



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE *Castanedia santamartensis*
(ASTERACEAE) E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES ACTIVOS**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Ciencias
Farmacéuticas por:**

HELENA QUINTERO PERTUZ

DIRECTORES DE TESIS

A blue ink signature of Claudio Olea Azar, written in a cursive style.

Dr. CLAUDIO OLEA AZAR
Depto. De Química Inorgánica y Analítica

A blue ink signature of Juan Diego Maya Arango, written in a cursive style.

Dr. JUAN DIEGO MAYA ARANGO
Instituto de Ciencias Biomédicas

A blue ink signature of Carla Delporte Vergara, written in a cursive style.

Dra. CARLA DELPORTE VERGARA
Depto. De Química Farmacológica y Toxicológica

Santiago de Chile, 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

HELENA QUINTERO PERTUZ


Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 12 de mayo del 2022.

Directores de Tesis:

Dr. Claudio Olea A. _____



Dra. Carla Delporte V. _____

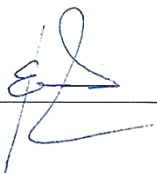


Dr. Juan Diego Maya A. _____



Comisión Informante de Tesis:

Dr. Hernán Pessoa M. (presidente) _____



Dr. Bruce Cassels N. _____



Dr. Mario Faúndez C. _____



Dra. Silvia de Debenedetti _____



Quiero dedicar esta tesis a mi familia

“No estalla como las bombas ni suena como los tiros. Como el hambre, mata callando.

Como el hambre, mata a los callados: los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido. Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende...

El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas. Elige a sus víctimas en el pobrerío. Las muere y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren...”.

Eduardo Galeano

Agradecimientos

A mis padres Segismundo Quintero y Feliciano Pertuz, por su apoyo incondicional y por su amorosa misión de ayudarme a crecer e impulsarme a soñar. A mis hermanos, hermanas y sobrinos por su confianza y por estar siempre conmigo.

A la Dra Carla Delporte por aceptarme en su grupo de investigación de Productos Naturales y por orientar mi tesis doctoral de principio a fin con un respaldo infinito.

Al Dr Juan Diego Maya, por su acompañamiento en la tutoría de mi tesis, por el tiempo dedicado a las asesorías, por su apoyo en el logro de los objetivos relacionados con los ensayos biológicos y por sus enseñanzas en la escritura científica.

Al Dr Claudio Olea, por su apoyo en la dirección de la tesis y acogida en su laboratorio.

A los miembros de la comisión, por sus orientaciones y asesorías en el desarrollo de la tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Productos Naturales, Rubén, Araceli, Alexandra, Paula, Gabriela, José y a Paola. A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos por su apoyo y camaradería, Michel, Ileana, Fabiola, Daniela, Cristhian, Anita, Mabel, Gonzalo, Simone, Alejandra, Charlotte, Camila, Sebastian, Felix y Raúl. A mis compañeros del laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes, Mauricio, Diego, Gaby, Fredys, Sandy, Josué y a la Profe María Carolina.

Al Dr Juan Carlos Dib y a Duamaco Escribano, por la inspiración a trabajar con esta especie vegetal de la Sierra Nevada de Santa Marta.

A mi profesor y amigo Basilio Díaz Pongutá, por sus asesorías en las técnicas de análisis instrumental y por sus consejos desde siempre.

Al Dr Omar Torres Ayazo, que en paz descanse, por su colaboración en la obtención de los extractos alcohólicos en la Universidad de Córdoba, Colombia.

Al Sr Günter Adler, a su esposa Sra. Mónica Naudón (que en paz descanse), y a Norma Naudón por todo su cariño y apoyo incondicional desde que llegué a Santiago de Chile para empezar mis estudios, y a Waldy por su ternura can.

A los señores Karin y Jochen Bender, Elke y Reini, Giovanna y Wolf por todo su cariño, acompañamiento e infinito apoyo desde Alemania.

A la familia Manni Vega por su amorosa acogida en su casa y por todo su apoyo en Chile.

A Alexandra Elbakyan por facilitarme el acceso a publicaciones científicas

A todas las personas que de alguna u otra manera han colaborado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Financiamiento

El desarrollo de esta tesis doctoral ha sido financiado gracias a la Beca ANID N° 21170968 de Doctorado Nacional otorgada a mi persona, y a los proyectos FONDECYT 1210359, 21170427, 21170501, 1210359, 1190340, 1190341 y 11180712.

Publicaciones de la tesis

- **Quintero-Pertuz H**, Veas-Albornoz R, Carrillo I, González-Herrera F, Lapier M, Carbonó-Delahoz E, Del Olmo E, San Feliciano A, Kemmerling U, Olea-Azar C, Delporte C, Maya Juan D. Trypanocidal effect of alcoholic extract of *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) leaves is based on altered mitochondrial function. **Biomedicine & Pharmacotherapy. 2022**

Otras publicaciones

- Carrillo I, Rabelo R, Barbosa C, Rates M, Fuentes-Retamal S, Gonzalez-Herrera F, Guzman-Rivera D, **Quintero H**, Kemmerling U, Castillo C, Machado F, Diaz-Araya G, Maya Juan D. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces parasitic cardiac load by decreasing inflammation in a murine model of early chronic Chagas disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases. 2021**

Divulgaciones científicas en Congresos nacionales e internacionales

- **Quintero H**; Veas R, Lapier M; Carrillo I; González-Herrera F; Carbonó-Delahoz E; Quintero-Pertuz I; Diaz-Pongutá B; Olea-Azard C; Maya Juan Diego; Delporte C. Identification of phenolic compounds and trypanocidal activity of an ethanolic extract obtained from the leaves of *Castanedia santamartensis* (Asteraceae). Modalidad póster. 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020. Cartagena, Colombia. 11-15 de octubre de **2021**.
- **Quintero H**; Lapier M; Carbonó, E; Dib J; Torres O; Liempi A; Pozo J; Olea C; Maya J; Delporte C. Fraccionamiento químico guiado por bioensayos de un extracto etanólico de *Castanedia santamartensis* sobre *Trypanosoma cruzi*. Formato Póster, modalidad On-line. I Congreso de Estudiantes de Posgrado, Campus Dra. Eloísa Díaz, Universidad de Chile. Santiago de Chile. 10-11 de diciembre **2020**.

- Ileana Carrillo, Rayane, Daniela Guzmán-Rivera, Fabiola González-Herrera, **Helena Quintero**, Fabiana S. Machado, Guillermo Díaz-Araya, Juan Diego Maya. Efecto terapéutico de AT-RvD1 durante la infección crónica con *T. cruzi*: Modelo murino de cardiomiopatía chagásica crónica. Formato Póster, modalidad On-line. I Congreso de Estudiantes de Posgrado, Campus Dra. Eloísa Díaz, Universidad de Chile. Santiago de Chile. 10-11 de diciembre **2020**.
- **Quintero H**; Lapier M; Carbonó, E; Torres O; Liempi A; Maya J; Delporte C. Tripanocidal activity of *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) against *Trypanosoma cruzi*. Modalidad póster. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología SOFARCHI. Concepción, Chile. 4-8 de noviembre de **2019**
- Lapier, M; **Quintero, H**; Ramos-Aguayo A; Maya J. Rational design and biological evaluation of triazolopyridines against *T. cruzi*. Modalidad póster. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología SOFARCHI. Concepción, Chile. 4-8 de noviembre de **2019**
- Maya Juan Diego; Guzmán-Rivera, D; **Quintero H**; González-Herrera, F; Carrillo, I; Lapier, M; Liempi A; Fuentes-Retamal, S; Pesce, B; Castillo C; Kemmerling, U. Simvastatin and 15-Epi-Lipoxin A4 induce cardiac repairment through Notch 1 activation in Chronic Chagas Cardiomyopathy. Modalidad póster. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología SOFARCHI. Concepción, Chile. 4-8 de noviembre de **2019**
- **Quintero, H**; Olmo, E. del; San Feliciano, A; Carbonó, E; Dib, J; Torres, O; Campanini, J; Vásquez, D; Álvarez, S; Delporte, C. Evaluación “*in vitro*” de la actividad antibacteriana de *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Modalidad póster. XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología SOFARCHI. Santa Cruz, Chile. 13-16 de noviembre de **2018**

Abreviaturas

δ	Desplazamientos químicos
J	constantes de acoplamiento
$\Delta\Psi_m$	Potencial de Membrana Mitocondrial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AK	Ácido kaurenoico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BNZ	Benznidazol
Ca^{2+}	Catión de Calcio
CC	Cromatografía de Columna
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CCCP	Cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CLAE-DAD	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de arreglo diodos
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dm28	Cepa parasitaria de <i>T. cruzi</i>
DTU	<i>Discreet Typing Units</i> . (Unidades Discretas de Tipificación)
EC	Enfermedad de Chagas
EET	Extracto Etanólico

EMT	Extracto Metanólico
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
HPLC-UV-ESI-MS	<i>High-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (MS/MS)</i> (Cromatografía líquida de alto rendimiento con detección UV acoplada a espectrometría de masas en tándem, con ionización por electrospray (EM/EM))
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
IS	Índice de selectividad
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i> (triptosa en infusión hepática)
MeOD	Metanol deuterado
MOI	Multiplicity of infection
m.s.n.m	Metros Sobre el Nivel del Mar
MTT	Bromuro de 3-(4, 5-dimetil tiazolil-2) -2, 5-difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFX	Nifurtimox
NRT	Nitroreductasa
ON	Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solución salina tamponada con fosfato)
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RM	Receptores de Muerte

rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (Medio Instituto Conmemorativo Roswell Park)
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SFB	Suero fetal bovino
SNSM	Sierra Nevada de Santa Marta
TMRE	Tetrametilrodamina
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tiempo de retención
UA	Unidades de Absorbancia

Índice General

1	Introducción	1
1.1	La Enfermedad de Chagas	1
1.1.1	Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas	2
1.1.2	Formas parasitarias y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
1.1.3	Tratamiento para la Enfermedad de Chagas y mecanismos de acción propuestos para las drogas antichagásicas.....	6
1.2	Investigación en productos naturales contra la Enfermedad de Chagas	9
1.3	Antecedentes de <i>Castanedia santamartensis</i> y de la familia Asteraceae	12
1.3.1	Taxonomía de <i>C. santamartensis</i> R.M. King & H. Rob	13
1.3.2	La familia Asteraceae y su variabilidad	14
2	Hipótesis y Objetivos	16
2.1	Hipótesis.	16
2.2	Objetivo general.....	16
2.3	Objetivos específicos	16
3	Metodología	17
3.1	Selección, recolección, identificación y acondicionamiento del material vegetal.	17
3.2	Química.....	18
3.2.1	Obtención de los extractos alcohólicos	18
3.2.2	Fraccionamiento del extracto metanólico (EMT) y purificación del compuesto mayoritario	18
3.2.3	Fraccionamiento bio guiado del extracto etanólico (EET).....	20
3.2.4	Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (CCF).....	22
3.2.5	Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas. (CG-EM)	22

3.2.6	Análisis por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (CL-EM)	23
3.2.7	Identificación de compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con Detección UV acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, con Ionización por Electrospray (MS/MS). HPLC-UV-ESI-MS24	
3.2.8	Caracterización por RMN e IR.....	25
3.2.9	Identificación y cuantificación mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de Arreglo de Diodos (CLAE-DAD)	25
3.3	Bioactividad.....	26
3.3.1	Cultivos celulares	26
3.3.2	Mantenimiento de parásitos.....	26
3.3.3	Determinación del efecto biológico del EET, de sus fracciones y del AK	27
3.3.4	Determinación del índice de selectividad.....	28
3.3.5	Tinción DAPI y cuantificación de amastigotes intracelulares.....	29
3.3.6	Generación de ERO en cultivos de <i>T. cruzi</i>	29
3.3.7	Ensayo para evaluar el $\Delta\Psi_m$ en <i>T. cruzi</i>	30
3.3.8	Evaluación de los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+})	30
3.3.9	Análisis estadístico	31
4	Resultados	32
4.1	Selección, recolección e identificación del material vegetal	32
4.2	Obtención de extractos alcohólicos a partir de las hojas de <i>C. santamartensis</i>	32
4.3	Análisis de los extractos por cromatografía de capa fina (CCF)	33
4.4	Fraccionamiento del EMT seguido por RMN e IR.....	35
4.5	Identificación, purificación y caracterización del compuesto mayoritario presente en el EMT de las hojas de <i>C. santamartensis</i> mediante CG-EM, RMN 1H y RMN ^{13}C ..	38

4.6	Fraccionamiento del EET de <i>C. santamartensis</i> orientado por ensayos biológicos contra <i>T. cruzi</i>	42
4.7	Actividad tripanocida de EET y de las fracciones CS200, CS300 y CS400	43
4.8	Actividad tripanocida de las distintas subfracciones del EET proveniente de las hojas de <i>C. santamartensis</i> determinada mediante tamizaje a 50 ug/mL	46
4.9	Evaluación de la actividad citotóxica sobre células de mamífero	47
4.10	Efecto de las fracciones CS400 y CS402 sobre la infección intracelular	48
4.11	Identificación de compuestos presentes en las fracciones CS400 y CS402 mediante CL-EM	49
4.12	Identificación y cuantificación de AK mediante CLAE-DAD	52
4.13	Efecto del AK sobre tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	54
4.14	Determinación del estado oxidativo en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	54
4.15	Identificación de compuestos fenólicos en fracciones derivadas del EET	55
4.16	Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la movilidad de calcio intracelular (Ca^{+2}) en tripomastigotes	56
5	Discusión	58
6	Conclusiones	67
7	Bibliografía	68
8	Anexos	81
8.1	Anexo 1. Análisis de cromatogramas y espectros obtenidos por CL-EM	81
8.2	Anexo 2. Cromatograma de ion base (base peak chromatogram, BPC): polaridad negativa. Fracción CS400	84
8.3	Anexo 3. Compuestos identificados en la fracción CS400 por CL-EM (polaridad negativa)	85
8.4	Anexo 4. Cromatograma de ion base (base peak chromatogram, BPC): polaridad negativa. Fracción CS402	88

8.5	Anexo 5. Compuestos identificados en la fracción CS402 por CL-EM (polaridad negativa).....	89
8.6	Anexo 6. Compuestos identificados en la fracción CS400 por CL-EM (polaridad positiva)	90
8.7	Anexo 7. Compuestos en la fracción CS402 por CL-EM (polaridad positiva).	95

Índice de Figuras

Fig. 1.	Prevalencia mundial de la enfermedad de Chagas, 2017	2
Fig. 2.	Niño con el signo de Romaña asociado a la fase aguda de la EC.	3
Fig. 3.	A. Paciente con miocardiopatía chagásica y portador de marcapasos (radiografía de tórax). B) Paciente con megacolon chagásico (enemaopaco).....	3
Fig. 4.	Formas morfológicas de <i>T. cruzi</i>	4
Fig. 5.	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	5
Fig. 6.	Estructuras químicas del BZN y del NFX.	6
Fig. 7.	Estructuras químicas con propiedades anti <i>T. cruzi</i> identificadas en plantas. 11	
Fig. 8.	Estructura química del ácido kaurenoico.....	11
Fig. 9.	Testigo de herbario de <i>C. santamartensis</i>	13
Fig. 10.	Mapa del registro del área de muestreo de <i>C. santamartensis</i> en la SNSM... 32	
Fig. 11.	CCF del EET y sus fracciones observada bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.....	34
Fig. 12.	CCF del EET y sus fracciones observada a la luz visible.	34
Fig. 13.	CCF del EET y sus fracciones, observada bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.....	35
Fig. 14.	RMN ¹ H del EMT (A) y de la fracción CS5.101(B).....	36
Fig. 15.	RMN ¹ H (A) e IR (B) de la fracción CS5.112.....	36
Fig. 16.	RMN ¹ H (A) e IR (B) de la fracción CS5.116.....	37
Fig. 17.	RMN ¹ H de la fracción A4 del EMT proveniente de las hojas de <i>C. santamartensis</i> . Solvente: CDCl ₃	38
Fig. 18.	Estructuras químicas de los compuestos identificados por CG-EM de la fracción A4 proveniente del EMT de <i>C. santamartensis</i>	39

Fig. 19.	Cromatograma de gases (CG) de la fracción A4 proveniente del EMT (A) e identificación del compuesto mayoritario (Tr 31,752) por comparación con base de datos Wiley GC/MS 6 ^{ta} edición (B).....	40
Fig. 20.	Espectros de RMN ¹ H (A) y de RMN ¹³ C (B) del AK aislado de la fracción B25 del extracto metanólico de las hojas de <i>C. santamartensis</i> . Los espectros se registraron en un espectrómetro Varian de 400 MHz (funcionando a 400 MHz para ¹ H y 100 MHz para ¹³ C)	41
Fig. 21.	Análisis por citometría de flujo de la actividad tripanocida del extracto etanólico (EET) de las hojas de <i>C. santamartensis</i> y sus fracciones.....	45
Fig. 22.	Las fracciones CS400 y CS402 afectan al porcentaje de células Vero infectadas.	48
Fig. 23.	Cromatograma de ion base (<i>base peak chromatogram</i> , BPC): polaridad positiva. CS400.....	49
Fig. 24.	Cromatograma de ion base (<i>base peak chromatogram</i> , BPC): polaridad positiva. CS402.....	51
Fig. 25.	Cromatogramas del AK (color rojo) y de la fracción CS402 (color negro) a 210 nm	52
Fig. 26.	Curva de calibración del AK mediante el método de adición de estándar.	53
Fig. 27.	Estado oxidativo de los tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> tratados con las fracciones CS400 y CS402 del EET proveniente de las hojas de <i>C. santamartensis</i>	55
Fig. 28.	Efecto de las fracciones CS400 y CS402 y del AK sobre el potencial de membrana mitocondrial de <i>T. cruzi</i> y los niveles de calcio intracelular.	57

Índice de Tablas

Tabla 1.	Porcentaje de rendimiento de los extractos alcohólicos obtenidos a partir de las hojas de <i>C. santamartensis</i>	33
Tabla 2.	Compuestos identificados por CG-EM de la fracción A4 proveniente del EMT de hojas de <i>C. santamartensis</i>	39
Tabla 3.	Actividad tripanocida y citotoxicidad del EET y de sus fracciones provenientes de las hojas de <i>C. santamartensis</i>	44
Tabla 4.	<i>Screening.</i> Actividad tripanocida de las fracciones derivadas de CS200	46
Tabla 5.	<i>Screening.</i> Actividad tripanocida de las fracciones derivadas de CS300	46
Tabla 6.	<i>Screening.</i> Actividad tripanocida de las fracciones derivadas de CS400	47
Tabla 7.	Identificación de compuestos en la fracción CS400 (polaridad positiva)	50
Tabla 8.	Identificación de compuestos en la fracción FCS402 (polaridad positiva). ...	51
Tabla 9.	Cuantificación de AK en la fracción CS402	53
Tabla 10.	Compuestos químicos identificados por HPLC-MS/MS en las fracciones CS400 y CS402.	56
Tabla 11.	Actividad tripanocida de extractos alcohólicos obtenidos de diferentes especies vegetales	59

Índice de Esquemas

Esquema. 1. Esquema de fraccionamiento liquido-liquido del EMT. Las fracciones CS5.112, CS5.114, y CS5.116 corresponden a las fracciones neutras. Las fracciones CS5.111, CS5.113, y CS5.115 corresponden a las fracciones acidas. 19

Esquema. 2. Esquema de la separación por CC de la fracción mayoritaria (CS5.116) del EMT proveniente de las hojas de *C. santamartensis*. CC: cromatografía de columna; %: porcentaje de rendimiento; A-4,54: Fracciones obtenidas en la cromatografía A; B-1,40: fracciones obtenidas en la cromatografía B; C-1,46: Fracciones obtenidas en la cromatografía C; AK: ácido kaurenoico. 20

Esquema. 3. Esquema de fraccionamiento del EET de *C. santamartensis*. CC: cromatografía de columna; CS100-500: Códigos de las fracciones obtenidas por CC en Sephadex LH-20; EtOH: etanol; DMC: diclorometano; CS201-07, CS301-10, CS401-06: códigos de las subfracciones obtenidas por CC en sílice gel; Hex: Hexano; AcOEt: Acetato de Etilo; MeOH: Metanol; %: porcentajes de rendimiento; polaridad creciente: aumento de la polaridad de los solventes y/o mezcla de solventes..... 21

Resumen

El déficit de tratamientos eficaces para la enfermedad de Chagas ha llevado a la búsqueda de nuevas sustancias con potencial terapéutico. Los productos naturales poseen una gran variedad de motivos estructurales químicos, por lo que son una valiosa fuente de diversos compuestos para el desarrollo de nuevos fármacos. *Castanedia santamartensis* es endémica de Colombia y las comunidades indígenas locales la utilizan a menudo para tratar las llagas de la piel causadas por la leishmaniasis; sin embargo, no se ha determinado su mecanismo de acción contra la forma infecciosa de *Trypanosoma cruzi*. Por ello, se realizó una serie de estudios químicos y biológicos de dos extractos alcohólicos provenientes de las hojas de *C. santamartensis* para identificar sus fracciones activas y relacionarlas con un efecto tripanocida, así como para evaluar su mecanismo de acción. Los extractos alcohólicos se obtuvieron mediante maceración a temperatura ambiente y se fraccionaron mediante cromatografía en columna. Tanto el extracto etanólico como el metanólico mostraron actividad contra *T. cruzi*. Los estudios químicos revelaron que el ácido kaurenoico (AK) era el componente mayoritario de las hojas de *C. santamartensis*. Sin embargo, la actividad tripanocida de los extractos y sus fracciones no puede atribuirse únicamente al AK, ya que también se identificaron otros compuestos con actividad tripanocida previamente informada.

Dentro de los compuestos presentes en las fracciones provenientes de los extractos alcohólicos se identificaron: los ácidos grandiflorénico, grandiflorólico, pimárico e isopimárico, loliolida, óxido de cariofileno, kaurenol, acetato de taraxasterol, pentadecanona, los ésteres metílico y etílico del palmitato, entre otros, así como un grupo de compuestos fenólicos, como el ácido ferúlico, el ácido cafeico, el ácido clorogénico, la miricetina, la quercitrina, el ácido criptoclorogénico, entre otros. El AK y las fracciones más activas (CS400 y CS402) colapsaron el potencial de membrana mitocondrial de los tripomastigotes, demostrando por primera vez el probable mecanismo contra *T. cruzi* tanto del AK puro, como de las fracciones con mayor actividad tripanocida.

Summary

The lack of effective treatments for Chagas disease has led to the search for new substances with therapeutic potential. Natural products possess a wide variety of chemical structural motifs, making them a valuable source of diverse compounds for the development of new drugs. *Castanedia santamartensis* is endemic to Colombia and is often used by local indigenous communities to treat skin sores caused by leishmaniasis; however, its mechanism of action against the infectious form of *Trypanosoma cruzi* has not been determined. Therefore, we performed chemical and biological studies of two alcoholic extracts from the leaves of *C. santamartensis* to identify their active fractions and relate them to a trypanocidal effect, as well as to evaluate their mechanism of action. The alcoholic extracts were obtained by maceration at room temperature and fractionated by column chromatography. Both ethanolic and methanolic extracts showed activity against *T. cruzi*. Chemical studies revealed that kaurenoic acid (AK) was the major component of *C. santamartensis* leaves. However, the trypanocidal activity of the extracts and their fractions cannot be attributed to AK alone, as other compounds with previously reported trypanocidal activity were also identified.

Among the compounds present in the fractions from the alcoholic extracts were identified: grandiflorenic, grandiflorolic, pimaric and isopimaric acids, loliolide, caryophyllene oxide, kaurenol, taraxasterol acetate, pentadecanone, the methyl and ethyl esters of palmitate, among others, as well as a group of phenolic compounds, such as ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, myricetin, quercitrin, cryptochlorogenic acid, among others. AK and the most active fractions (CS400 and CS402) collapsed the mitochondrial membrane potential of trypomastigotes, demonstrating for the first time the probable mechanism against *T. cruzi* of both pure AK and fractions with higher trypanocidal activity.

1 Introducción

1.1 La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (EC) es una infección parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, perteneciente a la familia Trypanosomatidae, que supone un grave problema sanitario en América Latina (1)(2). Está clasificada como una de las enfermedades tropicales más desatendidas causando una importante mortalidad y morbilidad, especialmente entre las poblaciones de bajos ingresos (3). Sin embargo, no se limita a los países latinoamericanos, debido a que en las últimas décadas, el flujo migratorio de personas infectadas desde zonas endémicas hacia otras partes del mundo ha permitido la aparición en países no endémicos de nuevos casos relacionados con la donación de sangre o la transmisión vertical (4).

En la Fig. 1, se muestra la prevalencia mundial de la EC (5). La transmisión se concentra en áreas con infestación de vectores domésticos y, por lo tanto, muestra un fuerte agrupamiento espacial. Sin embargo, debido a que la infección dura toda la vida en ausencia de tratamiento, la prevalencia refleja la transmisión durante décadas, no solo por la transmisión vectorial sino como consecuencia de la migración de personas infectadas (4)(6).

En Chile, la encuesta nacional de salud (ENS 2016-2017) reportó una prevalencia de seropositividad IgG para la EC de 1,2% en la población general, valor mayor a la ENS anterior del año 2009-2010 con 0,7%, y continúa siendo mayor la prevalencia en zonas rurales (2,3%) comparado con 1,1% en zona urbana (7). En la Región de Coquimbo por ejemplo, la prevalencia alcanzó a 2,8% (cifra mayor a la ENS 2009-2010 con 1,8%), lo que podría deberse a un mayor diagnóstico en la región, especialmente en mujeres gestantes (7). Sin embargo, el Departamento de Enfermedades Transmisibles del Ministerio de Salud aclara que desde el año 2000 el país está certificado por la Organización Mundial de la Salud como libre de la transmisión vectorial de la enfermedad y aunque el vector sigue presente entre la región de Arica y Parinacota y la de O'Higgins, hoy la principal vía de contagio es de madre infectada a hijo (8). Es por ello que desde el año 2014, en el país y en especial la Región de

O'Higgins tamiza al 100 % de las embarazadas en el control prenatal, asegurando el diagnóstico temprano de los recién nacidos y la posibilidad de una cura parasitaria completa para los menores de un año mediante el tratamiento de estos en el 1er año de vida (8).

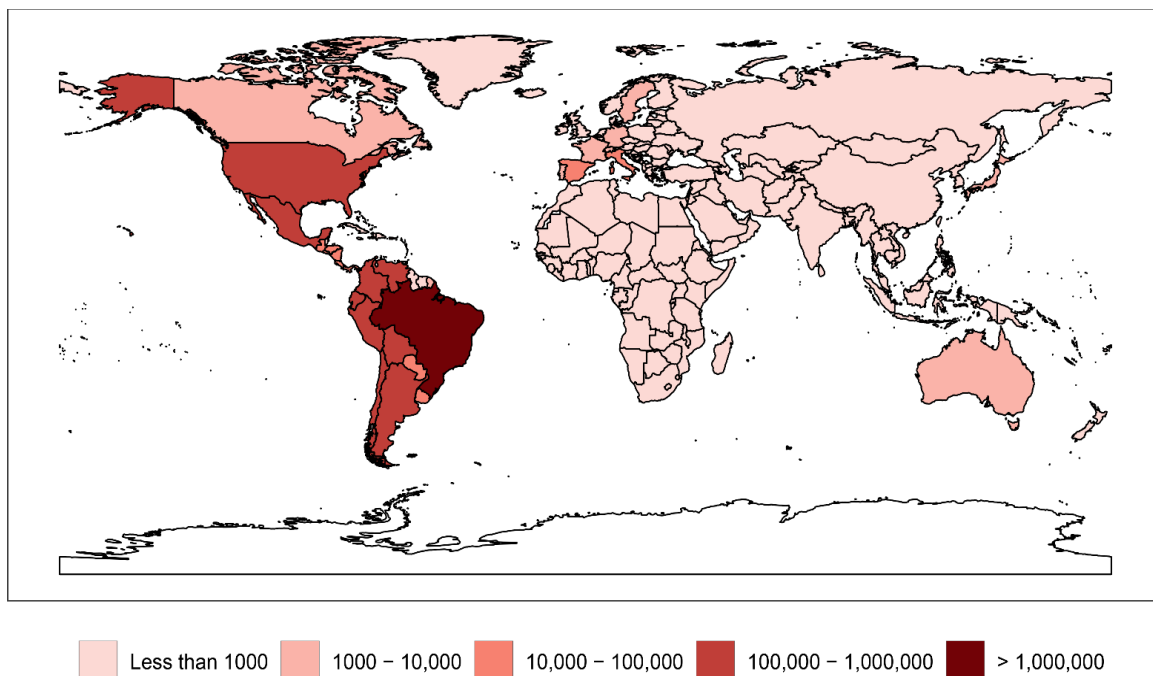


Fig. 1. Prevalencia mundial de la enfermedad de Chagas, 2017

1.1.1 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas

La EC presenta dos fases clínicas: una fase aguda, en la que se detecta una parasitemia elevada, sin síntomas apreciables, y una fase crónica que puede ser sintomática o asintomática (9). Las manifestaciones clínicas más notables se observan en los pacientes crónicos, incluyendo la miocardiopatía dilatada y/o las alteraciones digestivas (10).

Los síntomas de la fase aguda incluyen fiebre, inflamación en el lugar de inoculación (chagoma), edema palpebral unilateral (signo de Romaña; cuando la conjuntiva es un portal de entrada (Fig. 2) (11)), linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. La fase aguda dura entre 4 y 8 semanas, y la parasitemia disminuye sustancialmente a partir de los 90 días (9). La enfermedad aguda grave se produce en menos del 1-5% de los pacientes e incluye manifestaciones secundarias a miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis

(riesgo de mortalidad del 0-2-0-5%) (12). La transmisión oral a través de alimentos o bebidas contaminados con heces de triatominos parece causar una enfermedad más grave, con mayor mortalidad que la transmitida por vectores (13). La fase aguda suele resolverse espontáneamente, tras lo cual los pacientes permanecen crónicamente infectados si no reciben tratamiento. La mayoría de las personas nunca desarrollan síntomas ni afectación visceral, por lo que constituyen el grupo más numeroso de pacientes afectados. Esta forma denominada indeterminada de la EC tiene un buen pronóstico y se caracteriza por la seropositividad a *T. cruzi*, la ausencia de signos y síntomas clínicos de afectación cardíaca y digestiva, y la normalidad de la radiografía de tórax y el electrocardiograma (12).

La afectación cardíaca es la complicación más frecuente y grave (Fig. 3A)(14), se produce en el 14-45 % de los pacientes con infección crónica y afecta principalmente al sistema de conducción y al miocardio (12). La afectación gastrointestinal es menos común (10-21%) y ocurre con más frecuencia en el Cono Sur de Sudamérica (15). Las manifestaciones van desde trastornos asintomáticos de la motilidad hasta acalasia leve y megaesófago grave. Los síntomas incluyen disfagia, odinofagia, reflujo esofágico, pérdida de peso, tos y regurgitación. Los pacientes con megaesófago pueden tener un mayor riesgo de padecer cáncer de esófago. El megacolon (Fig. 3B) (14) se caracteriza por un estreñimiento persistente y puede provocar fecaloma, vólvulo e isquemia intestinal. El sigmoide y el recto están dilatados en casi todos los casos de megacolon, mientras que la dilatación de los segmentos colónicos más proximales es menos frecuente (12).



Fig. 2. Niño con el signo de Romaña asociado a la fase aguda de la EC.

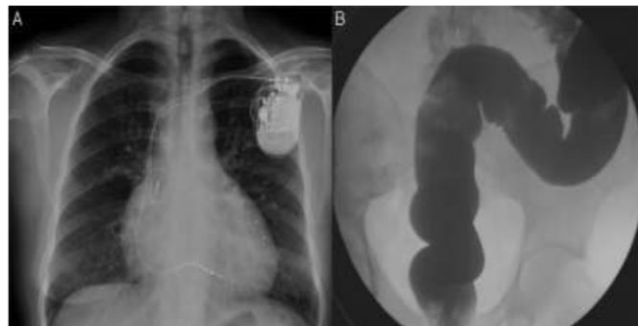


Fig. 3. A. Paciente con miocardiopatía chagásica y portador de marcapasos (radiografía de tórax). B) Paciente con megacolon chagásico (enemaopaco).

1.1.2 Formas parasitarias y ciclo de vida de *T. cruzi*

El protozoo *T. cruzi* es el agente etiológico de la EC. Pertenece al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae, junto con *Leishmania* y *T. brucei*, que también son parásitos de gran impacto en la salud humana. *T. cruzi*, es zoonótico, más de 100 especies de mamíferos actúan como reservorios, y 40 especies de triatominos (insectos vectores) pueden transmitirlo (16). El rango de vectores infectados y huéspedes mamíferos en las Américas es de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y el norte de Chile. La especie *T. cruzi* ha sido dividida en seis linajes intraespecies (unidades de tipificación discretas, DTU del inglés *discrete typing units*) TcI – TcVI (17).

Tiene tres principales formas morfológicas durante su ciclo de vida: El epimastigote (Fig. 4A) (replicativo, no infeccioso), que se encuentra en el vector; el tripomastigote (Fig. 4B) (no replicativo, infeccioso), que es la forma del parásito encontrado en ambos huéspedes vertebrados e invertebrados; y el amastigote (Fig. 4C) (replicativo, infeccioso), que es la forma intracelular que se encuentra solo en los mamíferos (11) (6).

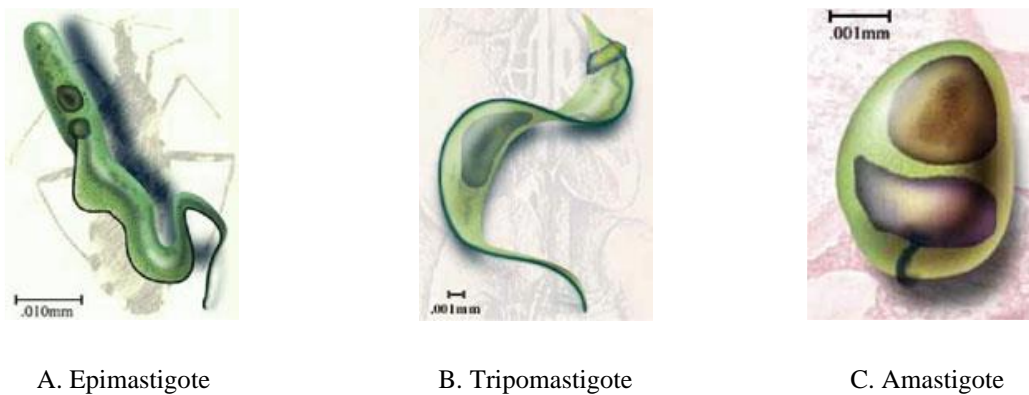


Fig. 4. Formas morfológicas de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi*, comienza cuando el vector triatomino ingiere tripomastigotes circulantes en sangre de un mamífero infectado, tal como se ilustra en la Fig. 5 (18). Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes en el intestino anterior del insecto vector.

Los epimastigotes migran al intestino posterior y, en su trayecto, se diferencian en tripomastigotes metacíclicos infecciosos, que se excretan con las heces del triatomino. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan a través de una herida provocada por la picadura o a través de una membrana mucosa intacta del huésped mamífero, e invaden varios tipos de células nucleadas. En el citoplasma, los tripomastigotes se diferencian en la forma amastigote intracelular, que se replica con un tiempo de duplicación de aproximadamente 12 horas, dependiendo del DTU, durante un período de 4 a 5 días. Al final de este período, los amastigotes se transforman en tripomastigotes, la célula hospedera se rompe, y los tripomastigotes se liberan en la circulación. Los parásitos circulantes pueden invadir nuevas células e iniciar nuevos ciclos de replicación y quedan disponibles para infectar vectores que se alimentan de la sangre del hospedero (6).

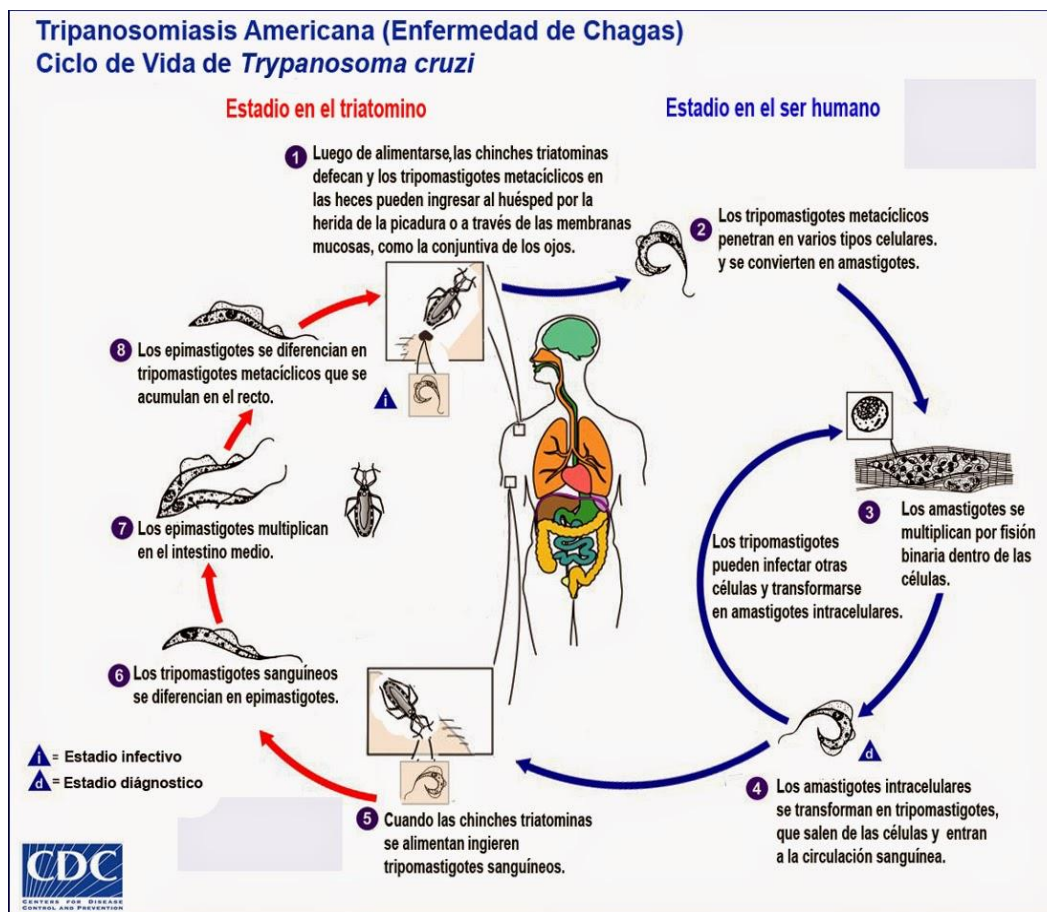


Fig. 5. Ciclo de vida de *T. cruzi*

1.1.3 Tratamiento para la Enfermedad de Chagas y mecanismos de acción propuestos para las drogas antichagásicas

El tratamiento comprende la terapia farmacológica para combatir la presencia del parásito y el manejo de las complicaciones clínicas a consecuencia de los daños provocados por la enfermedad. El objetivo del tratamiento etiológico en los pacientes con *T. cruzi* es eliminar o disminuir la presencia del parásito en las personas infectadas, control de la transmisión vertical, disminuir la probabilidad de desarrollar patologías cardíacas y digestivas, curación en casos de fase aguda, mejorar la calidad de vida y contribuir a la interrupción de la cadena de transmisión del *T. Cruzi* (19).

La quimioterapia para la EC se basa en dos fármacos que pertenecen a la misma clase de nitroheterociclos, el benznidazol (BZN) (Fig. 6A) y nifurtimox (NFX) (Fig. 6B).

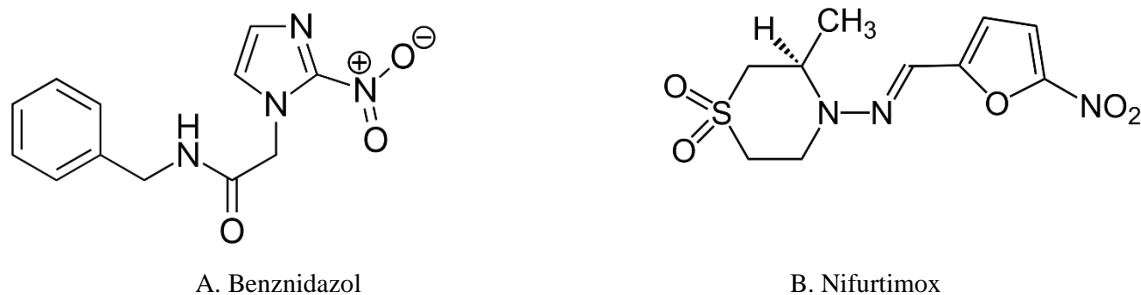


Fig. 6. Estructuras químicas del BZN y del NFX.

El benznidazol, (nombre IUPAC: N-bencil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida) y el nifurtimox (nombre IUPAC: 3-metil4-[ε-[(5-nitrofurano-2-il) metilideno]amino]-1λ6-tiomorfolina-1,1-diona) son compuestos pro-fármacos y en las células pueden activarse para actuar como fármacos, que pueden reaccionar con varias dianas moleculares celulares.

NFX es prescrito a una dosis diaria de 8-10 mg/kg cada 12 u ocho horas, con una dosis máxima diaria de 700 mg durante 60 días, mientras la dosis de BNZ es de 5-7,5 mg/kg por día, con una dosis máxima diaria de 300 mg durante 30-60 días (19). Las dosis se inician en forma paulatina con el objetivo de identificar precozmente los efectos adversos. Las recomendaciones de expertos orientan a iniciar la terapia de forma escalonada con un ¼ de dosis o ½ dosis los primeros días hasta lograr la dosis completa dentro de 3 a 10 días (19).

Durante décadas, el NFX y el BZN carecieron de una formulación pediátrica y el tratamiento de los niños solía administrarse con comprimidos de adultos, recurriendo a prácticas no autorizadas. Éstas incluían la subdivisión de los comprimidos no funcionales en fragmentos, lo que a menudo daba lugar a proporciones desiguales del fármaco activo en cada parte obtenida y, por tanto, a dosis diferentes a lo largo del día (20). Teniendo en cuenta que la deglución de los comprimidos o de sus partes suele ser difícil o imposible para los pacientes pediátricos, y puede conducir a la aspiración si las partículas son demasiado pequeñas, el desarrollo de formulaciones adecuadas para los niños era una vieja, pero urgente, deuda con los pacientes con EC. Afortunadamente, los últimos avances dieron sus frutos: en 2017, tras un estudio clínico en Argentina (21), la FDA aprobó una formulación pediátrica de BZN, para niños de menos de 20 kg (comprimido de 12,5 mg). Esta aprobación abarca las edades de 2 a 12 años con una dosis de 5 mg/kg a 8 mg/kg por vía oral administrada en dos dosis separadas por aproximadamente 12 horas, durante 60 días (22), mientras que el uso de BZN en adolescentes o niños de 0 a 2 años sigue sin estar indicado en la mayoría de los países (20). Actualmente está en marcha un estudio multicéntrico, prospectivo, de un solo brazo e históricamente controlado para evaluar la seguridad y la eficacia de la BZN en niños de 2 a 18 años, con el objetivo de aprobar la BZN también en adolescentes (NCT04024163) (20). Además, la FDA ha aprobado recientemente una nueva formulación de NFX, disponible en dosis de 30 mg y 120 mg, adecuada para todos los grupos de edad pediátrica, basándose en los resultados de un ensayo clínico que probó esta formulación en niños de 0 a 18 años con buena tolerancia y eficacia (23). La dosis de NFX diaria total para pacientes con 40 kg o más, es de 8 a 10 mg/kg, y para pacientes con menos de 40 kg la dosis diaria total es de 10 a 20 mg/kg (20). Esta relevancia del desarrollo se basa en el hecho de que la aprobación de NFX cubre un rango de edad más amplio que BZN y también proporciona incrementos de la formulación disponible y la deglución para niños pequeños y pacientes que no pueden tragar entidades enteras para evitar el riesgo de aspiración (20). Sin embargo, y a pesar de estos avances, el acceso a los fármacos, las resistencias informadas, las dificultades para evaluar su eficacia en casos individuales y su limitada tolerancia en los adultos, siguen siendo retos clave para la expansión de este tratamiento (24) (25) (26).

En adultos, BZN puede causar náuseas, erupción cutánea, dolor epigástrico, hinchazón abdominal, trastornos del sistema nervioso, y trastornos de los glóbulos blancos como eosinofilia (27). Mientras las reacciones adversas más comúnmente observadas a NFX son: anorexia y pérdida de peso, irritabilidad, somnolencia y otros signos y síntomas del sistema nervioso (28). NFX también se asocia con erupción cutánea, prurito y hepatitis asociada al fármaco, pero con menor frecuencia que BNZ. También se han notificado casos de depresión, neuropatía periférica y síntomas psiquiátricos (28). Al igual que ocurre con BNZ, las reacciones adversas asociadas a la NFX parecen ser mucho más frecuentes y graves en los adultos y suelen ser leves en los niños, incluidos los neonatos. Sin embargo, los datos actuales de tolerabilidad proceden principalmente de estudios de pequeñas cohortes. Aún no se han estudiado las bases farmacológicas de las diferencias en la incidencia de acontecimientos adversos (28).

Se cree que el mecanismo de acción de la NFX se basa en la activación intracelular por parte de las nitrorreductasas del parásito (NTR) -tipo I y II-, que genera radicales nitroaniónicos que conducen a la producción de radicales libres que dañan componentes celulares vitales de *T. cruzi*, aceleran la degradación del ADN y el ARN y bloquean la síntesis de ADN (29). La NTR tipo I media una reducción del grupo nitro produciendo una serie de reducciones que no involucran al oxígeno ni producen especies reactivas de oxígeno, usualmente referido como un proceso "insensible al oxígeno". Por otro lado, la NTR de tipo II desencadena una cadena de reacción sensible al oxígeno, aceptada como el principal mecanismo tripanocida, aunque esto ha sido cuestionado (30)(31). Se ha propuesto un mecanismo de activación alternativo, pero esto todavía requiere más pruebas (26). Por otro lado, BZN parece actuar a través de varios mecanismos diferentes. Se ha sugerido que BZN podría actuar mediante un mecanismo de estrés reductor, que implica modificaciones covalentes de las proteínas, los lípidos y el ADN del parásito (32), o aumentando la lisis y la fagocitosis del parásito por parte de las células del sistema inmunitario del huésped e inhibiendo el crecimiento del parásito por la acción de la enzima fumarato reductasa-NADPH (33). Otro mecanismo sugerido es la reducción del BZN por una nitrorreductasa de tipo I en el parásito, seguida de varias reacciones que dan lugar a la formación del dialdehído glioxal, que tiene efecto tripanocida, ya que puede formar aductos con las bases de guanosina del ADN y ARN del

parásito (27). Sin embargo, estudios de metabolómica reportan que no se pudo detectar señales pertenecientes a los productos más comunes de la conjugación del glioxal con ningún metabolito celular, incluidos nucleótidos, bases nitrogenadas o aminoácidos, y aunque se buscaron señales de baja intensidad, no fue detectado ningún aducto del glioxal propuesto (34). Tampoco se encontraron aductos de desoxi-guanosina o guanosina, los principales aductos del glioxal y metilglioxal *in vivo* (34). Por lo tanto, los mecanismos de acción tripanocida de los fármacos comercialmente disponibles, siguen siendo controvertidos.

1.2 Investigación en productos naturales contra la Enfermedad de Chagas

En la búsqueda de nuevas alternativas para la terapia de la EC, la diversidad natural puede proporcionar una amplia gama de agentes bioactivos o compuestos líderes, por lo que los productos naturales son una fuente de estructuras químicas que podría utilizarse para inspirar la síntesis de nuevas moléculas activas (35), debido a que representan una extraordinaria especificidad y potencia. La razón de ello radica en la diversidad y complejidad estructural, ya que poseen estructuras tridimensionales bien definidas, con grupos funcionales dadores y aceptores de protones y electrones que han sido biosintetizados en una precisa orientación espacial, que les permite unirse a receptores, enzimas y otras biomoléculas con relativa especificidad y selectividad (53). Además, estos compuestos naturales pueden ser mejorados químicamente en términos de farmacocinética, selectividad para una diana biológica concreta y eficaz (36). Por lo tanto, uno de los enfoques de la quimioterapia antiparasitaria se basa en las pruebas de la actividad biológica de productos naturales, específicamente de extractos derivados de plantas (37-42).

Se han desarrollado varios enfoques centrados en la identificación y aislamiento de productos basados en plantas con actividad anti-*T. cruzi*. En este sentido, los extractos de diferentes plantas como *Salvia*, *Valeriana*, *Hypericum*, *Silybum*, *Arnica* y *Curcuma* han sido evaluados y han demostrado actividad tripanocida (35). Así mismo, las lactonas sesquiterpénicas se destacan por su actividad sobre *T. cruzi* (35). Por lo tanto, la posibilidad de desarrollar nuevos medicamentos para la EC ha llevado en los últimos años al *screening* de diversas especies de plantas, pertenecientes a familias como: Asteraceae, Anacardiaceae, Annonaceae,

Euphorbiaceae, Lamiaceae, Malpighiaceae, Phytolaccaceae, Polypodiaceae, Smilacaceae y Sterculiaceae (43). De esta manera, se han aislado e identificado una gran variedad de estructuras químicas con propiedades anti *T. cruzi*, entre las que se puede citar con mayor representatividad a los flavonoides como chalconas (Fig. 7A), flavonas o isoflavonas (Fig. 7B), diterpenos (ácido kaurenico, kaurano)(Fig. 7C) y/o derivados de diterpenos (icetexano, labdano, azorellano), triterpenos pentacíclicos o lactonas sesquiterpénicas, lignanos (7D), cumarinas (7E), catequinas, xantonas (Fig. 7F), arilfloroglucinoles, antraquinonas (7G) y naftilisoquinolinas (43-47).

El ácido kaurenico (AK) (Fig. 8), es un diterpeno con actividad tripanocida, que ha sido aislado de algunas especies de plantas (44). Presenta también actividad antialérgica, inmunosupresora, inductora de apoptosis, antiinflamatoria, antibacteriana y leishmanicida (44) (48). Así, el AK elimina las formas de *L. amazonensis* mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y despolarización mitocondrial del promastigote (48). Otro estudio también informó sobre el efecto *in vitro* y los mecanismos del AK contra *L. amazonensis*, en el que mostró un efecto antileishmania directo sobre los promastigotes, redujo el número intracelular de amastigotes y el porcentaje de macrófagos peritoneales infectados de ratones BALB/c (49). Mecanísticamente, el tratamiento con AK restableció la producción de óxido nítrico (ON) dependiente de la sintasa de ON constitutiva (cNOS), subvirtiendo el mecanismo de escape de *L. amazonensis* que agota el ON. Además, indujo un aumento de la producción de IL-1 β y de la expresión del componente activador del inflammasoma NLRP12. Estos hallazgos demuestran la capacidad leishmanicida del AK contra *L. amazonensis* en el cultivo de macrófagos mediante la activación de un mecanismo NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO (49).

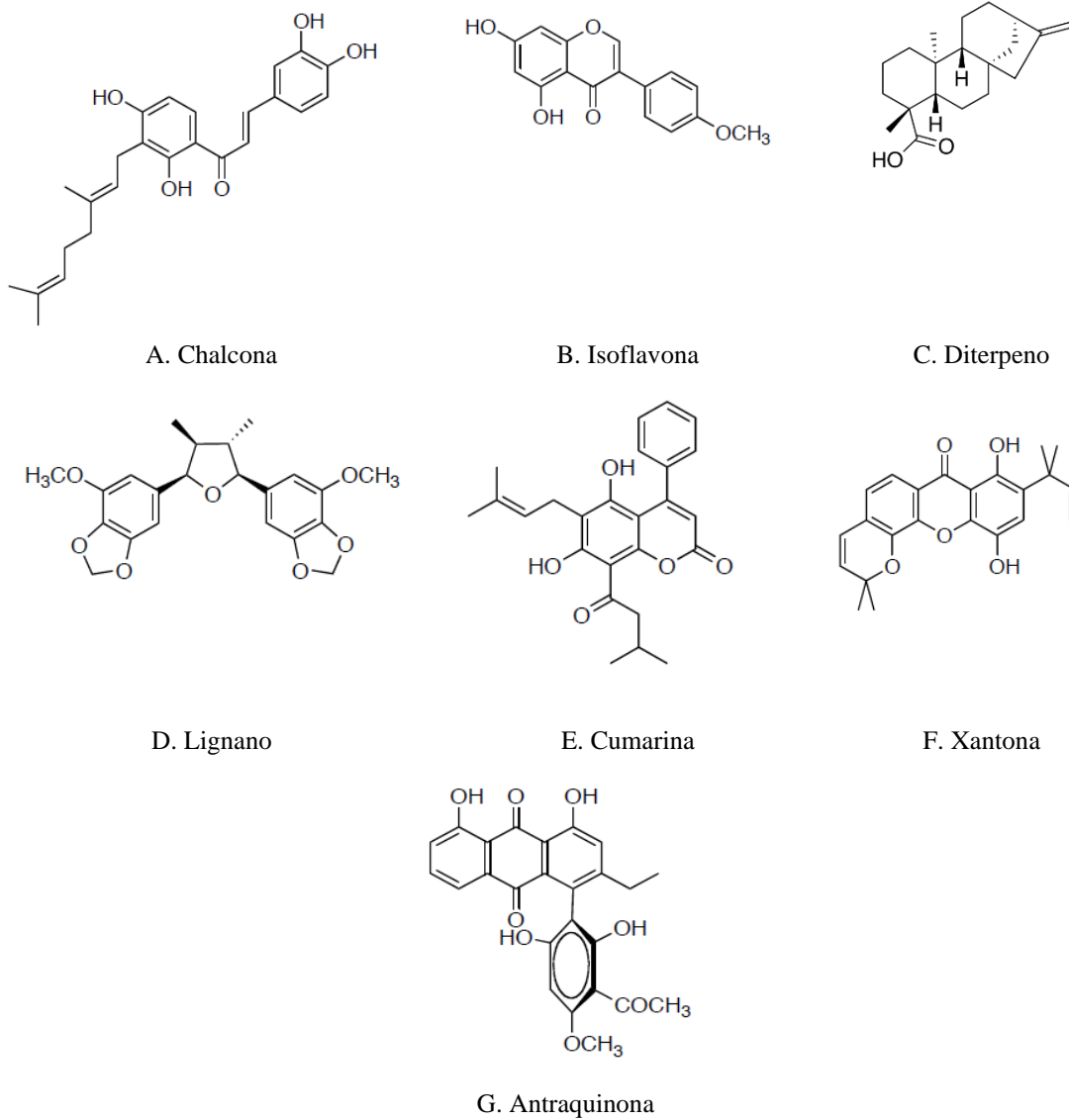


Fig. 7. Estructuras químicas con propiedades anti *T. cruzi* identificadas en plantas.

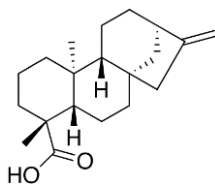


Fig. 8. Estructura química del ácido kaurenoico

Se ha informado además que, el AK altera la integridad de la membrana externa de *T. cruzi* (44) y conduce a una disminución en la infección de los macrófagos por parte del parásito, así como a la reducción de la tasa de liberación de tripomastigotes (44). Por lo tanto, se ha descrito para el AK no solo su actividad antiprotozoaria, sino inmunomoduladora. (44). Por ende, estos resultados sugieren los beneficios del AK como compuesto terapéutico para la EC, especialmente por su efecto antiinflamatorio, con posibilidades de controlar el daño causado por la respuesta inmune exacerbada que provoca el parásito (44). Sin embargo, no se ha comprobado ni descrito la causa de su acción tripanocida.

Por otro lado, la literatura también informa sobre efectos sinérgicos exponiendo al parásito a múltiples compuestos (50)(51). Por ejemplo, un estudio informó el efecto sinérgico sobre los epimastigotes de *T. cruzi* entre partenolida, una lactona sesquiterpénica aislada de *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) y BZN, observando que la CI_{50} de BZN se redujo 23 veces cuando se combinó con el compuesto natural (52).

Si bien hay un número importante de publicaciones relativas al desarrollo de una nueva quimioterapia con agentes y fármacos contra *T. cruzi*, la búsqueda de un tratamiento eficaz para la EC ha tenido un éxito limitado. Por lo tanto, este campo permanece abierto a la investigación (53)(28)

1.3 Antecedentes de *Castanedia santamartensis* y de la familia Asteraceae

La especie *C. santamartensis* pertenece a la familia Asteraceae, crece de manera silvestre y en forma de arbusto a 2.600 msnm, es la única especie del género *Castanedia*, y es endémica de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia (54). El uso etnomédico de *C. santamartensis*, consiste en aplicar sus hojas en forma de emplasto sobre forúnculos y/o úlceras de la piel (55). Teniendo en cuenta que la zona en la que se usa esta especie es altamente endémica para leishmaniasis cutánea, las úlceras podrían corresponder a lesiones provocadas por los parásitos del género *Leishmania*. Por extensión, es posible atribuir un efecto antiparasitario más amplio y por lo tanto servir también para el tratamiento de otras enfermedades causadas por tripanosomátidos, como la EC.

1.3.1 Taxonomía de *C. santamartensis* R.M. King & H. Rob

Reino	Plantae
Phylum.	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Castanedia</i>
Especie	<i>santamartensis</i>
Autores	Robert Merrill King y Harold Ernest Robinson (54)



Fig. 9. Testigo de herbario de *C. santamartensis*

Como antecedentes de actividades biológicas evaluadas para extractos y fracciones de *C. santamartensis*, se encuentra que en el año 2016 un estudio de trabajo final de máster describió la actividad antiviral y antiparasitaria de un extracto metanólico (EMT) proveniente de las hojas de *C. santamartensis*, encontrando una actividad interesante contra VIH para el EMT y sus fracciones CS-A30 y CSB.ACIDA1 con porcentajes inhibitorios de la replicación viral de 83% y 78% a 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (56). Así mismo, se determinó actividad contra promastigotes de *L. donovani* para una de las fracciones derivadas del EMT (CS-NEUTRA1), con una CI_{50} de 174,6 $\mu\text{g/mL}$ (57). En el año 2017 se divulgó un estudio sobre la actividad antifúngica (58) en el que el EMT presentó actividad inhibitoria del 50% de *Candida tropicalis* ATCC 750 a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ (59). Posteriormente en el 2018, se determinó la actividad antibacteriana de un EMT sobre *Escherichia Coli* ATCC®25922™ y *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina ATCC®29213™, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, encontrando que las fracciones CS5.110 Y CS5.120 presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus* con una MIC de 226 y 128 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (60)

1.3.2 La familia Asteraceae y su variabilidad

La Asteraceae (sinónimo: Compositae), es una familia cosmopolita perteneciente a la clase de las eudicotiledóneas. Es una de las familias más grandes de plantas de angiospermas, y sus especies son reconocidas por sus propiedades terapéuticas, cosméticas y aromáticas, por lo que presentan una considerable importancia ecológica, económica y medicinal (61). Es la familia más numerosa de las plantas con flores, incluye aproximadamente 1,600 géneros y 25,000 especies perteneciente a 17 tribus y tres subfamilias, empleadas como oleaginosas, hortícolas, insecticidas, ornamentales, condimentarias, aromáticas y medicinales (62).

Esta familia ha sido estudiada intensamente, respecto a su morfología, anatomía, ontogenia y ecología, así como su composición química, citogenética, aspectos macromoleculares y actividades biológicas (63)(64). Se han descrito sus propiedades antioxidantes (65), antiinflamatorias, anticancerosas, antibacterianas (64), antimalárica, tripanocida (66) y mecanismos de mejora para las enfermedades cardiovasculares (67).

Diferentes especies de la familia Asteraceae sintetizan una gran variedad y cantidad de compuestos bioactivos. Entre ellos, se destacan los terpenoides y los flavonoides por sus actividades biológicas y sus potenciales beneficios para la salud (68). Los terpenoides constituyen la mayor clase de productos naturales derivados de unidades de isopreno (C₅) unidad cabeza con cola o cola con cabeza, entre otras posibilidades. Se clasifican en hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) y politerpenos (>C₄₀) (68). Se encuentran en numerosos organismos vivos, especialmente en plantas, hongos y animales marinos (68). Los terpenoides son de gran interés debido a la amplia gama de actividades biológicas reportadas, como los efectos preventivos del cáncer y las actividades analgésicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiparasitarias (68).

Por otra parte, los flavonoides son compuestos fenólicos hidroxilados que están presentes en las plantas y ocupan un lugar especial entre los metabolitos secundarios (68). Se clasifican en diferentes clases, siendo las más comunes las flavonas, los flavonoles, las flavanonas y las isoflavonas las catequinas, y las antocianidinas. Al igual que los terpenoides, también

presentan una amplia gama de actividades biológicas. Se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos protectores contra muchas enfermedades infecciosas y degenerativas como el cáncer, entre otras actividades farmacológicas importantes como antioxidantes y antiinflamatorias (68).

Muchos de estos compuestos bioactivos y sus derivados ya se están utilizando para tratar enfermedades o se están estudiando en ensayos preclínicos y clínicos. Las lactonas sesquiterpénicas artemisinina y arglabina, ambas aisladas de especies de *Artemisia*, son fármacos aprobados para el tratamiento de la malaria en humanos y para el cáncer, respectivamente. El fármaco anticanceroso paclitaxel es también un compuesto terpenoide utilizado actualmente contra varios tipos de cáncer (68). Entre los flavonoides, el flavonol quercetina se está evaluando actualmente en ensayos clínicos sobre el cáncer de próstata y su prevención primaria (68).

Por lo anteriormente expuesto, los estudios biológicos de extractos, aceites y metabolitos secundarios provenientes de especies de la familia Asteraceae, están atrayendo cada vez más el interés interdisciplinario de la comunidad científica para la producción de fitofármacos.

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis.

Los extractos alcohólicos obtenidos desde las hojas de *Castanedia santamartensis* exhiben actividad tripanocida, y contienen metabolitos secundarios que afectan el potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi*, causando la muerte del parásito.

2.2 Objetivo general.

Evaluar la actividad tripanocida de dos extractos alcohólicos obtenidos a partir de las hojas de *C. santamartensis*, identificar los metabolitos secundarios bioactivos y determinar su mecanismo de acción tripanocida.

2.3 Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar los compuestos químicos presentes en dos extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) provenientes de las hojas de *C. santamartensis*.
- Evaluar la actividad biológica *in vitro* de los extractos alcohólicos, fracciones y metabolitos secundarios mayoritarios sobre *T. cruzi*, y sobre cultivo celular de mamífero (células Vero).
- Determinar el mecanismo de acción tripanocida de las fracciones con mayor actividad, y del o de los metabolito(s) secundario(s) activo(s).

3 Metodología

3.1 Selección, recolección, identificación y acondicionamiento del material vegetal

El criterio para seleccionar el material vegetal de este estudio fue la información brindada por la medicina popular. La información sobre el uso etnomédico de *C. santamartensis*, se obtuvo de la literatura científica (55) que documenta el uso tradicional de la planta en una zona tropical donde la EC y la leishmaniasis cutánea son enfermedades endémicas, y cuyos pobladores (comunidades indígenas) poseen gran tradición en el uso de las hierbas medicinales (55).

Las hojas de *C. santamartensis*, fueron recogidas antes de la floración y en su etapa de madurez, en la hora de medio día en La Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia, en la localidad de San Lorenzo, Latitud: 11.107528 | Longitud: -74.049028, durante enero de 2018.

La identificación del material vegetal se llevó a cabo por un botánico experto, quien clasificó la planta determinando a qué familia, género, especie, orden y clase pertenece. Se preparó un ejemplar de herbario, adjuntando los datos referidos a su nombre científico, la parte recolectada, la fecha y el lugar de recolección. Dicho ejemplar está conservado en el herbario UTMC de la Universidad del Magdalena, Colombia, e identificado con el código: 016457 (Fig.9).

El acondicionamiento posterior a la recolección involucró el secado, molienda del material vegetal y almacenamiento con la finalidad de conservar las características químicas, organolépticas y farmacológicas de la planta. El secado de las hojas se realizó en una estufa eléctrica a una temperatura de 37 °C, permitiendo la ventilación. Una vez seco, el material vegetal se pulverizó para mejorar la eficacia de la extracción al hacer que la muestra sea más homogénea con el aumento del área superficial y facilitar la penetración del disolvente en las células.

3.2 Química

3.2.1 Obtención de los extractos alcohólicos

Los extractos provenientes de las hojas de *C. santamartensis* fueron obtenidos mediante maceración a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas, usando metanol o etanol respectivamente, y repitiendo el procedimiento cuatro veces con solventes frescos. La relación masa/solvente de extracción fue de 1/10 (masa del material vegetal/volumen del solvente).

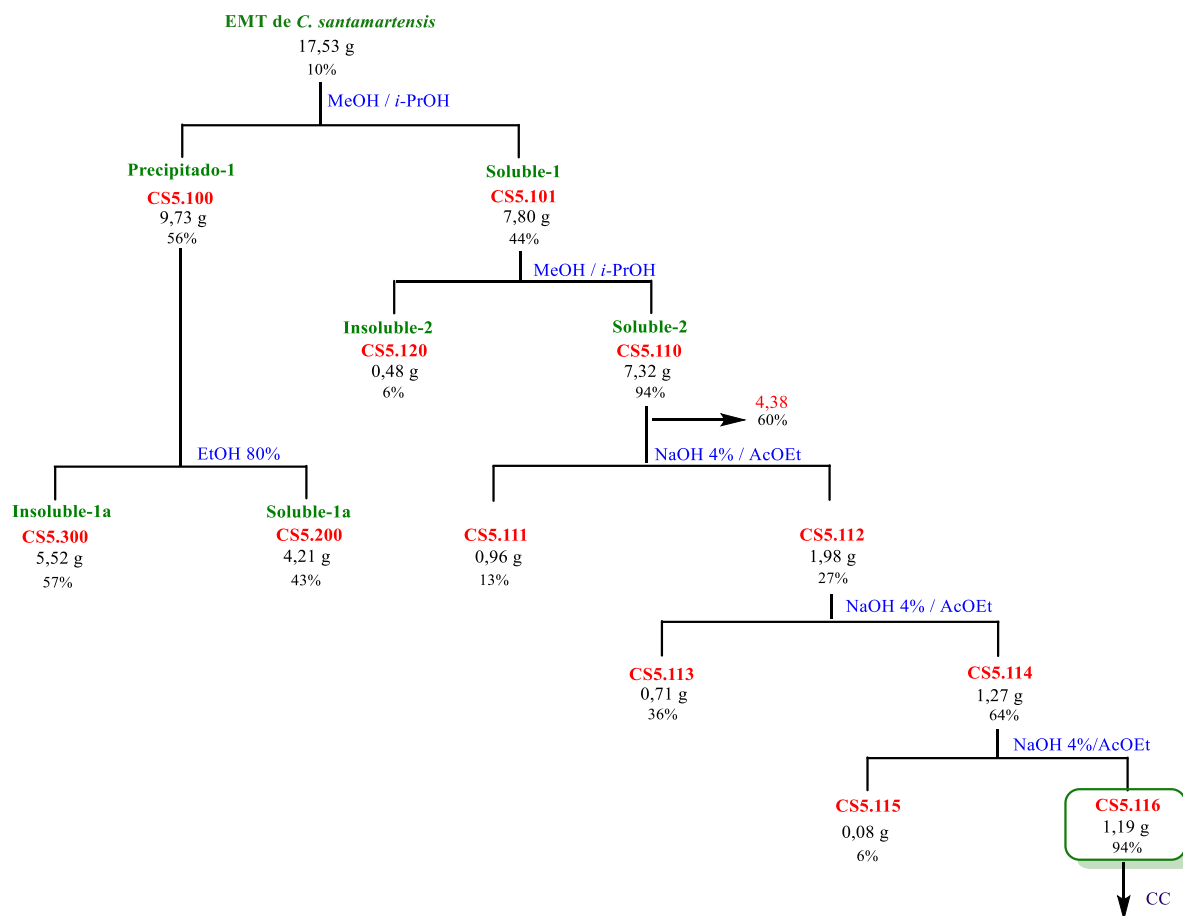
A continuación, los solventes alcohólicos fueron evaporados a presión reducida y a temperatura controlada. Los extractos fueron almacenados a 5 °C y protegidos de la luz hasta el momento de su utilización.

Para determinar el porcentaje de rendimiento de la extracción, se pesó previamente el material vegetal seco obtenido después de la molienda, se determinó el peso de cada extracto concentrado, y se realizó el cálculo siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Peso del Extracto}}{\text{Peso de las hojas molidas}} \times 100$$

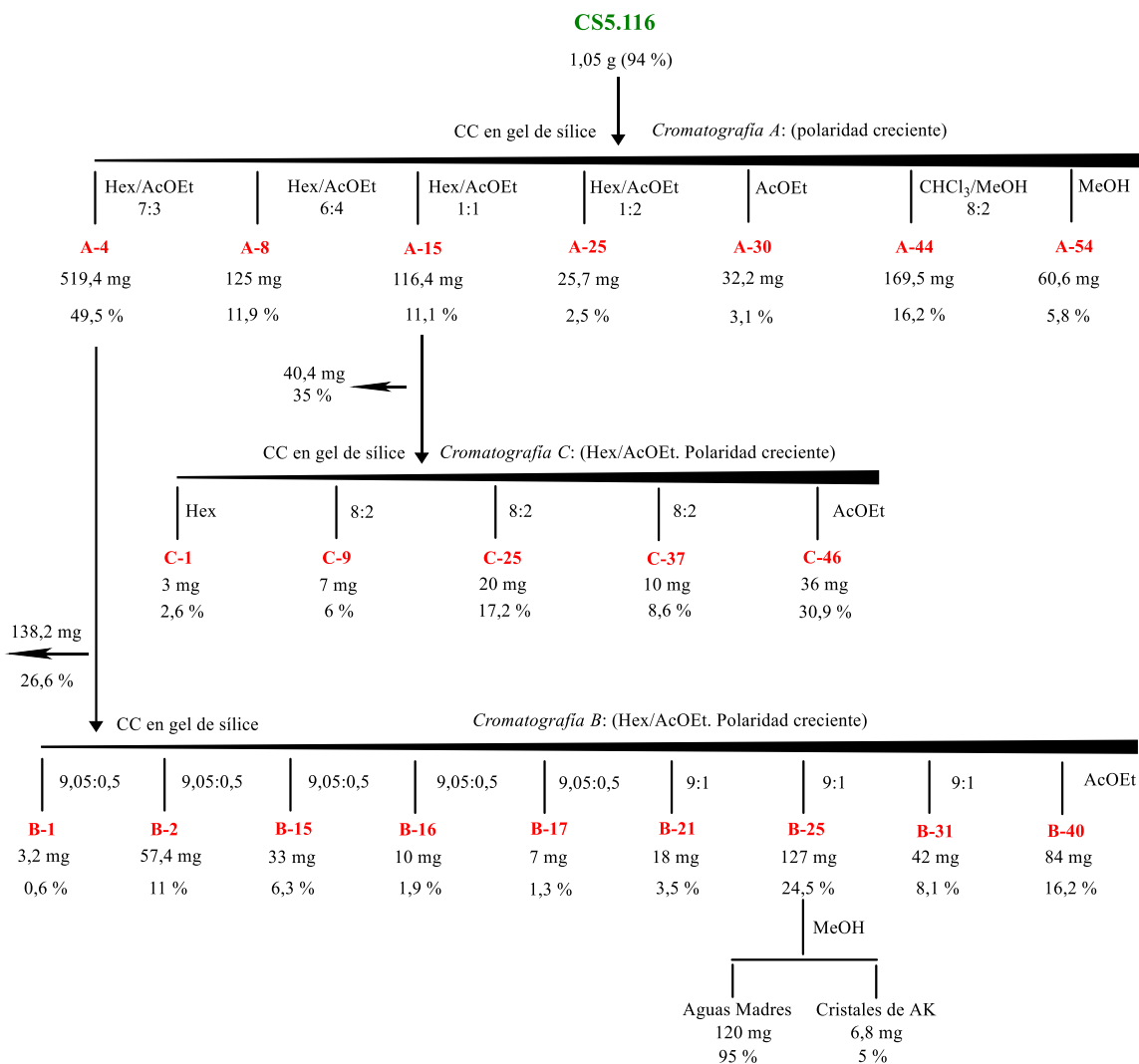
3.2.2 Fraccionamiento del extracto metanólico (EMT) y purificación del compuesto mayoritario

El EMT (17,53 g) se fraccionó mediante separación líquido-líquido con disolventes de diferentes polaridades, como metanol, isopropanol, etanol y acetato de etilo, entre otros (Esquema 1).



Esquema. 1. Esquema de fraccionamiento liquido-liquido del EMT. Las fracciones CS5.112, CS5.114, y CS5.116 corresponden a las fracciones básicas iónicas. Las fracciones CS5.111, CS5.113, y CS5.115 corresponden a las fracciones polares neutras.

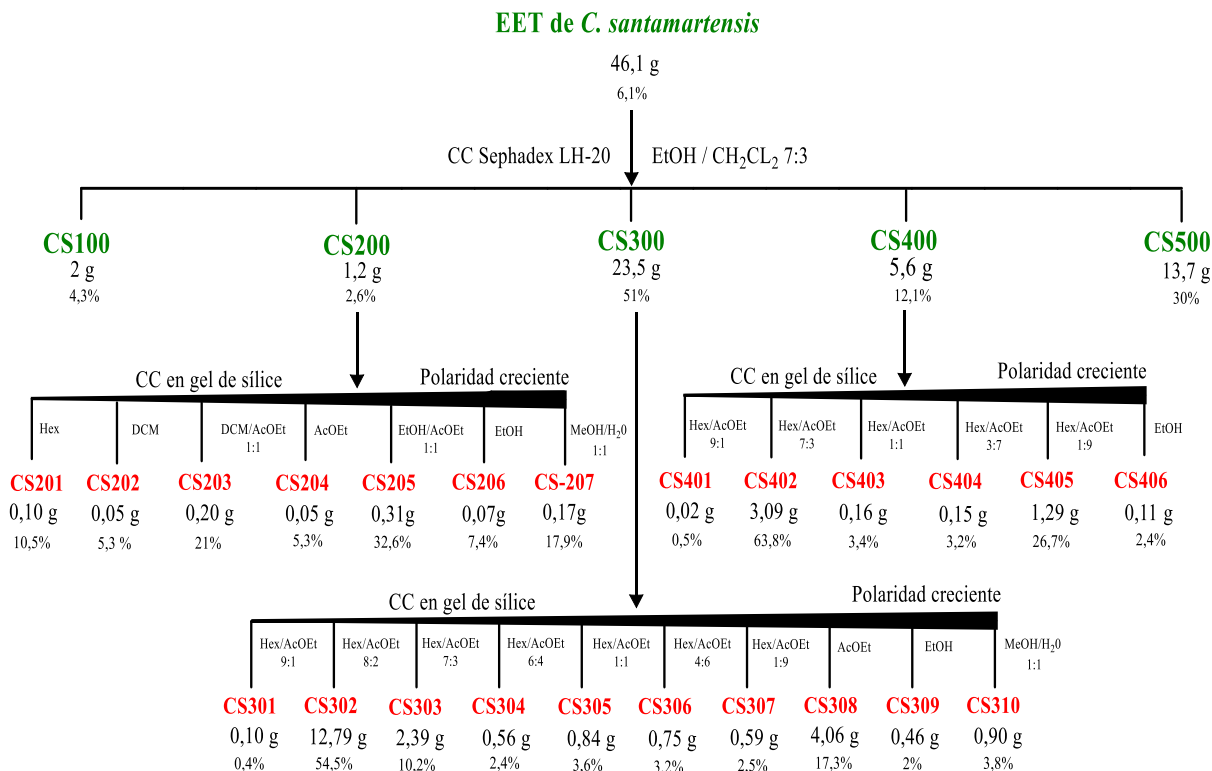
1,05 g de la fracción CS-5.116 proveniente del EMT de *C. santamartensis*, se separaron mediante cromatografía en columna (CC) sobre gel de sílice-60 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), eluyendo a una polaridad creciente (Esquema 2). El fraccionamiento fue seguido por cromatografía en capa fina (CCF), resonancia magnética nuclear, IR y espectrometría. Por lo tanto, se hicieron espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , IR y CG-EM de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación. La fracción mayoritaria (B-25) proveniente de A4, (principalmente AK) se purificó por cristalización en metanol, separando los cristales de AK de las aguas madre.



Esquema. 2. Esquema de la separación por CC de la fracción mayoritaria (CS5.116) del EMT proveniente de las hojas de *C. santamartensis*. CC: cromatografía de columna; %: porcentaje de rendimiento; A-4,54: Fracciones obtenidas en la cromatografía A; B-1,40: fracciones obtenidas en la cromatografía B; C-1,46: Fracciones obtenidas en la cromatografía C; AK: ácido kaurenoico.

3.2.3 Fraccionamiento bio guiado del extracto etanólico (EET)

El fraccionamiento bioguiado del EET, se basó en un proceso por el que se obtuvieron fracciones que contenían compuestos responsables de la actividad tripanocida observada. Se realizó mediante CC y utilizando dos tipos de adsorbente (Esquema 3).



Esquema. 3. Esquema de fraccionamiento del EET de *C. santamartensis*. CC: cromatografía de columna; CS100-500: Códigos de las fracciones obtenidas por CC en Sephadex LH-20; EtOH: etanol; DMC: diclorometano; CS201-07, CS301-10, CS401-06: códigos de las subfracciones obtenidas por CC en sílice gel; Hex: Hexano; AcOEt: Acetato de Etilo; MeOH: Metanol; %: porcentajes de rendimiento; polaridad creciente: aumento de la polaridad de los solventes y/o mezcla de solventes.

La separación inicial se desarrolló por cromatografía de exclusión por geles, mediante Sephadex LH-20 y utilizando como fase móvil etanol/diclorometano 7:3, obteniendo un total de cinco fracciones que fueron sometidas a ensayos biológicos. En la segunda etapa de separación, se utilizó CC en sílica gel en fase normal, utilizando solventes con polaridad creciente, empezando con hexano, seguido de una mezcla de hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones, desde 9:1 hasta 1:9 respectivamente, y finalizando con etanol y metanol (Esquema 3).

3.2.4 Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (CCF)

El seguimiento cualitativo de la composición química del EET y de sus diferentes fracciones, se realizó mediante la técnica de CCF, en placas cromatográficas de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia (254 nm) y soporte de aluminio, se sembraron aproximadamente 8-10 μL de muestra disuelta en un sistema de solventes, a una concentración de 10,0 mg/mL. Se utilizaron distintas fases móviles, y reveladores como *P*-anisaldehído, Liebermann Burchard (5 mL de anhídrido acético y 5 mL de H_2SO_4 (conc.) en 50 mL de Et-OH absoluto), NP-PEG (solución de 2-aminoetildifenilborato al 1% con polietilenglicol-4000 en Et-OH al 5%). Las placas de CCF fueron observadas bajo luz ultravioleta a dos longitudes de onda (254 y 365 nm).

3.2.5 Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas. (CG-EM)

Los cromatogramas fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II acoplado a un espectrómetro de masas provisto de un detector de masas Hewlett Packard 5971, en modo de impacto electrónico (IE), equipado con una columna de dimetilsilicona SPB-1 de 12 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno y 0,33 μm de espesor de pared. Las condiciones experimentales utilizadas fueron las siguientes: se disolvió una pequeña cantidad de muestra en CHCl_3 , luego se tomaron 0,1 μl de la solución preparada y se inyectaron en el sistema. El detector se mantuvo a 100 °C durante cinco min y luego se aumentó la temperatura 5 °C por min hasta alcanzar la temperatura máxima de 300 °C, que se mantuvo durante 5 min. Se utilizó He (10 psi) como gas portador y el retraso en la adquisición de datos debido al disolvente de 5 min. Se eligió una escala de identificación positiva con la base de datos (Wiley - 275,1) $\geq 90\%$.

3.2.6 Análisis por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (CL-EM)

Las muestras se procesaron en la Plataforma Ómicas UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile en un sistema CL-EM con un cromatógrafo Elute UHPLC (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización de tipo electrospray y analizador de masas de tiempo de vuelo ESI-TOF Compact (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del cromatógrafo y del espectrómetro se utilizó el programa HyStar 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Kinetex C18 de 100×2,1 mm, 1,7 μm (Phenomenex Inc., CA-USA). La separación de 5 μL de cada muestra se realizó a una temperatura de 40 °C, utilizando el siguiente programa:

t (min)	B (%)	
0,0	10,0	Fase A: ácido fórmico 0,1% v/v (agua)
3,0	10,0	Fase B: ácido fórmico 0,1% v/v (acetonitrilo)
16,0	90,0	Flujo: 350 μL/min
21,0	90,0	
21,2	10,0	
26,0	10,0	

El proceso de ionización (nebulización) mediante electrospray se realizó a 4500 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una presión de 1,8 bar y flujo de 9,0 L/min, asistido por nitrógeno como gas de secado a una temperatura de 220 °C. Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron en polaridad positiva y negativa. Para la visualización de los cromatogramas y espectros de masas se utilizó el programa DataAnalysis versión 4.4 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la identificación de las señales m/z se utilizó el programa Metaboscope versión 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) que identificó a los compuestos en base a su masa, su patrón de fragmentación y distribución isotópica. Para los análisis de identificación por el patrón de fragmentación utilizaron las librerías espectrales de MassBank of North America (MoNA), MS-DIAL y de LipidBlast. Las identificaciones se sometieron a un filtrado manual que consistió en escoger aquellas que coincidieran con

las señales m/z detectadas y seleccionadas anteriormente en DataAnalysis. Los análisis de identificación mediante Metaboscape, GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) (69) y Sirius (versión 4,9,9) (70) se correlacionaron entre ellos. En Metaboscape se seleccionaron finalmente aquellas identificaciones con un MS/MS *score* mayor a 800, en Sirius se seleccionaron aquellas identificaciones con un porcentaje de similitud mayor a 80% y en GNPS se seleccionaron aquellas identificaciones con un coseno de similitud mayor a 0.8000.

3.2.7 Identificación de compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con Detección UV acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, con Ionización por Electrospray (MS/MS). HPLC-UV-ESI-MS

Se utilizó un Eksigent EkspertUltra LC100-XL acoplado a un sistema de espectrómetro de masas TripleQuad 4500. La separación cromatográfica se realizó utilizando la columna Merck®, LiChrospher® 100 RP-18 (125 mm x 4 mm, 5 µm) a 50 °C y una elución en gradiente de ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y metanol (B) como fase móvil. El gradiente se programó como sigue: 0-1 min, 15% de B; 1-17 min, 15-100% de B; 17-21 min; 100% de B; 21-22 min, 100-15% de B y 22-25 min, 15% de B. El volumen de inyección fue de 10 µL, y el caudal se mantuvo en 0,5 mL/min.

Para el análisis MS/MS los parámetros fueron: gas 1 N₂ (50 psi); gas 2 N₂ (50 psi); voltaje de pulverización de iones, 4500 V, temperatura de la fuente de iones, 650 °C; gas cortina N₂ (30 psi), modo de barrido de monitorización de reacciones múltiples (MRM) y polaridad negativa. Se construyeron curvas de calibración para cada compuesto en el rango de 0,1-1,0 µg/mL.

Los patrones utilizados fueron: ácido gálico, ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido abscísico, ácido cryptoclorogenico, ácido 3-HBenzoico, ácido elágico, ácido vanílico, catequina, pinocembrina, rutina, crisina, quercetina, luteolina, canferol, epicatequina, apigenina, resveratrol, miricetina, isoramnetina, quercitrina, astilbina, y taxifolin.

3.2.8 Caracterización por RMN e IR

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (DEPT) se registraron en un equipo Varian 400 MHz (400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C). Los espectros se midieron en cloroformo deuterado o metanol- d_6 utilizando tetrametilsilano (TMS) como patrón interno, los desplazamientos químicos (δ) se indicaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en hertz.

Los espectros infrarrojo (IR) se registraron (KBr, 1%) en un espectrofotómetro Nicolet Impact 410 para detectar los grupos funcionales.

3.2.9 Identificación y cuantificación mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de Arreglo de Diodos (CLAE-DAD)

Para identificar y cuantificar el componente principal de una de las fracciones bioactivas (CS402) del EET, se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 1260 LC Infinity (Agilent, Santa Clara, California, EE.UU.) equipado con un automuestreador con DAD, un sistema de bomba cuaternaria y una inyección automática para el análisis por HPLC. Se utilizó una columna C18 encapsada de $100 \times 4,6$ mm (Merck KGaA). El volumen de inyección fue de 20 μL , y la longitud de onda de detección fue de 210 nm. La separación se llevó a cabo utilizando una fase móvil isocrática de acetonitrilo: agua (85:15). Para determinar el tiempo de retención del componente principal (AK), realizamos un análisis del compuesto puro (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a 10 $\mu\text{g/mL}$. Para cuantificar el AK, añadimos un estándar a diferentes concentraciones en muestras de la fracción CS402 que se inyectaron en el equipo HPLC-DAD por triplicado. Se preparó una curva de calibración con 0,0-5,0 $\mu\text{g/mL}$ de AK estándar ($y = 7,866 x + 16,12$, $R^2 = 0,9955$), y el contenido total de AK en la fracción CS402 se determinó interpolando en la curva de calibración. La idoneidad del modelo de la línea se evaluó utilizando la regresión lineal seguida de una prueba de falta de ajuste, si p es $>0,05$. El contenido total de AK se expresó como μg de AK por g de la fracción CS402.

3.3 Bioactividad

3.3.1 Cultivos celulares

Los cultivos celulares de *T. cruzi* de la cepa Dm28 (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes), y las células de mamífero Vero (células epiteliales renales del mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), fueron obtenidos en el Programa de Farmacología Molecular y Clínica del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile.

3.3.2 Mantenimiento de parásitos

Los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron a 28°C a una densidad inicial de 3×10^6 parásitos por mL (determinada por recuento microscópico en cámara de Neubauer) en medio LIT (liver infusion tryptose) complementado con 4 μM de hemina, 5% de suero bovino neonatal y una mezcla de 100 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina sódica y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina

Para obtener tripomastigotes y amastigotes de cultivos, se cultivaron células Vero en RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute medium*), a una concentración de 1×10^5 células/ml, pH 7,6, más suero fetal bovino (SFB) al 10%, 2 mg / ml de glutamina en una atmósfera de CO_2 al 5% a 37 ° C. Después de la formación de la monocapa, las células se infectaron con tripomastigotes obtenidos de sangre infectada de ratones Balb/c, a una proporción de 1:10 de células a parásitos. Después de 2 días, los parásitos se recogieron del sobrenadante de cultivo por centrifugación a 5.000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el sedimento. Los tripomastigotes obtenidos se lavaron con PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) 1X, y se añadieron nuevamente a una monocapa de células epiteliales Vero previamente cultivada, para su mantenimiento.

3.3.3 Determinación del efecto biológico del EET, de sus fracciones y del AK

3.3.3.1 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de bromuro de 3-4, 5-dimetil tiazolil-2) -2, 5-difeniltetrazolio (MTT).

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, se realizaron ensayos de colorimetría evaluando la reducción a formazán de MTT, o la exclusión de la sonda fluorescente Zombie mediante citometría de flujo. Para ello, los parásitos ($1,0 \times 10^7$ tripomastigotes/mL), $3,0 \times 10^7$ epimastigotes/mL o células Vero ($3,0 \times 10^6$ cells/mL), fueron sembrados en microplacas (96 pocillos) e incubados a 37 °C o 28 °C (5% CO²) dependiendo del cultivo celular, por 24 horas con las distintas concentraciones de las fracciones y/o compuestos, incluyendo al nifurtimox (NFX) como control positivo, disueltos en dimetilsulfoxido (DMSO, <0,5% v/v concentración final).

La viabilidad celular se determinó por reducción de bromuro de 3-4, 5-dimetil tiazolil-2) -2, 5-difeniltetrazolio (MTT). Este ensayo consiste en la reducción metabólica de MTT a un cristal de color azul (formazán). La concentración de formazán es proporcional al número de células metabólicamente activas.

Los cultivos fueron lavados con PBS y se agregó MTT [5 mg/ml] y fenazina [0,22 mg/ml], las placas fueron incubadas a 37 °C o 28 °C por 4 horas, luego se agregó a cada pocillo 100 µl del solubilizante SDS (decalauril sulfato) 10% en HCl 0.01 N, para disolver los cristales de formazán. Las placas se dejaron por 1 hora en agitación a 37° C o 28 °C, y luego se midieron mediante espectrofotometría en un multilector de placa (Asys Expert Plus®, Austria) a 570 nm. Los resultados fueron analizados mediante el software Graph Pad Prism 9 y representados como el porcentaje de células viables respecto al control.

3.3.3.2 Evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo

Alternativamente, 4×10^5 parásitos fueron incubados por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO² de 5 %, exponiéndolos al EET y a sus fracciones en diferentes concentraciones (0, 10, 50; 100 y 200 µg/mL), en un volumen final de 200 µL. Posteriormente la placa que contenía los parásitos en suspensión se centrifugó a 3,500 rpm a una temperatura de 4 °C durante 10 minutos. Luego de descartar el sobrenadante se adicionó 100 µL de la solución de la sonda Zombie® UV (1:1000, Ex/Em 350/459 nm, BioLegend®) (1:1000) previamente preparada, y la placa se llevó a la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C, para luego ser centrifugada bajo las mismas condiciones, se adicionó 200 µL de Staining Buffer set (eBioscience®, USA) sobre los parásitos. La fluorescencia asociada se detectó por citometría de flujo en el equipo LSRFortessa con 30.000 eventos por condición con el software BD FACSDIVA® (BD, Biosciences®, USA). Los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron con ayuda del programa WEASEL v3.0.

3.3.4 Determinación del índice de selectividad

Para evaluar la seguridad de las fracciones y del EET sobre células de mamíferos, se comparó su citotoxicidad con su actividad tripanocida, utilizando la relación del índice de selectividad (IS) (CI₅₀ para células Vero / CI₅₀ para parásitos). Cuando este valor es mayor que 1, el compuesto es más selectivo contra los parásitos que las células de mamíferos; cuando el valor es inferior a 1, el compuesto es más selectivo contra las células de mamíferos (71).

3.3.5 Tinción DAPI y cuantificación de amastigotes intracelulares

Se sembraron 5×10^4 células Vero (ATCC® CCL-81) en portaobjetos de cámaras Lab-Tek II durante 4 h. Las células se expusieron a las fracciones CS400 (15,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CS402 (33,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ácido kaurenico (17,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y nifurtimox (5,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas después de la infección con *T. cruzi* (cepa Dm28), a una MOI (*multiplicity of infection*) 1:3 (célula: parásito) durante 3 y 24 horas. Luego, las células se lavaron y se fijaron en metanol frío (70%) durante la noche. Para la identificación de amastigotes de *T. cruzi*, las células infectadas se procesaron por tinción nuclear con DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes; 1 mg DAPI / mL) y los amastigotes se reconocieron por su tamaño nuclear y la presencia de kinetoplasto (72). Las células se fotografiaron utilizando un microscopio de disco giratorio (OlympusBX43). En total, se obtuvieron diez imágenes por pocillo, y las células de cada imagen se contaron utilizando el software Image J (73).

3.3.6 Generación de ERO en cultivos de *T. cruzi*

Para la detección de ERO (especies reactivas de oxígeno), se utilizó el método del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA). Se sembraron placas de 96 pocillos con $1,5 \times 10^6$ tripomastigotes/mL en medio RPMI. Los cultivos se incubaron con una solución de DCFH₂-DA de 20 μM durante 15 minutos a 28 °C. A continuación, se centrifugaron a 3500 rpm y se lavaron 2 veces con tampón fosfato salino de pH 7,4. Las células cargadas con DCFH₂-DA se transfirieron a una placa de fluorescencia Nunc® de 96 pocillos, donde se añadieron las fracciones (CI₅₀) y el AK (CI₅₀). Se registró la fluorescencia (excitación: 488 nm, emisión: 528 nm) durante 40 minutos en un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT. El área bajo las curvas de aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo se determinó utilizando el software Origin 8; las áreas se normalizaron con el control. Los resultados son las medias \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes (74).

3.3.7 Ensayo para evaluar el $\Delta\Psi_m$ en *T. cruzi*

El análisis de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de *T. cruzi* (cepa Dm28) se realizó mediante la determinación del cambio de la fluorescencia del éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE). Los tripomastigotes (5×10^6 células/ml) cultivados en placas de fondo plano de 24 pocillos durante 2 h en ausencia o presencia de las fracciones se expusieron durante 30 min a TMRE (concentración final 200 nM). Como control positivo, los tripomastigotes de control se trataron durante 10 min con 25 μ M de cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP; Sigma) para provocar la despolarización de la membrana mitocondrial interna. A continuación, los parásitos se lavaron con PBS, se resuspendieron en PBS y se transfirieron a placas negras de fondo plano de 96 pocillos, con cada pocillo que contenía 100 μ l de muestra. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las placas se leyeron con un lector de placas de fluorescencia TECAN Spark, utilizando una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 595 nm. La cuantificación se realizó utilizando el software GraphPad Prism 9. Los valores representan medias \pm desviaciones estándar de determinaciones por triplicado de 3 réplicas biológicas independientes. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnet. $p < 0,05$ indicó diferencias significativas en las señales de TMRE en los parásitos tratados con las fracciones CS400, CS402 y AK en comparación con el control no tratado (75).

3.3.8 Evaluación de los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+})

Los niveles de calcio se evaluaron según lo descrito por Rea *et al*, 2013. Brevemente, los tripomastigotes (2×10^6 células/pozo) fueron pretratados con 5 μ M de Fluo-4 AM (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en PBS 1x, durante 60 min a 37°C en la oscuridad. A continuación, se lavaron los parásitos y se trataron con la fracción CS402 (33,1 μ g/mL). Las mediciones de fluorescencia se realizaron durante 4 h utilizando un lector de placas de fluorescencia Tecan Spark (Tecan, Männedorf, Suiza), con las longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente. Los niveles máximos de calcio se

obtuvieron con Tritón X-100 al 0,5% y los parásitos no tratados se utilizaron como control negativo.

3.3.9 Análisis estadístico

Las curvas concentración-efecto y los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Todos los experimentos fueron realizados por triplicados de manera independiente, y los datos que se muestran en los gráficos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se identificaron diferencias significativas entre las medias utilizando las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o Dunnett. Los valores $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Selección, recolección e identificación del material vegetal

La planta seleccionada según su uso etnomédico, fue identificada como *C. santamartensis*, sus hojas fueron recolectadas, secadas y molidas para la obtención de los extractos. El área de muestreo y sus respectivas coordenadas fueron registradas en un mapa (Fig. 10).

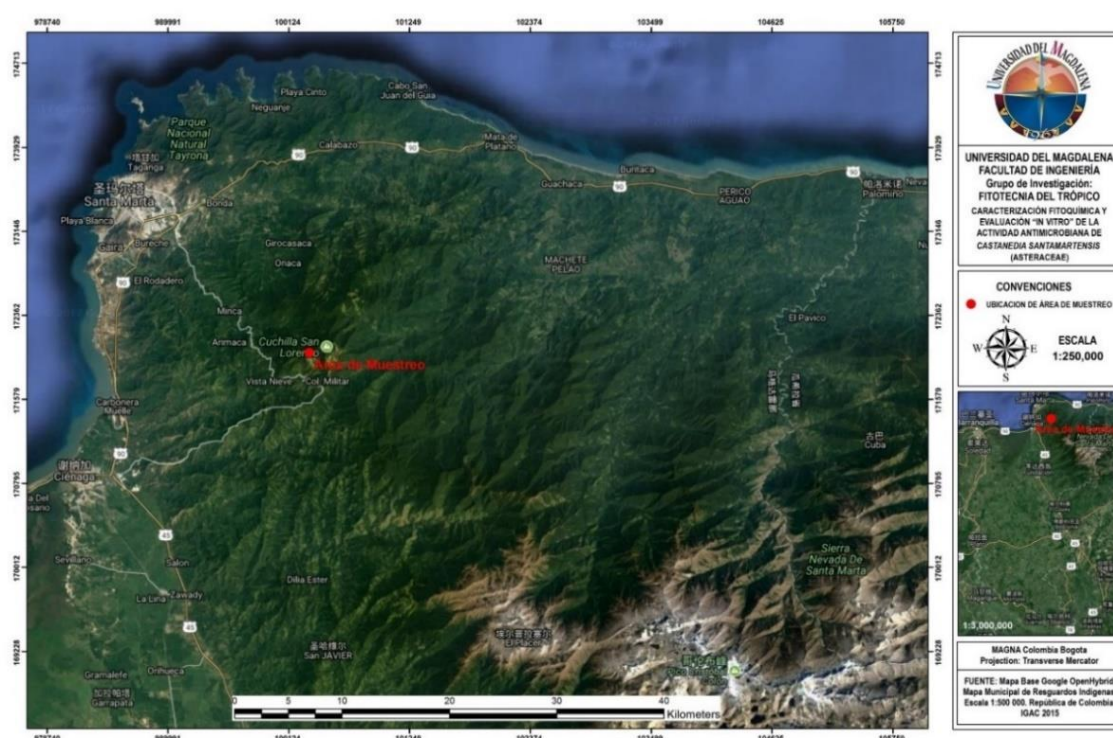


Fig. 10. Mapa del registro del área de muestreo de *C. santamartensis* en la SNSM

4.2 Obtención de extractos alcohólicos a partir de las hojas de *C. santamartensis*

A partir de dos lotes de hojas de *C. santamartensis* secas y molidas, se realizaron las extracciones obteniéndose dos extractos con metanol y etanol. El peso final de cada extracto fue de 54,6 g (10,1% de rendimiento) para el extracto metanólico (EMT) y 63 g (6,1% de rendimiento) para el extracto etanólico (EET) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos alcohólicos obtenidos a partir de las hojas de *C. santamartensis*

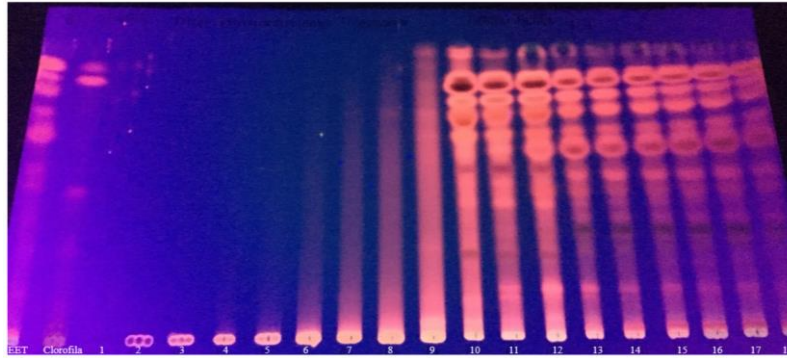
Especie	Solvente	Peso en g de hojas secas	Peso en g de extracto seco	Nombre del extracto	Rendimiento %
<i>Castanedia</i>	Etanol	1,042	63,00	EET	6,1
<i>santamartensis</i>	Metanol	540	54,6	EMT	10,1

4.3 Análisis de los extractos por cromatografía de capa fina (CCF)

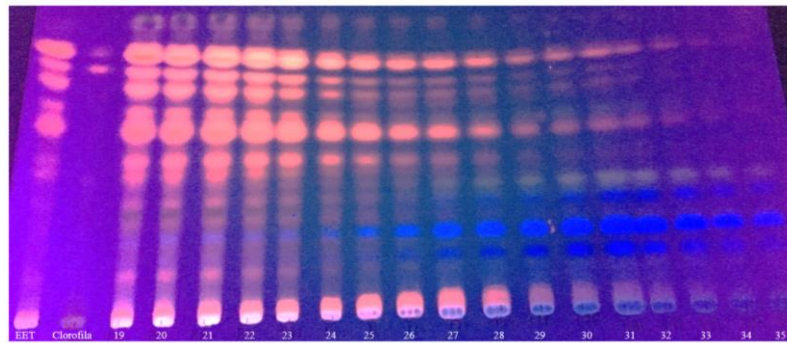
Los extractos y fracciones fueron analizados mediante CCF, para evaluar los sistemas de elución y separación que fueron utilizados en el fraccionamiento mediante CC, y con el objetivo de obtener una estimación previa de las diferencias cualitativas en la composición química de los EET y EMT y las respectivas fracciones. En la Fig. 11 se indica la fase móvil usada para separar los compuestos presentes en el EET, y se observan las marcas de los cromatofolios bajo la luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.

De acuerdo a “Plant & Drug Analysis” (1), los compuestos pertenecientes a la familia de los flavonoides pueden presentar fluorescencias a la luz UV (365 nm) que van desde una coloración naranja hasta verde, mientras que los ácidos fenólicos presentan una fuerte tonalidad celeste. En los cromatofolios de la Fig. 11 se puede apreciar un conjunto de marcas de color naranja, indicando la presencia de flavonoles y sus heterósidos, y las marcas color celestes indicaron la presencia de ácidos fenólicos.

Por otro lado, el revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard (Fig. 12) permitió determinar la presencia de marcas con colores pardo y violeta, indicando la presencia de compuestos triterpénicos o esteroidales.

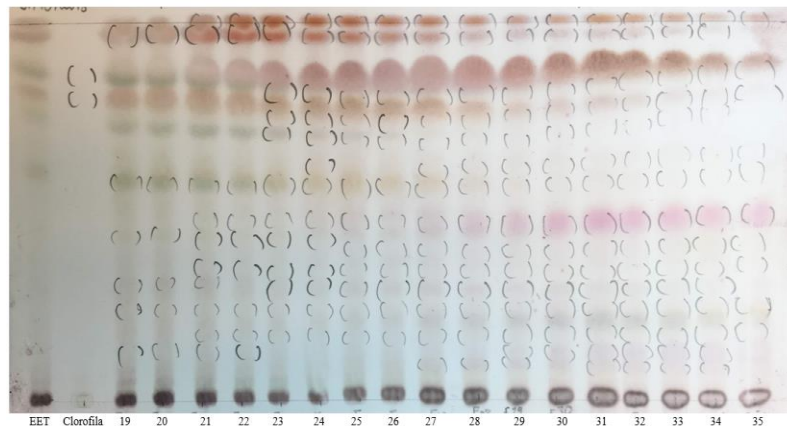


A. Hex/AcoEt 6:4. Luz UV (365 nm).



B. Hex/AcoEt 6:4. Luz UV (365 nm).

Fig. 11. CCF del EET y sus fracciones observada bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm. Fase móvil: Hex/AcoEt 6:4. A: Fracciones 1-18; B: Fracciones 19-35.



Hex/AcoEt 6:4. Revelador: Liebermann Burchard. Luz visible

Fig. 12. CCF del EET y sus fracciones observada a la luz visible. Fase móvil: Hex/AcoEt 6:4. Revelador: Liebermann-Burchard + 100 °C.

De esta manera, las fracciones 1-9 (Fig. 11A) obtenidas del EET, se reagruparon en la fracción nominada con el código de CS200 (Fig. 13), las fracciones 10-23 (Fig. 11A y B) se reagruparon en la fracción CS300 (Fig. 13) y las fracciones 24-35 (Fig. 11A) se reagruparon en la fracción CS400 (Fig. 13).

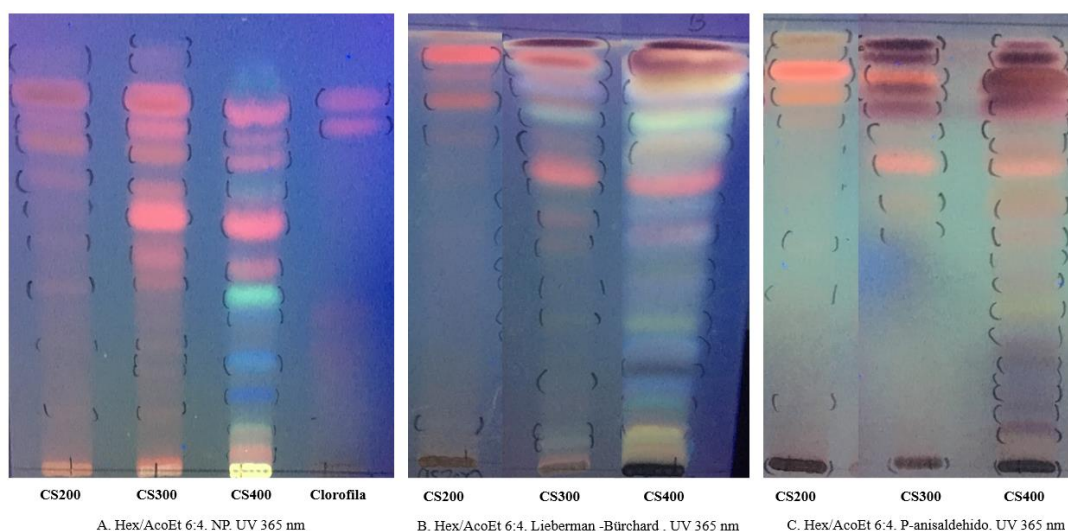


Fig. 13. CCF del EET y sus fracciones, observada bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm. A: Fase móvil: Hex/AcoEt 6:4. Revelador: Natural Product. B: Fase móvil: Hex/AcoEt 6:4. Revelador: Liebermann-Burchard. C: Fase móvil: Hex/AcoEt 6:4. Revelador: *p*-anisaldehído-ácido sulfúrico.

4.4 Fraccionamiento del EMT seguido por RMN e IR

Previo al fraccionamiento del EMT, se evaluó su actividad tripanocida sobre epimastigotes de *T. cruzi* y se determinó su concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) con un valor de $5 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$. A continuación, se presentan detalles del fraccionamiento y su seguimiento por RMN e infrarrojo (IR).

En el espectro de RMN de protón del EMT (Fig. 14A) realizado en metanol deuterado (MeOD), se observa diferentes tipos de señales en toda la escala del espectro, hay señales aromáticas, alquénicas y alquílicas, por lo tanto, se procedió a un fraccionamiento líquido-líquido del extracto (Esquema 1).

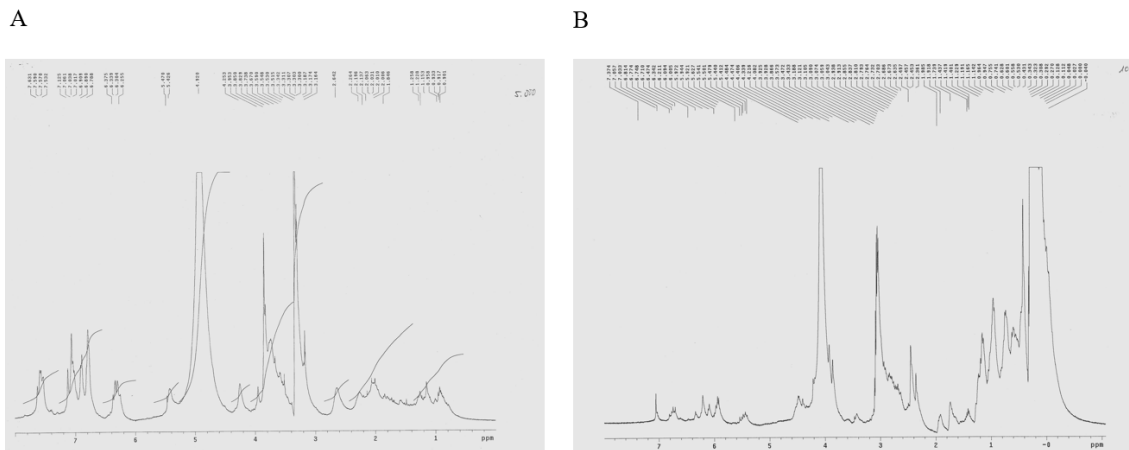


Fig. 14. RMN ¹H del EMT (A) y de la fracción CS5.101(B)

En el espectro de RMN ¹H correspondiente a la fracción CS5.101 (Fig. 14B), las señales se observan con una mejor resolución. Es notable que los picos son más angostos y se empieza a definir las constantes de acoplamiento, lo que motivó a continuar con el proceso de purificación e identificación.

La Fig. 15A muestra el espectro de RMN ¹H de la fracción CS5.112, con señales claras en la zona de los dobles enlaces, por lo tanto, los compuestos que originan las señales deben contener grupos funcionales alquénicos. Así mismo, en la zona de baja frecuencia del espectro se observa señales que se relacionan con grupos metilos, metilénicos y metínicos.

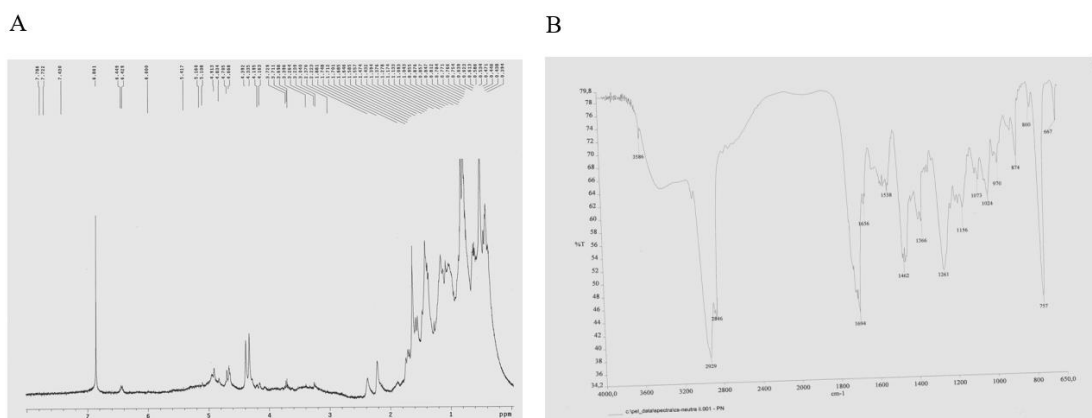


Fig. 15. RMN ¹H (A) e IR (B) de la fracción CS5.112

En el espectro de infrarrojo (IR) de la fracción CS5.112 de la Fig. 15B se observa la señal correspondiente al enlace C=O de un grupo carbonilo (1694 cm^{-1}), donde también están las señales de los enlaces C-H alquílicos (2929 cm^{-1}); y por encima de 3000 cm^{-1} , se observa una señal ancha, que al correlacionarla con la primera señal permite deducir la presencia de un grupo carbonilo de ácido. De manera similar ocurre para el espectro IR de la fracción CS5.116 (Fig. 16B).

El espectro de RMN ^1H de la fracción CS5.116 (Fig. 16A) llamó particularmente la atención, por la presencia de una señal de resonancia por encima de 9 ppm y que según la bibliografía se origina de un protón perteneciente a un grupo ácido carboxílico (76). Por lo tanto, la fracción CS5.116 fue seleccionada para continuar con un nuevo proceso de fraccionamiento por CC. (Esquema 2).

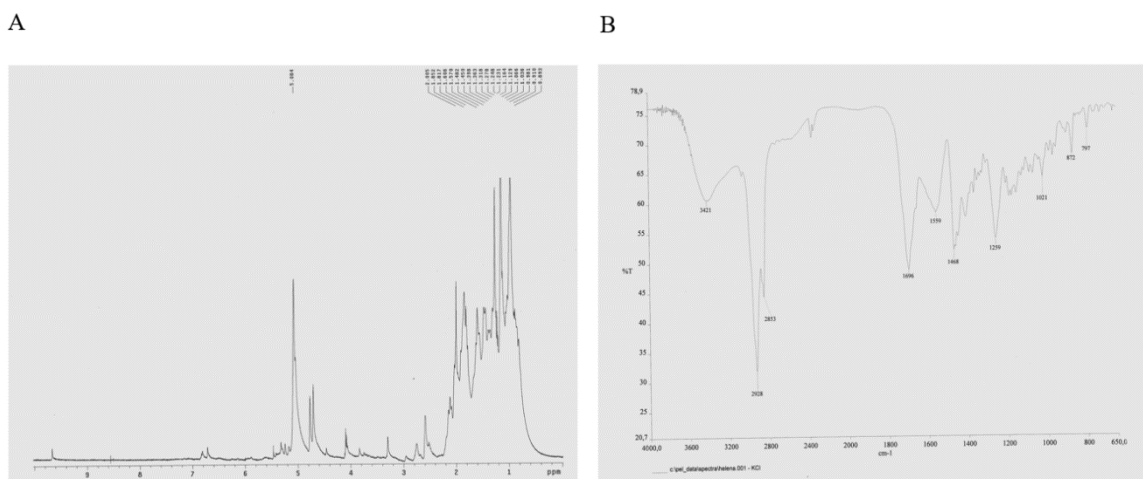


Fig. 16. RMN ^1H (A) e IR (B) de la fracción CS5.116

La fracción menos polar y mayoritaria de las obtenidas a partir de CS5.116 correspondió a A-4 (Esquema 2), cuyo espectro de RMN ^1H mostró principalmente señales de alcanos y alquenos (Fig. 17). La señal a 4,70 y 4,76 ppm, típica de los protones de un grupo vinilideno asimétricamente sustituido, apareció muy bien definida. Por lo tanto, la fracción A4 se sometió a una nueva CC (cromatografía B) (Esquema 2), y posteriormente, la fracción B-25

(fundamentalmente AK) se purificó por cristalización en metanol, separándose 6,8 mg de cristales de AK de 120 mg de aguas madres (Esquema 2).

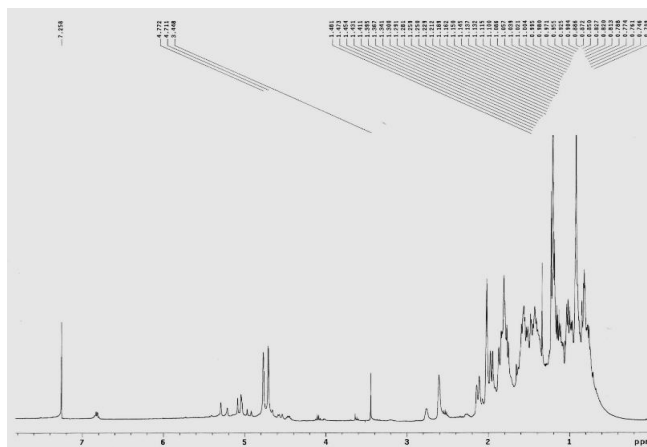


Fig. 17. RMN ^1H de la fracción A4 del EMT proveniente de las hojas de *C. santamartensis*. Solvente: CDCl_3

4.5 Identificación, purificación y caracterización del compuesto mayoritario presente en el EMT de las hojas de *C. santamartensis* mediante CG-EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C

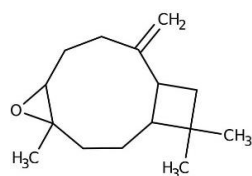
Por CG-EM se identificó una serie de compuestos detallados en la Tabla 2, que corresponden a un sesquiterpeno (óxido de cariofileno (Fig. 18A)), dos diterpenos (kaurenol Fig. 18B y ácido kaurenico (Fig. 18C), un triterpeno (acetato de taraxasterol (Fig. 18D)) y tres compuestos lineales (2-pentadecanona (Fig. 18E) y los ésteres metílico (Fig. 18F) y etílico del palmitato (Fig. 18G)). En el cromatograma de la fracción A4 (Fig. 19A), se destacó la señal con un tiempo de retención de 31,87 (pico n°6), por lo que se procedió a obtener su correspondiente espectro de masas (Fig. 19B), en donde se observó una señal a m/z 302, equivalente a la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ y que fue reconocida como ácido kaurenico de acuerdo con la base de datos consultada.

El compuesto mayoritario de la fracción A4 fue el ácido kaurenico (Tabla 2). Por lo tanto, se aisló (Esquema 2) y caracterizó mediante espectroscopía de RMN (Fig. 20).

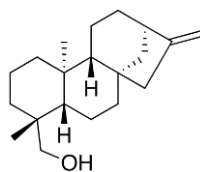
Tabla 2. Compuestos identificados por CG-EM de la fracción A4 proveniente del EMT de hojas de *C. santamartensis*

Pico cromatográfico	Tr	%	Compuesto ^(a)	Similitud (%)
1	15,17	0,472	Óxido de cariofileno	91
2	20,67	1,342	2-pentadecanona	91
3	22,27	2,239	Palmitato de metilo	99
4	23,57	2,239	Palmitato de etilo	98
5	28,09	6,910	Kaurenol	95
6	31,87	77,697	Ácido kaurenico	96
7	45,77	3,530	Acetato de taraxasterol	95

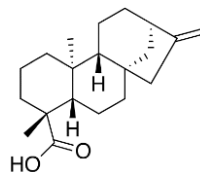
Tr: tiempo de retención. ^(a) Por comparación con la base de datos Wiley GC/MS 6^{ta} edición



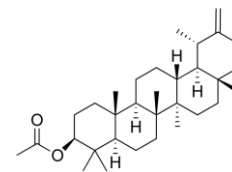
A. Óx. de cariofileno



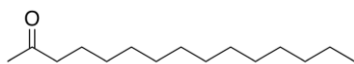
B. Kaurenol



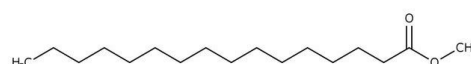
C. Ácido kaurenico



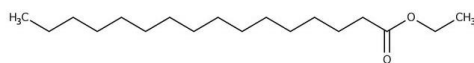
D. Acetato de taraxasterol



E. 2-pentadecanona



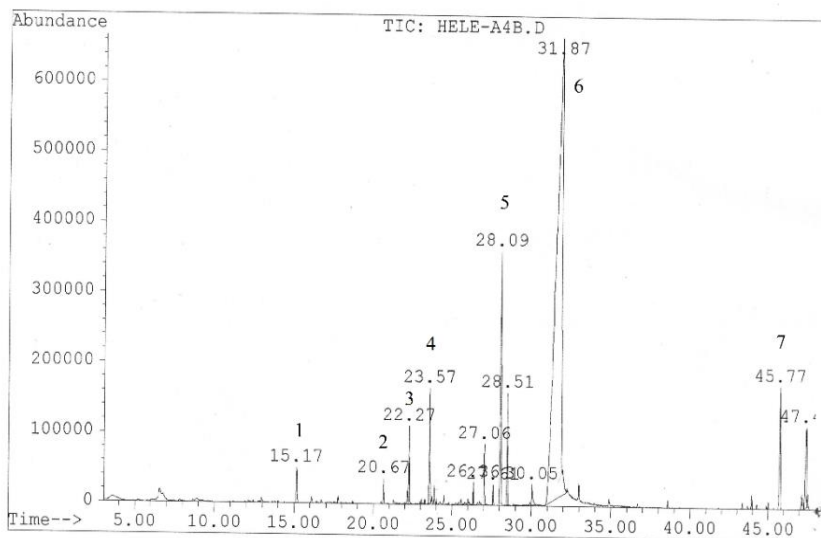
F. Palmitato de metilo



G. Palmitato de etilo

Fig. 18. Estructuras químicas de los compuestos identificados por CG-EM de la fracción A4 proveniente del EMT de *C. santamartensis*

A



B

Library Searched : C:\DATABASE\W9N08.L
 Quality : 55
 ID : Kaur-16-en-18-oic acid, (4.beta.)- (CAS) \$\$ Kaur-16-en-19-oic acid

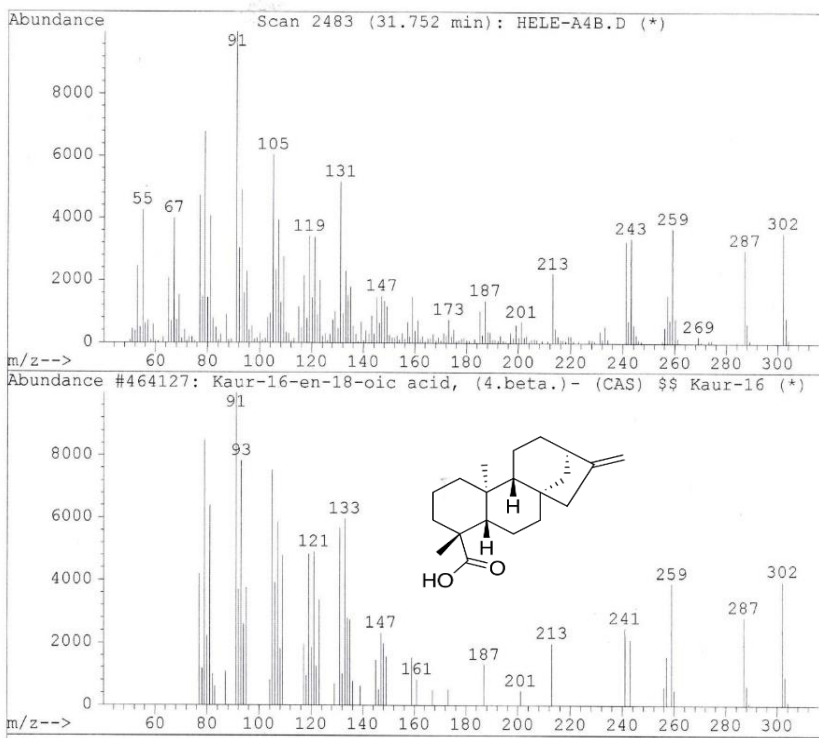
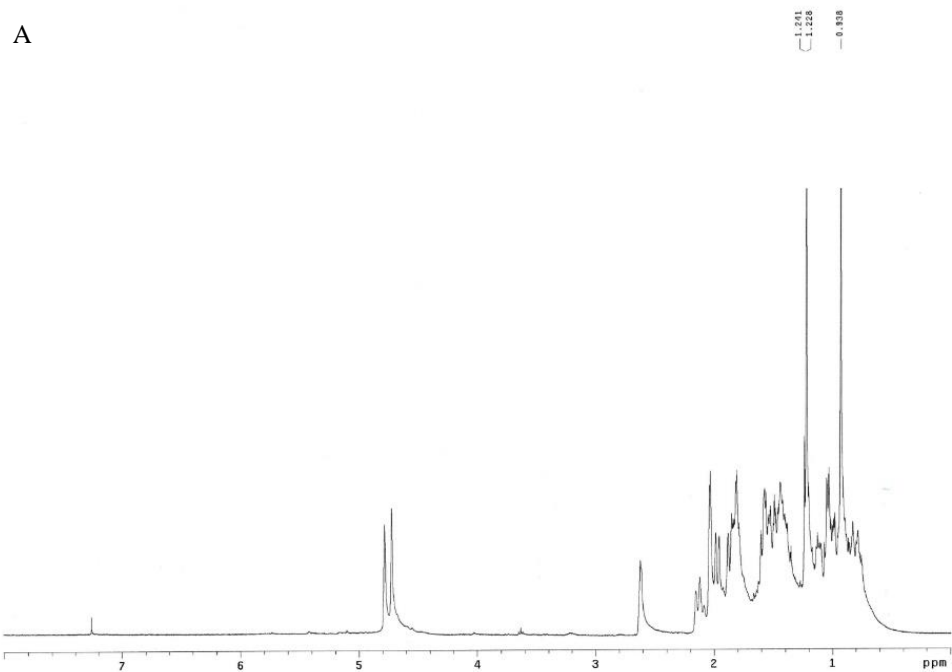


Fig. 19. Cromatograma de gases (CG) de la fracción A4 proveniente del EMT (A) e identificación del compuesto mayoritario (Tr 31,752) por comparación con base de datos Wiley GC/MS 6^{ta} edición (B)



B

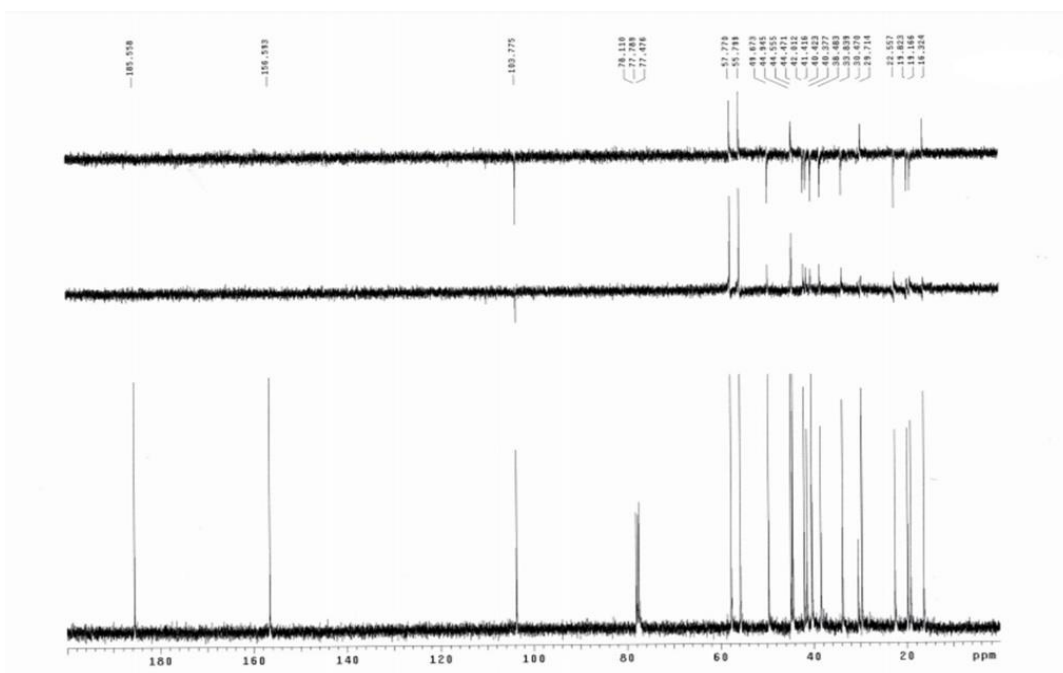


Fig. 20. Espectros de RMN ^1H (A) y de RMN ^{13}C (B) del AK aislado de la fracción B25 del extracto metanólico de las hojas de *C. santamartensis*. Los espectros se registraron en un espectrómetro Varian de 400 MHz (funcionando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C)

El espectro de RMN ^1H de la fracción B25 (proveniente de la fracción A4) (Fig. 20A) mostró las señales esperadas asignadas a los grupos metilo, metileno y metileno del esqueleto de carbono policíclico del AK a baja frecuencia, mientras que los singuletes amplios bien definidos característicos de su metileno olefínico *exo*-cíclico aparecen a 4,70 y 4,76 ppm.

El análisis espectral de RMN ^{13}C (Fig. 20B) reveló 20 señales, 3 de las cuales estaban por encima de 100 ppm. La señal más desplazada estaba por encima de 180 ppm y se asignó a un carbono carbonílico, mientras que las otras dos se asignaron a carbonos de un grupo alqueno. Las señales originadas por los grupos metilo se observan en la parte superior del espectro y hacia el campo de baja frecuencia que se origina en los metilenos y metinos. Se utilizó un espectro DEPT/135 para deducir la presencia de 10 carbonos metilénicos, 2 carbonos metílicos, 3 carbonos metínicos, 4 carbonos cuaternarios y 1 carbono carbonílico. Así, se confirmó que el compuesto contenía 20 carbonos, 3 hidrógenos y 2 oxígenos, con un peso molecular de 302 Da. Basándose en la información espectroscópica anterior, se concluyó que el compuesto purificado y caracterizado químicamente fue el AK.

Cabe resaltar que, cada extracto obtenido se secó para eliminar el solvente; sin embargo, si quedaran restos de metanol en el EMT, podrían producirse falsos positivos en los estudios biológicos debido a la toxicidad del metanol como solvente (77)(78). Por lo tanto, el fraccionamiento bioguiado se realizó a partir del EET, que tiene además un poder extractivo similar al metanol (78).

4.6 Fraccionamiento del EET de *C. santamartensis* orientado por ensayos biológicos contra *T. cruzi*

Previo al fraccionamiento, se evaluó la actividad biológica del EET sobre tripomastigotes de *T. cruzi* por dos métodos diferentes.

En la primera etapa del fraccionamiento, se obtuvo un total de cinco fracciones: CS100; CS200; CS300; CS400 y CS500 (Esquema 3) que se evaluaron sobre *T. cruzi* bajo las mismas condiciones del EET. Las fracciones con mayor actividad tripanocida se seleccionaron para la segunda etapa del fraccionamiento. De esta forma, las fracciones: CS200; CS300 y CS400

se fraccionaron posteriormente en 7; 10 y 6 nuevas fracciones respectivamente (Esquema 3) que, a su vez fueron sometidas a un *screening* sobre la forma infectiva del parásito. Las subfracciones que presentaron mayor porcentaje de muerte parasitaria a la menor concentración evaluada, fueron seleccionadas para continuar con los estudios químicos de identificación de compuestos, y cuantificación del compuesto mayoritario identificado previamente por CG-EM.

4.7 Actividad tripanocida de EET y de las fracciones CS200, CS300 y CS400

Se determinó la CI_{50} del EET y de sus fracciones CS100, CS200, CS300, CS400 y CS500 por MTT y se obtuvieron los siguientes valores: $63,9 \pm 0,3$; > 200 ; $83,4 \pm 4,0$; $52,6 \pm 2,3$; $15,4 \pm 3,1$ y $> 200 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabla 3). Los resultados muestran que, las fracciones CS300 y CS400 presentan valores de CI_{50} menores en relación con el EET. En contraste, la fracción CS200 presenta un valor de CI_{50} aparentemente mayor que el EET, y las fracciones CS100 y CS500 mostraron pérdida de la actividad tripanocida en las concentraciones evaluadas.

Para confirmar que la actividad tripanocida observada no era producto de alteraciones metabólicas inducidas por el extracto o las fracciones, se procedió a realizar un ensayo de viabilidad celular evaluando la exclusión de la sonda fluorescente Zombie[®] mediante citometría de flujo (Fig. 21). Los valores de CI_{50} también se presentan en la Tabla 3. Este resultado confirmó que las fracciones activas eran CS400, CS300 y CS200.

Tabla 3. Actividad tripanocida y citotoxicidad del EET y de sus fracciones provenientes de las hojas de *C. santamartensis*

Extracto y fracciones de <i>C. santamartensis</i>	CI ₅₀ Tripomastigotes (Dm28) $\mu\text{g/mL}$			CI ₅₀ células Vero $\mu\text{g/mL}$		IS
	Zombie	MTT	R ²		R ²	
EET	> 200	63,9 \pm 0,3	0,98	446,9 \pm 12,0	0,98	6,9
CS100	> 200	>200	0,97	N.D.	---	---
CS200	186,5 \pm 1	83,4 \pm 4,0	0,99	133,5 \pm 0,6	0,99	1,6
CS300	122,9 \pm 3,2	52,6 \pm 2,3	0,98	282,6 \pm 4,0	0,99	5,4
CS400	88,2 \pm 3,6	15,4 \pm 3,1	0,99	131,4 \pm 2,0	0,99	8,5
CS402	N.D.	33,1 \pm 1,5	0,99	55,1 \pm 0,7	0,99	1,7
CS500	> 200	> 200	0,93	N.D.	---	---
Ácido kaurenico	N.D.	17,3 \pm 1,0	0,98	61,3 \pm 1,0	0,99	3,5
Nifurtimox	*	5,7 \pm 0,5	0,99	183,7	0,99	32

Los valores de CI₅₀ corresponden a la media \pm DE de tres experimentos individuales. * El nifurtimox disminuyó la viabilidad en un 72,9% en el cálculo de la CI₅₀ determinado por MTT (5,7 $\mu\text{g/mL}$). EET: extracto etanólico; CS400: fracción del EET; CS402: subfracción del CS400; R²: coeficiente de correlación de Pearson; CI₅₀: Concentración que disminuye el 50 % de la viabilidad celular. IS: Índice de selectividad (CI₅₀ para células Vero/CI₅₀ para parásitos); N.D: No determinado.

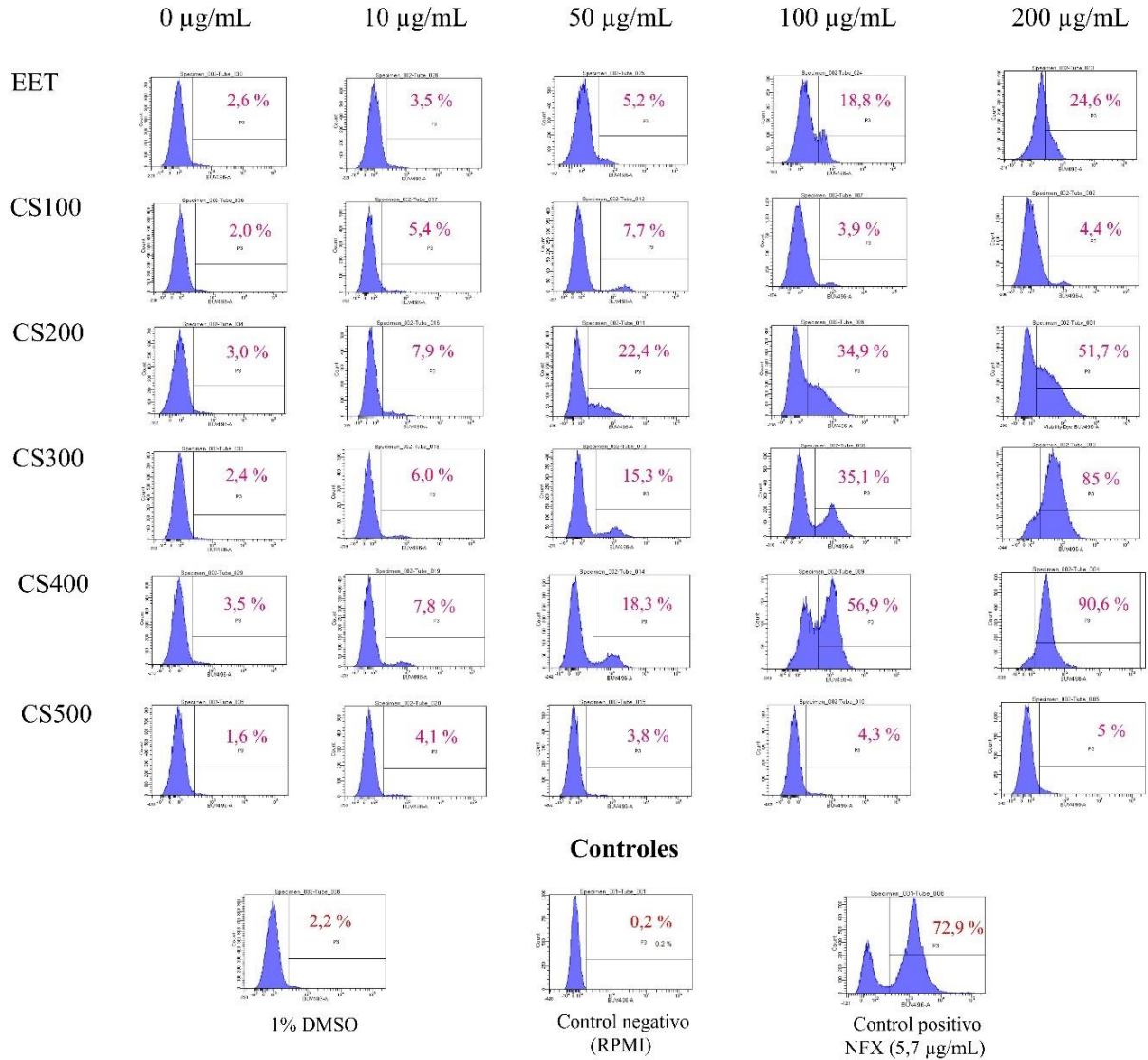


Fig. 21. Análisis por citometría de flujo de la actividad tripanocida del extracto etanólico (EET) de las hojas de *C. santamartensis* y sus fracciones.

Los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* se incubaron con el EET y las fracciones durante 24 h y se tiñeron con la sonda Zombie. Los valores porcentuales en el cuadrante superior derecho de cada figura corresponden a los porcentajes de parásitos muertos (positivos para Zombie) a las concentraciones indicadas. La mortalidad de los parásitos se determinó contando las células positivas para Zombie que son excluidas por las células vivas. Cada histograma corresponde al recuento de 50.000 eventos.

4.8 Actividad tripanocida de las distintas subfracciones del EET proveniente de las hojas de *C. santamartensis* determinada mediante tamizaje a 50 µg/mL

Siguiendo con el ensayo bioguiado, se procedió a evaluar la actividad tripanocida de las subfracciones derivadas de CS200, CS300 y CS400 de manera respectiva. Para lo que se procedió a realizar un tamizaje usando 50 µg/mL y 100 µg/mL de cada una de las subfracciones, y se analizó la viabilidad celular mediante la reducción de MTT. El resultado de estos tamizajes se presenta en las Tablas 4, 5 y 6. A menor porcentaje de viabilidad celular, mayor es la actividad biológica. Se observa que a la concentración de 50 µg/mL, la subfracción CS402 presenta una mayor actividad tripanocida en comparación con el resto, por lo que se determinó su CI₅₀ sobre tripomastigotes, obteniendo como resultado un valor de $33,1 \pm 1,5$ µg/mL (Tabla 3).

Tabla 4. *Screening.* Actividad tripanocida de las fracciones derivadas de **CS200**

Código de las fracciones	Porcentaje de viabilidad ± DE a 50 µg/mL	Porcentaje de viabilidad ± DE a 100 µg/mL
CS200	84,1 ± 5,2	39,4 ± 4,9
CS201	98,0 ± 0,4	97,3 ± 0,7
CS202	96,9 ± 2,4	74,0 ± 6,9
CS203	97,4 ± 1,3	74,0 ± 4,4
CS204	91,9 ± 2,5	78,0 ± 1,5
CS205	94,8 ± 1,8	39,0 ± 1,5
CS206	92,3 ± 2,2	5,0 ± 1,2
CS207	79,3 ± 3,8	92,0 ± 0,8

A menor porcentaje de viabilidad celular, mayor es la actividad tripanocida. La concentración final de DMSO para la concentración evaluada fue del 0,2%.

Tabla 5. *Screening.* Actividad tripanocida de las fracciones derivadas de **CS300**

Código de las fracciones	Porcentaje de viabilidad celular ± DE a 50 µg/mL	Porcentaje de viabilidad celular ± DE a 100 µg/mL
CS300	55,9 ± 5,2	6,8 ± 3,8
CS301	100 ± 0,0	73,0 ± 3,4

CS302	100 ± 0,0	56,0 ± 3,9
CS303	100 ± 0,0	21,0 ± 3,5
CS304	100 ± 0,0	37,0 ± 1,7
CS305	96,4 ± 2,1	19,0 ± 2,8
CS306	100 ± 0,0	21,0 ± 2,7
CS307	100 ± 0,0	20,0 ± 3,4
CS308	95,2 ± 2,7	30,0 ± 5,1
CS309	90,1 ± 6,1	28,0 ± 1,5
CS310	92,3 ± 4,2	92 ± 6,4

A menor porcentaje de viabilidad celular, mayor es la actividad tripanocida. La concentración final de DMSO para la concentración evaluada fue del 0,2%.

Tabla 6. *Screening.* Actividad tripanocida de las fracciones derivadas de **CS400**

Código de las fracciones	Porcentaje de viabilidad celular ± DE a 50 µg/mL	Porcentaje de viabilidad celular ± DE a 100 µg/mL
CS400	4,4 ± 3,1	3,1 ± 0,1
CS401	95,2 ± 3,2	94,6 ± 1,2
CS402	3,9 ± 0,3	4,0 ± 0,1
CS403	50,5 ± 1,7	1,0 ± 0,3
CS404	95,5 ± 1,4	1,0 ± 0,5
CS405	95,2 ± 3,6	88,0 ± 2,9
CS406	94,2 ± 3,1	89,0 ± 1,5

A menor porcentaje de viabilidad celular, mayor es la actividad tripanocida. La concentración final de DMSO para la concentración evaluada fue del 0,2%.

4.9 Evaluación de la actividad citotóxica sobre células de mamífero

De la misma forma en que se evaluó la actividad tripanocida del EET y de sus fracciones, también se evaluó su actividad citotóxica sobre células Vero, y se determinó el índice de selectividad para cada fracción (Tabla 3). Se observa que la fracción CS400 presenta la mayor selectividad de la serie, en concordancia con la selectividad observada para EET. Sin embargo, al índice de selectividad (IS) correspondiente a la fracción CS402 disminuye significativamente, ya que la actividad frente a células de mamífero está en el mismo orden de magnitud que la actividad tripanocida.

4.10 Efecto de las fracciones CS400 y CS402 sobre la infección intracelular

Se ensayó el efecto de las fracciones CS400 y CS402 en células de mamífero infectadas con amastigotes intracelulares (Fig. 22). Ambas fracciones disminuyeron ($p \leq 0,05$) el porcentaje de células infectadas a concentraciones de 15,4 y 33,1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Fig. 22C).

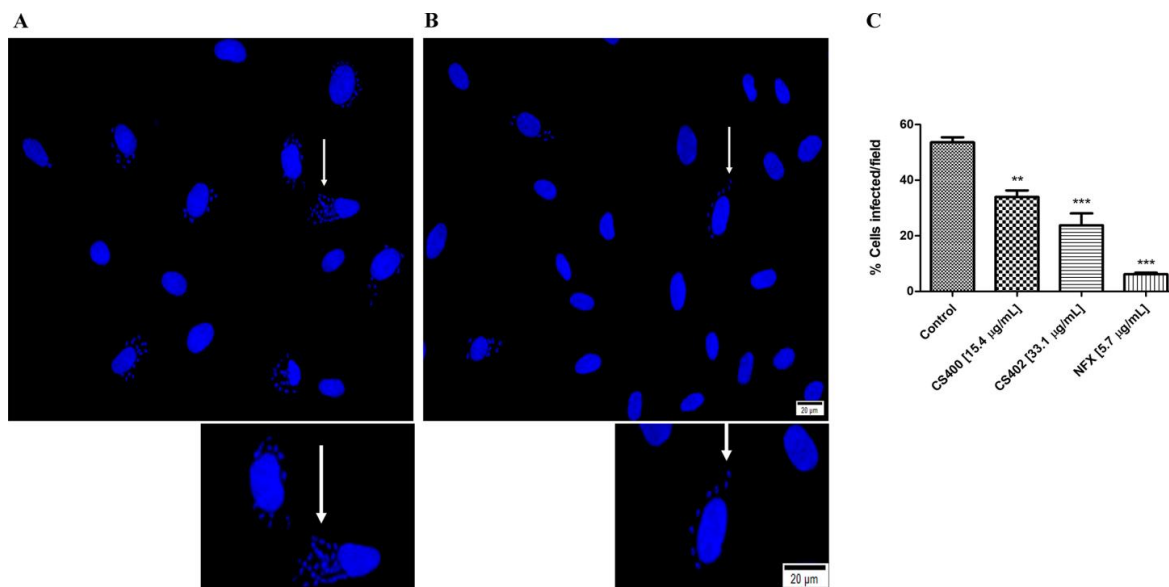


Fig. 22. Las fracciones CS400 y CS402 afectan al porcentaje de células Vero infectadas.

Se incubaron células Vero en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* durante 24 h a una MOI de 3:1 en presencia y ausencia de las fracciones CS400 y CS402. A y B (panel superior) muestran imágenes representativas de células Vero que fueron procesadas para la tinción con DAPI y que corresponden al control negativo no tratado (A), y a las células tratadas con la fracción CS402 (a 33,1 $\mu\text{g/mL}$) (B). Las flechas blancas muestran los amastigotes intracelulares en las células Vero. Barra de escala: 20 μm . C (panel inferior): cuantificación de células infectadas con *T. cruzi* y tratadas con las fracciones CS400 y CS402 a las concentraciones indicadas en la figura, NFX (5,7 $\mu\text{g/mL}$): tratamiento de referencia. Los datos representan las medias \pm SD y se analizaron mediante la prueba de comparación de Dunnet, * $p < 0,05$.

Por lo tanto, las fracciones CS400 y CS402 mostraron actividad biológica, no sólo contra los tripomastigotes (Tabla 3), sino también sobre la infección intracelular con amastigotes (Fig. 22), lo que las convierte en candidatas a análisis químico para identificar sus metabolitos secundarios.

4.11 Identificación de compuestos presentes en las fracciones CS400 y CS402 mediante CL-EM

En las Figs. 23 y 24 se muestran los cromatogramas de ion base (*base peak chromatogram*, *BPC*) adquiridos en polaridad positiva para las fracciones CSS400 y CS402 respectivamente. Las identificaciones obtenidas para algunos de los picos cromatográficos detectados en polaridad positiva se describen en las Tablas 7 y 8, en las que se indica el tiempo de retención (Tr), identificación tentativa, herramienta utilizada para la identificación y similitud.

Se observa que en ambas fracciones obtenidas a partir del EET se identificó también el ácido kaurenico al igual que en la fracción A4 obtenida a partir del EMT (Tabla 2).

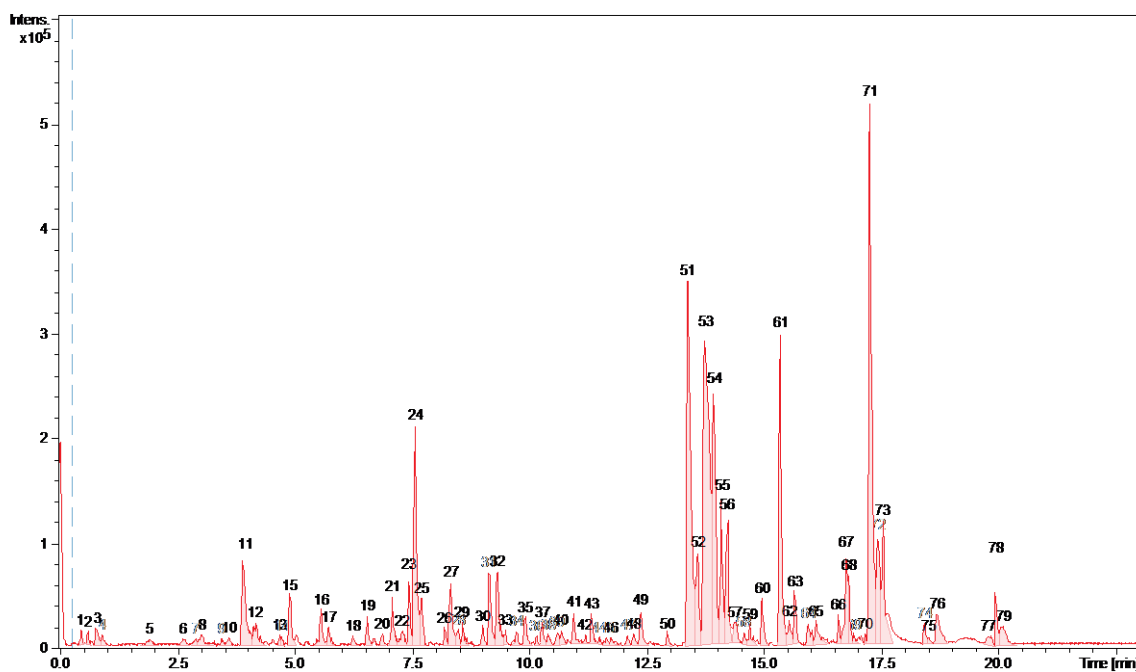


Fig. 23. Cromatograma de ion base (*base peak chromatogram*, *BPC*): polaridad positiva. CS400

Tabla 7. Identificación de compuestos en la fracción CS400 (polaridad positiva)

Pico	Tr (min)	Identificación	Herramientas	Similitud
8	3,1	Ácido feruloilquínico	GNPS	0,9299
10	3,7	Ácido ferúlico	GNPS	0,8558
11	4,0	Loliolida	GNPS	0,8565
17	5,8	Ácido diferuloilquínico	GNPS	0,9629
19	6,6	Éter metílico de escutelareína	GNPS	0,8171
23	7,5	Ácido 15-Hidroxikaurano-9(11).16-dieno-19-oico	Sirius	79,679
26	8,2	Lauroilamida propilbetaína	Sirius	100,000
30	9,0	Ácido 16-oxo-17-norkaurano-18-oico	GNPS	0,8718
31	9,2	Ácido grandiflorólico	Sirius	85,629
32	9,4	Ácido grandiflorénico	Sirius	90,667
33	9,5	Ácido grandiflorénico	Sirius	84,076
34	9,8	Ácido pimárico (<i>Usic acid</i>)	Sirius	88,966
35	9,9	Ácido ent-17-hidroxikaura-9(11).15-dieno-19-oico	Sirius	83,140
37	10,3	Ácido Kaur-15-en-17-al-19-oico	GNPS	0,907
38	10,4	Ácido 15-oxo-kaurenoico	Sirius	87,952
39	10,6	(3-hydroxi-hexadecanoil) glicina	GNPS	0,9350
40	10,9	1-Monolinolenina	Sirius	94,767
41	11,0	1-Monolinolenina	Sirius	97,024
44	11,5	Ácido grandiflorénico	GNPS	0,8672
50	13,0	1-Monolinolenina	Sirius	95,349
52	13,6	Esteviol	Sirius	81,977
53	13,8	Ácido grandiflorénico	Sirius	88,235
53	13,9	Ácido angeloxigrandiflorico	Sirius	78,037
56	14,2	Ácido kaurenoico	Sirius	87,421
57	14,4	Ácido isopimárico	Sirius	89,404
58	14,6	Monopalmitin	GNPS	0,9109
61	15,4	Feofórbido A	Metaboscape	906,6
63	15,7	Feofórbido A	Metaboscape	940,2
65	16,2	Monoestearato de glicerilo	Sirius	99,342
72	17,4	Erucilamida	GNPS	0,9569

En Metaboscape se seleccionaron finalmente aquellas identificaciones con un MS/MS *score* mayor a 800, en Sirius se seleccionaron aquellas identificaciones con un porcentaje de similitud mayor a 80% y en GNPS se seleccionaron aquellas identificaciones con un coseno de similitud mayor a 0.8000.

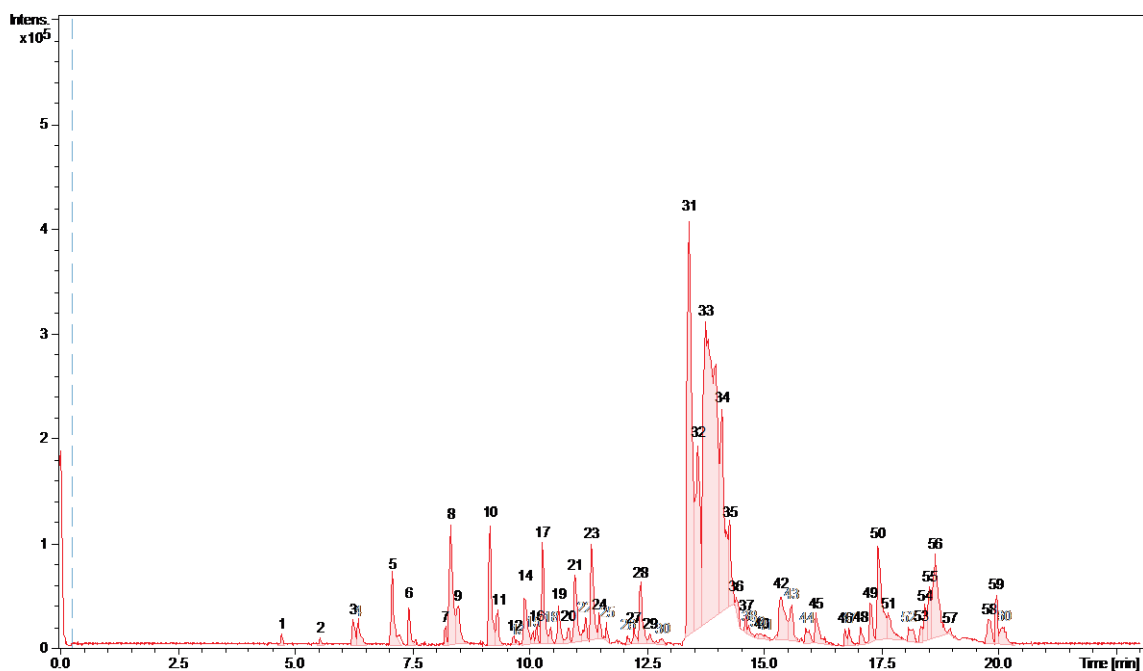


Fig. 24. Cromatograma de ion base (*base peak chromatogram, BPC*): polaridad positiva. CS402

Tabla 8. Identificación de compuestos en la fracción FCS402 (polaridad positiva).

Pico	Tr	Identificación	Herramientas	Similitud
6	7,5	Ácido 15-Hidroxi-kaurano-9(11).16-dieno-19-oico	Sirius	80,0
8	8,4	Ftalato de dietilo	GNPS	0,9956
11	9,4	Ácido grandiflorénico	GNPS	0,8979
31	13,4	Ácido grandiflorénico	Metaboscape	867,2
32	13,6	Ácido grandiflorénico	Sirius	88,0
33	13,8	Ácido grandiflorénico	Sirius	87,097
35	14,2	Ácido kaurenoico	Metaboscape	813,9
36	14,4	Ácido pimárico	GNPS	0,8862
39	14,9	9-oxooctadeca-10.12-dienoato de etilo	Sirius	89,189
42	15,4	Kaurano	Metaboscape	930,5
43	15,6	Kaurano	GNPS	0,929
44	15,9	Lupa-20(29).21-dien-3-ol	Sirius	88,16
45	16,3	Monoestearato de glicerilo	Sirius	99,342
46	16,7	Ester etílico del ácido linolénico	GNPS	0,8786
50	17,4	Erucilamida	Sirius	99,083
56	18,7	Lupa-18.21-dien-3-yl acetato	Sirius	87,63

En Metaboscape se seleccionaron finalmente aquellas identificaciones con un MS/MS *score* mayor a 800, en Sirius se seleccionaron aquellas identificaciones con un porcentaje de similitud mayor a 80% y en GNPS se seleccionaron aquellas identificaciones con un coseno de similitud mayor a 0.8000.

Los cromatogramas de ion base adquiridos en polaridad negativa para ambas fracciones, se encuentran en los Anexos 2 y 4 al final de esta tesis, y así mismo las tablas que corresponden a la identificación de todos los picos cromatográficos detectados en polaridad negativa (Anexos 3 y 5), y en polaridad positiva (Anexos 6 y 7) con mayor información como el intervalo de elución (min), m/z experimental, fórmula generada a partir del m/z experimental, m/z teórico generado a partir de la fórmula, error relativo en ppm entre m/z experimental y m/z teórico, especie detectada, y algunas señales m/z no identificadas para las que se proporcionó solamente la fórmula más probable.

4.12 Identificación y cuantificación de AK mediante CLAE-DAD

La Fig. 25 muestra el cromatograma representativo de la identificación por CLAE-DAD del AK, en el que se observa un pico coincidente con el estándar del compuesto, lo que sugiere la presencia de esta molécula en la fracción CS402.

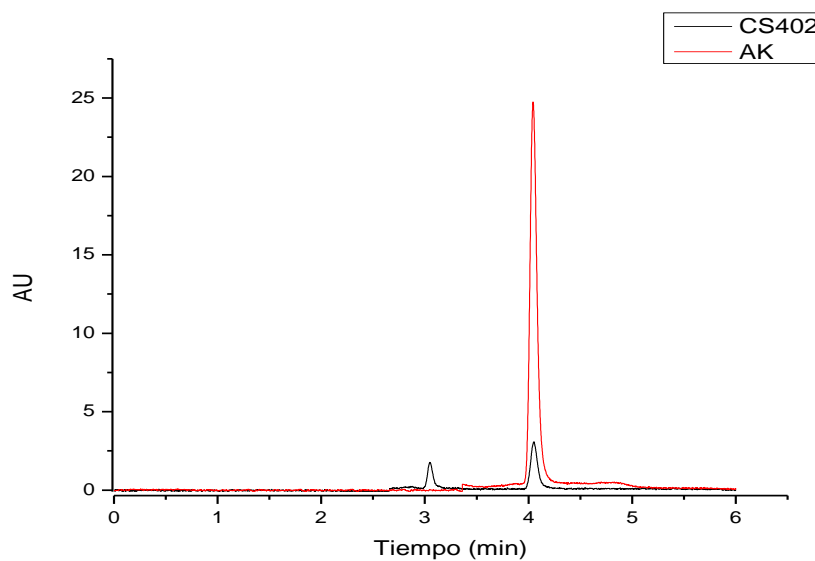


Fig. 25. Cromatogramas del AK (color rojo) y de la fracción CS402 (color negro) a 210 nm

UA: Unidades de Absorbancia; Tiempo (min): Tiempo expresado en minutos. La separación se realizó con una fase móvil isocrática de acetonitrilo:agua 85:15 v/v a una longitud de onda de 210 nm usando una columna C18 encapsada de 100 x 4.6 mm.

En la Tabla 9 se detallan las concentraciones de AK, su tiempo de retención, las áreas de los picos y la longitud de onda de máxima y en la Fig. 26 se muestra la curva de calibración del método de cuantificación, a partir de la cual se determinó la cantidad de AK presente por mg de fracción. Se estimó un equivalente a $203 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($20,3 \pm 0,6 \%$) de AK en la fracción CS402.

Tabla 9. Cuantificación de AK en la fracción CS402

AK [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Tiempo de retención (min)	Área del pico	λ máx
0,0	4,1	$15,9 \pm 0,2$	210 nm
0,8		$23,7 \pm 0,7$	
2,5		$34,0 \pm 0,5$	
5,0		$56,0 \pm 0,5$	

λ máx: Longitud de onda de máxima absorción. 210 nm: Doscientos diez nanómetros.

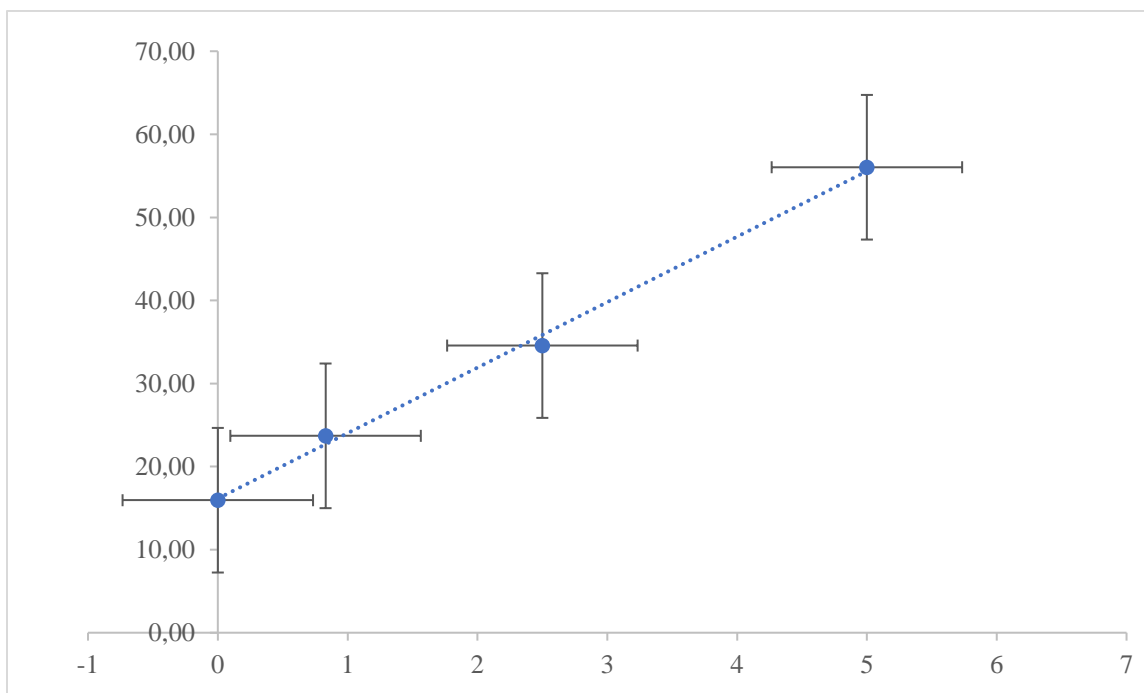


Fig. 26. Curva de calibración del AK mediante el método de adición de estándar.

La curva se preparó con 0,0-5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AK estándar ($y = 7,866x + 16,12$, $R^2 = 0,9955$). Instrumento: *Agilent Technologies 1260 LC Infinity*. Longitud de onda de detección: 210 nm. Fase móvil isocrática: acetonitrilo: agua (85:15).

4.13 Efecto del AK sobre tripomastigotes de *T. cruzi*

Teniendo en cuenta que en este estudio se identificó al AK como el compuesto mayoritario de ambos extractos, se evaluó también su actividad sobre la cepa parasitaria Dm28. Se observó que el AK presentó actividad tripanocida contra tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28 con un valor de CI_{50} correspondiente a $17,3 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ y un índice de selectividad de 3,5 (Tabla 3).

4.14 Determinación del estado oxidativo en tripomastigotes de *T. cruzi*

Un mecanismo tripanocida frecuente implica la inducción de estrés oxidativo, como el reportado para varios compuestos nitroheterocíclicos, incluyendo el nifurtimox y los derivados de la nitrosemicarbazona (30)(74). Por lo tanto, se evaluó la capacidad de las fracciones tripanocidas para generar ROS. Los resultados mostraron que el AK no indujo la generación de ROS en el parásito ni mostró actividad antioxidante. Similarmente, el AK tampoco indujo un entorno antioxidante en los macrófagos infectados por *T. cruzi* en otro estudio (44). Por lo tanto, el modo de acción tripanocida del AK no está directamente relacionado con la generación de ROS. Además, las fracciones CS400 y CS402 tampoco indujeron la producción de ROS en los tripomastigotes. Sin embargo, la relación de área de las fracciones fue similar e inferior a 1, lo que indica una ligera actividad antioxidante (Fig. 27) que podría atribuirse, al menos parcialmente, a compuestos fenólicos presentes en las fracciones CS400 y CS402. Por lo tanto, se buscó la presencia de polifenoles que pudieran estar relacionados con la actividad antioxidante observada.

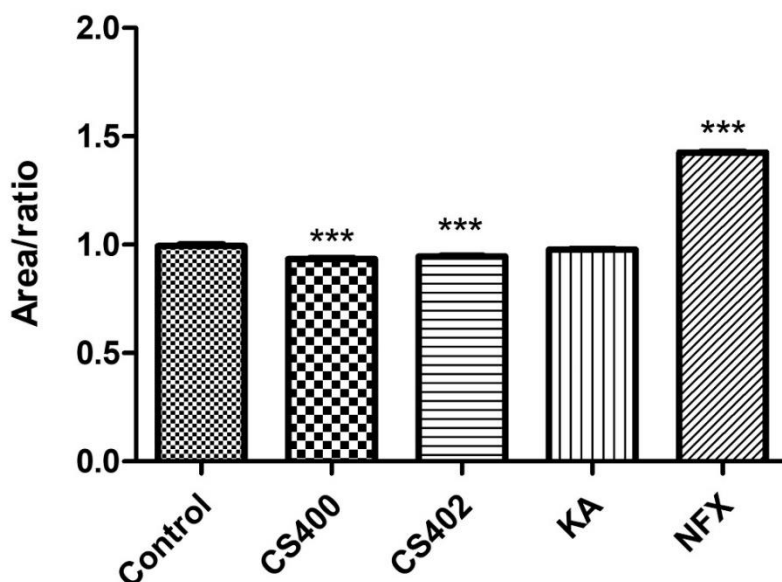


Fig. 27. Estado oxidativo de los tripomastigotes de *T. cruzi* tratados con las fracciones CS400 y CS402 del EET proveniente de las hojas de *C. santamartensis*.

Se incubaron $1,5 \times 10^6$ tripomastigotes/mL con DCFH2-DA durante 15 min a 28 °C, y con 15,4 µg/mL de CS400, 33,1 µg/mL de CS402 y 17,3 µg/mL de AK durante 24 h. Se registró la fluorescencia (excitación: 488 nm, emisión: 528 nm) durante 40 min. El área bajo la curva de fluorescencia relativa se normalizó con el control. Los resultados son la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. * $P < 0,05$ a partir de un ANOVA y una prueba de comparación de Dunnet. KA: ácido kaurenoico; NFX: nifurtimox.

4.15 Identificación de compuestos fenólicos en fracciones derivadas del EET

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo amplio y diversificado de metabolitos secundarios que se encuentran principalmente en las plantas y tienen interesantes propiedades, como bioactividades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas, antimicrobianas (79) y antiparasitarias (80). Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos están formados por un núcleo estructural basado en un grupo hidroxilo unido directamente a un anillo bencénico aromático, lo que les permite capturar radicales libres, ROS, y quelar iones metálicos (81). Por lo tanto, al encontrar la presencia de estos compuestos en las fracciones provenientes del EET, podríamos relacionarlo con la actividad antioxidante observada en los ensayos biológicos previos.

Los resultados de identificación de compuestos fenólicos en las fracciones CS400 y CS402 muestran la presencia de quince compuestos fenólicos (Tabla 10).

Tabla 10. Compuestos químicos identificados por HPLC-MS/MS en las fracciones CS400 y CS402.

Compuestos	TR (min)	[M-H]	MS/MS
Ácido gálico *	0,93	168,9	124,9
Ácido siríngico *	4,41	197,0	181,9
Ácido ferúlico	5,77	192,9	134,0
Ácido clorogénico	3,78	353,1	191,0
Ácido cafeico	3,95	178,9	135,0
Ácido cumárico *	5,16	162,9	119,0
Ácido 3-HBenzoico	6,23	137,0	92,9
Rutina*	5,80	609,0	299,8
Quercetina*	8,32	301,0	150,9
Ácido abscísico	7,85	263,1	152,9
Canferol*	9,61	285,0	184,9
Apigenina	9,30	269,0	117,0
Quercitrina	7,03	447,0	299,9
Ácido criptoclorogénico	3,58	353,0	173,0
Miricetina	6,97	316,9	150,9

TR (min): tiempo de retención (minutos); [M-H] -: Análisis molecular realizado en modo de iones negativos.

*Compuestos identificados en la fracción CS400 pero no en la fracción CS402.

4.16 Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la movilidad de calcio intracelular (Ca^{+2}) en tripomastigotes

Para investigar si el EET y las fracciones CS400 y CS402 afectan el funcionamiento de la mitocondria como un posible mecanismo de acción tripanocida, se determinó el cambio del potencial de membrana mitocondrial, a través de la incorporación de la sonda fluorescente TMRE en parásitos expuestos a distintas concentraciones de las fracciones y del AK. Los resultados mostraron que ambas fracciones y el AK indujeron despolarización del potencial de la membrana mitocondrial (Fig. 28A). Además, la fracción CS402 aumentó el calcio intracelular (Fig. 28B), lo que se correlaciona con la alteración del $\Delta\Psi_m$.

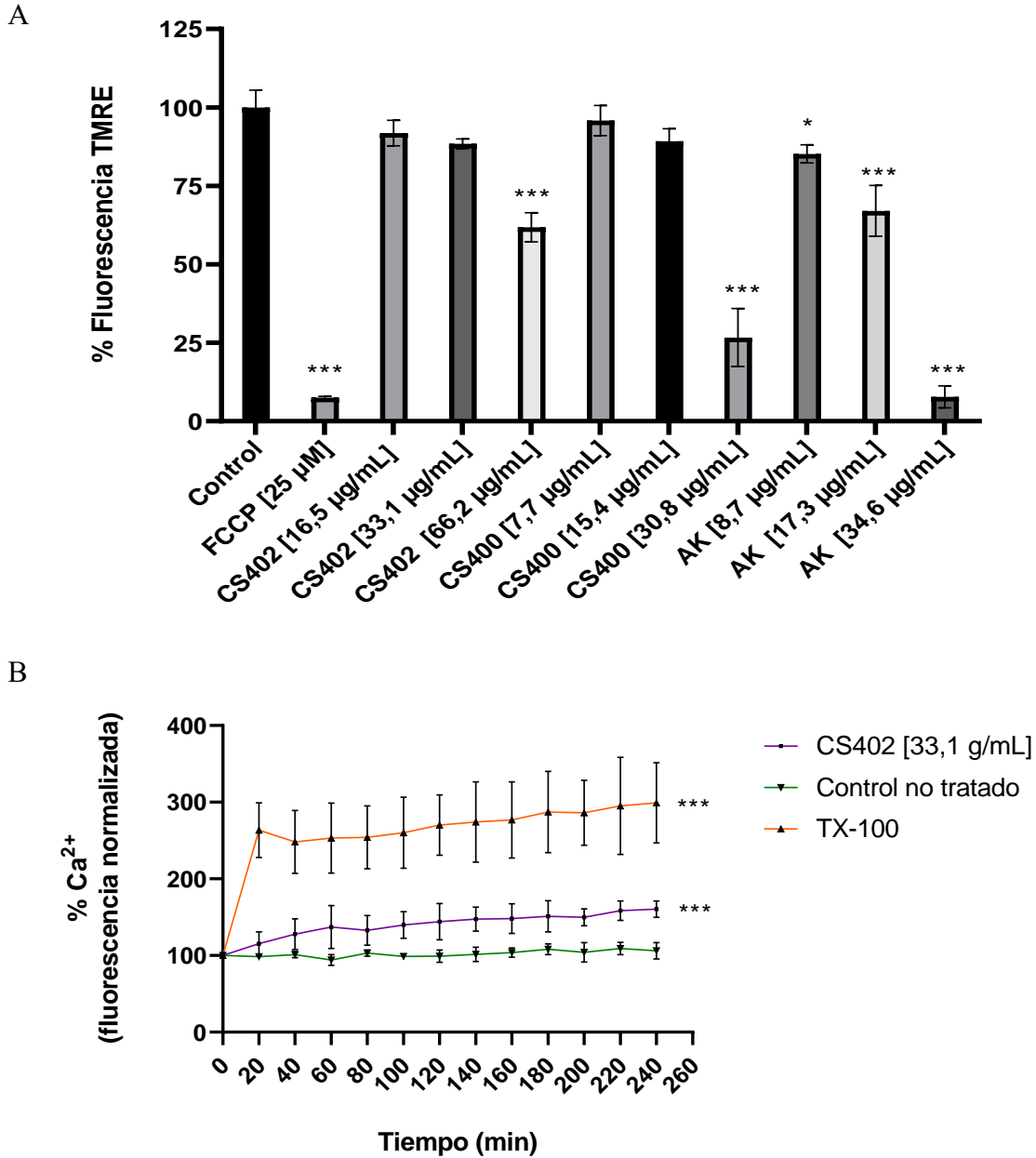


Fig. 28. Efecto de las fracciones CS400 y CS402 y del AK sobre el potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi* y los niveles de calcio intracelular.

A) Los tripanosomas fueron expuestos a cianuro de carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), CS400, CS402 o AK durante 40 min. El desacoplador FCCP se utilizó como control positivo. Los valores representan las medias \pm desviaciones estándar de determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ en comparación con el control no tratado. **B)** Evaluación de los niveles de Ca^{2+} en tripomastigotes de *T. cruzi* tratados con la fracción CS402 (33,1 $\mu\text{g/mL}$) durante 4 h. La fluorescencia del colorante Fluo- 4 AM se monitorizó espectrofluorimétricamente (excitación 485 nm y emisión 535 nm). Los tripomastigotes no tratados y los tratados con TX-100 al 0,5% se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. La fluorescencia se presenta como el porcentaje relativo al tiempo 0 min (100%). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. *** $p < 0.0001$.

5 Discusión

Este es el primer estudio que combina la identificación de compuestos químicos, con la evaluación de la actividad tripanocida de extractos alcohólicos y sus fracciones, provenientes de las hojas de *C. santamartensis*, contra las distintas formas de *T. cruzi*.

En uno de los procesos de extracción se utilizó metanol para obtener la totalidad de los metabolitos presentes en el material vegetal, ya que este solvente permite extraer compuestos con características no polares, medianamente polares y polares (36)(82). La extracción con metanol es importante en este estudio ya que, permite por primera vez estudiar la composición de las hojas de *C. santamartensis*.

Es necesario señalar que los extractos obtenidos se secaron para eliminar el solvente; sin embargo, la actividad tripanocida observada con este extracto podría atribuirse a la presencia de trazas de metanol, dada la extrema toxicidad de este solvente (78)(83). Por lo tanto, el extracto etanólico fue seleccionado para realizar el fraccionamiento biodirigido, teniendo en cuenta que, tanto el metanol como el etanol tienen un poder extractivo similar (84). Los resultados presentados en este trabajo señalan que el AK es el componente mayoritario de las hojas de *C. santamartensis*, lo que coincide con otros reportes donde este diterpeno también es mayoritario en las partes aéreas de otras asteráceas como *Wedelia paludosa* ($0,85 \pm 0,8 \%$) (85) o en las semillas de *Xylopia frutescens* ($3,16 \pm 0,9 \%$) (86).

El AK es un diterpeno que ha sido aislado de especies de plantas (44), y que presenta actividad tripanocida, leishmanicida, inmunosupresora, inductora de apoptosis, antiinflamatoria y antibacteriana (56)(87)(88)(89)(90). Sin embargo, su mecanismo de acción tripanocida aún no se ha informado. Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar y proponer su potencial blanco en *T. cruzi*, y/o sugerir un mecanismo de muerte parasitaria.

La viabilidad celular de los parásitos fue evaluada por dos métodos diferentes, y aunque ambos convergieron en resultados que apuntan a las fracciones con mayor actividad tripanocida, se observó diferencias entre los valores de CI_{50} determinados por ambos métodos, coincidiendo con lo reportado en otros trabajos (91). Esta diferencia puede deberse

a los fundamentos de cada técnica, ya que MTT es un método indirecto basado en la reducción del tetrazolio, principalmente por la acción de las reductasas mitocondriales. Así, si las células son metabólicamente activas, reducirán el reactivo a formazán proporcionalmente. En consecuencia, la disminución de la viabilidad observada no implica necesariamente la muerte de la célula, sino que podría atribuirse, alternativamente, a una reducción metabólica general (91). En contraste, la sonda Zombi es un colorante fluorescente y reactivo a las aminas, que es permeable solo cuando la membrana plasmática está comprometida. Por lo tanto, se puede utilizar para diferenciar el estado vivo frente al estado muerto de las células (92).

Al comparar los valores de CI_{50} obtenidos en el presente trabajo con los valores reportados en otros estudios, se observa que la actividad de las fracciones CS400 y CS402 está dentro de un rango de actividad muy bueno (Tabla 9). Por ejemplo, la actividad del extracto de *Larnax sachapapa* y *Solanum psychotrioides* (93) son las más potentes dentro del grupo seleccionado, pero la actividad de la fracción CS400 es al menos equivalente al de *Hieronyma antioquensis* y *Solanum nematorhachis* y superior a la de otras plantas del género *Copaifera* (94). Considerando la clasificación arbitraria de intensidad de la actividad, propuesta por De Moura y cols., donde la actividad alta ocurre a valores de $CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$, significativa: 15-30 $\mu\text{g/mL}$, moderada: 30-60 $\mu\text{g/mL}$, débil: 60-100 $\mu\text{g/mL}$ y sin actividad ($>100 \mu\text{g/mL}$) (73); entonces, la actividad de la fracción CS400 puede considerarse significativa y la de CS402 moderada.

Tabla 11. Actividad tripanocida de extractos alcohólicos obtenidos de diferentes especies vegetales

Especie y familia (Extractos)	CI_{50} Tripomastigote ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa de parásitos
<i>Larnax sachapapa</i> (Solanaceae) (93)	$2,0 \pm 4,1$	HA
<i>Solanum psychotrioides</i> (Solanaceae) (93)	$5,47 \pm 0,8$	HA
<i>Eugenia dysenterica</i> (Myrtaceae) (95)	$9,5 \pm 3$	Y
<i>Solanum nematorhachis</i> (Solanaceae) (93)	$11,4 \pm 3,6$	HA
<i>Hieronyma antioquensis</i> (Phyllanthaceae) (93)	$11,48 \pm 2,8$	HA
<i>Desmopsis panamensis</i> (Annonaceae) (93)	$42,1 \pm 10,9$	HA

<i>Copaifera martii</i> (Fabaceae) (94)	97,5 ± 3,5	Y
<i>Copaifera officinalis</i> (Fabaceae) (94)	110,0 ± 14,1	Y
<i>Copaifera langsdorfii</i> (Fabaceae) (94)	175,0 ± 7,0	Y
<i>Copaifera paupera</i> (Fabaceae) (94)	182,5 ± 10,6	Y
<i>Copaifera cearensis</i> (Fabaceae) (94)	210,0 ± 14,1	Y
<i>Copaifera lucens</i> (Fabaceae) (94)	215,0 ± 21,2	Y
<i>Copaifera multijuga</i> (Fabaceae) (94)	242,5 ± 53,0	Y
<i>Copaifera reticulata</i> (Fabaceae) (94)	285,0 ± 7,0	Y
<i>Castanedia santamartensis</i> (Asteraceae) (Fracción CS400)	15,4 ± 3,1	Dm28
<i>Castanedia santamartensis</i> (Asteraceae) (Fracción CS402)	33,1 ± 1,5	Dm28
<i>Castanedia santamartensis</i> (Asteraceae) EET	63,9 ± 0,3	Dm28

En este estudio, no solo se evaluó la actividad biológica sobre tripomastigotes, sino también sobre amastigotes, ya que, ambas son las formas parasitarias de mayor importancia en el ciclo de infección y replicación en mamíferos (96). Aunque la mayoría de los extractos o compuestos con potencial actividad tripanocida se ensayan sobre la forma epimastigote, ésta es la que se encuentra en el vector, y no se considera necesariamente infectiva (27). El estudio del efecto sobre la forma tripomastigote podría, eventualmente, servir como una aproximación *in vitro* a la fase aguda de la enfermedad, mientras que la evaluación del efecto sobre las formas amastigotas podría, también eventualmente, aproximarse al contexto crónico (74).

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, las dos fracciones con mayor actividad tripanocida sobre tripomastigotes y amastigotes, CS400 y CS402 fueron seleccionadas para realizar estudios químicos de identificación de compuestos, dentro de los que se destacó una serie de compuestos fenólicos que poseen conjuntamente actividad tripanocida y antioxidante, informadas anteriormente en otras especies de plantas. Estos compuestos corresponden al ácido gálico (97)(98)(99), quercetina (100)(101), canferol (102)(101), miricetina (103)(104), ácido ferúlico (105)(106), ácido cafeico (107)(108) y ácido cumárico (109)(110) (Tabla 10). Lo que también se asocia con lo informado en la literatura sobre interacciones entre moléculas antioxidantes y compuestos con actividad tripanocida (111)(33). Sin embargo, la fracción CS402 carece de algunos compuestos fenólicos presentes en la fracción CS400, como el ácido gálico, el ácido cumárico y el canferol (Tabla 10), lo

que podría explicar la disminución de la actividad tripanocida al separarse los compuestos presentes en esta última fracción.

Se han sugerido mecanismos de acción de muerte parasitaria para algunos de estos fenoles. Por ejemplo, se ha postulado que el mecanismo de acción de la quercetina y la miricetina puede interrumpir la función mitocondrial en *T. cruzi*, y muy probablemente inhibir diferentes enzimas, incluyendo proteínas de *shock*, topoisomerasas y quinasas, entre otras (112). Un estudio de acoplamiento molecular (*docking*) propone que los ésteres derivados del ácido *p*-cumárico actuarían sobre *T. cruzi* a través de dos mecanismos, bien por unión a las aldo-ceto-reductasas (AKR) o bien por la inhibición de la cruzaína (CZ) que es una de las enzimas clave del desarrollo de *T. cruzi* (109). Por otro lado, epimastigotes de *T. cruzi* tratados con acetato de canferol y acetato de quercetina presentaron daños severos en su ultraestructura, y estos compuestos cambiaron la excreción de metabolitos finales, afectando principalmente la excreción de acetato y succinato, posiblemente influyendo directamente en ciertas enzimas o en su síntesis (113). Por otra parte, el ácido gálico inhibe significativamente el crecimiento de *Trypanosoma brucei* reduciendo significativamente el contenido de hierro intracelular en este parásito (114). No obstante, otros estudios demostraron que el ácido gálico no es tóxico para los epimastigotes de *T. cruzi* (115), aunque su esterificación (dando lugar a ésteres de galato con diferentes longitudes de cadena lateral) dio lugar a compuestos con un fuerte potencial tripanocida, probablemente por un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial e interferencia en la biosíntesis del ergosterol en los parásitos (115).

También se identificaron compuestos terpénicos en las fracciones CS400 y CS402 con actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, y anticancerígenas previamente informadas. Estos son: loliolida, ácido grandiflorénico, ácido grandiflorólico, ácido pimárico, ácido isopimárico, ácido 15-oxo-kaurenoico y kaurano (Tablas 7 y 8). Así mismo, se identificaron flavonoides, ésteres y derivados de clorofila, entre otros (Tablas 7 y 8), que han sido previamente identificados en distintas especies de la familia Asteraceae, entre otras, como se describe a continuación para la mayoría de los compuestos presentes en las Tablas 7 y 8.

La loliolida, una hidroxilactona monoterpenoide (116) presente en plantas superiores, algas de agua dulce (117) y en algas marinas (118), fue identificada como metabolito secundario

en fracciones con actividad tripanocida, provenientes de *Centroceras clavulatum* (Ceramiaceae) (119). Se ha descrito además su actividad antioxidante (120), efecto protector celular (120), actividad antiinflamatoria, antienvjecimiento, y presenta efectos antiapoptosis y anti escaras en queratinocitos humanos (117). Por su parte, el ácido grandiflorénico es uno de los principales diterpenos kauránicos que se encuentran en diferentes partes de *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae) (121). Tiene varias actividades biológicas, especialmente contra tripomastigotes de *T. cruzi*, ocasionando cambios morfológicos y ultraestructurales en los parásitos, acumulación de gotas de lípidos, presencia de vacuolas autofágicas, exposición de fosfatidilserina, daños en la membrana plasmática y despolarización mitocondrial (121). También reduce el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por macrófago, sin mostrar citotoxicidad en líneas celulares de mamíferos, además de aumentar el TNF- α y reducir los niveles de IL-6 en macrófagos infectados (121). El ácido grandiflorólico es otro diterpeno con actividad antiinflamatoria (122), que se aisló por primera vez de *Espeletia grandiflora* (Asteraceae), una especie colombiana que crece en los alrededores de la ciudad de Bogotá (123). El ácido pimárico, corresponde a un diterpeno con actividad tripanocida sobre epimastigotes de *T. cruzi* (124) (125), y fue aislado a partir de extractos de *Pinus oocarpa* (Pinaceae) (124) y *Viguiera arenaria* (Asteraceae) (125). A su vez, el diterpeno ácido isopimárico, fue extraído de los conos inmaduros de *Pinus nigra* Arnold (Pinaceae) mediante un fraccionamiento guiado por bioensayos de un extracto crudo de hexano (126). También se identificó en un extracto de *Pinus oocarpa* (Pinaceae) y presenta actividad tripanocida sobre epimastigotes de *T. cruzi* (124). El ácido 15-oxo-kaurenico o ácido ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oico se aisló por primera vez de *Espeletia grandiflora* (Asteraceae) (123). Es un diterpeno identificado como el principal compuesto responsable de la actividad citotóxica del extracto de *Xylopia aethiopica* (Annonaceae) contra un panel de líneas celulares cancerosas (127), y se ha descrito su efecto proapoptótico en la línea celular epitelial del carcinoma de próstata humano PC-3 (123). Por lo tanto, puede ser un compuesto líder prometedor para nuevas estrategias quimiopreventivas, solo o en combinación con agentes quimioterapéuticos tradicionales para superar la resistencia a los fármacos en las células tumorales (123). El esteviol es precursor de varios glucósidos diterpénicos, y se puede sintetizar a partir de ácido ent-kaurénico (128). El kaurano corresponde a un diterpeno precursor fundamental de los terpenoides y sus

derivados han sido evaluados contra formas parasitarias de *T. cruzi*, con resultados prometedores (129)(130).

El ácido diferuloilquínico pertenece a la familia de los ácidos clorogénicos, una familia de ésteres formados entre el ácido quínico y ciertos ácidos trans-cinámicos, principalmente el cafeico, el *p*-cumárico y el ferúlico (131). Han sido aislados de especies de plantas de la familia Asteraceae (132), y muestran una variedad de actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatoria, anti VIH, anti VHB, e inhibición de la mutagénesis y carcinogénesis. Por lo tanto, los ácidos clorogénicos se consideran beneficiosos para la salud humana (132).

El éter metílico de escutellareína es un flavonoide (132) que ha sido identificada en algas (133). Así mismo, el ácido feruloilquínico (*Feruloyl quinic acid*) es un flavonoide (134) identificado en *Lannea schweinfurthii* (Anacardiaceae), una especie de planta medicinal muy valiosa entre los diferentes grupos étnicos del África tropical (135), y también se identificó en un extracto de *Turraea fischeri* (Meliaceae), que mostró una importante actividad antioxidante (136).

1-Monolinolenina es un monoglicérido insaturado (137). Presenta actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (138). Ha sido identificado en extractos de hojas de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae), cuyas propiedades atribuidas comprenden la regulación hipotensiva, hipoglucemiante, antimicrobiana y anticonceptiva (137). También se caracterizó en las hojas de *Premna microphylla* Turcz, un arbusto distribuido principalmente en el sur de China y cuyas hojas se aplican ampliamente para tratar la piel, la malaria, la disentería, los dolores de cabeza y las mordeduras de víbora (139). Así mismo, se identificó en una fracción de etanol de tempe, una soja fermentada indonesia producida con *Rhizopus oligosporus* (138).

El feofórbido A es un derivado de la clorofila, similar a la protoporfirina IX animal (140), con capacidad fotosensibilizadora que puede inducir efectos antiproliferativos significativos en varias líneas celulares de cáncer humano (141). Se encuentra en las especies *Scutellaria barbata* (Lamiaceae) (142), *Camellia sinensis* (Theaceae) (143) y *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae) (144), y se describió que induce la inactivación fotodinámica de tripomastigotes de *T. cruzi*, por lo que se ha propuesto su uso en los bancos de sangre para la

hemofilaxis (144). Recientemente se describió que el compuesto feofórbido A, tiene una extraordinaria actividad antiviral contra el SARS-CoV-2, impidiendo la infección de células cultivadas de mono y humanas, sin citotoxicidad apreciable, y que se dirige directamente a la partícula viral, interfiriendo en su infectividad de forma dependiente de la dosis y el tiempo, además, presenta una actividad antiviral de amplio espectro contra patógenos virales de ARN envuelto como el VHC, el Nilo Occidental y otros coronavirus, por lo que Jimenez-Aleman y cols, sugieren que puede ser considerado como un candidato potencial para la terapia antiviral contra el SARS-CoV-2 (140).

Erucilamida es una amida de ácido graso (145). Ha sido reportada como uno de los componentes principales en los aceites de hoja y cáscara de *Citrus medica* (Rutaceae), que crece ampliamente en Bangladesh. La alta concentración de erucilamida en el aceite de las hojas y de la cáscara de *Citrus medica* lo hace potencialmente útil en los medicamentos, ya que presenta fungitoxicidad (145).

El ftalato de dietilo es el éster dietílico del ácido benceno-1,2-dicarboxílico (146). Fue identificado como uno de los potenciales aleloquímicos de la hierba de corral (*Echinochloa crusgalli*) por Xuan *et al.* (147). Se usa como ingrediente en recubrimiento de aspirinas (147). Se ha informado su actividad tripanocida contra *Trypanosoma brucei brucei* (148).

El éster etílico del ácido linolénico o linolenato de etilo, es un metabolito vegetal y humano (149), identificado en extractos de semillas de *Platonia insignis* Mart (Clusiáceae) (150) y *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae) (151), que presentaron actividad leishmanicida contra promastigotes de *L. amazonensis* (150) y *L. infantum* (151). Además, es activo contra las bacterias *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguis* y el hongo *Candida albicans* (152), e inhibe la producción de óxido nítrico, prostaglandina E₂, IL-6 y TNF- α inducida por el LPS en células RAW 264.7 (153). Estos resultados indican el potencial uso terapéutico del éster etílico del ácido linolénico como agente antimicrobiano y antiinflamatorio (153).

El monoestearato de glicerilo ha sido estudiado con el fin de desarrollar nanopartículas sólidas con estructuras de matriz lipídica estables para el suministro de compuestos bioactivos, en conjunto con monopalmitato de propilenglicol y carvacrol como modelo antimicrobiano lipofílico (154). Nayak y cols. (155), prepararon nanopartículas lipídicas

altamente estables cargadas de curcuminoides para su administración parenteral en el tratamiento de la malaria. Los resultados *in vivo* mostraron que la actividad farmacodinámica de los curcuminoides atrapados en nanopartículas lipídicas se duplicó en comparación con los curcuminoides libres en el nivel de dosificación probado (155). Así mismo, el monoestearato de glicerilo es usado para mejorar la especificidad de los tratamientos para la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la tripanosomiasis africana, como una alternativa terapéutica única mediante el reposicionamiento de los medicamentos existentes y la administración dirigida de fármacos (156).

Por lo tanto, los resultados de este estudio evidencian que las fracciones con mayor actividad biológica (CS400 y CS402) contienen una amplia gama de metabolitos activos que podrían contribuir a la actividad tripanocida y/o actividad antioxidante observada en los ensayos biológicos.

En la búsqueda de un posible mecanismo de acción de las fracciones CS400 y CS402 y del compuesto mayoritario (AK), se evaluó el cambio del potencial de membrana mitocondrial en tripomastigotes de *T. cruzi*, la movilidad de Ca^{2+} y la capacidad para generar especies radicales de oxígeno dentro del parásito. Los resultados mostraron que el AK no generó ERO, ni mostró actividad antioxidante, en concordancia con el estudio de Kian y cols, donde AK no indujo ningún entorno antioxidante en macrófagos infectados por *T. cruzi* (44). De esta manera, el modo de acción tripanocida de AK no está relacionado con la generación de ERO. De igual forma, las fracciones CS400 y CS402 tampoco provocaron la producción de ERO en los tripomastigotes. Sin embargo, sí se observó una muy ligera actividad antioxidante (Fig. 24) que podría ser atribuible, al menos parcialmente, a los componentes fenólicos identificados en estas fracciones. En contraste, el AK y las fracciones CS400 y CS402 indujeron la despolarización del potencial de membrana mitocondrial (Fig. 25.A), efecto también observado previamente en promastigotes de *Leishmania amazonensis* (48). Además, la fracción CS402 aumentó el calcio intracelular (Fig. 25B), lo que se correlaciona con la alteración del $\Delta\Psi_m$. Así, tras la pérdida de $\Delta\Psi_m$, puede observarse un aumento de la permeabilidad de protones a través de la membrana interna, con la consiguiente disminución de la producción de ATP, y la liberación de citocromo c y Ca^{2+} al citosol, que a su vez puede activar las proteasas tipo caspasa, y finalmente promover la apoptosis del parásito (157). De

esta manera, es probable que el potencial mecanístico tripanocida de las fracciones CS400 y CS402 pueda estar mediado a través de la inducción de un proceso apoptótico, desencadenado por el colapso del $\Delta\Psi_m$ y la liberación de Ca^{2+} . El papel de la regulación del Ca^{2+} en la bioenergética de los tripanosomátidos es un objetivo prometedor para nuevos fármacos, ya que el Ca^{2+} es un mensajero de señalización esencial, y en los tripanosomátidos, varios mecanismos diferentes a los de las células de los mamíferos son responsables de su regulación (158). Este papel se demostró con los fármacos aprobados por la FDA amiodarona y dronedarona, que afectan a la homeostasis del Ca^{2+} en *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, lo que provoca la muerte del parásito (159). En el presente estudio, la fracción CS402 provocó un aumento de los niveles de Ca^{2+} tras el tratamiento de los parásitos, como se observó por el aumento de la fluorescencia con la sonda Fluo-4 AM (Fig. 25B). Cabe resaltar que para los tripanosomátidos, el retículo endoplásmico, las mitocondrias y los acidocalcisomas desempeñan un papel esencial en la regulación del Ca^{2+} (158).

Rebai y cols, describieron la capacidad del ácido clorogénico y del ácido cafeico para disminuir el contenido de calcio intracelular en las neuronas estimuladas con glutamato lo que sugiere un efecto protector de estos dos polifenoles presentes tanto en la fracción CS400 como en la CS402 (160). Además, también se ha descrito que el ácido cafeico previene la inflamación mitocondrial inducida por el calcio, aparte de sus propiedades antioxidantes (161). Sin embargo, Kamil y cols. encontraron un aumento transitorio del calcio intracelular con los ésteres del ácido cafeico (162). Por otro lado, se ha sugerido un efecto antineoplásico de la miricetina, a través del aumento del Ca^{2+} en un modelo de células de coriocarcinoma, reduciendo su proliferación (163). Sin embargo, los flavonoides como la quercetina, la miricetina y el ácido cafeico, entre otros, parecen tener un efecto protector sobre el funcionamiento mitocondrial y también evitan el aumento del Ca^{2+} (164). Por lo tanto, el aumento observado en este experimento puede deberse a varios agentes, siendo el AK un probable candidato, pero considerando la interacción con otros componentes tripanocidas, incluidos los polifenoles y los terpenos presentes en estas fracciones.

6 Conclusiones

Este estudio muestra por primera vez la actividad tripanocida de la especie *C. santamartensis* contra varias formas de *T. cruzi*, y a su vez describe la presencia de una serie de compuestos químicos en dos extractos alcohólicos obtenidos de sus hojas, en los que se identificó al ácido kaurenico (AK) como el componente mayoritario. Sin embargo, la actividad tripanocida de las fracciones no puede atribuirse únicamente al AK, ya que también se identificaron otros compuestos con actividad tripanocida informada.

Los resultados obtenidos en esta tesis se acercan a la descripción de un mecanismo que explique la muerte parasitaria, y que está en directa relación con la despolarización del $\Delta\Psi_m$ y la movilización de Ca^{+2} en tripomastigotes por acción las fracciones CS400, CS402 proveniente del EET de las hojas de *C. santamartensis*, y por el AK. De esta manera, se comprueba la hipótesis propuesta para esta tesis.

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical desatendida, para la que se requiere nuevas moléculas activas, y los productos naturales representan una fuente inigualable para el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de agentes antiprotozoarios. En este contexto, el fraccionamiento biodirigido representa una estrategia metodológica adecuada, debido a que las fracciones obtenidas de los extractos contienen un conjunto de compuestos o metabolitos secundarios bioactivos. Por lo tanto, es interesante no sólo aislar compuestos puros, sino también obtener extractos y/o fracciones que contengan metabolitos con actividad antimicrobiana o antiparasitaria, o con efectos antioxidantes reguladores de la respuesta inmune, u otros efectos que, en conjunto, pueden constituirse en candidatos a fármacos o fitofármacos, pero que deben ser sometidos a rigurosos estudios preclínicos y clínicos. De esta forma, las fracciones CS400 y CS402 obtenidas de las hojas de *C. santamartensis*, son candidatas potenciales para seguir investigando en el desarrollo de nuevos fármacos antiprotozoarios.

7 Bibliografía

1. World Health Organization. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [Internet]. Chagas Disease Fact Sheets. 2021 [cited 2021 Oct 1]. p. 8. Available from: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1
2. Francisco AF, Jayawardhana S, Olmo F, Lewis MD, Wilkinson SR, Taylor MC, et al. Challenges in Chagas Disease Drug Development. *Molecules*. 2020;25(12):1–14.
3. Tarleton RL, Gürtler RE, Urbina JA, Ramsey J, Viotti R. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):8–13.
4. Radisic M V., Repetto SA. American trypanosomiasis (Chagas disease) in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2020;22(6):1–12.
5. Hotezid P, Bottazziid ME, Strub-Wourgaft N, Sosa-Estani S, Torrico F, Pajín L, et al. A new patient registry for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 [cited 2022 Feb 14];14(10):1–6.
6. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(5):456–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1410150>
7. Salas R. P. Epidemiología de la enfermedad de Chagas: alta mortalidad y tasa de incidencia, Región de Coquimbo. *Rev Chil infectología*. 2020;37(4):402–12.
8. Miniterio de Salud del Gobiernos de Chile. Servicio de salud O'Higgins, Chile [Internet]. Mal de Chagas, una enfermedad bajo control en Chile. 2020. Available from: <https://www.saludohiggins.cl/mal-de-chagas-una-enfermedad-bajo-control-en-chile/>
9. Bern C, Messenger LA, Whitman JD, Maguire JH. Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clin Microbiol Rev*. 2019;33(1):1–42.
10. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275–91.
11. Muñoz-Saravia SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: Epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev*. 2012;17(1):45–64.
12. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82–94.
13. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho BN. Oral transmission of Chagas Disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845–52.
14. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(2):132–8.

15. Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezos J, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: Epidemiological and clinical profile. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(7):706–12.
16. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):1–19.
17. McClean MCW, Bhattacharyya T, Mertens P, Murphy N, Gilman Q, Gustin Y, et al. A lineage-specific rapid diagnostic test (Chagas Sero K-Set) identifies Brazilian *Trypanosoma cruzi* II/V/VI reservoir hosts among diverse mammalian orders. *PLoS One*. 2020;15(4):1–13.
18. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Parasites. American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) Biology [Internet]. CDC page. 2019 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
19. Ministerio de Salud de Chile. Manual de Procedimientos para la atención de pacientes con Enfermedad de Chagas [Internet]. Plan Nacional de Control y Prevención de Enfermedad de Chagas. 2017. p. 17–8. Available from: https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2018/01/2018.01.18_ENFERMEDAD-DE-CHAGAS-2017.pdf%0Ainternal-pdf://0.0.3.219/informacion-para-equipos-de-salud-chagas.html
20. Lascano F, Altcheh J. An evaluation of nifurtimox for Chagas disease in children. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2021;9(5):139–49.
21. Altcheh J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Marson ME, et al. Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):1–10.
22. U.S. Food & Drug Administration. Drug Trials Snapshot: BENZNIDAZOLE [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 20]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshot-benznidazole>
23. Altcheh J, Castro L, Dib JC, Grossmann U, Moscatelli G. Prospective, historically controlled study to evaluate the efficacy and safety of a new paediatric formulation of nifurtimox in children aged 0 to 17 years with Chagas disease one year after treatment (CHICO). *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(1):1–18.
24. Jackson Y, Wyssa B, Chappuis F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas disease. *J Antimicrob Chemother*. 2019;75:690–1.
25. Vázquez K, Paulino M, Salas CO, Zarate-Ramos J, Brenda V, Gildardo R. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti- *Trypanosoma cruzi* Drugs. *Mini-Reviews Med Chemistry*. 2017;17(11):939–46.
26. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5022–7.

27. Müller Kratz J, Garcia Bournissen F, Forsyth CJ, Sosa-Estani S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. Vol. 11, Expert Review of Clinical Pharmacology. Taylor & Francis; 2018. 943–957 p.
28. Berenstein AJ, Falk N, Moscatelli G, Moroni S, González N, Garcia-Bournissen F, et al. Adverse events associated with nifurtimox treatment for chagas disease in children and adults. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(2).
29. Bartel LC, Montalto De Mecca M, Rodríguez De Castro C, Bietto FM, Castro JA. Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular fractions of rat mammary tissue. Hum Exp Toxicol. 2010;29(10):813–22.
30. Boiani M, Piacenza L, Hernández P, Boiani L, Cerecetto H, González M, et al. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? Biochem Pharmacol. 2010;79(12):1736–45.
31. Baker N, Alsford S, Horn D. Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. Mol Biochem Parasitol. 2011;176(1):55–7.
32. Sales PA, Molina I, Murta SMF, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(5):1289–303.
33. Maldonado E, Rojas DA, Urbina F. The Use of Antioxidants as Potential Co-Adjuvants to Treat Chronic Chagas Disease. antioxidants. 2021;10:1–27.
34. Robello C, Trochine A, Creek DJ, Faral-Tello P, Barrett MP. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5).
35. Mazzeti AL, Capelari-Oliveira P, Bahia MT, Mosqueira VCF. Review on experimental treatment strategies against *Trypanosoma cruzi*. J Exp Pharmacol. 2021;13:409–32.
36. Muschietti L V, Sülsen VP, Martino VS. Metodología empleada en el estudio de los productos naturales para el descubrimiento de fármacos con actividad tripanocida. In: Cerecetto Meyer H, González M, editors. Enfermedad de Chagas: Estrategias en la Búsqueda de nuevos medicamentos. México, DF; 2012. p. 239.
37. Lopera Valle JS, Rojas Jiménez S, Mejía Ochoa M. Actividad tripanocida de plantas latinoamericanas, una futura alternativa terapéutica para la Enfermedad de Chagas. Rev Ibero-Latinoam Parasitol. 2013;72(72):22–30.
38. Muelas-Serrano S, Le-Senne A, Fernández-Portillo C, Nogal JJ, Ochoa C, Gómez-Barrio A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(4):553–7.
39. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Ríos JL, Buschiazzi H, Zaidenberg A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. Fitoterapia. 2002;73(7–8):569–75.

40. Kayser O, Kiderlen a. F, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res.* 2003;90(SUPPL. 2):55–62.
41. Satalaya R. J, Rojas U. J, Ríos B, Grandez M, Rengifo Salgado E, Ruiz G, et al. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. *Biofarbo.* 2009;17(2):23–31.
42. Rojas J, Palacios O. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *An Fac med.* 2010;71(3):161–5.
43. Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Júnior VF, Nakamura CV. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Rep.* 2011;28(4):809.
44. Kian D, Lancheros CAC, Assolini JP, Arakawa NS, Veiga-Júnior VF, Nakamura CV, et al. Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. *Biomed Pharmacother* 2018;103 (November 2017):1294–301.
45. Coura JR, De Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(1):3–24.
46. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol.* 2007;146(4):601–20.
47. Campillo NE, Naranjo PG-, Páez JA. Presente y Futuro en el Descubrimiento de Fármacos para la Enfermedad de Chagas. 2011;34–61.
48. dos Santos AO, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, da Veiga-Júnior VF, Vataru Nakamura C. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(1):59–64.
49. Miranda MM, Panis C, da Silva SS, Macri JA, Kawakami NY, Hayashida TH, et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO Pathway. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:392918.
50. Sandjo LP, de Moraes MH, Kuete V, Kamdoun BC, Ngadjui BT, Steindel M. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2016;26(7):1772–5.
51. Lechuga GC, Borges JC, Calvet CM, de Araújo HP, Zuma AA, do Nascimento SB, et al. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2016;6(3):154–64.
52. Pelizzaro-Rocha KJ, Tiunan TS, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Diaz Filho BP, Nakamura CV. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine.* 2010;18(1):36–9.
53. Losada Galván I, Alonso-Padilla J, Cortés-Serra N, Alonso-Vega C, Gascón J, Pinazo MJ. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*

2021;19(5):547–56.

54. Bernal R, Gradstein S., Celis M. *Castanedia santamartensis* R.M.King & H.Rob. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Universidad Nacional de Colombia Bogotá. 2015 [cited 2021 Sep 29]. Available from: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
55. Carbonó-Delahoz E, Dib-Diazgranados JC. Medicinal plants used by the Cogui at Palomino river , Sierra Nevada of Santa Marta (Colombia). *Caldasia*. 2013;35(2):333–50.
56. Quintero-Pertuz H. Búsqueda de principios activos útiles contra enfermedades tropicales a partir de plantas medicinales de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Memoria de Trabajo de Fin de Máster en Enfermedades Tropicales. Curso 2015/2016. Universidad de Salamanca; 2016.
57. Quintero H, Del Olmo E, San Feliciano A. Bioevaluation of the antiparasitic potencial of five vegetal species endemic to Colombia. *Global Challenges in Neglected Tropical Diseases*. 2016;80.
58. Flórez S, Quintero H, Feliciano A. Antifungal activity of extracts and fractions of plants of traditional use in the Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. *Italo ILtin American Congress of Etnomedicina XXVI SILAE*. 2017.
59. Quintero H, López-Abán J, Del Olmo E, Muro A, Carbonó-Delahoz E, Dib-Diazgranados JC, et al. “In vitro” evaluation of the anti-helminthic potential of extracts from five Colombian plants. *Salamanca, España*; 2018. p. IPAP18.
60. Quintero H, Delporte C, del Olmo E, San Feliciano A, Carbonó-Delahoz E, Dib-Diazgranados JC, et al. Evaluación “in vitro” de la actividad antibacteriana de *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Farmacol Chile*. 2018;11(1):44.
61. Cilia-López VG, Cariño-Cortés R, Zurita-Salinas LR. Ethnopharmacology of the Asteraceae family in Mexico. *Bot Sci*. 2021;1(1):455–86.
62. Rolnik A, Olas B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3009.
63. Soković M, Skaltsa H, Ferreira ICFR. Editorial: Bioactive Phytochemicals in Asteraceae: Structure, Function, and Biological Activity. *Front Plant Sci*. 2019;10:1464.
64. Antonio CNS, Selene M de M, Elnatan B de S, Raquel O dos SF. The genus *Eupatorium* L. (Asteraceae): A review of their antimicrobial activity. *J Med Plants Res*. 2017;11(3):43–57.
65. Rolnik A, Soluch A, Kowalska I, Olas B. Antioxidant and hemostatic properties of preparations from Asteraceae family and their chemical composition – Comparative studies. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:111982.
66. Kimani NM, Matasyoh JC, Kaiser M, Brun R, Schmidt TJ. Sesquiterpene lactones

- from *Vernonia cinerascens* Sch. Bip. and their *in vitro* antitrypanosomal activity. *Molecules*. 2018;23(2):1–8.
67. Michel J, Abd Rani NZ, Husain K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. *Front Pharmacol*. 2020;11(June):1–26.
 68. Sülsen VP, Lizarraga E, Mamadalieva NZ, Lago JHG. Potential of Terpenoids and Flavonoids from Asteraceae as Anti-Inflammatory, Antitumor, and Antiparasitic Agents. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2017;2017:6–8.
 69. Wang M, Carver JJ, Phelan V V., Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):828–37.
 70. Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, Aksenov AA, Melnik A V., Meusel M, et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat Methods*. 2019;16(4):299–302.
 71. Simões-Silva MR, De Araújo JS, Peres RB, Da Silva PB, Batista MM, De Azevedo LD, et al. Repurposing strategies for Chagas disease therapy: The effect of imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2019;146(8):1006–12.
 72. Carrillo I, Droguett D, Castillo C, Liempi A, Muñoz L, Maya JD, et al. Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*. 2016;168:9–15.
 73. Campos-Estrada C, Liempi A, González-Herrera F, Lapier M, Kemmerling U, Pesce B, et al. Simvastatin and Benznidazole-Mediated Prevention of *Trypanosoma cruzi*-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(5):1–20.
 74. Salgado F, Moncada-Basualto M, Pozo-Martinez J, Liempi A, Kemmerling U, Maya J-D, et al. Chemical and biological analysis of 4-acyloxy-3-nitrocoumarins as trypanocidal agents. *Arab J Chem*. 2021;14(3):102975.
 75. Jelk J, Balmer V, Stibal D, Giannini F, Süß-Fink G, Bütikofer P, et al. Anti-parasitic dinuclear thiolato-bridged arene ruthenium complexes alter the mitochondrial ultrastructure and membrane potential in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Exp Parasitol*. 2019;205(June):107753.
 76. Günther H. The proton magnetic resonance spectra of organic molecules - Chemical shift and spin - spin coupling. In: Wiley John & Sons, editor. *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts and applications in chemistry*. 3rd ed. Weinheim, Germany; 2013.
 77. Rojas de A, Gonzales M, Cerecetto H, Mahler C, Moreira L, Gambino D. Enfermedad de Chagas: Estrategia en la búsqueda de nuevos medicamentos. Cerecetto M, Gonzalez M, editors. México; 2012. 238 p.
 78. Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of plant secondary metabolites. *Methods Mol Biol*. 2012;20(13):330–6.

79. Shahidi F, Yeo JD. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1–16.
80. Tullius Scotti M, Scotti L, Ishiki H, Fávaro Ribeiro F, Marques Duarte da Cruz R, Pedrosa de Oliveira M, et al. Natural Products as a Source for Antileishmanial and Antitrypanosomal Agents. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2016;19(7):537–53.
81. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol Biochem.* 2019;144(September):135–43.
82. Truong DH, Nguyen DH, Ta NTA, Bui AV, Do TH, Nguyen HC. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *J Food Qual.* 2019;2019.
83. Joshi DR, Adhikari N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *J Pharm Res Int.* 2019;28(3):11.
84. Duan L, Dou LL, Guo L, Li P, Liu EH. Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustain Chem Eng.* 2016;4(4):2405–11.
85. Batista R, Braga FC, Oliveira AB. Quantitative determination by HPLC of entkaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. *Rev Bras Farmacogn.* 2005;15(2):119–25.
86. De Melo AC, Cota BB, De Oliveira AB, Braga FC. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. *Fitoterapia.* 2001;72(1):40–5.
87. Ueno AK, Barcellos AF, Costa-Silva TA, Mesquita JT, Ferreira DD, Tempone AG, et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). *Fitoterapia.* 2018;125(October 2017):55–8.
88. Da Silva B, Gonçalves M, Tomiotto-Pellissier F, Menegazzo M, Assolini JP, Machado A, et al. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. *Phytomedicine.* 2018;46(15):11–20.
89. Matos DM de, Viana MR, Alvim MC de O, Carvalho LSA de, Leite LHR, Da Silva Filho AA, et al. Pharmacokinetic profile and oral bioavailability of Kaurenoic acid from *Copaifera* spp. in rats. *Fitoterapia.* 2018;128 (December 2017):142–7.
90. Izumi E, Ueda-Nakamura T, Veiga VF, Pinto AC, Nakamura CV. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. *J Med Chem.* 2012;55(7):2994–3001.
91. Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193–203.
92. McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.5.
93. Valencia L, Muñoz DL, Robledo SM, Echeverri F. Actividad tripanocida y citotóxica

- de extractos de plantas Colombianas. *Biomédica*. 2011;31:552–9.
94. Izumi E, Ueda-Nakamura T, Veiga-Júnior VF, Nakamura C V. Toxicity of oleoresins from the genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: A Comparative Study. *Planta Med*. 2013;79(11):952–8.
 95. Santos LS, Fernandes Alves CC, Borges Estevam EB, Gomes Martins CH, de Souza Silva T, Rodrigues Esperandim V, et al. Chemical Composition, in vitro Trypanocidal and Antibacterial Activities of the Essential Oil from the Dried Leaves of *Eugenia dysenterica* DC from Brazil. *J Essent Oil Bear Plants*. 2019;22(2):347–55.
 96. Liu Z, Ulrich vonBargen R, McCall LI. Central role of metabolism in *Trypanosoma cruzi* tropism and Chagas disease pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2021;63(Cd):204–9.
 97. Koide T, Nose M, Inoue M, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. *Planta Med*. 1998;64(1):27–30.
 98. AL Zahrani NA, El-Shishtawy RM, Asiri AM. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *Eur J Med Chem*. 2020;204(112609):1–4.
 99. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv*. 2015;5(35):27540–57.
 100. Jordão CO, Vichnewski W, Petto De Souza GE, Albuquerque S, Callegari Lopes JL. Trypanocidal Activity of Chemical Constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. *Phyther Res*. 2004;18(4):332–4.
 101. Tian C, Liu X, Chang Y, Wang R, Lv T, Cui C, et al. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African J Bot*. 2021;137:257–64.
 102. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1352–64.
 103. Faria RX, Souza ALA, Lima B, Tietbohl LAC, Fernandes CP, Amaral RR, et al. Plants of *Brazilian restingas* with tripanocide activity against *Trypanosoma cruzi* strains. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(6):473–83.
 104. Barzegar A. Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell- free and cell-based systems. *Mol Biol Res Commun*. 2016;5(2):87–95.
 105. Moraes Neto RN, Setúbal RFB, Higino TMMI, Brelaz-De-Castro MCA, Da Silva LCN, Dos Santos Aliança AS. Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and chagas disease. *Front Pharmacol*. 2019;10(MAY):1–20.
 106. Yang J, Chen J, Hao Y, Liu Y. Identification of the DPPH radical scavenging reaction adducts of ferulic acid and sinapic acid and their structure-antioxidant activity relationship. *Lwt*. 2021;146 (December 2020):111411.

107. Grecco SDS, Félix MJP, Lago JHG, Pinto ÉG, Tempone AG, Romoff P, et al. Anti-trypanosomal phenolic derivatives from *Baccharis uncinella*. *Nat Prod Commun*. 2014;9(2):171–3.
108. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 2006;217(2–3):213–20.
109. Lopes SP, Castillo YP, Monteiro ML, de Menezes RRPPB, Almeida RN, Martins AMC, et al. Trypanocidal mechanism of action and in silico studies of p-coumaric acid derivatives. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):1–21.
110. Masek A, Chrzescijanska E, Latos M. Determination of antioxidant activity of caffeic acid and p-coumaric acid by using electrochemical and spectrophotometric assays. *Int J Electrochem Sci*. 2016;11(12):10644–58.
111. Sánchez-Villamil JP, Bautista-Niño PK, Serrano NC, Rincon MY, Garg NJ. Potential Role of Antioxidants as Adjunctive Therapy in Chagas Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1–13.
112. Larit F, Elokely KM, Nael MA, Benyahia S, Le F, Cutler SJ, et al. Proposed Mechanism for the Antitrypanosomal Activity of quercetin and myricetin Isolated from *Hypericum afrum* Lam.: Phytochemistry, *In vitro* Testing and Modeling Studies. *Molecules*. 2021;26(04):1009.
113. Samira BC, Manuel SM, Díaz JG, Rosales MJ, Huertas O, Ramon GS, et al. Activity and mode of action of flavonoids compounds against intracellular and extracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Open Nat Prod J*. 2011;4:1–7.
114. Amisigo CM, Antwi CA, Adjimani JP, Gwira TM. *In vitro* anti-trypanosomal effects of selected phenolic acids on *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*. 2019;14(5):1–17.
115. Andréo R, Regasini LO, Petrônio MS, Chiari-Andréo BG, Tansini A, Silva DHS, et al. Toxicity and Loss of Mitochondrial Membrane Potential Induced by Alkyl Gallates in *Trypanosoma cruzi*. *Int Sch Res Not*. 2015;2015:1–7.
116. Grabarczyk M, Wińska K, Mączka W, Potaniec B, Anioł M. Loliolide - the most ubiquitous lactone. *Folia Biol Oecologica*. 2015;11:1–8.
117. Park SH, Kim DS, Kim S, Lorz LR, Choi E, Lim HY, et al. Loliolide presents antiapoptosis and antiscratching effects in human keratinocytes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):2–17.
118. Nogueira da Silva Avelino Oliveira Rocha G, Dutra LM, Pinheiro Paz WH, Araujo da Silva FM, Costa EV, Guedes da Silva Almeida JR. Chemical constituents from the leaves and branches of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2021;97(June):104297.
119. Rocha OP, De Felício R, Rodrigues AHB, Ambrósio DL, Cicarelli RMB, De Albuquerque S, et al. Chemical profile and biological potential of non-polar fractions from *Centroceras clavulatum* (C. Agardh) montagne (ceramiales, rhodophyta). *Molecules*. 2011;16(8):7105–14.

120. Yang X, Kang M-C, Lee K-W, Kang S-M, Lee W-W, Jeon Y-J. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. coreanum. *Algae*. 2011;26(2):201–8.
121. Gonçalves MD, Bortoleti BT da S, Tomiotto-Pellissier F, Concato VM, de Matos RLN, Silva TF, et al. Grandiflorenic acid isolated from *Sphagneticola trilobata* against *Trypanosoma cruzi*: Toxicity, mechanisms of action and immunomodulation. *Toxicol Vitro*. 2022 Feb 1;78:105267.
122. Vicedo RED. Farmacología de terpenoides de *Helianthus annuus* L. *An la Real Acad Nac Farm*. 2007;73(3):725–46.
123. Ruiz Y, Rodríguez J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, et al. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzii*. *Phytochemistry*. 2008;69(2):432–8.
124. Rubio J, Calderón JS, Flores A, Castro C, Céspedes CL. Trypanocidal activity of oleoresin and terpenoids isolated from *Pinus oocarpa*. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2005;60(9–10):711–6.
125. Ambrósio S, Arakawa NS, Esperandim VR, De Albuquerque S, Da Costa FB. Trypanocidal Activity of Pimarane Diterpenes from *Viguiera arenaria*. *Phyther Res*. 2008;22:1412–5.
126. Smith E, Williamson E, Zloh M, Gibbons S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. *Phyther Res*. 2005;19(6):538–42.
127. Choumessi AT, Danel M, Chassaing S, Truchet I, Penlap VB, Pieme AC, et al. Characterization of the antiproliferative activity of *Xylopi aethiopica*. *Cell Div*. 2012;7(1)(8):2–8.
128. Morarescu O. Synthetic transformations of ent-kaurenoic acid. *Chem J Mold*. 2015;10(1):12.
129. Rocha ACFS, Morais GO, da Silva MM, Kovatch PY, Ferreira DS, Esperandim VR, et al. *In vitro* anti-trypanosomal potential of kaurane and pimarane semi-synthetic derivatives. *Nat Prod Res*. 2020;1–10.
130. Sülsen VP. Sesquiterpene lactones and diterpenes: Promising therapeutic candidates for infectious diseases, neoplasms and other chronic disorders. *Molecules*. 2021;26(5):2–4.
131. Clifford MN, Knight S, Surucu B, Kuhnert N. Characterization by LC-MS of Four New Classes of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *J Agric Food Chem*. 2006;54(6):1957–69.
132. Jaiswal R, Deshpande S, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of *Rudbeckia hirta*, *Helianthus tuberosus*, *Carlina acaulis* and *Symphytotrichum novae-angliae* leaves by LC-MSn. *Phytochem Anal*. 2011;22(5):432–41.

133. Sabina H, Aliya R. Seaweed as a new source of flavone, Scutellarein 4'-methyl ether. *Pakistan J Bot.* 2009;41(4):1927–30.
134. Wang A, Li R, Ren L, Gao X, Zhang Y, Ma Z, et al. A comparative metabolomics study of flavonoids in sweet potato with different flesh colors (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Food Chem.* 2018;260 (October 2017):128.
135. Maroyi A. Review of ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Lannea schweinfurthii* (Engl.) Engl. *Molecules.* 2019;24(4).
136. Hassan SA, Khalil WA, Hassan MAE, Yousif AI, Sabry OM, Wink M, et al. Antioxidant and Antiapoptotic Effects of a *Turraea fischeri* Leaf Extract on *Cryopreserved goat Sperm.* *Animals.* 2021;11(10).
137. Marković IS, Darmati ZA, Abramović BF. Chemical composition of leaf extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown experimentally in Vojvodina. *J Serbian Chem Soc.* 2008;73(3):295.
138. Kusumah D, Wakui M, Murakami M, Xie X, Yukihito K, Maeda I. Linoleic acid, α -linolenic acid, and monolinolenins as antibacterial substances in the heat-processed soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84(6):1285–90.
139. Zhan ZJ, Yue JM. New Glyceroglycolipid and Ceramide from *Premna microphylla*. *Lipids.* 2003;38(12):1299–303.
140. Jimenez-Aleman GH, Castro V, Londaitzbehere A, Gutierrez-Rodríguez M, Garaigorta U, Solano R, et al. Sars-cov-2 fears green: The chlorophyll catabolite pheophorbide a is a potent antiviral. *Pharmaceuticals.* 2021;14(10):1–19.
141. Saide A, Lauritano C, Ianora A. Pheophorbidea State of the Art.pdf. *Mar Drugs.* 2020;18(257):2–12.
142. Bui-Xuan NH, Tang PMK, Wong CK, Fung KP. Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231. *J Ethnopharmacol.* 2010;131(1):95–103.
143. Yu X, Hu S, He C, Zhou J, Qu F, Ai Z, et al. Chlorophyll Metabolism in Postharvest Tea (*Camellia sinensis* L.) Leaves: Variations in Color Values, Chlorophyll Derivatives, and Gene Expression Levels under Different Withering Treatments. *J Agric Food Chem.* 2019;67(38):10624–36.
144. Miranda N, Gerola AP, Novello CR, Ueda-Nakamura T, de Oliveira Silva S, Dias-Filho BP, et al. Pheophorbide a, a compound isolated from the leaves of *Arrabidaea chica*, induces photodynamic inactivation of *Trypanosoma cruzi*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;19:256–65.
145. Jia X, Li P, Wan J, He C. A review on phytochemical and pharmacological properties of *Litsea coreana*. *Pharm Biol.* 2017;55(1):1368–74.
146. Pubchem. Diethyl phthalate [Internet]. Compound Summary. 2022 [cited 2022 Mar

- 8]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6781>
147. Cheng TS. The toxic effects of diethyl phthalate on the activity of glutamine synthetase in greater duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.). *Aquat Toxicol.* 2012;124–125:171–8.
 148. Ahmad G, Muhammad A, Abubakar K. *In Vitro* Antitrypanosomal and Antioxidant Activities of Diethyl Pthalate from the Stem Bark of *Strychnos spinosa* LAM. *Int J Med Biosci.* 2018;1(2):1–22.
 149. Pubchem. Ethyl linolenate [Internet]. Compound Summary Linolenic acid ethyl ester. 2022 [cited 2022 Mar 8]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5367460>
 150. Oliveira M das DA de, Alves P e S, Sousa HG, Silva D da C, Rai MK, Lima NM, et al. Genotoxic and cytotoxic activities of hexane extract in seeds from *Platonia insignis* Mart. *Res Soc Dev.* 2022;11(2):e13911225504.
 151. Rodrigues IA, Azevedo MMB, Chaves FCM, Alviano CS, Alviano DS, Vermelho AB. *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania spp.* *Biomed Res Int.* 2014;2014.
 152. Huang CB, George B, Ebersole JL. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2010;55(8):555–60.
 153. Park SY, Seetharaman R, Ko MJ, Kim DY, Kim TH, Yoon MK, et al. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;19(2):253–61.
 154. He J, Huang S, Sun X, Han L, Chang C, Zhang W, et al. Carvacrol loaded solid lipid nanoparticles of propylene glycol monopalmitate and glyceryl monostearate: Preparation, characterization, and synergistic antimicrobial activity. *Nanomaterials.* 2019;9(8):1–14.
 155. Nayak AP, Tiyaboonchai W, Patankar S, Madhusudhan B, Souto EB. Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: Novel approach towards malaria treatment. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010;81(1):263–73.
 156. Volpedo G, Costa L, Ryan N, Halsey G, Satoskar A, Oghumu S. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2019;25(February):1–14.
 157. Rodríguez-Hernández KD, Martínez I, Reyes-Chilpa R, Espinoza B. Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. *Bioorg Chem.* 2020;100:103894.
 158. Londero VS, Costa-Silva TA, Antar GM, Baitello JB, De Oliveira LVF, Camilo FF, et al. Antitrypanosomal Lactones from *Nectandra barbellata*. *J Nat Prod.* 2021;84(5):1489–97.

159. Benaim G, Casanova P, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Parra-Gimenez N, Plaza-Rojas L, et al. Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2295–303.
160. Rebai Olfa, Belkhir Manel, Sanchez-Gomez María, Matute Carlos, Fattouch S, et al. Differential Molecular Targets for Neuroprotective Effect of Chlorogenic Acid and its Related Compounds Against Glutamate Induced Excitotoxicity and Oxidative Stress in Rat Cortical Neurons. *Neurochem Res.* 2017;42:3559–72.
161. Olalekan Elekofehinti O, Kamdem JP, Bolington AA, Athayde ML, Lopes SR, Waczuk EP, et al. *African eggplant (Solanum anguivi Lam.)* fruit with bioactive polyphenolic compounds exerts in vitro antioxidant properties and inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial swelling. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(10):757–66.
162. Burgazli MK, Aydogdu N, Rafiq A, Mericliler M, Chasan R, Erdogan A. Effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on membrane potential and intracellular calcium in human endothelial cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:720–8.
163. Yang C, Lim W, Bazer FW, Song G. Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. *Cancer Lett.* 2017;399:10–9.
164. Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, Boucher W, Cao J, Papadopoulou N, et al. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *Br J Pharmacol.* 2005;145:934–44.

8 Anexos

8.1 Anexo 1. Análisis de cromatogramas y espectros obtenidos por CL-EM

Para la visualización de los cromatogramas y espectros de masas se utilizó el programa DataAnalysis versión 4.4 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Los datos se calibraron utilizando el peak de calibración (Tr: 0,1 min) en el intervalo m/z 90-1300 correspondiente a diferentes agrupaciones de iones formados por ácido fórmico e ion sodio (cúmulos de iones Na/formato). Para la detección de los peaks cromatográficos se consideraron los parámetros por defecto (razón señal/ruido, 3). Para cada peak cromatográfico detectado se examinaron sus señales m/z para establecer la señal principal y discriminar sus aductos lo que se realizó en combinación con la herramienta MS Adduct Calculator (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator>), además, de establecer la presencia de compuestos en co-elución. Las señales m/z seleccionadas se examinaron por medio de la opción SmartFormula Manually del programa DataAnalysis para generar las probables fórmulas.

Para la identificación de las señales m/z se utilizó el programa Metaboscape versión 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) [NOTA: análisis realizado en la Plataforma Ómicas UC]. El programa identificó a los compuestos en base a su masa, su patrón de fragmentación y distribución isotópica. El patrón de fragmentación utilizó las librerías espectrales de MassBank of North America (MoNA), MS-DIAL y de LipidBlast. El programa proporcionó varios parámetros para definir la identificación (valor annotation quality; MS/MS score y mSigma).

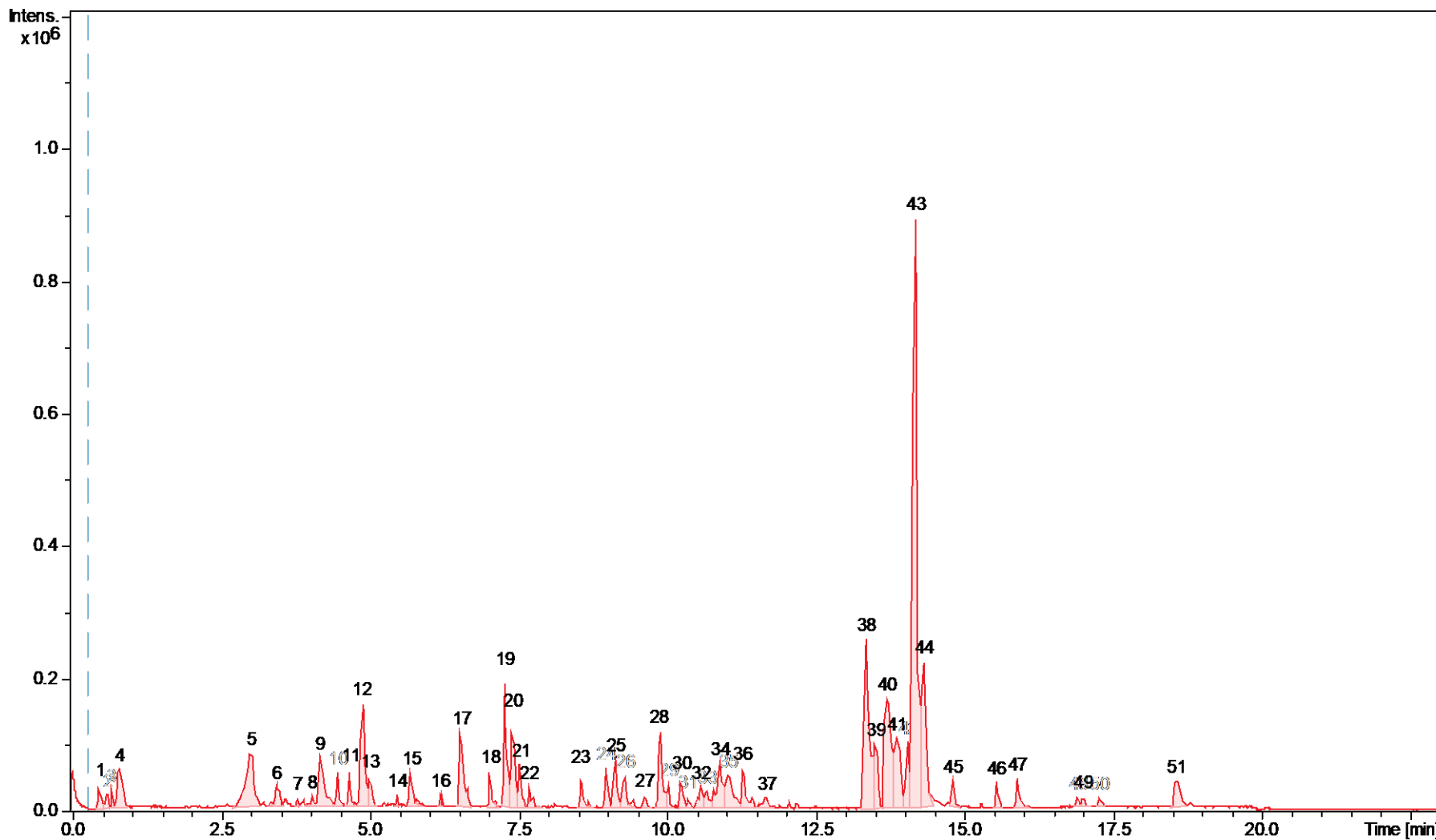
Para la identificación a través del servidor GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking (69), los datos calibrados se exportaron por medio del programa DataAnalysis a formato mzXML en modo espectros de masas de línea (centroides). Los archivos mzXML generados se subieron al servidor donde se analizaron a través de la opción Library Search considerando todas las bibliotecas disponibles y utilizando los siguientes parámetros:

tolerancia de masa de ion precursor, ± 0.025 Da; tolerancia de masa de ion fragmento, 0.02 Da; clase librería, gold; búsqueda de análogos, do search; para otros parámetros se utilizaron los valores por defecto. Las identificaciones se sometieron a diferentes filtrados manuales: se eliminaron aquellas identificaciones en las que no había correspondencia entre la polaridad experimental y la de librería; se seleccionaron aquellas identificaciones que coincidieran con las señales m/z detectadas y seleccionadas anteriormente en DataAnalysis; y se seleccionaron las identificaciones en donde la fórmula teórica generó una señal m/z con una diferencia máxima de 10 ppm con respecto a la observada experimentalmente.

Para la identificación mediante el programa Sirius versión 4.9.9 (70), los datos calibrados fueron procesados a través de la opción Compounds-AutoMS(n) que permitió la detección de las señales m/z (precursor) y sus correspondientes fragmentaciones utilizando los siguientes parámetros: umbral de intensidad, 1000 (para ambas polaridades); ventana m/z, 0.5; ventana tiempo de retención, 1 min; tipo de espectro, línea. Los datos se exportaron en formato mgf. Para el análisis de identificación mediante Sirius los archivos mgf fueron cargados en el programa, en la opción *Molecular Formula Identification* se consideraron los siguientes parámetros: instrumento, Q-TOF; filtrado de distribución isotópica, activado; error de asignación MS2, 10 ppm; filtrado de fórmulas basado bases de datos, todas seleccionadas; elementos permitidos en la fórmula, valor por defecto; especie m/z, en polaridad positiva se consideró [M+H]⁺, [M+Na]⁺ y/o [M+K]⁺ y en polaridad negativa se consideró [M-H]⁻ y/o [M+Cl]⁻. En la opción CSI:FingerID - Structure Elucidation, se consideró todas las bases de datos; y se activó la opción CANOPUS - *Compound Class Prediction*. Las identificaciones se sometieron a un filtrado manual que consistió en seleccionar aquellas identificaciones que coincidieran con las señales m/z detectadas y seleccionadas anteriormente en DataAnalysis.

Los análisis de identificación mediante Metaboscape, GNPS y Sirius se correlacionaron entre ellos además de correlacionar con la selección de las señales m/z realizada mediante DataAnalysis. En Metaboscape se seleccionaron finalmente aquellas identificaciones con un MS/MS score mayor a 800, en Sirius se seleccionaron aquellas identificaciones con un porcentaje de similitud mayor a 80% y en GNPS se seleccionaron aquellas identificaciones con un coseno de similitud mayor a 0.8000.

En los Anexos 2 y 4 se muestran los cromatogramas de ion base (base peak chromatogram, BPC) adquiridos en polaridad negativa para las fracciones CS400 y CS402 respectivamente. Las identificaciones obtenidas para los peaks cromatográficos detectados en polaridad negativa se describen en los Anexos 3 y 5 de manera respectiva para las fracciones CS400 y CS402, y en polaridad positiva con información complementaria a la detallada previamente (Anexos 6 y 7), donde se indica el tiempo de retención (Tr), intervalo de elución (min), m/z experimental, fórmula generada a partir del m/z experimental, m/z teórico generado a partir de la fórmula, error relativo en ppm entre m/z experimental y m/z teórico, especie detectada, identificación tentativa, herramienta utilizada para la identificación y similitud.



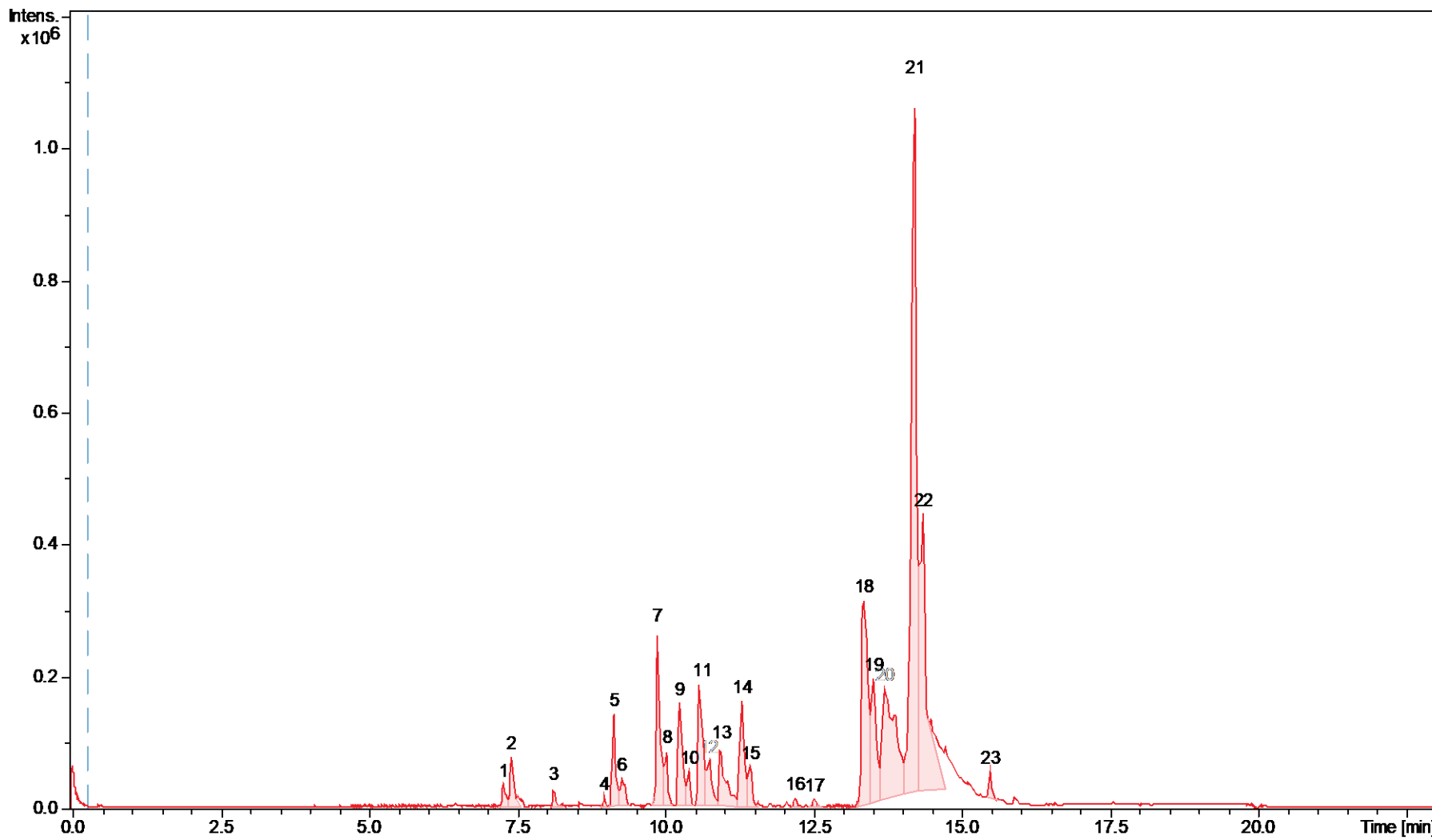
8.2 Anexo 2. Cromatograma de ion base (base peak chromatogram, BPC): polaridad negativa. Fracción CS400

8.3 Anexo 3. Compuestos identificados en la fracción CS400 por CL-EM (polaridad negativa).

Pico	Tr (min)	Intervalo (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	error (ppm)	Especie	Identificación	Herramienta	Similitud
1	0.5	0.5-0.5	387.1131	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₃	387.1144	3.4	[M-H]-			
2	0.6	0.6-0.7								
3	0.7	0.7-0.8								
4	0.8	0.7-1.0	253.0702							
4	0.9	0.8-0.9	465.2331	C ₁₈ H ₃₀ N ₁₀ O ₅	465.2328	-0.7	[M-H]-			
5	3.1	2.8-3.2	367.1022	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.1035	3.4	[M-H]-	Feruloylquinic acid	GNPS	0.9791
							[M-H]-	Feruloyl quinic acid	Metaboscape	978.4
5	2.9	2.9-3.0	697.2701							
6	3.5	3.4-3.6	377.1806							
6	3.5	3.5-3.6	445.1680							
7	3.8	3.8-3.9	375.1660	C ₁₇ H ₂₈ O ₉	375.1661	0.1	[M-H]-			
7	3.8	3.8-3.9	463.0878	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0882	0.9	[M-H]-	Quercetin-O-hexoside	Sirius	78.165
8	4.1	4.0-4.1	419.2277							
9	4.2	4.1-4.4	297.0366	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₈	297.0364	-0.5	[M-H]-			
9	4.2	4.2-4.2	571.2725							
9	4.4	4.1-4.7	637.1382							
10	4.5	4.4-4.6	517.1913							
11	4.7	4.6-4.8	371.1333							
12	4.9	4.8-5.0	191.0339	C ₁₀ H ₈ O ₄	191.0350	5.7	[M-H]-	Dihydroxy-methylisocoumarin	Metaboscape	915.1
13	5.0	5.0-5.2	529.1328	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	529.1352	4.4	[M-H]-	Methyl di-O-caffeoylquinic acid	Sirius	75.152
13	5.2	5.0-5.3	395.1337							
14	5.5	5.5-5.6	469.1693							
15	5.7	5.7-5.9	543.1476	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543.1508	5.9	[M-H]-	Diferuloylquinic acid	Sirius	78.248
16	6.2	6.2-6.3	415.1378	C ₁₈ H ₂₀ N ₆ O ₆	415.1372	-1.6	[M-H]-			
17	6.6	6.5-6.8	299.0547	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0561	4.7	[M-H]-	Scutellarein methyl ether	Metaboscape	995.1
17	6.6	6.6-6.6	627.2833							
17	6.6	6.6-6.7	655.4386							

18	7.1	7.0-7.2	329.2322	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2333	3.5	[M-H]-	9.12.13-trihydroxy-10-octadecenoic acid	GNPS	0.9772
								9.12.13-trihydroxy-10-octadecenoic acid	Metaboscape	936.3
19	7.3	7.3-7.4								
19	7.3	7.3-7.4	335.2216	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.2228	3.5	[M-H]-	ent-16beta.17-Dihydroxy-19-kauranoic acid	Metaboscape	886.3
20	7.4	7.4-7.5	333.2058	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	4.0	[M-H]-			
20	7.5	7.4-7.5	429.1947							
21	7.6	7.5-7.7	333.2069	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	0.7	[M-H]-			
21	7.6	7.6-7.6	639.3528							
22	7.7	7.7-7.9	305.1746							
23	8.6	8.5-8.8	331.1920	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331.1915	-1.6	[M-H]-			
24	9.0	9.0-9.1	303.1974	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	303.1966	-2.7	[M-H]-			
24	9.0	9.0-9.0	659.4587							
25	9.2	9.1-9.3	317.2128	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	-1.8	[M-H]-			
25	9.2	9.1-9.2	643.4025							
26	9.3	9.3-9.5	317.2128	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	-1.8	[M-H]-			
27	9.7	9.6-9.8	363.2554	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	363.2541	-3.6	[M-H]-			
27	9.7	9.7-9.7	681.4773							
27	9.7	9.6-9.7	801.5190							
28	9.9	9.8-10.0	333.2085	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	-4.1	[M-H]-			
28	9.9	9.9-10.0	1009.5783							
29	10.0	10.0-10.1	333.2093	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	-6.5	[M-H]-			
29	10.0	10.0-10.1	717.4629							
30	10.3	10.2-10.3	315.1983	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315.1966	-5.5	[M-H]-			
30	10.3	10.2-10.3	669.3978							
31	10.4	10.3-10.5	353.1911	C ₂₆ H ₂₀ O	353.1911	0.0	[M-H]-			
31	10.4	10.3-10.5	377.2357							
31	10.4	10.4-10.4	693.4448							
32	10.6	10.5-10.6	293.2135	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.2122	-4.4	[M-H]-	9.12.13-trihydroxy-10-octadecenoic acid	GNPS	0.8299
								9.12.13-trihydroxy-10-octadecenoic acid	Metaboscape	873.9
32	10.6	10.6-10.6	611.4359							

33	10.7	10.6-10.8	293.2136	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.2122	-4.7	[M-H]-	9-hydroperoxy-10.12.15-octadecatrienoic acid	GNPS	0.9497
								13-OH-9Z.11E.15Z-octadecatrienoic acid	Metaboscape	906.2
34	10.9	10.8-11.0	309.2089							
34	10.9	10.7-11.1	559.3148	C ₂₇ H ₄₆ O ₆	559.3124	-4.3	[M+FA-H]-	9.12.15-octadecatrienoic acid. 3-(hexopyranosyloxy)-2-hydroxypropyl ester	GNPS	0.9811
								MGMG 18:3	GNPS	0.9287
34	10.9	10.9-10.9	823.5259							
35	11.1	11.0-11.3	317.2139	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	-5.3	[M-H]-			
36	11.3	11.3-11.5	431.2462							
36	11.3	11.3-11.3	759.5471							
37	11.7	11.5-11.8	311.2244	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	311.2228	-5.2	[M-H]-			
38	13.5	13.3-13.6	433.2618							
39	13.5	13.5-13.6	387.2562							
39	13.5	13.5-13.6	1053.6782							
40	13.8	13.6-14.0	399.2561							
41	13.9	13.8-14.0	399.2552							
41	14.0	13.9-14.0	677.4814							
42	14.1	14.0-14.1	401.2716							
42	14.1	14.0-14.1	679.4967							
43	14.2	14.1-14.3								
44	14.3	14.3-14.5	301.2190	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	301.2173	-5.6	[M-H]-	Abietic acid	Metaboscape	930.5
44	14.3		949.6397							
45	14.8	14.8-14.9	279.2339	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2330	-3.4	[M-H]-			
46	15.6	15.5-15.7	255.2338	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.2330	-3.3	[M-H]-	Ethyl myristate	Metaboscape	944.9
46	15.6	15.5-15.7	355.1592	C ₂₇ H ₂₀ N ₄ O	355.1564	-7.8	[M-H]-			
47	15.9	15.9-16.1	449.3292	C ₂₇ H ₄₆ O ₅	449.3272	-4.3	[M-H]-			
47	15.9	15.9-15.9	751.5578							
48	16.9	16.8-17.0	619.4222							
49	17.0	17.0-17.1	477.3612							
49	17.1	17.0-17.2	981.5852							
50	17.3	17.2-17.4	621.4373							
51	18.6	18.5-18.7	819.5276							



8.4 Anexo 4. Cromatograma de ion base (base peak chromatogram, BPC): polaridad negativa. Fracción CS402

8.5 Anexo 5. Compuestos identificados en la fracción CS402 por CL-EM (polaridad negativa)

Pico	Tr (min)	Intervalo (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Error (Ppm)	Especie	Identificación	Herramienta	Similitud
1	7.3	7.2-7.4	335.2222	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.2228	1.7	[M-H]-			
1	7.3	7.3-7.4	431.2110	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	431.2075	-8.1	[M-H]-			
2	7.5	7.4-7.6	333.2062	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	2.8	[M-H]-			
2	7.5	7.4-7.6	429.1944	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	429.1919	-5.9	[M-H]-			
3	8.2	8.1-8.3	349.2009	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	349.2020	3.3	[M-H]-			
3	8.2	8.2-8.2	589.2689	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₁	589.2654	-5.9	[M-H]-			
4	9.0	9.0-9.1	303.1949	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	303.1966	5.5	[M-H]-			
4	9.0	9.0-9.0	371.1834	C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₃	371.1837	0.8	[M-H]-			
5	9.2	9.1-9.2	317.2113	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	2.9	[M-H]-			
5	9.2	9.1-9.2	997.6115							
6	9.3	9.2-9.5	317.2115	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	2.3	[M-H]-			
7	9.9	9.8-10.0	333.2052	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	5.8	[M-H]-			
7	10.0	9.9-10.1	1045.5977							
8	10.1	10.0-10.2	333.2046	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.2071	7.6	[M-H]-			
9	10.3	10.2-10.4	315.1948	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315.1966	5.6	[M-H]-	<i>ent-15-Oxo-16-kauren-19-oic acid</i>		
9	10.3	10.3-10.4	411.1818	C ₂₄ H ₂₈ O ₆	411.1813	-1.2	[M-H]-			
10	10.4	10.4-10.5	315.1951	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315.1966	4.7	[M-H]-			
10	10.4	10.4-10.4	693.4376	C ₄₂ H ₆₂ O ₈	693.4372	-0.6	[M-H]-			
11	10.6	10.6-10.7	317.2111	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	3.5	[M-H]-			
11	10.7	10.6-10.8	997.6147							
12	10.8	10.7-10.9	317.2111	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2122	3.5	[M-H]-			
13	11.0	10.9-11.3	415.2473	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	415.2490	4.1	[M-H]-			
13	11.0	11.0-11.0	785.4770							
14	11.3	11.3-11.4	431.2421	C ₂₅ H ₃₆ O ₆	431.2439	4.2	[M-H]-			
14	11.3	11.3-11.3	847.4999							
14	11.4	11.3-11.4	749.4634							

15	11.5	11.4-11.6	431.2425	C ₂₅ H ₃₆ O ₆	431.2439	3.3	[M-H]-			
15	11.5	11.5-11.5	819.4658							
16	12.2	12.1-12.3	415.2482	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	415.2490	1.9	[M-H]-	(4R)-9beta-Hydroxy-15alpha-(tigloyloxy)-kaura-16-ene-19-oic	Sirius	55.973
16	12.2	12.2-12.3	483.2336	C ₃₅ H ₃₂ O ₂	483.2330	-1.3	[M-H]-			
17	12.5	12.5-12.6	373.2374	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	373.2384	2.8	[M-H]-			
18	13.4		387.2540	C ₂₄ H ₃₆ O ₄	387.2541	0.2	[M-H]-			
19	13.5		387.2547	C ₂₄ H ₃₆ O ₄	387.2541	-1.6	[M-H]-			
20	14.0	13.7-14.3	399.2550	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	399.2541	-2.3	[M-H]-			
20	14.0	13.7-14.4	787.5169							
21	14.2	14.0-14.3	301.2186	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	301.2173	-4.3	[M-H]-	Kaurenoic acid		
21	14.2	14.1-14.3	703.4970							
22	14.4	14.1-14.7	301.2185	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	301.2173	-4.0	[M-H]-	Kaurenoic acid		
23	15.5	15.4-15.6	327.2921	C ₂₀ H ₄₀ O ₃	327.2905	-5.0	[M-H]-			

8.6 Anexo 6. Compuestos identificados en la fracción CS400 por CL-EM (polaridad positiva)

Pico	Tr (min)	Intervalo (min)	m/z Experimental	Fórmula	m/z teórico	Error (ppm)	Especie	Identificación	Herramienta	Similitud
1	0.5	0.5-0.6	162.1122	C ₇ H ₁₅ NO ₃	162.1125	1.7	[M+H] ⁺			
1	0.5	0.5-0.5	176.1280	C ₈ H ₁₇ NO ₃	176.1281	0.7	[M+H] ⁺			
1	0.5		203.0522	C ₄ H ₆ N ₆ O ₄	203.0523	0.6	[M+H] ⁺			
2	0.6	0.6-0.7	118.0495	C ₄ H ₇ NO ₃	118.0499	3.1	[M+H] ⁺			
3	0.8	0.8-0.9	387.0962							
4	1.0	0.9-1.1	157.0835	C ₄ H ₈ N ₆ O	157.0832	-1.7	[M+H] ⁺			
5	2.0	1.8-2.2	169.0470	C ₄ H ₄ N ₆ O ₂	169.0469	-0.9	[M+H] ⁺			
6	2.7	2.6-2.8	212.0889	C ₆ H ₉ N ₇ O ₂	212.0890	0.7	[M+H] ⁺			
7	2.9	2.8-3.0								
8	3.1	3.0-3.1	369.1186	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	369.1180	-1.6	[M+H] ⁺	Feruloylquinic acid	GNPS	0.9299
								Feruloylquinic acid	Sirius	100.000

									<i>Feruloyl quinic acid</i>	Metaboscape	977.0
9	3.5	3.4-3.6	355.1716								
10	3.7	3.6-3.7	195.0647	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.0652	2.5	[M+H] ⁺	<i>Ferulic acid</i>	Sirius	98.261	
								<i>Ferulic acid</i>	GNPS	0.8558	
11	4.0	3.9-4.1	197.1164	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	197.1172	4.2	[M+H] ⁺	<i>Loliolide</i>	GNPS	0.8565	
							[M+H] ⁺	<i>Loliolide</i>	Metaboscape	885.6	
11	4.0	3.9-4.0	415.2073								
12	4.2	4.2-4.2	369.1887	C ₁₉ H ₂₈ O ₇	369.1908	5.6	[M+H] ⁺				
12	4.2	4.2-4.2	639.1566	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₇	639.1556	-1.6	[M+H] ⁺				
13	4.7	4.7-4.7	344.1678								
13	4.7	4.7-4.7	349.1241								
14	4.8	4.7-4.8	218.2103	C ₁₂ H ₂₇ NO ₂	218.2115	5.3	[M+H] ⁺				
15	4.9	4.9-5.1	193.0489	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0495	3.3	[M+H] ⁺				
16	5.6	5.6-5.7	340.1740								
17	5.8	5.7-5.9	545.1631	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	545.1654	4.1	[M+H] ⁺	<i>Diferuloylquinic acid</i>	Metaboscape	963.4	
								<i>Diferuloylquinic acid</i>	Sirius	98.354	
								<i>Diferuloylquinic acid</i>	GNPS	0.9629	
18	6.3	6.3-6.3	151.1108	C ₁₀ H ₁₄ O	151.1117	6.2	[M+H] ⁺				
19	6.6	6.5-6.7	301.0686	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0707	6.9	[M+H] ⁺	<i>Scutellarein methyl ether</i>	Metaboscape	940.7	
								<i>Scutellarein methyl ether</i>	Sirius	97.076	
								<i>Scutellarein methyl ether</i>	GNPS	0.8171	
20	6.9	6.8-7.0	229.1212	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	229.1223	4.8	[M+H] ⁺				
21	7.1	7.0-7.2	181.1212	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	181.1223	6.1	[M+H] ⁺				
22	7.3	7.2-7.4	319.2250	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	319.2268	5.5	[M+H] ⁺	<i>Gradifloric acid</i>	Sirius	81.065	
22	7.4	7.3-7.4	860.5501								
23	7.5	7.4-7.5	317.2095	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.2111	5.1	[M+H] ⁺	<i>15-Hydroxykaurane-9(11),16-diene-19-oic acid</i>	Sirius	79.679	
23	7.5	7.5-7.5	856.5183								
24	7.7	7.6-7.8	630.3239								
24	7.7	7.6-7.8	635.2789								
25	7.8	7.7-7.8	307.1884								

26	8.2	8.2-8.3	343.2934	C ₁₉ H ₃₈ N ₂ O ₃	343.2955	6.2	[M+H] ⁺	<i>Lauroylamide propylbetaine</i>	Sirius	100.000
27	8.4	8.3-8.4	467.1643							
28	8.5	8.5-8.6	245.0777	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	245.0768	-3.6	[M+H] ⁺			
29	8.6	8.6-8.7	333.2036	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	333.2060	7.3	[M+H] ⁺			
30	9.0	9.0-9.1	305.2099	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	305.2111	4.0	[M+H] ⁺	<i>16-oxo-17-norkaurane-18-oic acid</i>	Sirius	79.769
								<i>16-oxo-17-norkaurane-18-oic acid</i>	GNPS	0.8718
31	9.2	9.1-9.3	301.2150	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2162	4.0	[M-H ₂ O+H] ⁺	<i>Gradifloric acid</i>	Sirius	85.629
31	9.2	9.2-9.2	520.2516							
31	9.2	9.2-9.3	525.2070							
32	9.4	9.3-9.5	301.2143	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2162	6.3	[M-H ₂ O+H] ⁺	<i>Gradifloric acid</i>	Sirius	85.030
				C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	6.3	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	90.667
33	9.5	9.5-9.6	301.2140	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	7.3	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	84.076
34	9.8	9.7-9.8	303.2298	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.2319	6.8	[M+H] ⁺	<i>Usic acid</i>	Sirius	88.966
35	9.9	9.9-10.1	317.2091	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.2111	6.4	[M+H] ⁺	<i>15-oxo-karenoic acid</i>	Sirius	80.337
								<i>ent-17-hydroxykaura-9(11),15-dien-19-oic acid</i>	Sirius	83.140
35	9.9	9.9-10.0	651.4216							
36	10.2	10.1-10.2	181.1208	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	181.1223	8.3	[M+H] ⁺			
37	10.3	10.3-10.4	317.2090	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.2111	6.7	[M+H] ⁺	<i>15-oxo-karenoic acid</i>	Sirius	76.923
								<i>Kaur-15-en-17-al-19-oic acid</i>	GNPS	0.907
38	10.4	10.4-10.5	317.2088	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.2111	7.3	[M+H] ⁺	<i>15-oxo-karenoic acid</i>	Sirius	87.952
39	10.6	10.6-10.7	342.2974	C ₂₀ H ₃₉ NO ₃	342.3003	8.4	[M+H] ⁺	<i>(3-hydroxyhexadecanoyl) glycine</i>	GNPS	0.9350
40	10.9	10.7-11.1	353.2662	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	353.2686	6.9	[M+H] ⁺	<i>1-Monolinolenin</i>	Sirius	94.767
40	10.7	10.7-10.7	361.2323							
41	11.0	10.9-11.1	333.2009							
41	11.0	10.9-11.1	353.2659	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	353.2686	7.7	[M+H] ⁺	<i>1-Monolinolenin</i>	Sirius	97.024
42	11.2	11.1-11.3	219.1724	C ₁₃ H ₂₂ O	219.1743	8.9	[M+H] ⁺			
43	11.4	11.3-11.4	321.1678							
43	11.4	11.3-11.4	343.1485							

44	11.5	11.5-11.6	301.2150	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	4.0	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	81.410
								<i>Grandiflorenic acid</i>	GNPS	0.8672
45	11.7	11.6-11.7	267.1941	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	267.1955	5.1	[M+H] ⁺			
46	11.8	11.7-11.9	273.2192	C ₁₉ H ₂₈ O	273.2213	7.7	[M+H] ⁺			
47	12.2		439.2463							
48	12.3		439.2429							
49	12.4	12.3-12.6								
50	13.0	12.9-13.1	353.2678	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	353.2686	2.4	[M+H] ⁺	<i>1-Monolinolenin</i>	Sirius	95.349
51	13.4	13.4-13.4	389.2678							
51	13.4	13.4-13.5	689.4744							
52	13.6	13.6-13.7	301.2158	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2162	1.3	[M-H ₂ O+H] ⁺	<i>Steviol</i>	Sirius	81.977
				C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	1.3	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	86.000
53	13.8	13.7-13.9	301.2163	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	-0.3	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	88.235
				C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2162	-0.3	[M-H ₂ O+H] ⁺	<i>Steviol</i>	Sirius	84.211
53	13.9	13.7-14.0	401.2688	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	401.2686	-0.4	[M+H] ⁺	<i>Angeloxygrandifloric acid</i>	Sirius	78.037
53	13.9	13.7-14.0	701.4769							
54	14.0	13.9-14.1								
55	14.1	14.1-14.1	703.4960							
56	14.2	14.2-14.3	303.2328	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	303.2319	-3.1	[M-H ₂ O+H] ⁺	<i>17-hydroxybeyerane-18-oic acid</i>	Sirius	86.061
				C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.2319	-3.1	[M+H] ⁺	<i>1-phenanthrenecarboxylic acid, 7-ethenyl-1.2.3.4.4a.4b.5.6.7.9.10.10a-dodecahydro-1.4a.7-trimethyl-, (1S.4aR.10aR)</i>	GNPS	0.8770
								<i>Kaurenic acid</i>	Sirius	87.421
								<i>Kaurenic acid</i>	Metaboscapes	813.9
57	14.4		303.2326	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.2319	-2.5	[M+H] ⁺	<i>1-phenanthrenecarboxylic acid, 7-ethenyl-1.2.3.4.4a.4b.5.6.7.9.10.10a-dodecahydro-1.4a.7-trimethyl-, (1S.4aR.10aR)</i>	GNPS	0.8527
								<i>Isopimaric acid</i>	Sirius	89.404
58	14.6	14.6-14.7	331.2853	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	331.2843	-3.1	[M+H] ⁺	<i>Monopalmitin</i>	GNPS	0.9109
								<i>Monopalmitin</i>	Sirius	99.346
58	14.6	14.6-14.7	609.2717							
59	14.7	14.7-14.9	625.2656							
60	15.0	14.9-15.1	609.2721							

61	15.4	15.3-15.5	593.2778	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593.2758	-3.3	[M+H] ⁺	<i>Pheophorbide A</i>	Metaboscape	906.6
62	15.5	15.5-15.6	593.2783							
63	15.7	15.6-15.8	593.2781	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593.2758	-3.8	[M+H] ⁺	<i>Pheophorbide A</i>	Metaboscape	940.2
64	16.0	15.9-16.0	287.2381	C ₂₀ H ₃₀ O	287.2369	-4.0	[M+H] ⁺			
64	16.0	15.9-16.1	451.3439							
65	16.2	16.1-16.4	359.3168	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	359.3156	-3.4	[M+H] ⁺	<i>Glycerol monostearate</i>	Sirius	99.342
66	16.6	16.6-16.7	653.2985							
67	16.8	16.7-16.8	637.3037							
68	16.8	16.8-16.9	607.2923							
68	16.8	16.7-17.0	637.3035							
69	16.9	16.9-17.1	637.3012							
70	17.2	17.1-17.2	568.4278							
71	17.3	17.2-17.4	621.3083							
72	17.4	17.4-17.5	338.3423	C ₂₂ H ₄₃ NO	338.3417	-1.7	[M+H] ⁺	<i>Erucylamide</i>	GNPS	0.9569
								<i>Erucylamide</i>	Sirius	100.000
73	17.5	17.5-17.8	621.3084							
74	18.4	18.4-18.5	483.3835							
75	18.5	18.5-18.6								
76	18.7	18.6-18.8	399.3831							
76	18.7	18.6-18.9	792.5625							
77	19.8	19.7-19.9	463.3789							
77	19.8	19.7-19.9	555.4987							
78	19.9	19.9-20.0	143.0021							
78	20.0	19.9-20.0	201.0439	C ₁₄ H ₄ N ₂	201.0447	4.1	[M+H] ⁺			
79	20.1	20.0-20.3	158.9742							

8.7 Anexo 7. Compuestos en la fracción CS402 por CL-EM (polaridad positiva).

Pico	Tr (Min)	Intervalo (Min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Error (Ppm)	Especie	Identificación	Herramienta	Similitud
1	4.8	4.7-4.8	218.2103	C ₁₂ H ₂₇ NO ₂	218.2115	5.8	[M+H] ⁺			
2	5.6	5.5-5.7	197.0764	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₆	197.0768	2.1	[M+H] ⁺			
3	6.3		151.1106	C ₁₀ H ₁₄ O	151.1117	7.6	[M+H] ⁺			
4	6.4	6.4-6.6	360.2507	C ₁₈ H ₂₉ N ₇ O	360.2506	-0.2	[M+H] ⁺			
5	7.1	7.1-7.3	181.1207	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	181.1223	8.9	[M+H] ⁺			
6	7.5	7.4-7.6	317.2086	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.2111	8.3	[M-H ₂ O+H] ⁺	<i>15-Hydroxykaurane-9(11),16-diene-19-oic acid</i>	Sirius	80.0
6	7.5		335.2193	C ₁₅ H ₃₀ N ₂ O ₆	335.2177	-4.9	[M+H] ⁺			
7	8.2	8.2-8.3	343.2918	C ₁₅ H ₃₄ N ₈ O	343.2928	3.0	[M+H] ⁺			
8	8.4	8.3-8.5	223.0946	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	223.0965	8.4	[M+H] ⁺	<i>Diethyl phthalate</i>	Sirius	98.9
								<i>Diethyl phthalate</i>	GNPS	0.9956
9	8.5	8.5-8.7								
10	9.2	9.1-9.3	301.2132	C ₁₆ H ₂₄ N ₆	301.2135	1.1	[M+H] ⁺			
11	9.4	9.3-9.5	301.2128	C ₁₆ H ₂₄ N ₆	301.2135	2.4	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	GNPS	0.8979
12	9.7	9.7-9.8	229.1195	C ₁₁ H ₁₂ N ₆	229.1196	0.1	[M+H] ⁺			
13	9.8	9.8-9.8	321.1674	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₃	321.1670	-1.4	[M+H] ⁺			
13	9.8	9.8-9.8	361.1584	C ₁₁ H ₂₀ N ₈ O ₆	361.1579	-1.5	[M+H] ⁺			
14	9.9		335.2181	C ₁₅ H ₃₀ N ₂ O ₆	335.2177	-1.3	[M+H] ⁺			
15	10.1		335.2176	C ₁₅ H ₃₀ N ₂ O ₆	335.2177	0.2	[M+H] ⁺			
16	10.2	10.2-10.3	181.1197	C ₇ H ₁₂ N ₆	181.1196	-0.4	[M+H] ⁺			
17	10.3		334.2333							
18	10.5	10.4-10.6	317.2070	C ₁₅ H ₂₈ N ₂ O ₅	317.2071	0.3	[M+H] ⁺			
19	10.7	10.6-10.8	319.2231	C ₁₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	319.2227	-1.1	[M+H] ⁺			
20	10.9	10.8-10.9	227.1610	C ₉ H ₁₈ N ₆ O	227.1615	2.1	[M+H] ⁺			
21	11.0	11.0-11.0	855.4938							
22	11.2	11.1-11.3	219.1717	C ₁₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	219.1703	-6.3	[M+H] ⁺			
23	11.4	11.3-11.5	455.2362	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₄	455.2377	3.3	[M+Na] ⁺			

24	11.5	11.5-11.6									
25	11.7	11.6-11.8	267.1931	C ₁₂ H ₂₂ N ₆ O	267.1928	-1.2	[M+H] ⁺				
26	12.1	12.1-12.2	301.2119	C ₁₅ H ₂₈ N ₂ O ₄	301.2122	0.9	[M+H] ⁺				
27	12.3	12.2-12.3									
28	12.5	12.4-12.6	221.1876	C ₁₀ H ₂₄ N ₂ O ₃	221.1860	-7.4	[M+H] ⁺				
29	12.6	12.5-12.7									
30	12.9	12.7-12.9									
31	13.4	13.3-13.5	301.2133	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	9.7	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Metaboscape	867.2	
								<i>Grandiflorenic acid</i>	GNPS	0.808	
31	13.4	13.3-13.5	389.2648	C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₆	389.2646	-0.5	[M+H] ⁺				
32	13.6	13.5-13.7	301.2135	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	9.0	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	88.0	
32	13.6		389.2668	C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₆	389.2646	-5.6	[M+H] ⁺				
33	13.8	13.7-14.1	301.2132	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.2162	10.0	[M+H] ⁺	<i>Grandiflorenic acid</i>	Sirius	87.097	
33	13.9	13.7-14.1	401.2653	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₂	401.2660	1.6	[M+H] ⁺				
34	14.1	14.1-14.3	301.2128	C ₁₆ H ₂₄ N ₆	301.2135	2.4	[M+H] ⁺				
35	14.3	14.3-14.4	303.2303	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.2319	5.1	[M+H] ⁺	<i>Kaurenic acid</i>	Metaboscape	813.9	
								<i>Kaurenic acid</i>	Sirius	87.013	
36	14.4	14.4-14.5	303.2300	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.2319	6.1	[M+H] ⁺	<i>Pimaric acid</i>	GNPS	0.8862	
37	14.6	14.6-14.7	331.2814	C ₁₅ H ₃₄ N ₆ O ₂	331.2816	0.6	[M+H] ⁺				
38	14.7	14.7-14.8									
39	14.9	14.8-14.9	323.2566	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	323.2581	4.6	[M+H] ⁺	<i>Ethyl 9-oxooctadeca-10,12-</i>	Sirius	89.189	
40	15.0	14.9-15.0	257.2254	C ₁₉ H ₂₈	257.2264	3.8	[M+H] ⁺	<i>limonene</i>			
41	15.0	15.0-15.2									
42	15.4	15.3-15.5	273.2562	C ₂₀ H ₃₂	273.2577	5.4	[M+H] ⁺	<i>Kaurane</i>	Metaboscape	930.5	
								<i>Kaurane</i>	GNPS	0.9212	
42	15.4	15.2-15.6	429.3702	C ₂₉ H ₄₉ O ₂	429.3727	5.8	[M] ⁺	<i>2.5.7.8-tetramethyl-2-[(E)-4.8.12-trimethyltridec-3-enyl]-3.4-dihydrochromen-1-ium-6-ol</i>	Sirius	78.571	
43	15.6	15.5-15.7	273.2568	C ₂₀ H ₃₂	273.2577	3.2	[M+H] ⁺	<i>Kaurane</i>	GNPS	0.929	
44	15.9	15.9-16.1	425.3762	C ₃₀ H ₄₈ O	425.3778	3.7	[M+H] ⁺	<i>Lupa-20(29),21-dien-3-ol</i>	Sirius	88.16	
45	16.3		359.3134	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	359.3156	6.2	[M+H] ⁺	<i>Glyceryl monostearate</i>	Sirius	99.342	
46	16.7	16.7-16.8	307.2615	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.2632	5.4	[M+H] ⁺	<i>Ethyl linolenate</i>	Sirius	86.364	

									<i>Linolenic acid ethyl ester</i>	GNPS	0.8786
47	16.9	16.8-16.9	441.3708	C ₂₆ H ₄₄ N ₆	441.3700	-1.8	[M+H] ⁺				
47	16.8	16.8-16.9	607.2892	C ₃₂ H ₅₄ N ₁₀ O ₃	607.2888	-0.6	[M+H] ⁺				
48	17.1	17.0-17.2									
49	17.3	17.2-17.4	621.3044	C ₃₃ H ₅₆ N ₁₀ O ₃	621.3045	0.1	[M+H] ⁺				
50	17.4	17.4-17.6	338.3400	C ₂₂ H ₄₃ N ₆	338.3417	5.1	[M+H] ⁺	<i>Erucylamide</i>	Sirius	99.083	
								<i>13-Docosenamide</i>	GNPS	0.9678	
50	17.4	17.4-17.5	391.2821	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391.2843	5.6	[M+H] ⁺	<i>Bis(2-ethylhexyl) phthalate</i>	Sirius	89.922	
								<i>Diethyl phthalate</i>	Metaboscape	987.9	
								<i>Diethyl phthalate</i>	GNPS	0.9783	
51	17.7	17.6-17.8	312.3237	C ₂₀ H ₄₁ N ₆	312.3261	7.7	[M+H] ⁺				
51	17.7	17.6-18.0	338.3394	C ₂₂ H ₄₃ N ₆	338.3417	6.9	[M+H] ⁺				
52	18.1	18.1-18.3									
53	18.3	18.3-18.4	467.3848	C ₃₂ H ₅₀ O ₂	467.3884	7.6	[M+H] ⁺				
54	18.4	18.4-18.5	483.3812	C ₂₈ H ₄₆ N ₆ O	483.3806	-1.3	[M+H] ⁺				
55	18.5	18.5-18.6	467.3873	C ₃₂ H ₅₀ O ₂	467.3884	2.3	[M+H] ⁺				
56	18.7	18.6-18.9	467.3861	C ₃₂ H ₅₀ O ₂	467.3884	4.8	[M+H] ⁺	<i>Lupa-18.21-dien-3-yl acetate</i>	Sirius	87.63	
57	19.0	18.9-19.1	467.3853	C ₃₂ H ₅₀ O ₂	467.3884	6.5	[M+H] ⁺				
58	19.8	19.7-19.9	463.3745								
59	19.9	19.9-20.0									
60	20.1	20.0-20.3									