



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y SISTEMAS NATURALES
DIRECCION DE POSTGRADO
MAGISTER EN FISIOLÓGÍA Y PRODUCCIÓN VEGETAL**

**BIOACTIVIDAD CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS DE CUATRO ESPECIES
NATIVAS DEL BOSQUE TEMPLADO DEL SUR DE CHILE.**

Tesis presentada como requisito para optar al grado de
Magíster en Fisiología y Producción Vegetal

Por:

Jesús Hernández Sarmiento

Comité de Tesis
Profesora Guía: Gloria Montenegro
Profesores Informantes
Miguel Gómez
Ady Giordano

18 de diciembre de 2023
Santiago - Chile

Agradecimientos

Extiendo mi agradecimiento a las personas que colaboraron a través de su acompañamiento, instrucciones y generosidad para el logro de este estudio, al laboratorio de productos naturales de la Facultad de Agronomía y Sistemas Naturales y el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química y Farmacia, ambos de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

*A mis profesores,
colegas de facultad y amigos.*

Índice

Abstract	2
Introducción	3
Materiales y métodos	6
Resultados y discusión	10
Conclusiones	17
Resumen	18
Referencias	19

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Propiedades medicinales según antecedentes etnobotánicos de especies seleccionadas	11
Tabla 2. Capacidad antioxidante.	13
Tabla 3. Mínima concentración inhibitoria (MCI) de los extractos contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	15
Figura 1. Especies elegidas para el estudio.	11
Figura 2. Fenoles totales y flavonoides totales.	12
Figura 3. Halo de inhibición de extractos vegetales y antibióticos, contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	14

Bioactividad contra bacterias patógenas de cuatro especies nativas del bosque templado del sur de Chile.

Jesús Hernández Sarmiento

Departamento de Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Abstract

Jesús Hernández Sarmiento. Bioactivity against pathogenic bacteria of four species native to the temperate Chilean rainforest. The native and endemic plants of Chile present potential as a source of new molecules that offer ecosystem services, specifically in food and medicine, which is why it is of interest to discover their potential through their bioactivity and antioxidant capacity, both relevant to human health. In this study, four species with ethnobotanical backgrounds were selected, and their antioxidant capacity and bioactivity against pathogenic bacteria were evaluated through the use of ethanolic extracts. The antioxidant capacity was measured by three tests: ferric reduction antioxidant power (FRAP), ABTS+ radical scavenger and DPPH radical scavenger, while bioactivity against pathogenic bacteria was evaluated by calculating the minimum inhibitory concentration (MIC) and halo inhibition (HI) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Additionally, the amount of total phenols was determined using the Folin-Ciocalteu methodology and total flavonoids using aluminum chloride. *Cissus striata* was the species whose extract obtained the highest antioxidant capacity in the three tests. The amount of total phenols has a high positive correlation with the antioxidant capacity of each species. *Mitraria coccinea* and *C. striata* presented activity against *S. aureus* where *M. coccinea* obtained the highest zone of inhibition and *C. striata* obtained the lowest MIC. Total flavonoids have a high positive correlation with the zone of inhibition and a high negative correlation with the MIC. Finally, it was determined that *C. striata* and *M. coccinea* are species of interest that offer ecosystem services through the composition of their extracts.

Key words: Bioprospection, Phenolic content, Antioxidant Capacity, Native plants, Chilean rainforest.

Introducción

Chile posee una diversidad de aproximadamente 4655 especies consideradas nativas o endémicas para el territorio, contando con un gran porcentaje de endemismo (39,2%) lo cual lo constituye como un país con una importante flora de potencial único en cuanto al uso de recursos genéticos para beneficios humanos (Rodríguez et al, 2018). Distintos servicios ecosistémicos se han aprovechado a partir de sus características únicas como son la selección de especies para uso ornamental, material de construcción, especies para creación de artesanía, alimentación y uso medicinal (Díaz-Forestier et al., 2019). En relación con el uso medicinal, sus propiedades pueden atribuirse tanto al beneficio de su alimentación como al resultado de su metabolismo secundario que corresponden a pequeñas moléculas derivadas del metabolismo primario (fotosíntesis, translocación y respiración) y que tienen diversas funciones dentro de la planta. Estos compuestos han sido utilizados ampliamente por el humano siendo la morfina el primer compuesto aislado del opio de amapola (*Papaver somniferum*) permitiendo abrir el estudio sobre los metabolitos (Teoh, E. S., 2015; Twajj, B. M., y Hasan, Md., 2022).

Entre los principales metabolitos secundarios podemos encontrar los siguientes grupos (Alamgir A. N. M. ,2018):

- **Terpenos:** compuestos principalmente por carbono e hidrógeno, en este grupo se puede encontrar como ejemplos el geraniol (monoterpeno) y el licopeno (tetraterpeno).
- **Fenoles:** compuestos por azúcares simples y anillos benceno, en este grupo encontramos la hidroxycumarina (cumarinas), resveratrol (lignanós), quercetina (flavonoides) y ácido tánico (taninos)
- **Compuestos nitrogenados o sulfurados:** En este grupo pertenecen los alcaloides, aminoácidos no proteicos (canavanina), y compuestos sulfurados como fitoalexinas, glucosinolatos, tioninas, entre otros.

Muchos de estos compuestos han sido comprobados como benéficos para el uso humano con efectos antioxidante, anticancerígeno, desinflamatorio, antimicrobianos además de combatir enfermedades crónicas no heredables como la hipertensión y diabetes (Seca, A. M. L., y Trendafilova, A., 2021), entre los cuales destacan los terpenos (Masyita, A. et al., 2022), flavonoides (Middleton, E. et al., 2000) y taninos (Huang, Q. et al., 2018)

Estas moléculas que provocan multiplicidad de beneficios los podemos definir como:

“Un tipo de químico encontrado en bajas cantidades en plantas y algunos alimentos (como son frutas, vegetales, nueces, aceites y granos enteros). Los compuestos bioactivos tienen acción en el cuerpo que promueve una buena salud. Son estudiados en la prevención del cáncer, enfermedades del corazón y otras enfermedades [...]” (National Cancer Institute. 2023)

Para Chile existe un catálogo de 103 especies medicinales aprobadas por el ministerio de salud, el cual se compone de un 60% de especies introducidas, 33% nativas y un 7% de especies endémicas (FUCOA 2022 y Rodríguez et al. 2018). Sin embargo, el registro de especies con uso medicinal en el territorio puede ser tan alto como al menos 501 registros según Díaz-Forestier et al. (2019).

El uso de estos compuestos está dado por la implementación cultural de la medicina complementaria o tradicional, donde el 71% de la población declara hacer uso de este tipo de producto, por falencias de los sistemas de salud nacional, siendo cada vez más los estudios que comprueban y respaldan los efectos farmacológicos de plantas utilizadas en medicina tradicional (Bodeker y Kronenberg, 2002).

Uno de los problemas para el caso de plantas de uso medicinal en Chile, es que un 5,4% de las especies nativas presenta problemas de conservación, ya sea por sobre explotación o bien el desplazamiento de su hábitat por zonas urbanas. (Montenegro et al., 2001; Wilckens et al., 2013). El segundo desafío tiene relación con la falta de conocimientos en cuanto a la composición de los compuestos extraídos de la planta para su uso medicinal, estos compuestos en la medicina tradicional no se utilizan de forma aislada, sino que son extraídos a través de infusiones, alcohol, aceites, entre otros, lo que implica que existan docenas o incluso cientos de metabolitos secundarios de diversos grupos estructurales actuando simultáneamente, provocando como consecuencia que sus efectos sean múltiples (Wink, 2015). Podemos encontrar como ejemplo de esta última problemática el caso de la especie *Aristolochia chilensis*, en donde Urzúa et al. (2013) determinaron, en la composición de los extractos de distintos órganos, la presencia de un agente nefrotóxico y carcinogénico llamado ácido aristolóquico, con lo cual la planta quedó fuera de los registros de uso medicinal.

La relevancia entonces de aportar conocimiento a través de la bioprospección, definida como la búsqueda sistemática y organizada de productos útiles a partir de recursos naturales como plantas, microorganismos, animales y otros, que puedan ser desarrollados para comercialización y beneficio de la sociedad (Oyemitan, 2017), radica

en reafirmar a través de la evidencia las propiedades farmacológicas y nutraceuticas de los extractos, junto con revelar especies cuyo uso alimenticio o medicinal sea nocivos para la salud.

La bioprospección de las plantas nativas y endémicas es un primer paso en el avance y superación de barreras en el mundo farmacéutico, al descubrir valor ecosistémico aportamos a la creación de variedades locales de plantas medicinales (Vogel, H. et al., 2004), que permitan obtener una concentración ideal de metabolitos secundarios de manera uniforme a partir de un cultivo a través de la cosecha sostenible y una segunda barrera corresponde al factor ecológico, ya que la situación global de escasez hídrica y de suelo fértil, junto con la conservación de plantas nativas para su uso hacen necesario el uso de herramientas innovadores para la producción y extracción de estos nuevos compuestos (Teoh, E. S., 2015; Twaij, B. M., y Hasan, Md., 2022).

En este estudio se plantea la hipótesis de que los recursos naturales nativos y endémicos con antecedentes etnobotánicos proveen servicios ecosistémicos a través de las propiedades biológicas específicas, con el fin de obtener productos naturales con bioactividad.

El objetivo general será seleccionar especies nativas o endémicas con antecedentes etnobotánicos que muestren un potencial de propiedades biológicas específicas, mientras que los objetivos específicos serán los siguientes:

1. Recopilar antecedentes etnobotánicos para la selección de 4 especies mostrando sus propiedades, distribución y antecedentes florísticos.
2. Resaltar las propiedades específicas de las especies y su uso etnobotánico local.
3. Obtener extractos fenólicos para pruebas de bioactividad de las plantas seleccionadas desde hojas adultas.
4. Determinar fenoles y flavonoides totales de los extractos de las especies seleccionadas.
5. Determinar experimentalmente las propiedades bactericida y bacteriostática de los extractos frente a patógenos de afecciones humanas.
6. Relacionar la composición química de los extractos con sus propiedades bioactivas.

Metodología

Elección de especies

Para evaluar su uso etnobotánico se hizo una revisión de registros en la base de datos RIZOMA (Cordero et al. 2022) y antecedentes relevantes que compilan relatos de registro de uso medicinal de diversas especies. A partir de esta revisión, se seleccionaron todas las especies que cumplieran los siguientes requisitos:

- Especies con uso medicinal, función cicatrizante y/o desinfectante.
- Vía de administración oral o de uso tópico.
- Hoja como parte útil
- Especies leñosas ya sea arbusto, árbol o liana.
- Especies categorizadas como nativa o endémica según Rodríguez et al. (2018), perteneciente al bosque templado lluvioso de Chile.

Sitio de colección

Todas las muestras de cada especie fueron recolectadas en el sitio ubicado en 41°00'04.4"S 72°34'23.0"O conocido como "sector de la Picada" en la comuna de Puerto Octay, región de Los Lagos, Chile. Se seleccionaron cinco individuos al azar de cada especie y se recolectó sus hojas frescas plenamente desarrolladas.

Extracción de compuestos fenólicos.

Las hojas fueron secadas en invernadero a temperatura ambiente y posteriormente trituradas hasta obtener 100 gramos de hoja seca. Las hojas trituradas fueron maceradas en una solución de etanol al 70% (1:10, *p:v*, g: mL, hoja:etanol). Se dejaron macerando durante dos días cada muestra, luego el líquido sobrenadante fue recolectado, repitiendo el procedimiento dos veces más, realizando un total de tres maceraciones. Cada extracto fue rotoevaporado a 38°C para dejar el extracto suspendido en agua, el cual fue congelado y liofilizado para obtener un producto seco para su almacenamiento a 4°C.

Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (FET) fue determinado según el método de Folin-Ciocalteu. Se preparó una solución de 1 mililitro que contuvo 100 microlitros del extracto vegetal (100 mg·ml⁻¹) mezclado con 500 microlitros del reagente Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) y 400 microlitros de una solución de Na₂CO₃ (7,5%). Luego de 40 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se extrajo una alícuota de 200 microlitros en triplicado

y se midió la absorbancia a 760 nm utilizando un lector de placas espectrofotométrico modelo FlexA-200. La cuantificación fue realizada por una regresión lineal de una curva de calibración construida con ácido gálico (10 a 150 ppm). Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por 1 gramo de extracto seco. Los valores son reportados como medias \pm desviación estándar (DE).

Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales (FLT) fue estimado utilizando una metodología basada en cloruro de aluminio. Se preparó una solución de 1 mililitro que contuvo 100 microlitros del extracto vegetal ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) mezclado con 400 microlitros de agua y 30 microlitros de NaCO_2 (5%). Se reservó la solución por 5 minutos en oscuridad y temperatura ambiente y luego se adicionó 30 microlitros de una solución de AlCl_3 (10%). Esta nueva solución fue reservada por 11 minutos en oscuridad y temperatura ambiente y luego se agregó 200 microlitros de NaOH (1M) y 240 microlitros de agua destilada. Inmediatamente se extrajo una alícuota de 200 microlitros de la solución en triplicado para cada muestra problema y se midió la absorbancia a 510 nm utilizando un lector de placas espectrofotométrico modelo FlexA-200. El contenido total de flavonoides fue calculado como miligramos de catequina equivalentes por 1 gramo de extracto seco a partir de una curva de calibración (100 a 450 ppm de catequina). Valores son reportados como la media \pm desviación estándar (DE).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las muestras fue determinada mediante 3 pruebas que se describen a continuación.

Prueba de secuestro de radical ABTS^+ (ABTS). Se mezclaron 50 microlitros de cada muestra problema por vórtex con 150 microlitros de una solución de ABTS cuya absorbancia medida a 732 nm resulte en $1,1 \pm 0,02$, conservando la mezcla por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La medición de absorbancia se realizó a 732 nm utilizando un lector de placas espectrofotométrico modelo FlexA-200, en triplicado para cada muestra problema. La capacidad antioxidante (CA_{ABTS}) fue calculada como miligramos de Trolox equivalentes por 1 gramo de extracto seco a partir de una curva de calibración (2 a 50 ppm de Trolox) y expresando el resultado como la media \pm desviación estándar (DE).

Prueba de secuestro de radical DPPH. Se mezclaron 50 microlitros de cada muestra problema por vórtex con 150 microlitros de una solución de DPPH cuya absorbancia medida a 517 nm resulte en $1,1 \pm 0,02$, conservando la mezcla por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La medición de absorbancia se realizó a 517 nm utilizando un lector de placas espectrofotométrico modelo FlexA-200, en triplicado para cada muestra problema. La capacidad antioxidante (CA_{DPPH}) fue expresada como miligramos de Trolox equivalentes por 1 gramo de extracto seco a partir de una curva de calibración (2 a 60 ppm de Trolox) y expresando los resultados como la media \pm desviación estándar (DE).

Prueba de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP): El reagente FRAP contiene 2,5 mL de una solución 10 mmol por litro de TPTZ en 40 mmol de HCl, 2,5 ml de una solución 20 milimolar de $FeCl_3$ hexahidratado y 25 ml de buffer acetato 300 milimolar a un pH 3.6. Esta solución fue calentada a 37°C, y se mezcló 150 microlitros del reagente FRAP junto con 50 microlitros del extracto vegetal, en triplicado para cada muestra problema. Esta mezcla fue almacenada e incubada por 30 minutos a 37 °C para la medición de absorbancia a 593 nm utilizando un lector de placas espectrofotométrico modelo FlexA-200. La capacidad antioxidante (CA_{FRAP}) fue calculada como miligramos de Trolox equivalentes por 1 gramo de extracto seco a partir de una curva de calibración (2 a 20 ppm de Trolox) y expresando el resultado como la media \pm desviación estándar (DE).

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se determinó mediante halos de inhibición de crecimiento en medios Mueller Hinton y mínima concentración inhibitoria, frente a dos bacterias, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Para la construcción de placas y la observación de halos de inhibición, cada cepa fue propagada en agar Mueller Hinton por 24 h. Se seleccionaron colonias de cada cepa y fueron disueltas en una solución salina para obtener una concentración viable de 10^8 CFU/mL por comparación visual con el patrón 0,5 de McFarland. Las cepas fueron distribuidas nuevamente en placas Petri con agar Mueller Hinton y se realizaron orificios de 6 mm en el agar para ser rellenados con 100 μ L de solución de extracto vegetal (100.000 ppm). Los cultivos en placas Petri fueron incubados por 24 h a 35°C y luego de 24 h se midió el diámetro de inhibición. Cada extracto fue evaluado en triplicado contra ambas bacteria.

En placas de pocillos de 300 microlitros se preparó una serie de diluciones para determinar la mínima concentración inhibitoria (MCI). Cada pocillo fue dispuesto con 150 microlitros de caldo de cultivo. En la primera fila de pocillos se agregó 150 microlitros del extracto a una concentración de $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a partir de aquí se extrajeron alícuotas sucesivas de 100 microlitros, siendo el extracto diluido a la mitad sucesivamente, hasta alcanzar una concentración de $0,39 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (256 veces menor a la concentración original, 8 diluciones sucesivas a la mitad de la concentración). Una vez preparadas las diluciones, se agregó 50 microlitros de caldo de cultivo con bacteria ($10^6 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0.5 McFarland) a cada pocillo. Finalmente, a partir de cada pocillo completo se extrajo 100 microlitros que fueron agregados en placas Petri para su observación posterior a una incubación por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. La zona que no presentó crecimiento de bacterias fue identificada para determinar la MCI (según la turbidez comparada con el tratamiento control). Cada extracto fue evaluado en triplicado contra ambas bacteria.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de Tukey con un 99% de confianza. Todos los análisis se realizaron en triplicado y fueron expresados como promedios. Para indicar correlaciones y su significancia, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson y el valor-p. El criterio para indicar diferencias significativas fue $p < 0.01$ para el análisis de varianza y $p < 0.05$ para el coeficiente de correlación.

Resultados y discusiones

Elección de especies

A partir de los antecedentes recopilados, las especies elegidas se describen a continuación, utilizando información de Hoffmann (2012), Rodríguez et al. (2018) y Riedemann y Aldunate (2011) y se muestra su hábito y detalle de algunas estructuras de cada especie en la **Figura 1**:

- *Buddleja globosa* Hope: Arbusto siempreverde, perteneciente a la familia Buddlejaceae, puede alcanzar alturas de 2 a 3 metros, habita normalmente en cerros a pleno sol y quebradas, presenta mayor abundancia hacia la zona sur en comparación a regiones de la zona centro y norte. Se distribuye desde las regiones de Arica y Parinacota hasta la región de Los Lagos.
- *Cissus striata* Ruiz & Pav: Liana o trepadora leñosa siempreverde, perteneciente a la familia Vitaceae, habita normalmente en ambientes húmedos y de baja temperatura, bajo el dosel del bosque en la zona centro o bien expuesto a pleno sol en las copas de árboles y arbustos en zonas más meridionales, comportándose como rastrera cuando no encuentra soporte. Utiliza zarcillos caulomáticos para asirse. Se distribuye desde la región de Coquimbo hasta la región de Magallanes.
- *Mitraria coccinea* Cav: Arbusto trepador siempreverde, perteneciente a la familia Gesneriaceae, habita principalmente en ambientes húmedos y sombríos o a orillas de camino. Utiliza raíces adventicias para asirse a troncos. Se distribuye desde la región de Coquimbo hasta la región de Magallanes.
- *Raukava laetevirens* (Gay) Frodin: Árbol o arbusto apoyante siempreverde, puede alcanzar alturas de hasta 8 metros, habita cercano a cursos de agua y zonas boscosas. Se distribuye desde la región del Maule hasta la región de Magallanes.

En la **Tabla 1** se resume la información de las especies elegidas a través de los antecedentes etnobotánicos recopilados y una caracterización de su información en cuanto a nombre científico, familia y propiedades.

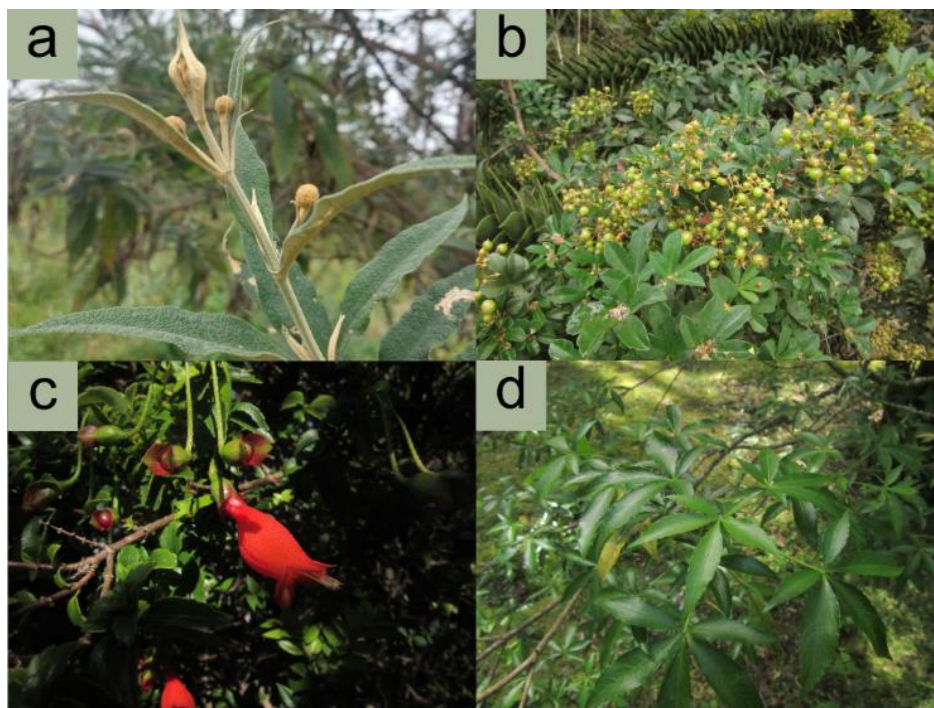


Figura 1. Especies elegidas para el estudio: a = *Buddleja globosa* Hope.; b = *Cissus striata* Ruiz et Pav.; c = *Mitraria coccinea* Cav.; d = *Raukaura laetevirens* (Gay) Frodin.

Tabla 1. Propiedades medicinales según antecedentes etnobotánicos de especies seleccionadas. * Construido con información de Cordero et al. (2022), Espinoza, E. (1987), Millas, M. (2023), Montenegro, G. (2002), Muñoz et al. (1981), Romo, M. (2001), Rosales, D. (1877) y Wilhelm de Moesbach, E. (1992).

Nombre científico	Propiedades*
<i>Buddleja globosa</i> Hope.	Cicatrizante, antiinflamatorio, diurético, antiséptico, gastroprotector, carminativo.
<i>Cissus striata</i> Ruiz et Pav.	Refrescante, astringente, para tratar heridas y afecciones cutáneas.
<i>Mitraria coccinea</i> Cav.	Para el tratamiento de afecciones cutáneas (hematomas, abscesos, inflamaciones, callos), purgante, vomitiva, para curar heridas.
<i>Raukaura laetevirens</i> (Gay) Frodin.	Sudorífico, diurético, purgativo, para tratar inflamaciones y quemaduras. Fumigante en conjuntivitis.

Contenido de fenoles totales y flavonoides totales

El valor obtenido para cada especie en fenoles y flavonoides totales puede observarse en la **Figura 2**. El mayor contenido de fenoles totales se observa en el extracto seco de *C. striata* (485.3 mgeq·g⁻¹ expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico) presentando diferencias significativas ($p < 0.01$) respecto a las otras tres especies, las cuales no presentaron diferencias significativas entre sí. En relación con el contenido de flavonoides, el extracto seco de *M. coccinea*, obtuvo significativamente ($p < 0.01$) el valor máximo de las muestras (225.2 mgeq·g⁻¹ expresado como miligramos equivalentes de catequina), seguido de *C. striata* (176.1 mgeq·g⁻¹) y finalmente por *B. globosa* (101.5 mgeq·g⁻¹) y *R. laetevirens* (36.0 mgeq·g⁻¹).

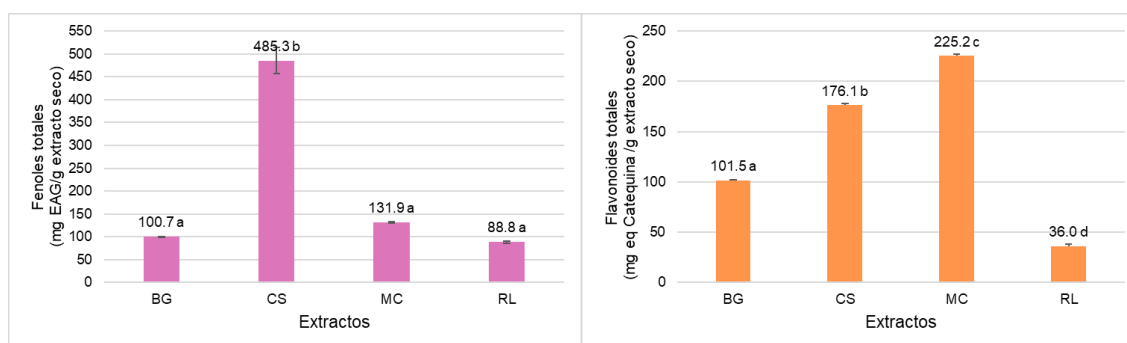


Figura 2. Fenoles totales (izquierda) y flavonoides totales (derecha). BG = *Buddleja globosa*. CS = *Cissus striata*. MC = *Mitraria coccinea*. RL = *Raukava laetevirens*. Letras distintas indican diferencias significativas entre especies ($p < 0,01$).

En relación con el contenido de fenoles y flavonoides totales, no se registran antecedentes previos para hoja en ninguna de las especies estudiadas, sin embargo, hay algunos registros para otras estructuras, en el caso de *C. striata*, Montenegro et al. (2012) reportan una concentración de 9,37 mg EAG · g⁻¹ de polen.

Los valores obtenidos en fenoles totales pueden compararse con otras especies de uso medicinal o cotidiano, como son el té (*Camellia sinensis*), que ha sido reportada como un excelente antioxidante y con una alta cantidad de fenoles totales, se pudo obtener hasta un máximo de 252.65 ± 4.74 mg EAG·g⁻¹ de peso seco, mientras que especies comúnmente utilizadas en productos cosméticos para la piel como *Fragaria vesca* o *Rubus fruticosus* presentaron valores de fenoles totales (para extracto de hoja) de 148.48 ± 3.12 mg EAG·g⁻¹ peso seco y 121.87 ± 2.11 mg EAG·g⁻¹ de peso seco (Zhao et al. 2019 y Ziemlewska et al. 2021). Esto nos puede ayudar a comprender que *C.*

striata, *M. coccinea* y *B. globosa* son especies que poseen una cantidad alta de fenoles totales, relevando la importancia de una caracterización más profunda.

Pérez-Jiménez et al. (2010) destacan que normalmente existen altos valores de fenoles totales en frutos y semillas, principalmente en tejidos epidérmicos y aquellos órganos que se observan de color negruzco, sin embargo, los resultados anteriores destacan que altos valores en fenoles pueden encontrarse también en hojas, lo cual es de suma importancia en cuanto a rendimiento productivo y optimización de los procesos de obtención.

Capacidad antioxidante

El extracto seco de *C. striata* obtuvo en las tres pruebas la mayor capacidad antioxidante con diferencias significativas, en comparación a las otras tres especies como se observa en el **Tabla 2**, obteniendo el mayor valor en CA_{ABTS} ($1101,2 \text{ mgeq}\cdot\text{g}^{-1}$), seguido de CA_{FRAP} ($869.9 \text{ mgeq}\cdot\text{g}^{-1}$) y finalmente $CA_{DPPH} = (321,6 \text{ mgeq}\cdot\text{g}^{-1})$, siendo este último significativamente menor que el valor CA_{ABTS} y CA_{FRAP} ($p < 0,01$). Al mismo tiempo en el análisis de correlación se observa una fuerte relación positiva entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de cada extracto.

Tabla 2. Capacidad antioxidante. Se muestran los resultados para reducción férrica FRAP (CA_{FRAP}), radical libre ABTS⁺ (CA_{ABTS}) y radical libre DPPH (CA_{DPPH}). BG = *Buddleja globosa*. CS = *Cissus striata*. MC = *Mitraria coccinea*. RL = *Raukava laetevirens*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies para una misma prueba de capacidad antioxidante ($p < 0,01$).

Especie	CA_{FRAP}	CA_{ABTS}	CA_{DPPH}
BG	$220,96 \pm 5,53^a$	$218,01 \pm 30,52^a$	$38,03 \pm 0,129^a$
CS	$869,89 \pm 96,91^b$	$1101,18 \pm 221,08^b$	$321,61 \pm 17,44^b$
MC	$133,60 \pm 11,56^c$	$270,94 \pm 28,88^a$	$38,47 \pm 0,40^a$
RL	$10,68 \pm 3,27^a$	$235,39 \pm 9,96^a$	$29,52 \pm 2,75^a$

Esta correlación se valida al revisar otros estudios previos de capacidad antioxidante y contenido de fenoles, ya que los compuestos fenoles tienen la capacidad de donar electrones que contribuye a la capacidad antioxidante (Aryal et al. 2019 y Perron, N. y Brumaghim, J. 2009). En el caso del té verde, Zhao et al. (2019) evaluaron su capacidad antioxidante mediante el secuestro del radical ABTS⁺, donde alcanzó un valor de

625.725 mg equivalente de Trolox por gramo de peso seco, lo que al comparar con el valor de *C. striata* podría indicar a esta especie nativa como un extracto de gran capacidad antioxidante.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de cuatro extractos vegetales fue probada mediante halos de inhibición (HI) y concentración mínima inhibitoria (CMI) en comparación dos antibióticos, los resultados fueron expresados en la **Figura 3** para el HI y en el **Cuadro 3** para la CMI. En relación con los halos de inhibición, contra *E. coli* ningún extracto logró alcanzar los 20 mm de diámetro, donde *M. coccinea* obtuvo el mayor resultado (12 mm) significativamente mayor ($p < 0.01$) que las otras tres especies y el antibiótico ampicilina. Similarmente para *S. aureus*, las cuatro especies presentaron valores superiores, sin embargo, solo *M. coccinea* obtuvo un HI superior a 20 mm con 26.7 mm, el cual es significativamente menor que ambos antibióticos, pero mayor que los otros tres extractos vegetales.

En la determinación de la CMI se observó que *M. coccinea* obtuvo el menor valor de los cuatro extractos contra *E. coli* logrando un mínimo de 12.5 mg·ml⁻¹, mientras que *C. striata* obtuvo el menor valor contra *S. aureus* alcanzando una concentración de 0.39 mg·ml⁻¹.

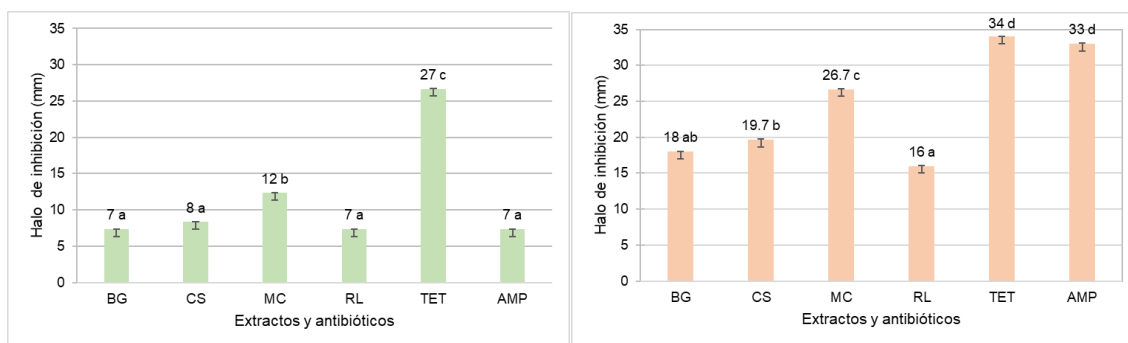


Figura 3. Halo de inhibición de extractos vegetales y antibióticos, contra *E. coli* (izquierda) y *S. aureus* (derecha). BG = *Buddleja globosa*. CS = *Cissus striata*. MC = *Mitriaria coccinea*. RL = *Raukava laetevirens*. TET = Tetraciclina. AMP = Ampicilina. Letras distintas indican diferencias significativas entre muestras.

Tabla 3. Mínima concentración inhibitoria (MCI) de los extractos contra *E. coli* y *S. aureus*. Resultados son expresados en mg·ml⁻¹. BG = *Buddleja globosa*. CS = *Cissus striata*. MC = *Mitraria coccinea*. RL = *Raukaua laetevirens*. TET = Tetraciclina. AMP = Ampicilina.

Extracto o antibiótico	MCI para <i>E. coli</i> (mg·ml⁻¹)	MCI para <i>S. aureus</i> (mg·ml⁻¹)
BG	50	6.25
CS	50	0.39
MC	12.5	1.56
RL	50	6.25
TET	6.25	0.39
AMP	25	1.56

Los resultados pueden ser comparados con investigaciones previas para algunas de las especies. En el estudio de Mølgaard et al. (2011) se realizaron distintos tipos de extractos a diferentes órganos de plantas nativas de Chile, donde se evaluaron las mismas especies de este estudio, determinando una cantidad mínima inhibitoria del crecimiento bacteriano (desde ahora MIA por sus siglas en inglés). Se debe considerar que los valores de este parámetro suelen ser menores a los del cálculo de MCI por la metodología que se utiliza (Scheler et al. 2020). *B. globosa* no presentó actividad contra bacterias en ninguna metodología de extracción presentadas por el autor, lo cual se relaciona con la baja actividad obtenida en este estudio. En *C. striata* presentó un MIA < 1 mg·ml⁻¹ el extracto en metanol de tallos contra *E. coli*, lo cual difiere de los resultados obtenidos en este trabajo para *E. coli*, en cambio para *S. aureus* este mismo extracto no presentó actividad, lo cual se contrasta con el extracto de hoja en metanol, donde sólo presentó actividad frente a *S. aureus* con un MIA cercano a 1 mg·ml⁻¹ que en relación con los resultados obtenidos es similar a los que se presentan en el **Tabla 3**. Para el extracto de *M. coccinea* y *R. laetevirens* el mismo estudio no presentó resultados de actividad contra las bacterias en ninguna de las metodologías de extracción, lo cual difiere ampliamente con los resultados obtenidos para el caso de *M. coccinea* cuya actividad fue demostrada mediante dos metodologías.

La alta correlación entre el contenido de flavonoides totales y la capacidad antibacteriana (positiva para HI y negativa para MCI) es comparable con las conclusiones de otros autores que indican que la capacidad bactericida de la planta se relaciona íntimamente con los flavonoides que produce, los cuales producen efectos antimicrobianos como disrupción de membranas, prevención de desarrollo de bio-películas bacterianas, inhibición de síntesis de coberturas celulares, entre otros, presentando mayor acción frente a bacterias Gram positivas por sobre Gram negativas (Górniak et al., 2019 y Kauffmann y Silva, 2023). Debido a la actividad presentada por *C. striata* y *M. coccinea*, sumado a ser las dos especies con mayor contenido de flavonoides totales, nos puede dar una referencia que los flavonoides producidos podrían funcionar bien para la prevención de infecciones para heridas superficiales.

Es relevante mencionar que a pesar de que exista una alta correlación negativa entre el HI y la MCI, se producen ciertas diferencias entre pruebas para un mismo extracto, como ocurre en los valores obtenidos para *C. striata* y *M. coccinea*, por lo cual es esencial realizar distintas pruebas, tanto cualitativas como cuantitativas, que sean complementarias para comprobar la real capacidad antibacteriana de cada planta (Balouiri et al., 2016).

Conclusiones

Sobre la base de los resultados presentados, se puede confirmar la hipótesis en la cual los recursos naturales nativos con antecedentes etnobotánicos proveen de servicios ecosistémicos mediante sus propiedades biológicas específicas. Existe una alta correlación entre el contenido de fenoles y flavonoides totales con la capacidad antioxidante y bacteriológica de cada extracto, respectivamente, obteniendo dos especies de interés, *Cissus striata* y *Mitraria coccinea*, donde la primera presenta alta capacidad antioxidante y ambas tienen actividad contra la bacteria *S. aureus*.

El presente trabajo entrega evidencia valiosa para dos especies no evaluadas anteriormente, abriendo la posibilidad de aplicar estos extractos como antioxidantes y agentes antibacteriales en la industria.

Se cumplen los objetivos planteados. Es necesario realizar pruebas de identificación para las moléculas de valor y pruebas a nivel celular para complementar estos estudios. *R. laetevirens* no presentó actividad antimicrobiana, ni actividad antioxidante relevante. Sería de interés evaluar los terpenos al pertenecer a la familia Araliaceae, como plantean Hao et al. (2015).

La relevancia de este tipo de investigaciones cae en el marco de la urgencia por el descubrimiento de nuevas moléculas que permitan la producción de antibióticos contra patógenos resistentes, según plantea la Organización Mundial de la Salud (2017) la bacteria *S. aureus* es de prioridad alta para la guía de nuevas investigaciones en este campo debido al desarrollo de resistencias a vancomicina y metilicina.

Finalmente, este tipo de estudio permite relevar la importancia del estudio de la vegetación y su relación con los seres humanos, ya que pone en evidencia el valor de los múltiples servicios ecosistémicos que cada planta tiene, basado en el conocimiento popular y de pueblos ancestrales, generando entonces un valor que permite promover acciones para evitar la pérdida progresiva de cultura e identidad arraigada al conocimiento popular del uso de la vegetación en Chile.

Resumen

Las plantas nativas y endémicas de Chile presentan un potencial como fuente de nuevas moléculas que ofrezcan servicios ecosistémicos, específicamente en alimentación y medicina, por lo cual es de interés descubrir su potencial mediante su bioactividad y capacidad antioxidante, ambas relevantes para la salud humana. En este estudio se seleccionaron 4 especies con antecedentes etnobotánicos y se evaluó su capacidad antioxidante y bioactividad contra bacterias patógenas mediante el uso de extractos etanólicos. La capacidad antioxidante se midió mediante 3 pruebas: poder antioxidante por reducción férrica (FRAP), secuestro de radical ABTS+ y secuestro de radical DPPH, mientras que la bioactividad contra bacterias patógenas se evaluó mediante el cálculo de la mínima concentración inhibitoria (MCI) y halo de inhibición (HI) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente se determinó la cantidad de fenoles totales mediante la metodología de Folin-Ciocalteu y flavonoides totales mediante uso de cloruro de aluminio. *Cissus striata* fue la especie cuyo extracto obtuvo la mayor capacidad antioxidante en las 3 pruebas. La cantidad de fenoles totales tiene una alta correlación positiva con la capacidad antioxidante de cada especie. *Mitraria coccinea* y *C. striata* presentaron actividad frente a *S. aureus* donde *M. coccinea* obtuvo el mayor halo de inhibición y *C. striata* obtuvo la MCI más baja. Los flavonoides totales tienen una alta correlación positiva con el halo de inhibición, y alta correlación negativa con la MCI. Finalmente se determinó que *C. striata* y *M. coccinea* son especies de interés que ofrecen servicios ecosistémicos a través de la composición de sus extractos.

Fuente de financiamiento: Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía y Sistemas Naturales

Referencias

- Alamgir A. N. M. 2018. Biotechnology, In Vitro Production of Natural Bioactive Compounds, Herbal Preparation, and Disease Management (Treatment and Prevention). Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds, 74, 585–664. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_7
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., & Koirala, N. 2019. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* (Basel, Switzerland), 8(4), 96. <https://doi.org/10.3390/plants8040096>
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bodeker, G. y F. Kronenberg. 2002. A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. *Am J Public Health* 92(10): 1582-1591
- Cordero, S., Abello, L., Gálvez, F. 2022. Rizoma: a new comprehensive database on traditional uses of Chilean native plants. *Biodiversity Dara Journal* 10: e80002. <https://doi.org/10.3897/BDJ.10.e80002>
- Díaz-Forestier, J., León-Lobos, P., Marticorena, A., Celis-Diez, J. & Giovannini, P. 2019. Native Useful Plants of Chile: A Review and Use Patterns. *Econ Bot* 73, 112–126. <https://doi.org/10.1007/s12231-019-09447-2>
- Espinoza, Enrique. 1897. *Plantas medicinales de Chile*. Santiago: Imprenta y Encuadernación Barcelona, 1897.
- Fundación de Comunicaciones, Capacitación y Cultura del Agro (FUCOA). 2018. 103 hierbas medicinales. Disponible en: https://www.fucoa.cl/publicaciones/hierbas_medicinales/64/
- Górniak, I., Bartoszewski, R. y Króliczewski, J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev* 18, 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Hao, D., Gu, X. y Xiao, P. 2015. Phytochemical and biological research of *Panax* medicinal resources. En Hao, D., Gu, X. y Xiao, P. (Eds.), *Medicinal Plants Chemistry, Biology and Omics* (pp. 641-670). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00015-3>

Hoffman, A. 2011. Flora Silvestre de Chile Zona Central. Editorial Fundación Claudio Gay.

Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., & Wang, Y. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)*, 4(2), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004>

Kauffmann, A. C., y Castro, V. S. 2023. Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(4), 645. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040645>

Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. B., Nainu, F., & Simal-Gandara, J. 2022. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food chemistry*: X, 13, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>

Middleton, E., Jr, Kandaswami, C., y Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673–751.

Millas, M. 2023. *Dioses de la medicina en la Araucanía*. Libros del Amanecer Ltda.

Mølgaard, P., Holler, J., Asar, B., Liberna, I., Rosenbæk, L., Jebjerg, C., Jørgensen, L., Lauritzen, J., Guzman, A., Adersen, A. y Simonsen, H. 2011. Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. *Journal of ethnopharmacology*. 138. 219-27. [10.1016/j.jep.2011.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.006).

Montenegro, G., Patrick, G., Echenique, P., Gómez, M. y B. Timmermann. 2001. Mechanisms towards a sustainable use of *Chorizanthe vaginata* Benth. var. *marítima* Remy: a medicinal plant from Chile. *Phyton, Int. J. Exp. Bot.* (68): 91 – 106

Montenegro, G. 2002. *Chile nuestra flora útil*. Editorial Universidad Católica de Chile.

Montenegro, G., Pizarro, R., Mejías, E. y Rodríguez, S. 2012. Biological evaluation of bee pollen from native Chilean plants. *Phyton*. 82. 7-14.

Muñoz, M., Barrera, E. y Meza, I. 1981. *El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile*. En publicación ocasional N° 33, Santiago: Editores Museo Nacional de Historia Natural.

National Cancer Institute. 2023. NCI Dictionary of cancer terms. Extraído de: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bioactive-compound>

Organización Mundial de la Salud. 2017. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva.

Oyemitan, I. A. 2017. African medicinal spices of genus Piper. In: Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Academic Press, pp. 581-597

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., y Scalbert, A. 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. European journal of clinical nutrition. 64 Suppl 3. S112-20. 10.1038/ejcn.2010.221.

Perron, N.R., Brumaghim, J.L. 2009. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. Cell Biochem Biophys 53, 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>

Riedemann, P. y Aldunate, G. 2012. Flora nativa de valor ornamental zona sur y austral. Editorial Chagual.

Rodríguez, R., C. Marticorena, D. Alarcón, C. Baeza, C. Cavieres, V. Finot, N. Fuentes, A. Kiessling, M. Mihoc, A. Pauchard, E. Ruiz, P. Sánchez y A. Marticorena. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. Gayana Botánica 75(1): 1-430.

Romo, M. 2001. *Folklore médico de Chiloé*. Ediciones del Orfebre, Santiago, Chile.

Rosales, D. 1877. *Historia general del reyno de Chile. Flandes indiano*. Imprenta del Mercurio, Santiago.

Seca, A. M. L., & Trendafilova, A. 2021. Secondary Metabolites in Edible Species: Looking beyond Nutritional Value. Foods (Basel, Switzerland), 10(5), 1131. <https://doi.org/10.3390/foods10051131>

Scheler, O., Makuch, K., Debski, P. R., Horka, M., Ruszczak, A., Pacocha, N., Sozański, K., Smolander, O. P., Postek, W., & Garstecki, P. 2020. Droplet-based digital antibiotic susceptibility screen reveals single-cell clonal heteroresistance in an isogenic bacterial population. Scientific reports, 10(1), 3282. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60381-z>

Teoh E. S. 2015. Secondary Metabolites of Plants. Medicinal Orchids of Asia, 59–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5

Twaij, B. M., & Hasan, Md. N. 2022. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. International Journal of Plant Biology, 13(1), 4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>

- Urzúa, A. Olgún, A. y Santander, R. 2013. Aristolochic acids in the roots of *Aristolochia chilensis*, a dangerous Chilean medicinal plant. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(4), 2089-2091. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072013000400041>
- Vogel, Hermine, Razmilic, Iván, & González, Benita. 2004. Matico (*Buddleja globosa* Hope): evaluación de diferentes accesiones, número de cosechas, humedad del suelo y extracción de nutrientes. *Agricultura Técnica*, 64(4), 413-420. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072004000400010>
- Vogel, Hermine, Razmilic, Iván, & González, Benita. 2004. Matico (*Buddleja globosa* Hope): evaluación de diferentes accesiones, número de cosechas, humedad del suelo y extracción de nutrientes. *Agricultura Técnica*, 64(4), 413-420. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072004000400010>
- Wilckens, P., Fernández, M., Gómez, M., Peña, I. y G. Montenegro. 2013. Sustainable management and use of a medicinal emblematic plant in Chile: *Buddleja globosa* Hope. *Phyton, Int. J. Exp. Bot.* (82): 81 – 90
- Wilhelm, E. 1992. *Botánica Indígena de Chile*. Editorial Andrés Bello.
- Wink, M. 2015. Modes of action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* (3): 251 – 286
- Zhao, C., Tang, G., Cao, S., Xu, X., Gan, R., Liu, Q., Mao, Q. Shang, A., y Li, H. (2019). Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 8(7), 215. <https://doi.org/10.3390/antiox8070215>
- Ziemlewska, A., Zagórska-Dziok, M. y Nizioł-Łukaszewska, Z. 2021. Assessment of cytotoxicity and antioxidant properties of berry leaves as by-products with potential application in cosmetic and pharmaceutical products. *Sci Rep* 11, 3240. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82207-2>

