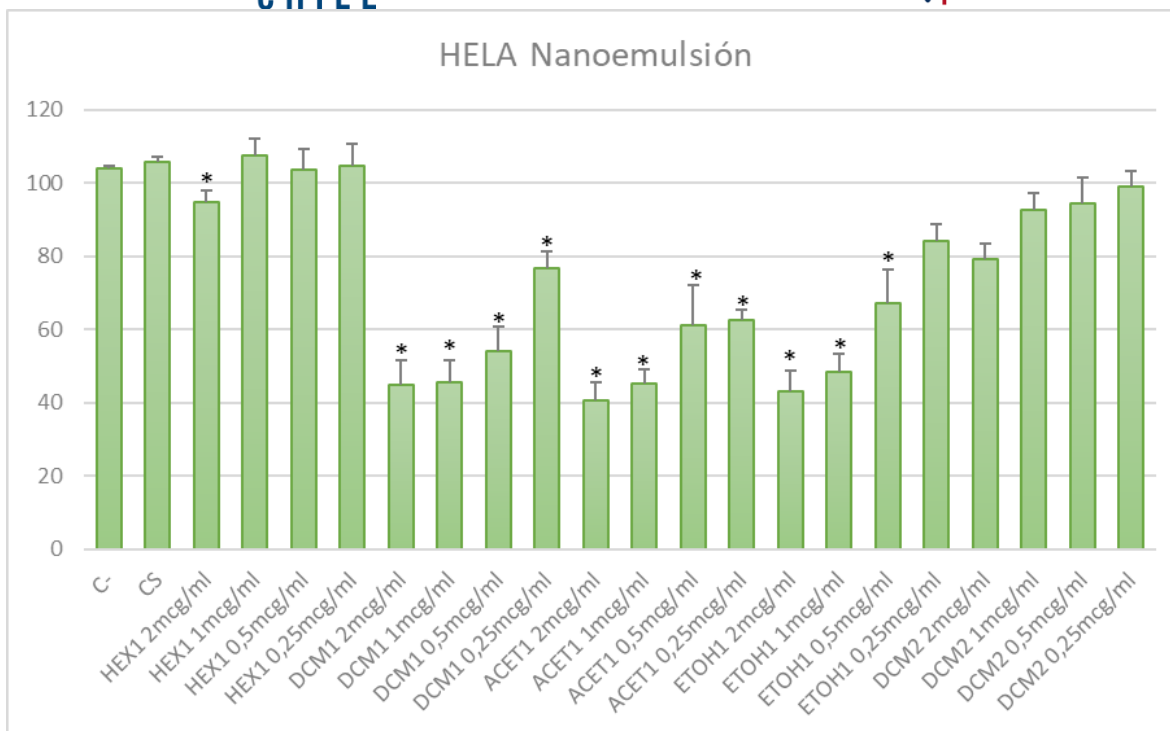


Figura 23. Tratamientos con las diferentes nanoemulsiones de flor de palo negro (*Leptocarpus rufus*) versus viabilidad celular en HELA.

En la figura 23 tratada con extractos nanoemulsionados es posible observar el efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular tumoral HELA que:

- Para HEX1, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del emulsionado que significa una viabilidad celular del 90% aproximadamente y una diferencia significativa (post-hoc con $p < 0,05$). En cambio, el resto de concentraciones no presentan diferencias significativas con los controles negativo y solvente (post-hoc $p < 0,05$).
- Para DCM1, el mayor efecto citotóxico se PRODUCE a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que reduce la viabilidad celular al 40%. Todas las concentraciones de este tratamiento llevan a una diferencia significativa con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).

- Para ACET1, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 mcg/ml que alcanza un 20% de viabilidad celular. En cambio, el menor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 0.25 µg/ml que alcanza una concentración del 60% aproximadamente. Todos estos tratamientos refieren una diferencia significativa con los controles negativos y solventes (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para ETOH1, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 mcg/ml que corresponde a una viabilidad aproximada del 40%. Para la concentración 0.25 µg/ml la viabilidad celular se acerca al 80%, diferencia que no es estadísticamente significativa. El resto de concentraciones de este tratamiento dan una diferencia significativa con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p < 0,05$).
- Para DCM2, el mayor efecto citotóxico se consigue a una concentración de 2 µg/ml que alcanza una viabilidad del 80% cuando con diferencia significativa (post-hoc con $p < 0,05$) . El resto de concentraciones no generan diferencias significativas con los controles negativos y solvente (post-hoc con $p = 0,89$ y $p = 0,99$ respectivamente).

En resumen:

- El efecto más inocuo se obtuvo con la nanoemulsión de n-hexano en todas las líneas celulares, con una viabilidad que varía entre el 80% a una concentración de 2 µg/ml y 115% a una concentración de 0,25 µg/ml y con diferencia significativa solamente en el tratamiento de mayor concentración (prueba de Kruskal Wallis con $p = 0,00001$).
- El mayor efecto citotóxico se obtuvo con la nanoemulsión de acetato de etilo, el cual logró menor viabilidad para las líneas celulares MCF-10, MCF-7 y HT-29.
- Se observa una relación inversamente proporcional en la concentración de la nanoemulsión y la viabilidad en todas las líneas celulares, es decir a mayor concentración de la nanoemulsión, menor es la viabilidad celular, por lo tanto,

también se describe una relación directamente proporcional entre la concentración de la nanoemulsión y su citotoxicidad.

Tras el análisis del efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares MCF-10, MCF-7, HELA y HT-29 tanto con los extractos celulares como con las nanoemulsiones de los extracto de la flor de *Leptocarpha Rivularis* (Palo negro) de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol se realizó la comparación entre los efectos en las mismas líneas celulares, obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en la tabla 24.

En la tabla se muestran valores similares de viabilidad celular y a la concentración a la que se produce el efecto por parte de los diferentes extractos y de las nanoemulsiones de los mismos extractos en las distintas líneas celulares

MCF-10	Viabilidad	Concentración	HELA	Viabilidad	Concentración
Control negativo	105%	-	Control negativo	102,06%	-
Extracto HEX	86%	6,25mcg/ml	Extracto HEX	98,20%	6,25mcg/ml
Nanoemulsión HEX1	80,78%	2mcg/ml	Nanoemulsión HEX1	94,92%	2mcg/ml
Extracto DCM	51,1633	6,25mcg/ml	Extracto DCM	58,61%	12,5mcg/ml
Nanoemulsión DCM1	41,64%	0,25mcg/ml	Nanoemulsión DCM1	54,03%	0,5mcg/ml
Nanoemulsión DCM2	59,11%	2mcg/ml	Nanoemulsión DCM2	79,17%	2mcg/ml
Extracto ACET	21,99%	50mcg/ml	Extracto ACET	45,04%	50mcg/ml
Nanoemulsión ACET1	22,31%	0,5mcg/ml	Nanoemulsión ACET1	45,18%	1mcg/ml
Extracto ETOH	95,14%	6,25mcg/ml	Extracto ETOH	87%	50mcg/ml
Nanoemulsión ETOH1	41,66%	0,25mcg/ml	Nanoemulsión ETOH1	84,33%	0,25mcg/ml
MCF-7	Viabilidad	Concentración	HT-29	Viabilidad	Concentración
Control negativo	108,05%	-	Control negativo	103,70%	-
Extracto HEX	62,13%	12,5mcg/ml	Extracto HEX	89,52%	12,5mcg/ml
Nanoemulsión HEX1	82,72%	2mcg/ml	Nanoemulsión HEX1	94%	2mcg/ml
Extracto DCM	34,51%	6,25mcg/ml	Extracto DCM	70,72%	50mcg/ml
Nanoemulsión DCM1	29,61%	1mcg/ml	Nanoemulsión DCM1	65,91%	0,25mcg/ml
Nanoemulsión DCM2	58,95%	2mcg/ml	Nanoemulsión DCM2	91,72%	2mcg/ml
Extracto ACET	19,67%	50mcg/ml	Extracto ACET	63,42	50mcg/ml
Nanoemulsión ACET1	15,65%	2mcg/ml	Nanoemulsión ACET1	58,65%	0,25mcg/ml
Extracto ETOH	65%	50mcg/ml	Extracto ETOH	125,03	6,25mcg/ml
Nanoemulsión ETOH1	56,83%	0,25mcg/ml	Nanoemulsión ETOH1	65,10%	0,25mcg/ml

Figura 24. Tabla de comparación concentración/viabilidad de extracto vs nanoemulsión en MCF-10, MCF-7, HELA y HT-29.

En las líneas MCF-10, MCF-7, HT-29 y HELA tratadas con extracto de etanol se obtuvo una viabilidad entre el 65% y el 95%, mostrando una baja citotoxicidad. Este efecto citotóxico era igualado o mejorado al trabajar con la nanoemulsión del mismo extracto a concentraciones entre 25 y 200 veces menores, obteniéndose una viabilidad entre el 41% y 84%.

Algo similar ocurre con el efecto del extracto de acetato de etilo y la nanoemulsión de este extracto obteniéndose valores comparables de viabilidad celular a concentraciones entre 25 y 200 veces menores de las nanoemulsiones según la línea celular. Respecto del efecto del extracto de diclorometano se observa también que concentraciones entre 6 a 200 veces más pequeñas de las nanoemulsiones generan porcentajes de viabilidad similares al

extracto en las distintas líneas celulares. En el caso del extracto de hexano ocurre un efecto similar pero a un nivel menor ya que las concentraciones de las nanoemulsiones que provocan efectos similares en la viabilidad al extracto solo son entre 3 a 6 veces menores. Si se analiza por línea celular se puede observar que en la línea celular MCF-10 se observa un efecto similar en cuanto a la viabilidad celular, pero a concentraciones mucho menores para la nano emulsión respecto a su extracto correspondiente *n*-Hexano, diclorometano y acetato de etilo, siendo este último el más destacado con una viabilidad entre el 21% y 22% a una concentración de 50 µg/ml en el extracto y 0,5 µg/ml en la nanoemulsión. Se puede observar el mismo resultado en la línea celular MCF-7 en los extractos y su respectiva nanoemulsión de *n*-Hexano, diclorometano y acetato de etilo, donde destaca este último con una viabilidad de 45% al ser tratadas con el extracto a una concentración de 50 µg/ml y con la nanoemulsión a una concentración de 1 µg/ml. Se evidencia un resultado semejante en la línea celular HELA para extractos y su respectiva nanoemulsión de *n*-Hexano, diclorometano y acetato de etilo, destacando este último con una viabilidad entre el 15% y 19% a una concentración de 50 µg/ml en el extracto y de 2 µg/ml en la nanoemulsión. También se destacan estos resultados en la línea celular HT-29 para los extractos y respectivas nanoemulsiones de *n*-Hexano, diclorometano y acetato de etilo, teniendo este último una viabilidad entre el 58% y 63% con una concentración de 50 µg/ml en el extracto y de 0,25 µg/ml en la nanoemulsión.

9. DISCUSIÓN.

Diversos estudios epidemiológicos sobre cáncer muestran cómo esta patología ha alcanzado un alto número de morbilidad y mortalidad en la población mundial cobrando millones de vidas cada año y dejando múltiples secuelas en los pacientes recuperados, alcanzando así el segundo lugar dentro del ranking mundial de las causas de muerte. Específicamente el cáncer mamario dentro de la población chilena alcanza la segunda causa de muerte dentro de la población femenina (37). A partir de esta información nos resulta imperativo estudiar posibles tratamientos a esta grave patología donde aparecen otros tipos de medicina que se alejan de la terapia convencional como lo es la fitomedicina, la cual basa sus tratamientos en los principios activos de diversas plantas y vegetales. De esta forma, el palo negro (*Leptocarpha rivularis*) surge como un tratamiento coadyuvante, de segunda línea, para tratamientos oncológicos de diferentes cánceres.

Extensas investigaciones han sido llevadas a cabo para comprender los mecanismos moleculares de los compuestos bioactivos como el palo negro sobre la actividad contra el cáncer, así como su posible uso en terapias preventivas para la misma enfermedad. Se ha descrito al palo negro como una planta endémica rica en lactonas sesquiterpénicas, como es la leptocarpina, la cual posee diversas propiedades biológicas, interfiriendo en las vías metabólicas de proliferación de las células tumorales. (38)

Según una estimación, más del 90% de los medicamentos contra el cáncer presentan biodisponibilidad y farmacocinética deficientes (Iwamoto 2013). Por lo tanto, es necesario desarrollar sistemas de administración de fármacos que puedan mejorar la biodisponibilidad, propiedades farmacocinéticas y que puedan llevar las moléculas activas del fármaco al lugar de acción sin afectar a las células sanas. Es aquí donde toma relevancia la nanotecnología ya que, aunque por sí solo el palo negro posee determinado grado de citotoxicidad frente a células tumorales, al usar un transportador que no afecta su composición molecular ni la de la célula inoculada se logra aún mayor efectividad.

Dentro de la presente investigación se estudió el efecto de extractos de palo negro sobre células de cáncer cervicouterino y mamario en comparación al efecto del extracto en nanoemulsión sobre las mismas células neoplásicas. Como se detalló en los resultados, los tratamientos fueron usados sobre diferentes líneas celulares de MCF-7, MCF-10, HELA y HT-29 con extractos de *n*-Hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol, y los tratamientos con las respectivas nanoemulsiones para, de esta forma, analizar la viabilidad celular en las placas tratadas.

Los resultados muestran una relación inversamente proporcional entre la viabilidad de las células tratadas con nanoemulsión, frente a la concentración utilizada en el tratamiento, es decir que, a medida que aumenta la cantidad de tratamiento utilizado, disminuye la viabilidad de las células. Cuando el tratamiento incluía las nanoemulsiones, el efecto citotóxico, en la mayoría de los tratamientos, aumentó a concentraciones mucho más reducidas, entre 6 y 200 veces menores. Tal es el caso del acetato de etilo, el cuál muestra resultados altamente efectivos sobre las diferentes líneas celulares.

En la línea celular MCF-10 a una concentración de 0,5 mcg/ml en nanoemulsión alcanza una viabilidad celular de alrededor del 21%, en la línea celular HELA a una concentración de 2 µg/ml en nanoemulsión alcanza una viabilidad entre 15 a 19%. Lo anterior deja en evidencia el efecto positivo que posee la nanotecnología en fármacos antineoplásicos, siendo beneficioso para la industria farmacológica.

Al comparar los resultados obtenidos con el uso de nanoemulsiones frente a otras investigaciones que utilizan el palo negro como tratamiento anticancerígeno, es posible ver un aumento de la eficacia y eficiencia del tratamiento, por lo que resulta interesante incluir en los esquemas de terapia sistemas de administración de fármacos (39).

Los nanotransportadores tienen una mayor superficie comparados con partículas más grandes, además pueden modificarse fácilmente para encapsular una gran cantidad de fármaco, aumentar el tiempo de circulación en la sangre y la acumulación de fármacos en los tumores sólidos a través del efecto de permeabilidad y la retención, así como la

focalización selectiva de las células tumorales (Tyagi y Ghosh 2011; Allen y Cullis 2013; Bozzuto y Molinari 2015). Los nanotransportadores también mejoran la solubilidad, la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas de los quimioterapéuticos (Gregoriadis y Florence 1993; Bozzuto y Molinari 2015; Pattni et al. 2015). En la actualidad existe una gran variedad de ellos, como los liposomas, nanopartículas poliméricas, micelas, nanotubos, etc. Los cuales ya se encuentran en el mercado de la farmacología o en las fases de experimentación para evaluar su funcionalidad en tratamientos oncológicos (Sutradhar y Lutful, 2014).

Los liposomas corresponden a una de las primeras formas de nanotecnología en utilizarse ya que cumplen todos los requisitos de un buen vehículo de administración; son biodegradables, biocompatibles y estables en soluciones coloidales (Akbarzadeh et al. 2013; Allen y Cullis 2013). Además, protegen al fármaco de la degradación y reducen la toxicidad inespecífica relacionada con el fármaco, también pueden producirse y formularse fácilmente para la entrega de objetivos específicos (Bitounis et al. 2012; Bozzuto y Molinari 2015).

Las nanoemulsiones, al igual que otras nanopartículas, permiten evitar barreras biológicas como la barrera hematoencefálica, por otro lado, logran acumularse en células tumorales debido a la sobreexpresión de moléculas de adherencia y receptores en los neovasos tumorales, reconocidos por el nanofármaco, disminuyendo los efectos sistémicos. Es por ello que resulta interesante el uso de nanoemulsiones en la oncología.

Su capacidad de incrementar la superficie aumenta la posibilidad de interacción celular, subcelular y molecular, aumentando el número de átomos superficiales disponibles para interactuar.

La evidencia ha demostrado que las posibilidades de interacción podrían traducirse en un incremento del estrés oxidativo, inflamación, daño mitocondrial, captación por parte del sistema reticuloendotelial y en perturbación de la función fagocítica, degradación proteica,

disfunción endotelial, generación de neoantígenos, alteración del ciclo celular y daño del ADN.

Es menester, entonces, avanzar en cuanto al manejo de la toxicología en el uso de nanotecnología en pos de maximizar los beneficios de ésta.

10. CONCLUSIONES.

La fitofarmacología representa una importante oportunidad de acción en usuarios/as como terapia coadyuvante al tratamiento convencional de cáncer cervicouterino y de mama. *Leptocarpha Rivularis*, utilizada durante años bajo este objetivo, requiere ser estudiada con mayor precisión.

En la presente investigación, los resultados indicaron que en las diferentes líneas celulares utilizadas (MCF-10, MCF-7, HT-29 y HELA) tratadas con un extracto cualquiera se obtuvo una viabilidad celular específica, la cual mejoraba ostensiblemente en términos de la eficiencia si pensamos en la concentración utilizada, al trabajar con la nanoemulsión del mismo extracto

Dichos resultados, concluyen que las nanoemulsiones suponen un efecto positivo en la administración de compuestos bioactivos a las células ya que no solo potencian el efecto del extracto, sino que en muchas ocasiones se observó que con la utilización de las nanopartículas se reducía significativamente la concentración total del preparado. Es decir, se logran mejores resultados de citotoxicidad con menor concentración del preparado bioactivo.

11. PROYECCIONES Y CONSIDERACIONES

Consideramos que se requieren muestras más grandes para poder definir una tendencia clara e, idealmente, adicionar estudios en células *in vivo*, puesto que los resultados podrían variar en cuanto a lo obtenido en esta investigación.

Se debe seguir trabajando en perfeccionar las nanoemulsiones ya que suponen una eficaz alternativa para tratar enfermedades tales como el cáncer de mama y cáncer cervicouterino.

Como se mencionó anteriormente, es necesario estudiar más en profundidad en cuanto a la citotoxicidad de esta planta medicinal administrada en forma de nanoemulsión para, de esta forma, maximizar los beneficios que dicha vía representa y también invertir en recursos materiales y humanos para perfeccionar la formulación y calidad de las nanoemulsiones.

Ante la evidencia en relación a plantas medicinales y sus múltiples beneficios a nivel biopsicosocial, en conjunto con los avances tecnológicos presentes en la actualidad, se hace necesario que los/as profesionales de salud integren estos conocimientos e insten en la necesidad de investigación. Debido a lo anterior, se invita al estudiantado y a profesionales matronas y matrones a estudiar y participar de investigaciones de este tipo para dar paso a terapias alternativas y efectivas que podrían tener un impacto profundo en la calidad de vida de nuestras/os usuarias/os en la cotidianidad, resguardando sus Derechos Sexuales y Reproductivos.

12. REFERENCIAS

- I. Fitofármacos: productos herbarios en beneficio de la salud de las personas [Internet]. Instituto de Salud Pública de Chile. 2021 [citado 10 enero 2021]. Disponible en: <https://www.ispch.cl/noticia/fitofarmacos-productos-herbarios-en-beneficio-de-la-salud-de-las-personas-2/>
- II. OMS. Medicina tradicional: definiciones [Internet]. WHO. 2010; [citado 28 Julio 2021] Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20es%20un%20proceso,en%20puntos%20distantes%20del%20organismo>
- III. Definición de cáncer [Internet]. Instituto nacional del cáncer. 2021 [citado 18 noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- IV. Cáncer metastásico [Internet]. Instituto nacional del cáncer. 2020 [citado 2 junio 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico>
- V. Definición de neoplasias [Internet]. Instituto nacional del cáncer. 2020 [citado 1 junio 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia>
- VI. Global Cancer Statistics 2020:[internet] GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [04 February 2021] <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>

- VII.** Demografía nacional [Internet]. Instituto nacional de estadística . 2017 [citado 15 agosto 2021]. Disponible en: <https://ine.cl/estadisticas/sociales/demografia-y-vitales/>
- VIII.** Cáncer en Chile: 25,9% de las muertes en 2017 se produjo por tumores [Internet]. Instituto nacional de estadística . 2020 [citado 15 junio 2021]. Disponible en: <https://www.ine.cl/prensa/detalle-prensa/2020/02/04/c%C3%A1ncer-en-chile-25-9-de-las-muertes-en-2017-se-produjo-por-tumores>
- IX.** Impacto económico del cáncer en Chile: una medición de costo directo e indirecto en base a registros 2009 [Internet]. Medwave. 2016 [citado 1 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Estudios/Investigacion/6509.act>
- X.** Ministerio de Salud de Chile. Guías Clínicas AUGÉ Cáncer de Mama [Internet]. 2015 [citado 2021 Oct 13]. Disponible en: <http://web.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/GPCCaMama.pdf>
- XI.** Obstetricia y Ginecología; Cáncer de mama [Internet]. Síntesis. 2017 [citado 2 junio 2021]. Disponible en: <https://sisintesis.med.uchile.cl/index.php/profesionales/informacion-para-profesionales/medicina/condiciones-clinicas2/obstetricia-y-ginecologia/421-3-01-1-030>
- XII.** Ministerio de Salud. III estudio nacional de salud bucal y II estudio nacional de factores de riesgo de enfermedades crónicas- ENFERC II. Bogotá: Ministerio de Salud; 1999. p 31.
- XIII.** Global Cancer Statistics 2020:[internet] 2021 [4 de febrero] Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>

- XIV.** MINSAL. Guía Clínica Cáncer de Mama [Internet]. 2010 [cited 2020 Dec 11]. Disponible en: <https://www.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c4423d1e04001011f011398.pdf>
- XV.** OPS, OMS. Control integral del cáncer cervicouterino Guía de prácticas esenciales [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 11]. Available from: www.paho.org/permissions
- XVI.** Global Cancer Statistics 2020:[internet] cifras a nivel mundial, 2021 [4 de febrero] from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>
- XVII.** Global Cancer Statistics 2020:[internet] cifras a nivel pais, chile 2021 [4 de febrero] from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>
- XVIII.** MINSAL. Guías Clínicas AUGE Cáncer Cérvico Uterino. 2015.
- XIX.** MINSAL. Guía Clínica Cáncer Cervicouterino [Internet]. 2010 [cited 2020 Dec 11]. Available from: <https://www.minsal.cl/portal/url/item/720bfefe91e9d2ede04001011f010ff2.pdf>
- XX.** Ferreccio C. Nuevas estrategias de prevención y control de cáncer de cuello uterino en Chile. Salud Pública Mex [Internet]. 2018 Dec 13 [cited 2020 Dec 11];60(6, nov-dic):713. Available from: <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/8577>
- XXI.** Cáncer de colon [Internet]. Mayo Clinic. 2021 [citado 23 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc-20353669>

- XXII.** Cáncer de colon y recto [Internet]. Clínica Alemana. 2021 [citado 21 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.clinicaalemana.cl/centro-de-extension/material-educativo/cancer-de-colon-y-recto>
- XXIII.** ¿Qué es el cáncer colorrectal? [Internet]. American Cancer Society. 2021 [citado 16 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/acerca/que-es-cancer-de-colon-o-recto.html>
- XXIV.** Cáncer de colon [Internet]. CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA. 2020 [citado 16 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/cancer-colon>
- XXV.** Cáncer de colon: ¿Quiénes se deben hacer los exámenes de detección? [Internet]. Instituto nacional español del Cáncer. 2020 [citado 16 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/hoja-informativa-deteccion#quienes-se-deben-hacer-los-exmenes-de-deteccin-de-cncer-colorrectal>
- XXVI.** Estadísticas importantes sobre el cáncer colorrectal [Internet]. American Cancer Society. 2021 [citado 16 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/acerca/estadisticas-clave.html>
- XXVII.** Chile Source GLOBOCAN 2020 [Internet]. 1.^a ed. Paris, Francia: International Agency for Research on Cancer ; 2020 [citado 15 octubre 2020]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>
- XXVIII.** Pérez P, González A, Mielles I, Uribe AF. Relación del apoyo social, las estrategias de afrontamiento y los factores clínicos y sociodemográficos en pacientes oncológicos. Pensam Psicológico [Internet]. 2017 Aug 3 [cited 2020 Dec 11];15(2):41–54.

Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-89612017000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- XXIX.** Martín, M.; Herrero, A.; Echavarría, I. (2015). “El cáncer de mama”. Arbor, 191 (773): a234. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2015.773n3004Copyright>

- XXX.** Léniz Martelli J, Van De Wyngard V, Lagos M, Barriga MI, Puschel Illanes K, Readí CF. Detección precoz del cáncer cervicouterino en Chile: Tiempo para el cambio. Rev Med Chil [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 11];142(8):1047–55. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872014000800012

- XXXI.** Tratamientos del cáncer colorrectal [Internet]. Instituto nacional español del cáncer. 2021 [citado 10 enero 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/tratamiento-colorrectal-pdq>

- XXXII.** González Benítez I. Las crisis familiares [Internet]. 2000 [cited 2020 Dec 12]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252000000300010

- XXXIII.** OMS. OMS | Medicina tradicional. WHO [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 12]; Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/

- XXXIV.** Morales MÁ. (PDF) Plantas medicinales, fitofarmacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica. [Internet]. 2015 [cited 2020 Dec 12]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/281747269_Plantas_medicinales_fitofarmacos_y_fitomedicamentos_hacia_una_fitomedicina_basada_en_la_evidencia_cientifica

- XXXV.** Marcia Avello L, Isabel Cisternas F. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chil [Internet]. 2010 Oct [cited 2020 Dec 12];138(10):1288–93. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- XXXVI.** Miguel Angel Morales, Juan Pablo Morales, Plantas Medicinales y Medicina Natural (pp.41-54) Edition: 3rd Edition Chapter: Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica. Publisher: Editorial Ocho Libros Editors: R Chateaneuf, M Benavides. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/281747269 Plantas medicinales fitofarmacos y fitomedicamentos hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica](https://www.researchgate.net/publication/281747269_Plantas_medicinales_fitofarmacos_y_fitomedicamentos_hacia_una_fitomedicina_basada_en_la_evidencia_cientifica)
- XXXVII.** Olea AF, Villena J, Moller A, Martínez R, Carrasco H. Enhancement of cytotoxic activity by encapsulation in pluronic polymer micelles: Leptocarpa rivularis extracts against human cancer cell lines. J Chil Chem Soc [Internet]. 2019 [cited 2020 Dec 12];64(2):4437–40. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072019000204437&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- XXXVIII.** R. Martinez, V. Kesternich, H. Carrasco, C. Alvarez-Contreras, C. Montenegro, R. Ugarte, E. Gutierrez, J. Moreno, C. Garcia, E. Werner, J. Carcamo, Synthesis and conformational analysis of leptocarpin derivatives. Influence of modification of the oxirane ring on leptocarpin's cytotoxic activity, J. Chil. Chem. Soc. 51 (2006) [https://www.researchgate.net/publication/291522992 Sintesis and conformatio](https://www.researchgate.net/publication/291522992_Sintesis_y_conformacion_de_derivados_de_leptocarpin)

- XXXIX.** Jiménez-González A, Quispe C, Bórquez J, Sepúlveda B, Riveros F, Areche C, et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry UHPLC-ESI-ORBITRAP-MS analysis of the native Mapuche medicinal plant palo negro (*Leptocarpha rivularis* DC.-Asteraceae) and evaluation of its antioxidant and cholinesterase inhibitory properties analysis of the native Mapuche medicinal plant palo negro (*Leptocarpha rivularis* DC.-Asteraceae) and evaluation of its antioxidant and cholinesterase inhibitory properties. 2018 [cited 2020 Dec 12]; Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ienz20>
- XL.** M. Robles, M. Aregullin, J. West, E. Rodriguez, Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones, *Planta Med.* 61 (1995) 199e203. [http://refhub.elsevier.com/S0009-2797\(15\)30108-3/sref2](http://refhub.elsevier.com/S0009-2797(15)30108-3/sref2))
- XLI.** R. Martinez, V. Kesternich, E. Gutierrez, H. Dolz, H. Mansilla, Conformational Analysis and biological activity of leptocarpin and leptocarpin acetate, *Planta Med.* 61 (1995) [http://refhub.elsevier.com/S0009-2797\(15\)30108-3/sref21](http://refhub.elsevier.com/S0009-2797(15)30108-3/sref21)))
- XLII.** P.M. Bork, M.L. Schmitz, M. Kuhnt, C. Escher, M. Heinrich, Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kB, *FEBS Lett.* 402 (1997) 85e90. [http://refhub.elsevier.com/S0009-2797\(15\)30108-3/sref3](http://refhub.elsevier.com/S0009-2797(15)30108-3/sref3))).
- XLIII.** : Andrea Jiménez-González, Cristina Quispe, Jorge Bórquez, Beatriz Sepúlveda, Felipe Riveros, Carlos Areche, Edgar Nagles, Olimpo García-Beltrán & Mario J. Simirgiotis (2018) UHPLC-ESI-ORBITRAP-MS analysis of the native Mapuche medicinal plant palo negro (*Leptocarpha rivularis* DC. – Asteraceae) and evaluation

of its antioxidant and cholinesterase inhibitory properties, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 33:1, 936-944, Disponible en: 10.1080/14756366.2018.1466880

- XLIV.** Fina BL, Lombarte M, Rigali A. INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN VIVO, IN VITRO O IN SILICO? [Internet]. 9.ª ed. Buenos Aires: Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario, 2018 [citado 29 abril 2020]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/21655/CONICET_Digital_Nro.25729.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- XLV.** Saavedra I, Ávila M L, Iturriaga V, Quiñones L. Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos [Internet]. 9.ª ed. Buenos Aires: Cuad Méd Soc (Chile; 2011 [citado 29 marzo 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Quinones2/publication/307930717_Biowaiver_studies_in_vitro_to_establish_equivalence_of_drugs/links/57d23b0f08ae0c0081e05c55/Biowaiver-studies-in-vitro-to-establish-equivalence-of-drugs.pdf
- XLVI.** 9. Pájaro C N, Olivero Verbel J, Redondo Padilla J. Nanotecnología aplicada a la medicina [Internet]. 1.ª ed. Bogota: Revista Guillermo de Okham; 2013 [citado 18 marzo 2020]. Disponible en: <http://revistas.usbbog.edu.co/index.php/GuillermoOckham/article/view/606>
- XLVII.** Deore SL, Kale SN. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. Syst Rev Pharm. 2017;8.
- XLVIII.** Shah P., Bhalodia D., Shelat P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. [Internet]. 1.ª ed. EBSCO; 2010 [citado 18 marzo 2020]. Disponible en: <https://web.p.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=09758453&AN=48216829&h=dtJuC6%2bLbfxtMlhRVooTVIXk>

I3CmQIBN%2botjD7JSYiTI7xjGcFipODcrcBV50%2b0TDw89iAyFKsTKkfRvRC3fA%3d
%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrINotAuth&crlhashurl=logi
n.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dc
awler%26jrnl%3d09758453%26AN%3d48216829

- XLIX.** Salvador G, Aguirre Alvarez G, Campos Montiel R, Jimenez Alvarado R. FORMULACIÓN DE NANOEMULSIONES CON COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DEL XOCONOSTLE (*Opuntia oligacantha* C. F. Först) [Internet]. 1.^a ed. Ciudad de México: UAEH; 2010 [citado 18 marzo 2020]. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icap/article/download/994/4252?inline=1#nota1>
- L.** Jaiswal M, Dudhe R, P. K S. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system [Internet]. 1.^a ed. Indian Journalist of Clinical Biochemistry: UAEH; 2015 [citado 18 marzo 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-014-0214-0>
- LI.** CLAVIJO GRIMALDI, DIANNEY, GARCÍA MORÁN, GRÉGORIO ALFONSO, MEJÍA MEJÍA, ÓMAR, RUIZ, ASTRID, GARCÍA CARDONA, ANANÍAS, CASADIEGO TORRADO, CIRO ALFONSO, VITTORINO MEJÍA, MARIO, *La frontera entre la Biología molecular y la Nanotecnología: impacto en la Medicina*. Iatreia [Internet]. 2007;20(3):297-307. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180513858007>.
- LII.** Orofino-Kreugera M.R., Grootjans S., Biavattib M.W., Vandenabeelec P. and D'Herdeek.(2012). Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drug*, 1-14.