



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA

Estudio fitoquímico, evaluación antineoplásica y antihelmíntica de la especie

Echinopsis pachanoi.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Castillo Veintimilla, Paola Maribel.

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ph.D.

LOJA - ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Juan Carlos Romero Benavides.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación, denominado: Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antineoplásica y antihelmíntica de la especie *Echinopsis pachanoi*, realizado por Castillo Veintimilla Paola Maribel, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Castillo Veintimilla Paola Maribel, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antineoplásica y antihelmíntica de la especie *Echinopsis pachanoi*, de la Maestría en Química Aplicada, siendo el Juan Carlos Romero Benavides, Ph.D. director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica de Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f)

Autor: Castillo Veintimilla Paola Maribel

Cédula: 1104615925

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado al Creador, por cada uno de estos días de vida, por esta nueva oportunidad de escalar un peldaño más en mi vida profesional, a mi madre: María Magdalena; por su esfuerzo, sacrificio y apoyo, para conseguir esta nueva meta, a mi pequeña Camila Julieth por haber cambiado mi vida entera.

A toda/os mis amiga/os y compañera/os por brindarme su apoyo, por compartir sus conocimientos, alegrías, tristezas y apoyo porque de una u otra forma fueron parte de cada uno de estos días de formación.

A mi papito Carlos (+), por tu amor y compañía, anhelo de todo corazón que estés siempre a mi lado cuidándome y guiando mi camino como hasta ahora lo has hecho.

Paola Castillo Veintimilla

AGRADECIMIENTO

Agradezco a María Magdalena la persona que me dio la vida, que me brindo su amor y compañía en cada momento y a quién debo todo lo que soy y he alcanzado, a Camila Julieth mi amor chiquito a quien le debo el haber conocido un amor incondicional.

Agradezco de manera especial al Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides por su paciencia, orientación, impartirme sus conocimientos y por su apoyo para el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación, ayudándome así a nuevamente dar un paso en mi crecimiento personal y profesional.

Por el financiamiento otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENESCYT), [PIC-013-INSPI-005], y la Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador [PROY_FIN_QUI_0008].

A todos los docentes y personal técnico J. Calva y M. Vega, por sus conocimientos compartidos su apoyo, colaboración y aporte para el desarrollo de este trabajo.

Muchas gracias también a Ronald, Claudia e Ivannova por su aporte, compañía, ocurrencias y por cada día compartido.

Paola Castillo Veintimilla

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
1. Aspectos generales.....	6
1.1. Cáncer.....	6
1.1.1. Causas del cáncer.....	7
1.1.2. Incidencia.	7
1.1.3. Cáncer de mama.....	8
1.1.4. Cáncer de próstata.	8
1.1.5. Cáncer de colon.	8
1.1.6. Astrocitoma cerebral.....	9
1.2. Parasitosis.....	9
1.3. Biodiversidad y Medicina tradicional.	10
1.4. Metabolitos secundarios.....	10
1.5. Metabolitos secundarios con uso en el tratamiento de cáncer y parasitosis por helminthos.....	11
1.6. Familia Cactaceae.....	12
1.6.1. Género <i>Echinopsis</i> – especie <i>Echinopsis pachanoi</i>	12

1.7.	Ensayos de evaluación de viabilidad celular.....	14
1.8.	Evaluación de actividad antihelmíntica.....	14
CAPITULO II.....		15
2.	Diseño metodológico.....	16
2.1.	Selección de la especie vegetal.....	16
2.2.	Recolección de materia vegetal.....	17
2.3.	Obtención de extractos.....	17
2.4.	Partición líquido-líquido.....	18
2.5.	Desclorofilación.....	18
2.6.	Evaluación de actividad inhibitoria del crecimiento celular de los extractos y fracciones obtenidas mediante ensayo de MTT.....	18
2.7.	Análisis de la actividad antihelmíntica en <i>Strongyloides venezuelensis</i>	19
2.8.	Tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos obtenidos de la especie <i>E. pachanoi</i>	19
2.9.	Aislamiento de metabolitos secundarios.....	20
2.9.1.	Cromatografía en columna – fraccionamiento de extractos.....	20
2.9.2.	Cromatografía en capa fina.....	20
2.10.	Purificación de metabolitos secundarios.....	20
2.11.	Identificación y caracterización de metabolitos secundarios.....	20
CAPITULO III.....		22
3.	Resultados y discusión.....	23
3.1.	Rendimiento de extracto y fracciones obtenidas de la especie <i>E. pachanoi</i>	23
3.2.	Evaluación de actividad inhibitoria del crecimiento celular del extracto y fracciones obtenidas analizadas mediante el ensayo de MTS.....	23
3.3.	Evaluación de actividad antihelmíntica del extracto en DCM:MeOH de la especie <i>E. pachanoi</i>	24
3.4.	Tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto y fracción obtenida de la especie <i>E. pachanoi</i>	25

3.5.	Cromatografía en columna de la fracción en AcOEt.	27
3.5.1.	Cromatografía en capa fina preparativa de la fracción F_AcOEt_20.....	28
3.6.	Desclorofilación de fracción obtenida mediante partición líquido-líquido en AcOEt (F_AcOEt).	30
3.6.1.	Cromatografía en columna de la fracción D1_AcOEt_2.....	32
3.7.	Desclorofilación del extracto obtenido en DCM:MeOH.	33
3.7.1.	Cromatografía en columna de la fracción F(2)EP.	36
3.7.2.	Cromatografía en columna de la fracción F(3)EP.	38
3.7.2.1.	Cromatografía en columna de la fracción F(3)EP_3.....	38
3.7.2.1.1.	Cromatografía en capa fina preparativa de la fracción F(3)EP_3_8. .	40
3.7.3.	Cromatografía en columna de la fracción F(6)EP	41
3.7.4.	Cromatografía en columna de la fracción F(7)EP	42
3.7.5.	Cromatografía en capa fina de la fracción F(13)EP.	42
3.7.6.	Cromatografía en capa fina de la fracción F(14)EP.	44
	CONCLUSIONES.....	46
	RECOMENDACIONES.....	47
	BIBLIOGRAFÍA.....	48
	ANEXOS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características que presentan las células cancerígenas.	6
Figura 2. Factores que inducen carcinogénesis.	7
Figura 3. Partes aéreas de la especie <i>Echinopsis pachanoi</i>	13
Figura 4. Esquema de la metodología empleada en el presente trabajo de investigación.	16
Figura 5. Mapa del lugar recolección de la especie <i>E. pachanoi</i>	17
Figura 6. Cromatografía en capa fina del compuesto 1	29
Figura 7. Estructura del compuesto identificado como: Éster metílico del ácido linolénico (1).	30
Figura 8. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la desclorofilación del extracto en AcOEt. (A) CCF, fase directa bajo luz UV de 254 nm, (B) CCF, fase directa bajo luz UV de 365 nm. Polaridad de elución de CCF fase directa: DCM:MeOH (9:1). (C) CCF, fase inversa bajo luz UV de 254 nm, (D) CCF, fase inversa bajo luz UV de 365 nm. Polaridad de elución de CCF fase inversa: MeOH:H ₂ O (7:3)	31
Figura 9. Cromatografía en capa fina de las fracciones desclorofiladas del extracto en DCM:MeOH de <i>E. pachanoi</i> reveladas con una solución de ácido sulfúrico y vainillina. (A) Polaridad de elución: AcOEt:MeOH:H ₂ O (77:13:10), (B) Polaridad de elución MeOH:H ₂ O (1:1).....	35
Figura 10. Cromatografía en capa fina en sílice de fase directa de las fracciones obtenidas en la elución cromatográfica de la fracción F(3)EP_3. (A) CCF bajo luz de 254nm, (B) CCF bajo luz de 365nm, (C) CCF revelado con una solución de ácido sulfúrico y vainillina. Polaridad de elución: AcOEt:MeOH:H ₂ O (77:13:10)	39
Figura 11. Cromatografía en capa fina del compuesto 2, revelada con una solución de ácido sulfúrico y vainillina. Polaridad de elución: CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O:Ac. Fórmico (65:25:4:1)	41
Figura 12. Cromatografía en capa fina de la fracción F(13)EP_DCM revelada con una solución de ácido sulfúrico y vainillina.. Polaridad de elución: DCM:MeOH (9:1).	43
Figura 13. Cromatografía en capa fina de la fracción F(14)EP_MeOH observada bajo luz UV de 354 nm. Polaridad de elución: HEX (100 %)	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Información Taxonómica de la especie <i>Echinopsis pachanoi</i>	13
Tabla 2. Peso y rendimiento del extracto obtenido a partir de la especie <i>E. pachanoi</i>	23
Tabla 3. Peso de las fracciones obtenidas de la partición líquido-líquido.....	23
Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular del extracto y fracciones obtenidas de la especie <i>E.pachanoi</i>	24
Tabla 5. Porcentaje de inmovilidad de larvas L3 de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	25
Tabla 6. CI ₅₀ para la inmovilidad de larvas (L3) de <i>Strongyloides venezuelensis</i> del extracto en DCM:MeOH de la especie <i>E. pachanoi</i>	25
Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico cualitativo de <i>E. pachanoi</i>	26
Tabla 8. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de la fracción en AcOEt.....	27
Tabla 9. Fracciones obtenidas de la desclorofilación de la fracción en AcEOt (F_AcOEt) obtenida mediante partición líquido-líquido de la especie <i>Echinopsis pachanoi</i>	30
Tabla 10. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna la fracción D1_AcOEt_2.....	32
Tabla 11. Fracciones obtenidas en cada desclorofilación del extracto en DCM:MeOH de la especie <i>E. pachanoi</i>	33
Tabla 12. Unión de fracciones desclorofiladas del extracto en DCM:MeOH obtenido de la especie <i>E. pachanoi</i>	35
Tabla 13. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de la fracción F(2)EP. .	37
Tabla 14. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de la fracción F(3)EP. .	38
Tabla 15. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de la fracción F(3)EP_3.....	40
Tabla 16. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de F(6)EP.....	41
Tabla 17. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de F(7)EP.....	42
Tabla 18. Fracciones obtenidas de la fracción F(13)EP.....	43

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDKs	Quinasa dependiente de ciclina
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas
D-384	Línea celular de astrocitoma cerebral
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCT-116	Línea celular de cáncer de colón
HDACs	Histona deacetilasa
HEX	Hexano
Hsp90	Proteína de shock térmico de 90kDa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
MCF-7	Línea celular de cáncer de mamá
MeOH	Metanol
MTS	(3 - (4,5-di-metiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) - 2 - (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio).
PC-3	Línea celular de próstata
R _F	Factor de retención
RKO	Línea celular de cáncer de colón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RESUMEN

De *Echinopsis pachanoi* se obtuvo el extracto en diclorometano:metanol y mediante partición líquido-líquido se obtuvo una fracción miscible en hexano y acetato de etilo. La fracción obtenida en acetato de etilo presentó la mayor actividad antineoplásica en líneas de cáncer humano, con una inhibición de alrededor del 50%, se obtuvo el compuesto éster metílico del ácido linolénico (1). El extracto obtenido en diclorometano:metanol presentó actividad sobre células de cáncer de próstata con un porcentaje de inhibición del 39.2% y actividad antihelmíntica con un porcentaje de inmovilidad de larvas L3 de *S. venezuelensis*, para las concentraciones de 600 y 1000 µg/ml del 54.9 y 81.3% a 24 horas y de 47.9 y 85.9% a 48 horas de exposición al extracto. La CI_{50} obtenida para este extracto fue de 595.1 µg/ml para 24 horas y 538.1 µg/ml a las 48 horas. Se realizó tamizaje fitoquímico al extracto y fracción en acetato de etilo, se evidenció que el extracto presentó mayor riqueza fitoquímica. sin embargo, es común la presencia de compuestos de tipo alcaloide y terpenos en el extracto y la fracción analizada.

Palabras clave: *Echinopsis pachanoi*, citotoxicidad, *Strongyloides venezuelensis*, éster metílico del ácido linolénico.

ABSTRACT

In this study, an extract from *Echinopsis pachanoi* was obtained by dichloromethane: methanol and by liquid-liquid partition in hexane and ethyl acetate. The fraction obtained in ethyl acetate presented the highest antineoplastic activity in human cancer lines, with an inhibition of about 50%; the methyl ester compound of linolenic acid was present in this fraction. The extract obtained in dichloromethane: methanol showed a 39% inhibition on prostate cancer cells and anthelmintic activity with a percentage of immobility of *S. venezuelensis* L3 larvae, for the concentrations of 600 and 1000 µg/ml of 54.9% and 81.3% at 24 hours and 47.9% and 85.9% at 48 hours exposure to the extract. The IC₅₀ obtained for this extract was 595.1 µg/ml at 24 hours and 538.1 µg/ml at 48 hours. Phytochemical screening revealed that the dichloromethane: methanol extract had greater phytochemical richness; however, alkaloid and terpene compound levels were similar in both samples.

Keywords: *Echinopsis pachanoi*, cytotoxicity, *Strongyloides venezuelensis*, Linolenic acid methyl ester.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han contribuido desde los inicios de la humanidad a conservar la salud de los seres humanos (Manju, R.K., & Anju, 2012), éstas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios los mismo que presentan actividades biológicas (Wink, 2016), además de presentarse la posibilidad del uso de extractos crudos que es opción de más fácil acceso y que además en algunos casos exhiben una menor toxicidad (Yehya et al., 2017).

En el Ecuador se puede encontrar un aproximado de 18919 especies (León et al., 2011), el uso de plantas medicinales en el país, así como aquellos países en vías de desarrollo por parte de la población es del 80% (Rios, Koziol, Borgtoft, & Granda, 2007). En los mercados de la provincia de Loja es usual la compra y expendio de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades o para disminuir alguna dolencia la selección de una determinada planta medicinal se puede basar en el conocimiento etnomédico existente de muchas de las comunidades indígenas presentes en el Ecuador (Jerves-Andrade et al., 2014; Tinitana, Rios, Romero-Benavides, de la Cruz Rot, & Pardo-de-Santayana, 2016). Un sin número de familias de plantas son usadas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, episodios parasitarios, procesos inflamatorias y otras, en la literatura se mencionan recurrentemente a las familias: Cactaceae, Asteraceae y Lamiaceae (Bailon-Moscoso, Romero-Benavides, Tinitana-Imaicela, & Ostrosky-Wegman, 2015; Jerves-Andrade et al., 2014; Romero-Benavides et al., 2017).

El cáncer figura como la segunda causa de muerte a nivel mundial, en el 2015 provocó 8,8 millones de defunciones, y se prevé un aumento del 70% en la aparición de nuevos casos en los próximos 20 años (World Health Organization, 2017b). Las estadísticas de la OMS para Ecuador muestran una incidencia de cáncer de próstata del 20%, cáncer de mama del 10.2% entre otros (World Health Organization, 2014).

En el presente trabajo de fin de titulación: “Estudio fitoquímico, evaluación antineoplásica y antihelmíntica de la especie *Echinopsis pachanoi*”, se desarrolló en el Departamento de Química y Ciencias Exactas, cabe mencionar que esta especie fue seleccionada para trabajarla en el Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD), dentro del Proyecto 5: Resistencia antiparasitaria

y perspectivas del uso de extractos de plantas nativas en ensayos preclínicos, perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en salud Pública (INSPI), financiado por la SENESCYT y que está siendo desarrollado en colaboración entre el INSPI y la UTPL, en donde se pretende la obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de especies nativas del sur del Ecuador: con posible actividad antiparasitaria, por lo que la actividad antiparasitaria fue desarrollada por el INSPI .

El presente trabajo está organizado en tres capítulos que comprenden: primer capítulo se abordan aspectos generales que se involucran en la temática a desarrollar, segundo capítulo se describe la metodología experimental que se desarrolló, en el tercer capítulo se exponen y discuten los resultados obtenidos además se presenta una sección de conclusiones y recomendaciones.

Con el desarrollo de esta investigación se pretende aportar al conocimiento de la química de la especie *Echinopsis pachanoi* y validar su uso etnomedicinal evaluando su posible acción antineoplásica en cinco líneas celulares de cáncer humano y su posible actividad antihelmíntica en larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis*.

CAPITULO I

1. Aspectos generales.

1.1. Cáncer.

Se define como cáncer al crecimiento y multiplicación sin control de las células de tejidos normales, que se puede generar en cualquier región del cuerpo (World Health Organization, 2017a).

El desarrollo de las células en los tejidos normales está controlado mediante señales promotoras de crecimiento que están vinculadas a un ciclo de crecimiento y división celular que asegura una homeostasis en la cantidad de células existentes y la producción de células funcionales, sin embargo, en las células cancerígenas este control se muestra ausente dando lugar a una proliferación descontrolada de células, característica principal de células cancerígenas. (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011)

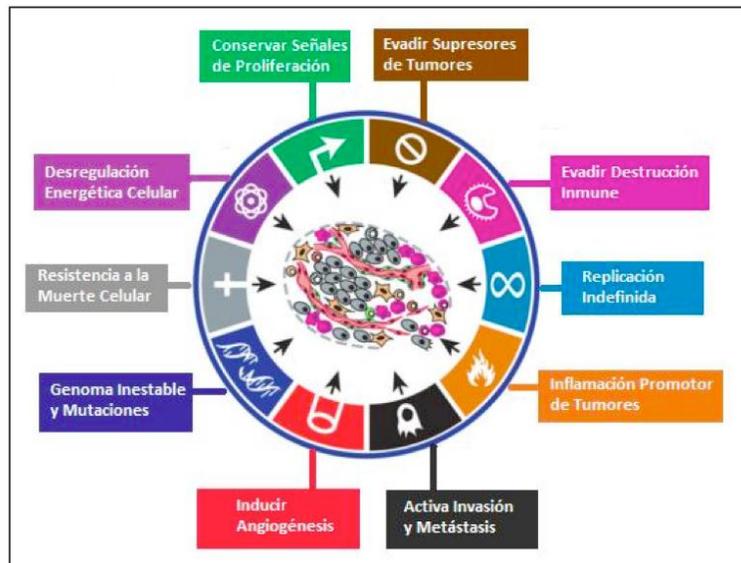


Figura 1. Características que presentan las células cancerígenas.

Fuente: (Hanahan & Weinberg, 2011)

Elaborado por: Castillo, P. 2017

La prevención del cáncer se consigue evitando una exposición innecesaria a factores de riesgo como el humo del cigarrillo, exposición de la piel a la luz solar intensa, consumo excesivo de alcohol, virus, radiación entre otros. Un diagnóstico temprano de la presencia de esta enfermedad permite un tratamiento oportuno a través de terapias o cirugía aumentando la probabilidad de supervivencia (World Health Organization, 2015a).

1.1.1.Causas del cáncer.

La conversión de las células normales a células cancerígenas son resultado de interacciones entre múltiples factores como la genética de individuo y agentes externos (World Health Organization, 2017c).

Los agentes externos a su vez están agrupados como carcinógenos: físicos, químicos y biológicos

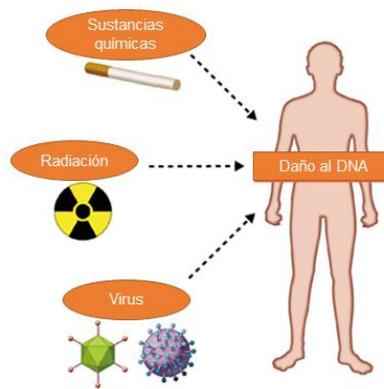


Figura 2. Factores que inducen carcinogénesis.

Fuente: (CSLS/The University of Tokyo., n.d.)

Elaborado por: Castillo, P. 2017

1.1.2.Incidencia.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, en el año 2015 provocó 8.8 millones de defunciones, y se prevé un aumento del 70% en la aparición de nuevos casos en los próximos 20 años (World Health Organization, 2017b). Las estadísticas de la OMS para Ecuador muestra un incidencia de cáncer de próstata de un 20%, cáncer cervical del 14.2%, estómago de 18.8% para los hombres y 13.7% para las mujeres, mama del 10.2% para las mujeres, tráquea, bronquios, 9.3% para los hombres, para el cáncer de hígado el número disminuye a 6.9% en hombres y 7.7% en las mujeres, y para el cáncer colorrectal a 5.9% en hombres y 7.5% en mujeres, para 2012 (World Health Organization, 2014).

En el Ecuador para el año 2014, la estadística más reciente del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) muestra que el cáncer de: estómago causó 1585 defunciones, las neoplasias relacionadas con tejido hematopoyético y linfático 1079 muertes, próstata 833, útero 720, tráquea, bronquios y pulmones 717, colon, sigmoides, recto y ano 678 y el cáncer de hígado y tracto biliar provocó 650 muertes (Vdatos | Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2015).

1.1.3.Cáncer de mama.

Se produce cuando hay una proliferación incontrolada de las células en el pecho, el cáncer de mama puede iniciar en diferentes partes de la mama, como, por ejemplo: conductos que transportan la leche hacia el pezón o en las glándulas que la producen. Este tipo de cáncer se produce casi su mayoría en mujeres sin embargo existe la posibilidad que los hombres también lo presenten (American Cancer Society, 2016b).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama se menciona: Estilo de vida (obesidad, poca actividad física, consumo de alcohol), terapias hormonales entre otros (American Cancer Society, 2016b; Cancer Research UK, 2016).

1.1.4.Cáncer de próstata.

Este tipo de cáncer es uno de los más frecuentes en hombres, en su mayoría de edad avanzada, que inicia con la afección de la glándula prostática. Entre los factores de riesgo se indican: edad, historial genético además del estilo de vida del individuo (American Cancer Society, 2016a; Cancer Research Uk, 2016)

1.1.5.Cáncer de colon.

El cáncer colorrectal en su mayoría inicia con un pólipo (masa de células que se desarrollan en el revestimiento interno del colon o recto), la transformación de un pólipo en cáncer se debe al tipo del que se trate pueden ser:

- Pólipos adenomatosos: se trata de una afección precancerosa.
- Pólipos inflamatorios y pólipos hiperplásicos: presentan una mayor frecuencia de aparición, pero no son de naturaleza pre cancerosa.

Se cuentan como factores de riesgo para este cáncer: sobrepeso, inactividad física, alimentación con un alto consumo de carne roja, el consumo de tabaco y alcohol entre otros (American Cancer Society, 2017; Cancer research Uk, 2016)

1.1.6. Astrocitoma cerebral.

En el cerebro se pueden presentar tanto tumores malignos como benignos, los tumores cerebrales cancerosos son más comunes en hombres que en mujeres, y estos con muy poca frecuencia se diseminan a otros tejidos (American Cancer Society, 2016b; Cancer Research UK, 2015).

El astrocitoma es un tumor que se genera en los astrocitos (células del cerebro en forma de estrella) que forman el tejido conectivo del cerebro, este tipo de tumor se gradúa en una escala de I a IV en base a la comparación entre la forma normal y anormal de las células mencionadas (American Brain Tumor Association, 2014).

1.2. Parasitosis.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, más de 1.5 billones de personas están infectados con helmintos transmitidos por el suelo y en regiones como África subsahariana, las Américas, China y Asia Oriental este tipo de infección tiene una alta incidencia, siendo habitual la presencia de una coinfección con esquistosomas y helmintos transmitidos por el suelo (World Health Organization, 2015b).

Para el Ecuador se presenta una incidencia del 49.8% de las infecciones provocadas por helmintos transmitidos por contacto, siendo strongyloides, ascaris y taenia los más frecuentes en las parasitosis de los niños (Aparicio Rodrigo & Tajada Alegre, 2007). Por cada parasitosis intestinal que afecte a un niño su coeficiente intelectual se ve reducido en promedio de 3.75 (Banco Interamericano de Desarrollo, Organización Panamericana de la Salud, & Instituto de Vacunas Sabin., 2011).

El tratamiento principal para la parasitosis intestinal se da con fármacos como: albendazol, mebendazol, tiabendazol entre otros, sin embargo, todos estos fármacos causan en los pacientes efectos secundarios como pérdida de apetito, dolor de cabeza, dolor abdominal, etc. (Manke, Dhawale, & Jamkhande, 2015; Ramos-Zúñiga et al., 2013).

1.3. Biodiversidad y Medicina tradicional.

La biodiversidad hace referencia a la pluridad de la información genética que existen en especies de plantas y animales además de la diversidad cultural, esta pluridad proporciona a las ciencias biológicas un amplio campo de recursos para investigación y descubrimientos médicos y farmacológicos obteniéndose así potenciales tratamientos para problemas de salud (World Health Organization, 2012).

En Sur América la región montañosa de los Andes representa un *hotspot* en biodiversidad con cerca de un 15% de las especies de plantas existentes a nivel mundial en un territorio que representa el 1% de toda la superficie terrestre (Pérez-Escobar et al., 2017). Particularmente en Ecuador existen aproximadamente 18198 especies de flora incluidas especies de plantas nativas y endémicas. (León et al., 2011).

Se define como medicina tradicional a los conocimientos aptitudes y prácticas con base en creencias y experiencias de las distintas culturas, aplicadas con la finalidad de prevenir, diagnosticar o brindar tratamiento de enfermedades físicas o mentales (World Health Organization, 2010).

Las plantas medicinales son ampliamente usadas como recurso principal para el tratamiento de enfermedades en países en vías de desarrollo como Ecuador (Rios et al., 2007). De hecho se estima que alrededor del 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por ende de plantas o productos naturales, para su salud y bienestar (Ansaloni et al., 2010) y a nivel mundial al menos de 4.500 millones de personas emplean la medicina tradicional con base principal en el uso de las plantas como su acceso a una atención de salud primaria (Cordell, 2015).

Las familias como: Asteraceae, Equisetaceae, Cactaceae entre otras son de las más comunes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, parasíticas y demás enfermedades que afectan el bienestar de un individuo (Bailon-Moscoso et al., 2015; Jerves-Andrade et al., 2014; Romero-Benavides et al., 2017).

1.4. Metabolitos secundarios.

La naturaleza durante miles de años nos ha otorgado medicamentos para el tratamiento de nuestras enfermedades. Algunos de los compuestos que provienen de plantas y han

resultado de gran importancia en la medicina son: morfina (*Papaver somniferum*), aspirina (*Salix alba vulgaris*), la vinblastina y vincristina (*Catharanthus roseus*) que son medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer (Chivian & Bernstein, 2010).

Los metabolitos secundarios resultan del metabolismo no esencial de un organismo el que puede ser plantas, bacterias, hongos u organismos marinos. Estos compuestos han resultado ser una fuente inestimable que puede usarse como agentes: antibacterianos y antiparasitarios, fármacos anticancerosos y demás actividades biológicas y farmacológicas, volviéndose algunos en papel clave para la prevención o tratamiento de un sin número de enfermedades (Vaishnav & Demain, 2011; Wink, 2016).

1.5. Metabolitos secundarios con uso en el tratamiento de cáncer y parasitosis por helmintos.

Los productos de origen natural han sido nuestra herramienta por más de 40 años para combatir enfermedades como cáncer, parasitosis, procesos inflamatorios, molestias gástricas entre otras (Cragg & Newman, 2013; Demain & Vaishnav, 2011; Romero-Benavides et al., 2017).

Compuestos como: vincristina, vinblastina, colchicina, paclitaxel o taxol, combrestastatin presentan interactividad con la tubulina razón por la cual son un recurso para el tratamiento del cáncer, sin embargo no es el único campo de acción para los compuestos con potencial actividad a esta enfermedad, el celastrol, gedunin, hipericina y cluvenone inhiben Hsp90 (proteína esencial para las funciones de las células cancerígenas), en interacciones o en diferentes niveles de actividad de esta proteína, el thujaplicin, ácido valérico, genisteína, quercetina, rohitukina son potenciales inhibidores de HDACs, tirosinas quinasa, CDKs, respectivamente (Butler et al., 2014; Cruz-Vega et al., 2009; Elbel et al., 2013; Gordaliza, 2007; Kittakoop, 2015; Ononye et al., 2013; Zhang et al., 2009)

Algunos otros metabolitos secundarios con origen en los productos naturales como: ascaridol, pinostrobin, ácido ursólico, aspidin, flicina, artemisinina, hesperitina han presentado actividad antihelmíntica (Bahmani, Rafieian-Kopaei, et al., 2014; Romero-Benavides et al., 2017). En general los compuestos de esta naturaleza se dividen en dos tipos: aquellos que generan daño en la integridad del helminto y los que tienen actividad

sobre los canales iónicos de la membrada de este organismo. Por ejemplo: dietilcarbamazina, levamisol e ivermectinav(Vardanyan & Hruby, 2016).

No obstante compuestos como: pamoato de pirvinio y niclosamida que han sido clásicos antihelmínticos orales han mostrado además una potencial acción en el tratamiento del cáncer mediante mecanismos como acción sobre la respiración mitocondrial e inhibiendo la migración de células de cáncer de tiroides además de inducir apoptosis (Ishii, Harada, & Kasahara, 2012; Yu et al., 2017).

1.6. Familia Cactaceae

La familia Cactaceae es nativa de América y presenta aproximadamente 1600 especies (Martins et al., 2016). Dentro de esta familia en el Ecuador figuran 16 géneros y 43 especies nativas, de las cuales hay 13 especies endémicas del país (Loaiza, Aguirre, & Jadán, 2009; Madsen, 2000).

Para esta familia existen en la literatura reportes de su actividad como: antiinflamatorio (Macias-Ceja et al., 2016; Soto-Cabrera, Torres-Olvera, Salazar, Cerón-Nava, & Rosales-Guevara, 2014), antihelmíntico (Vatta, Kandu-Lelo, Ademola, & Eloff, 2011), anticancerígeno (Harlev, Nevo, Solowey, & Bishayee, 2013), antigenotóxico (Zorgui, Ayed-Boussema, Ayed, Bacha, & Hassen, 2009), antimicótico (Silva-Hughes et al., 2015), antimicrobiano (Necchi, Alves, Alves, Manfron, & Farmacêuticas, 2012) y actividad citotóxica (Sri Nurestri et al., 2010; Tan, Sulaiman, Najimuddin, Samian, & Muhammad, 2005).

1.6.1. Género *Echinopsis*– especie *Echinopsis pachanoi*.

El género *Echinopsis* (Cactaceae) comprende alrededor de 50 especies (Kvist & Moraes, 2006), constan de cactus columnares de países como Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Ogunbodede, McCombs, Trout, Daley, & Terry, 2010). Las especies de este género son empleadas por las comunidades indígenas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, basando su uso en las propiedades psicoactivas que presenta este género, debido a la presencia de mezcalina (Laguna, Ferrer-gallego, Deltoro, Ferrerando, & Guillot Ortiz, 2013; Ogunbodede et al., 2010).

Las especies *Echinopsis pachanoi*, *Echinopsis peruviana* y *Echinopsis lageniformis* son conocidas comúnmente con el nombre vernáculo de San Pedro, haciendo referencia a el guardián del cielo que es San Pedro (Leonardo, 2006; Ogunbodede et al., 2010). Esta especie se la describe como: subarborescente a arborescente, presenta ramas de nacimiento basal flexibles y erectas, su altura va de 3 a 6 metros, tallos cilíndricos, con diámetro de 6 a 15cm, 6-8 costillas, anchas, redondeadas con areolas blanquecinas, en algunas ocasiones presenta espinas de color amarillento a marrón, flores de color blanco con una longitud de 19 – 24 cm, sus frutos son oblongos de color verde oscuro con una longitud de 5 a 6 cm. (Laguna et al., 2013). En la **Figura 3** se muestran partes aéreas de la especie *Echinopsis pachanoi*. y en la **Tabla 1** se detalla la información taxonómica de la misma.



Figura 3. Partes aéreas de la especie *Echinopsis pachanoi*.

Fuente: Castillo, P. 2017

Elaborado por: Castillo, P. 2017

Tabla 1. Información Taxonómica de la especie *Echinopsis pachanoi*.

Información Taxonómica de <i>E. pachanoi</i>	
Reino	Plantae
Clase	Equisetiosida
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Género	Echinopsis
Especie	<i>Echinopsis pachanoi</i>
Nombre común	Cactus San Pedro

Fuente: (Tropicos, n.d.)

Elaborado por: Castillo, P. 2017

1.7. Ensayos de evaluación de viabilidad celular.

Los ensayos celulares permiten evaluar el efecto de una sustancia, compuesto, fitoextracto sobre la proliferación o toxicidad de las células cultivadas para el ensayo, también permiten medir la unión a un receptor, transducción de señales que pueden estar involucradas en la expresión de genes, control de la función de organelos (Riss et al., 2013).

Existen muchos tipos de ensayos como por ejemplo: reducción de tetrazolio, reducción de resazurina, marcadores de proteasa y detección de ATP, que miden algún aspecto del metabolismo general o una actividad enzimática como marcador de células viables (Bunel, Ouedraogo, Nguyen, Stévigny, & Duez, 2014).

En el ensayo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolio), la sal de tetrazolio es transformada en un producto colorimétrico de formazán soluble por acción de enzimas deshidrogenadas mitocondriales de las células viables existentes, por lo que el formazán producido es equivalente al número de células vivas que hay en el cultivo (Fard, Jafari, & Eghbal, 2015).

1.8. Evaluación de actividad antihelmíntica.

Existen varias técnicas *in vitro* para el análisis de la resistencia antihelmíntica como indicador de la actividad de fitoextractos o compuestos sobre modelos *in vitro* de helmintos, como por ejemplo ensayos de: incubación de huevos, motilidad, migración o parálisis larval, ensayo de desarrollo de larvas, helmintos adultos y ensayos de actividad metabólica (Kotze, Clifford, O'Grady, Behnke, & McCarthy, 2004; Taylor, Hunt, & Goodyear, 2002).

La manera más común de la evaluación de actividad de extractos obtenidos de especies vegetales contra helmintos como *S. venezuelensis*, *H. concortus* entre otros, consiste en el aislamiento de larvas, mediante métodos como Baermann, en estadio 3 (L3), debido a que este corresponde a su estado infectivo al huésped. A las larvas aisladas se les administra diferentes concentraciones del extracto obtenido y se realiza monitoreo mediante técnicas microscópicas (Aparecida et al., 2017; Carvalho et al., 2012; Oliveira et al., 2017; Viney, 2007).

CAPITULO II

2. Diseño metodológico.

En la **Figura 4** se muestra un esquema de la metodología empleada en el presente trabajo de investigación.

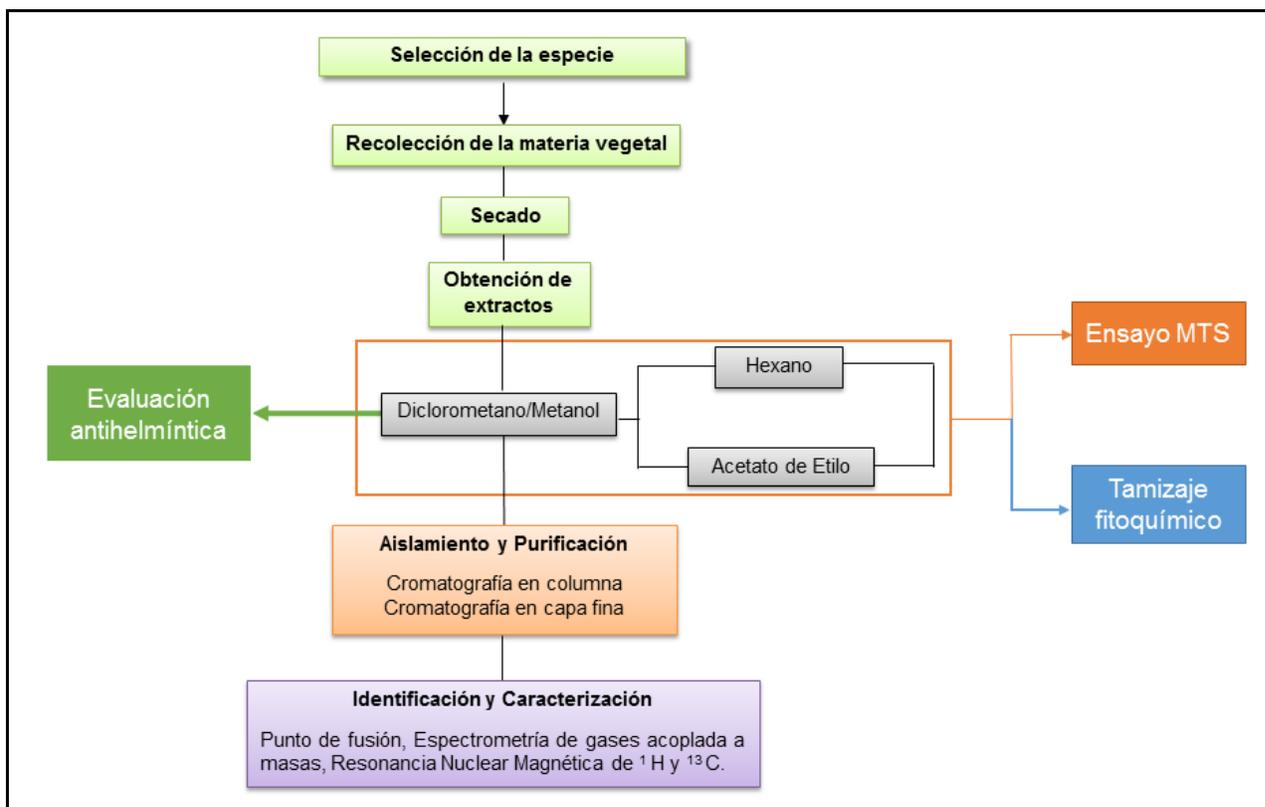


Figura 4. Esquema de la metodología empleada en el presente trabajo de investigación.

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

2.1. Selección de la especie vegetal.

La selección de la especie se la hizo en base a reportes de su uso etnomedicinal, conocimiento etnobotánico y reportes en bibliografía.

2.2. Recolección de materia vegetal.

La especie *Echinopsis pachanoi* fue recolectada en el segundo trimestre del año 2016 en el sector Época, provincia de Loja en las coordenadas 69°78'97"E,95°56'42.9"N. La especie fue identificada por la PhD. Fany Tinitana, una muestra de la misma se depositó en el herbario de la UTPL con el número de voucher: HUTPL7839.

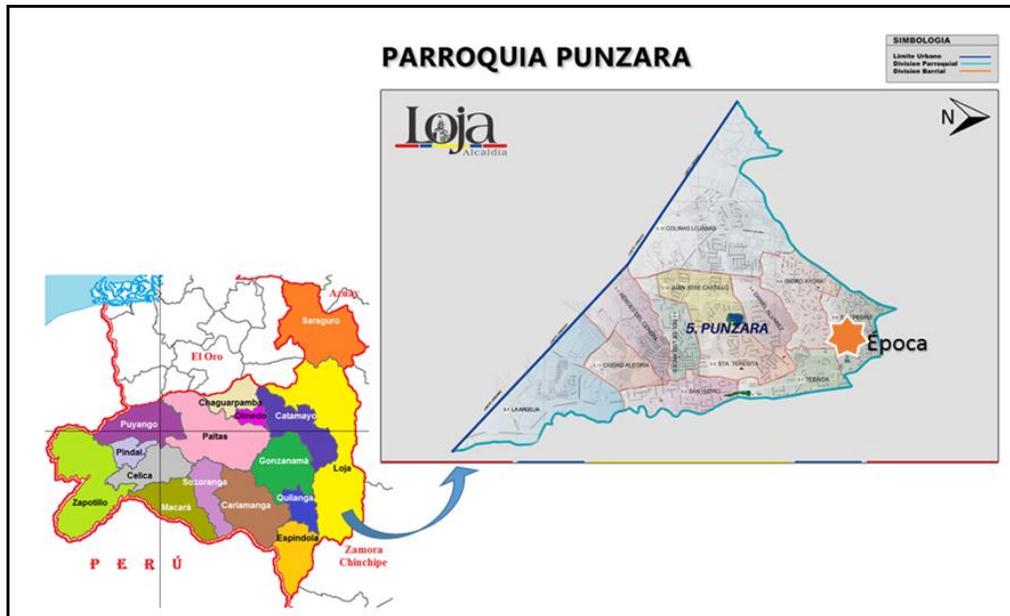


Figura 5. Mapa del lugar recolección de la especie *E. pachanoi*.

Fuente: (GAD, n.d.).

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

2.3. Obtención de extractos.

Las partes aéreas de la especie recolectada fueron secadas a 37°C hasta su peso constante en un secadero de bandejas con flujo de aire continuo, una vez seca la materia vegetal se la trituro manualmente, luego de esto se la sometió a maceración estática empleando una mezcla de disolventes DCM:MeOH en una relación 1:1.

La materia vegetal fue cubierta por completo con la mezcla de disolventes indicado, se dejó en reposo durante tres días, transcurrido este tiempo se filtró y concentró al vacío utilizando un rotaevaporador (Buchi model R-210), el procedimiento descrito se lo realizó en tres ocasiones, se pesó e etiquetó el extracto obtenido y se lo almacenó a 4°C hasta su uso.

2.4. Partición líquido-líquido.

Del extracto obtenido en DCM:MeOH se pesó 26.0 g y se disolvieron en 400 ml de una solución MeOH:H₂O (1:1), se colocó la disolución en un embudo de decantación y se agregó 400 ml de hexano (HEX) por tres ocasiones, una vez obtenida la fracción miscible en hexano se añadió 400 ml de AcOEt y se repitió el proceso, al finalizar la separación se obtuvo una fracción miscible en hexano etiquetada como: F_HEX, una miscible en AcOEt: (F_AcOEt), fracciones de las cuales se evaluó su actividad citotóxica, además se obtuvo una fracción etiquetada como (F_INS), la cual no fue evaluada debido a problemas de solubilidad.

2.5. Desclorofilación.

Para la desclorofilación del extracto se realizó una elución en sílica RP18 de aproximadamente 10 g del extracto en DCM:MeOH y 2.0 g de F_AcOEt obtenidos de la especie *E. pachanoi*, la mezcla eluyente en ambos casos fue MeOH:H₂O (8:2), la columna fue empacada en una proporción 1:20, es decir que por cada gramo de extracto se utilizó 20 g de sílica. Se recolectaron eluatos de aproximadamente 200ml, para recuperar totalmente la muestra se hizo una elución con 100% metanol y 100% acetato de etilo, los eluatos recolectados fueron concentrados a vacío en un rotavaporador y se realizó cromatografía en capa fina de cada uno de ellos. Este procedimiento se lo realizó con el objetivo de separar las clorofilas de los metabolitos secundarios presentes evitando así su interferencia en el aislamiento.

2.6. Evaluación de actividad inhibitoria del crecimiento celular de los extractos y fracciones obtenidas mediante ensayo de MTT

La evaluación se realizó sobre cinco líneas celulares de cáncer humano: RKO (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama), D-384 (astrocitoma cerebral), PC-3 (cáncer de próstata) y HCT-116 (cáncer de colon). Cada línea celular se cultivó en medio de RPMI (GIBCO) a 37°C, humedad del 95%, en una atmósfera con un 5% de CO₂. Todas estas líneas celulares fueron expuestas por 48 horas a todos los extractos y fracciones a dosis de 50 µg/ml, determinándose el efecto inhibitorio empleando el método de MTT, siguiendo el siguiente protocolo: en una caja multidish de 96 pocillos se sembraron 3000 células con 100 µl de medio de cultivo por pocillo, se incubó por 24 horas; se aplicó tratamiento con cada uno de los derivados disueltos en DMSO (0,5%) y medio de cultivo, también se

aplicó DMSO 0,5% como control negativo y Doxorubicina 2 μM como control positivo, en todos los casos se llegó a un volumen final de 200 μl en cada pocillo, cada dosis se aplicó por triplicado en tres experimentos diferentes, se incubó por 48 horas; se añadió 20 μl de reactivo de MTT GIBCO (Kit cell titer 96°, Aqueous one solution reagent), se incubó por 2 horas y se realizó la lectura en el espectrofotómetro (Sunrise) a una absorbancia de 490 nm; los datos obtenidos fueron analizados por medio del programa Prisma 5.0. Se evaluó la actividad del extracto en DCM:MeOH, F_HEX y F_AcOEt

2.7. Análisis de la actividad antihelmíntica en *Strongyloides venezuelensis*.

Se recogió una muestra fecal de ratas Wistar parasitadas y se realizó un coprocultivo con vermiculita por 3 días, con la finalidad de conseguir la eclosión de los huevos de *Strongyloides venezuelensis*. Para el aislamiento de las larvas (L3) se aplicó el método de Baaermann (Delgado, 1961; Olsen, Schumann, Pedersen, & Eriksen, 2003), se hizo 3 lavados con cloro (0.00028%) y se contó el número de larvas (al menos 5000 larvas/ml). Luego de esto se realizó los cálculos volumétricos para sembrar un volumen total de 500 μl por pocillo, la placa fue preparada dentro de una cabina de flujo laminar.

La inmovilidad larval fue observada a las 24 horas y 48 horas de administrado el extracto mediante microscopía. Las larvas que se encontraban en el pocillo se las expuso a la luz durante 30 segundos y luego se cuantificó el número de larvas móviles e inmóviles por pocillo. El control positivo fue Ivermectina (10 $\mu\text{g/ml}$) y como control negativo se usó agua destilada, el extracto fue evaluado a una concentración de 600 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ cada dosis se aplicó por duplicado en experimentos diferentes. Por razones de solubilidad solo se analizó el extracto en DCM:MeOH.

2.8. Tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos obtenidos de la especie *E. pachanoi*.

Se realizó un tamizaje fitoquímico cualitativo al extracto en DCM:MeOH obtenido de la especie *E. pachanoi* y a la fracción miscible en AcOEt obtenida mediante partición líquido-líquido (F_AcOEt), debido a que fueron las que presentaron mayor actividad en la inhibición del crecimiento de células tumorales. Este procedimiento se lo realizó con el objetivo de evidenciar en forma cualitativa la presencia de compuestos de tipo: alcaloides, flavonoides, quinonas, saponinas, taninos, terpenoides-esteroides, hidratos de carbono y grasas, en el extracto y fracción analizada.

El resultado de estas pruebas de tamizaje fitoquímico cualitativo revela presencia (+) o ausencia (-) de algunos tipos de compuestos basados en cambios de color o precipitados de acuerdo al ensayo realizado. El procedimiento de las pruebas aplicadas en este tamizaje se encuentra descrita en literatura (Mandal, Mandal, & Das, 2015; Miranda & Cuellar, 2001).

2.9. Aislamiento de metabolitos secundarios.

2.9.1. Cromatografía en columna – fraccionamiento de extractos.

Para el fraccionamiento de extractos o fracciones se empleó: sílica gel 60 F254 (0.015 – 0.040mm), F60 (0,063 – 0,0200 mm) y RP18 (0,04-0,063µm).

La relación sílica: extracto/fracción en (g) fue desde 1:15 a 1:200, para la elución se utilizó mezclas de: hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol, luego de esto se realizó cromatografía de capa fina de cada una de las fracciones obtenidas para la evaluación de su riqueza fitoquímica.

Estas condiciones fueron modificadas de acuerdo a lo requerido en cada caso.

2.9.2. Cromatografía en capa fina.

En la cromatografía en capa fina se utilizó placas de aluminio de sílica gel fase directa e inversa, las que fueron eluidas en diferentes disolventes y mezclas de: hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol, luego se las observó bajo luz ultravioleta de onda corta (254nm) y onda larga (365nm), se usó como revelador ácido sulfúrico y vainillina.

2.10. Purificación de metabolitos secundarios.

La purificación de metabolitos secundarios se la hizo mediante técnicas como: microcolumna, par de disolventes y cromatografía en capa fina preparativa.

2.11. Identificación y caracterización de metabolitos secundarios.

De los metabolitos secundarios que se logró su aislamiento se determinó el punto de fusión mediante el equipo Fisher Johns (Las temperaturas no fueron corregidas).

Se realizó análisis de RMN ^1H y ^{13}C a 400 MHz y 100 MHz respectivamente, en un equipo Varian 400 MHz-Premium Schelded, se usó tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos fueron expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hertz (Hz).

Los espectros de masas fueron determinados en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) y las columnas cromatográficas: DB-5MS y HP-INNOWAX.

CAPITULO III

3. Resultados y discusión

3.1. Rendimiento de extracto y fracciones obtenidas de la especie *E. pachanoi*.

En la **Tabla 2** se presentan los datos que corresponden al peso y rendimiento del extracto obtenido en DCM:MeOH.

Tabla 2. Peso y rendimiento del extracto obtenido a partir de la especie *E. pachanoi*.

Estructura morfológica	Peso planta seca	Peso (g)	Rendimiento (%)
Partes aéreas	5.3 Kg	827.9	15.8

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

De la partición líquido-líquido realizada a partir del extracto en DCM:MeOH, se obtuvo tres fracciones, el peso de las mismas se especifica en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Peso de las fracciones obtenidas de la partición líquido-líquido.

Peso de extracto (g)	Código	Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
26.0 g	F_HEX	HEX	2.05	7.9
	F_AcOEt	AcOEt	15.8	78.9
	F_INS	AC	5.2	20.0

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.2. Evaluación de actividad inhibitoria del crecimiento celular del extracto y fracciones obtenidas analizadas mediante el ensayo de MTS.

En la **Tabla 4** se presentan los datos correspondientes a la evaluación de actividad inhibitoria del crecimiento celular del extracto y fracciones F_Hex y F_AcOEt obtenidos de la especie *E. pachanoi*, la fracción en AcOEt (F-AcOEt), fue la que presentó mayor actividad con un porcentaje de inhibición de crecimiento de 51% para la línea celular MCF-7 y para las líneas celulares PC3 y D-384 fue del 50% y 50.5%, respectivamente. El extracto de DCM:MeOH, (EP-DCM:MeOH) presentó el mayor porcentaje de inhibición en la línea celular PC3 con un 39.2%, el porcentaje de inhibición del extracto en HEX fue en todos los casos menor al 23%.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular del extracto y fracciones obtenidas de la especie *E.pachanoi*.

Extracto/Fracción	% de inhibición ± SEM				
	MCF-7	PC3	RKO	D-384	HCT-116
F_HEX	23.0 ± 0.6	8.7 ± 1.0	6.7 ± 2.0	14.1 ± 1.0	13.7 ± 2.8
F_AcOEt	51.0 ± 0.7	50.0 ± 0.0	43.9 ± 0.8	50.5 ± 1.1	15.0 ± 0.1
EP-DCM:MeOH	30.8 ± 1.8	39.2 ± 0.3	31.1 ± 0.6	28.3 ± 3.2	9.7 ± 1.4

HEX, Hexano. AcOEt, Acetato de etilo. MeOH Metanol. DCM Diclorometano, SEM Media del error estándar de tres experimentos independientes. Las células control fueron consideradas el 100% de viabilidad. MCF-7, Línea celular de cáncer de glándula mamaria. PC3 Línea celular de cáncer de próstata. RKO Línea celular de cáncer de colon. D-384 Línea celular de astrocitoma cerebral. HCT-116 Línea celular de cáncer de colon.

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

Los datos obtenidos de la evaluación de la actividad de inhibición del crecimiento de líneas celular tumorales para *Echinopsis pachanoi*, constituyen el primer reporte de esta actividad, incluso son ausentes los reportes en la literatura sobre la actividad de inhibición de crecimiento celular para especies del género *Echinopsis*, si existen reportes de la actividad de la familia Cactaceae sobre líneas celulares de cáncer como por ejemplo: *Opuntia humifusa* presenta inhibición en la proliferación de células MCF-7 de un 53% a una concentración de 500 y 1000 mg/ml (Yoon, Hahm, Park, & Son, 2009) y se reporta la actividad del jugo extraído de cactus de especies como: *Opuntia robusta* y *Opuntia leucotricha*, evaluadas a una concentración del 0,5% de jugo en el medio de crecimiento de las células, los porcentajes de inhibición de crecimiento que presentaron para células de cáncer de próstata (PC3) son de: 100.9% y 69.7%, para células de cáncer de mama (MCF-7) del 105.6% y 119.7%, respectivamente (Chavez-Santoscoy, Gutierrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2009).

3.3. Evaluación de actividad antihelmíntica del extracto en DCM:MeOH de la especie *E. pachanoi*.

En la **Tabla 5** se presentan los resultados correspondientes a la actividad antihelmíntica del extracto en DCM:MeOH evaluado sobre larvas (L3) de *Strongyloides venezuelensis*, en donde se observa que el porcentaje de inmovilidad que presentó la especie fue de un 54.9% y 81.3% a una concentración de 600 y 1000 µg/ml a las 24 horas de la administración del extracto, sin embargo, el más alto porcentaje de inmovilidad fue observado a las 48 horas a 1000 µg/ml con un 85.9% mientras que a 600 µg/ml fue del 47.9%.

Tabla 5. Porcentaje de inmovilidad de larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis*.

Especie	% de inmovilidad			
	24 horas		48 horas	
	600µg/ml	1000 µg/ml	600 µg/ml	1000 µg/ml
<i>Echinopsis pachanoi</i>	54.9 ± 19.2	81.3 ± 5.7	47.9 ± 20.1	85.9 ± 8.7
Ivermectina (10 µg/ml)	58.0 ± 6.6		44.2 ± 8.1	

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

También se evaluó la CI_{50} para la inmovilidad de larvas (L3) de *S. venezuelensis*, la misma que se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. CI_{50} para la inmovilidad de larvas (L3) de *Strongyloides venezuelensis* del extracto en DCM:MeOH de la especie *E. pachanoi*.

Especie	CI_{50} µg/ml	
	24 hours	48 hours
<i>Echinopsis pachanoi</i>	538.5 ± 2.1	595.1 ± 1.1

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

Las infecciones provocadas por helmintos son de alta incidencia a nivel mundial, los tratamientos convencionales que se basan en el uso de fármacos de origen sintético ocasionan un sin número de efectos secundarios en los pacientes a los que se les suministra esta terapia razones que han provocado la búsqueda de tratamientos más idóneos, en donde la fuente más propicia para la búsqueda son las plantas medicinales (Bahmani, Zargaran, & Rafieian-Kopaei, 2014; Rafieian-kopaei, 2012). Las especies de la familia Cactaceae presentan muy pocos reportes de la evaluación de su actividad antihelmíntica, en la literatura se encuentran reportes de la actividad de *Opuntia ficus-indica* para *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus sp.* (Féboli et al., 2016) y *Cereus jamacaru* en nemátodos trichostrongílicos (Vatta et al., 2011).

3.4. Tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto y fracción obtenida de la especie *E. pachanoi*.

Se realizó tamizaje fitoquímico del extracto en DCM:MeOH (EP-DCM:MeOH) y la fracción obtenida en AcOEt mediante partición líquido-líquido (F_AcOEt), debido a que fueron los que presentaron el mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de células tumorales

evaluadas. Los resultados del tamizaje fitoquímico cualitativo se presentan en la **Tabla 7**, el ensayo de Ninhidrina que evalúa la presencia de proteínas en la especie y el ensayo de Cloruro férrico que nos indica la posible presencia de taninos y fenoles dieron resultado negativo para las dos muestras analizadas lo que nos indica que probablemente metabolitos secundarios de este tipo no se encuentren presentes. El extracto en diclorometano-metanol (EP-DCM:MeOH) presentó mayor riqueza fitoquímica, mientras que la fracción soluble en acetato de etilo (F_AcOEt) solo presentó resultados positivos en tres de las nueve pruebas realizadas.

Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico cualitativo de *E. pachanoi*.

Grupo químico	Ensayo	Resultado	
		EP-DCM: MeOH	F_AcOEt
<i>Proteínas</i>	Ensayo de Ninhidrina	-	-
<i>Carbohidratos</i>	Ensayo de Fehling	+	-
<i>Grasas</i>	Ensayo de Sudán	-	+
<i>Alcaloides</i>	Ensayo de Dragendorff	++	+++
<i>Terpenos</i>	Ensayo de Libermann – Burchard	+	+
<i>Flavonoides</i>	Ensayo de Shidona	+	-
<i>Saponinas</i>	Ensayo de espuma	+	-
<i>Quinonas</i>	Ensayo de Borntrager	+	-
<i>Taninos-fenoles</i>	Ensayo de cloruro férrico	-	-

(-), Ausencia. (+), Presencia. (++) turbidez definida. (+++) precipitado coposo.

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

Los resultados del tamizaje fitoquímico nos permite inferir una significativa presencia de compuestos de tipo alcaloide y terpeno en el extracto y fracción analizada. Los alcaloides son compuestos que presentan nitrógeno en su estructura son considerados de los metabolitos secundarios más activos e importantes presentes en las especies vegetales, esto debido a los variados efectos que han presentado sobre humanos y animales, además este grupo de metabolitos han contribuido con gran significancia al descubrimiento de fármacos para enfermedades como el cáncer y otros ejemplos de esto son: camptotecina y vinblastina fármacos citotóxicos de amplio espectro y vincristina fármaco utilizado para el tratamiento de leucemia aguda (Yehya et al., 2017). En la literatura se encuentran reportes de alcaloides naturales como: episipiloturina, pilosina, macaubina con actividad *in vitro* en *Schistosoma mansoni*, además de reportarse la potencial actividad antihelmíntica de fracciones alcaloideas de especies como: *Crinum macowanii*, *Gunnera perpensa*, *Azalia africana*, entre otras, también se reportan la acción

de alcaloides como la: solamargina, berberina, veranigrina, reserpina y triprantina sobre líneas de cáncer humano como MCF-7, HCT-116 entre otras líneas (Fomum & Nsahlai, 2017; Jiang et al., 2016; Joshi, Vishwakarma, & Bharate, 2017; Malang, Nafarnda, & Obeta, 2012; Rocha et al., 2017). Los terpenos son un grupo de metabolitos secundarios que presentan varios tipos como: monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides y tetraterpenoides se encuentran reportes de su actividad sobre cáncer y actividad parasitaria (Cho et al., 2017; González, Torres-Mendoza, Jones, & Fernandez, 2015; Kudryavtseva et al., 2016; Mafud et al., 2016; Silva et al., 2017; Yehya et al., 2017). En base a esta información se puede mencionar que la presencia de este tipo de compuestos podrían encontrarse relacionada a la actividad que presentó el extracto (EP-DCM:MeOH) y la fracción (F_AcOEt) analizadas en el presente trabajo de investigación.

3.5. Cromatografía en columna de la fracción en AcOEt.

La fracción miscible en AcOEt (F_AcOEt) obtenida mediante partición líquido-líquido y que fue la más activa en las pruebas de citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer humano evaluadas fue cromatografiada mediante columna abierta empleando una relación 1:200/Extracto:Sílice, se utilizó 13 gr de F_AcOEt, la mezcla eluyente fue: HEX:CH₂Cl₂:MeOH (3.5:1.5:0.1). Se obtuvieron 175 separaciones las cuales fueron unidas mediante similitud en su perfil cromatográfico evaluado mediante CCF, los datos correspondientes a la unión realizada se los presenta en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de la fracción en AcOEt.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F_AcOEt_1	1 - 12	27.3	Sólido blanquecino
F_AcOEt_2	13 - 24	11.7	Sólido blanquecino
F_AcOEt_3	25 - 36	6.9	Sólido blanquecino
F_AcOEt_4	37 - 60	9.5	Sólido blanquecino
F_AcOEt_5	61 - 72	13.4	Líquido transparente
F_AcOEt_6	73 - 77	11.3	Líquido transparente
F_AcOEt_7	78 - 84	21.5	Líquido transparente
F_AcOEt_8	85 - 96	54.1	Líquido transparente

F_AcOEt_9	97 - 108	31.3	Sólido amarillento
F_AcOEt_10	109	2.7	Sólido amarillento
F_AcOEt_11	110 - 120	31.1	Sólido amarillento
F_AcOEt_12	121 - 132	33.9	Sólido amarillento
F_AcOEt_13	133 - 144	46.9	Sólido amarillento
F_AcOEt_14	145 - 155	49.4	Sólido amarillento
F_AcOEt_15	156	4.4	Sólido amarillento
F_AcOEt_16	157 – 159	13.7	Sólido amarillento
F_AcOEt_17	160 - 166	42.9	Sólido amarillento
F_AcOEt_18	167	5.5	Sólido amarillento
F_AcOEt_19	168	5.7	Sólido amarillento
F_AcOEt_20	169 – 173	27.4	Semi-sólido amarillento
F_AcOEt_21	174	27.4	Sólido amarillento
F_AcOEt_22	175	3570	Sólido verdoso

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.5.1. Cromatografía en capa fina preparativa de la fracción F_AcOEt_20

Luego de analizar el perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas, la fracción F_AcOEt_20 presentó un buen perfil cromatográfico evidenciado dos manchas definidas, posibles compuestos, en CCF, por lo que se decidió realizar cromatografía en capa fina preparativa de donde se obtuvo 1.4 mg de un líquido transparente, denominado: **Compuesto 1**, este presentó un R_f de 0.4, soluble en CH₂Cl₂, el sistema de elución fue HEX:CHCl₃:Ac. Fórmico (70:30:1). Se realizó CCF (**Figura 6**) en diferentes polaridades observándose en todos los casos una sola mancha.

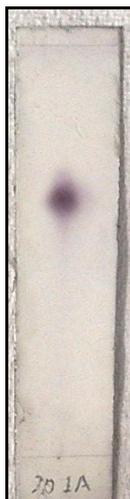


Figura 6. Cromatografía en capa fina del **compuesto 1**.

Polaridad de elución: Hex:DCM (1:1)

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

análisis mediante CG/EM el perfil obtenido del compuesto 1 mostró un tiempo de retención mayoritario de 25.03 min con porcentaje de área de 83.48%. En anexos ver espectro: N°1 Espectro de cromatografía de gases, en el espectro de masas el compuesto 1 presento un ión de 292 m/z (en Anexos ver espectro N°2) que concuerda con la masa molecular del éster metílico del ácido linolénico (**1**) (ver **Figura 7**) de formula $C_{19}H_{22}O_2$ y cuyo peso molecular es de 292.46 g/mol.

La identificación se la realizó mediante comparación con la base de datos Wiley 7n.I. del equipo de CG/EM, y la comparación de los patrones de fragmentación de masas con los reportados previamente en la literatura (Karim & M, 2017; NIST Standard Reference Data, 2014; Yamuna, Abirami, Vijayashalini, & Sharmila, 2017). El ácido linoleico posee efectos como: antiinflamatorio, anticancerígeno, nematocida, insecticida entre otros (Ajayi, Olagunju, Ademuyiwa, & Martins, 2011; Yamuna et al., 2017) este constituye el primer reporte de su presencia en la especie *Echinopsis pachanoi*, puesto que no existe en la literatura ningún reporte para la especie, ni tampoco para la familia Cactaceae, pero se reporta su presencia en especies como: *Cassia itálica* (Sermakkani & Thangapandian, 2012), *Coscinium fenestratum* (Irulandi, Geetha, Tamilselvan, & Mehalingam, 2016) y *Randia spinosa* (K & N, 2016).

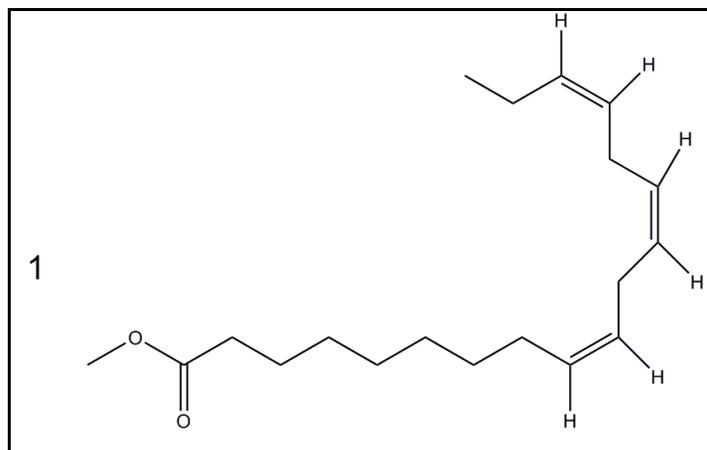


Figura 7. Estructura del compuesto identificado como: Éster metílico del ácido linolénico (**1**).

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.6. Desclorofilación de fracción obtenida mediante partición líquido-líquido en AcOEt (F_AcOEt).

Debido a la interferencia de las clorofilas para el aislamiento de metabolitos secundarios mediante CC de la fracción en AcOEt (F_AcOEt), se decidió desclorofilar la fracción, esperando obtener mejores resultados. Para ello se eluyó en sílica fase inversa (RP18), 2.0 g de la fracción F_AcOEt en una proporción de empacado 1:20/Fracción:Sílice, la elución se la hizo en una mezcla MeOH:H₂O (8:2), los eluatos recolectados se los concentró mediante rotaevaporación. En la **Tabla 9** se presenta datos correspondientes a la desclorofilación de la fracción F_AcOEt.

Tabla 9. Fracciones obtenidas de la desclorofilación de la fracción en AcEOt (F_AcOEt) obtenida mediante partición líquido-líquido de la especie *Echinopsis pachanoi*.

Código	Número de separaciones	Peso (g)
D1_AcOEt_1	1	0.2
D1_AcOEt_2	2 - 3	1.4
D1_AcOEt_3	4 - 5	0.1

D1_AcOEt_4	6	0.02
D1_AcOEt_5	7 - 10	0.09
D1_AcOEt_6	11 - 15	0.8

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

Se realizó CCF en sílica de fase directa e inversa de las fracciones recolectadas de la desclorofilación de la fracción F_AcOEt para evaluar el perfil cromatográfico de las mismas (ver **Figura 8**).

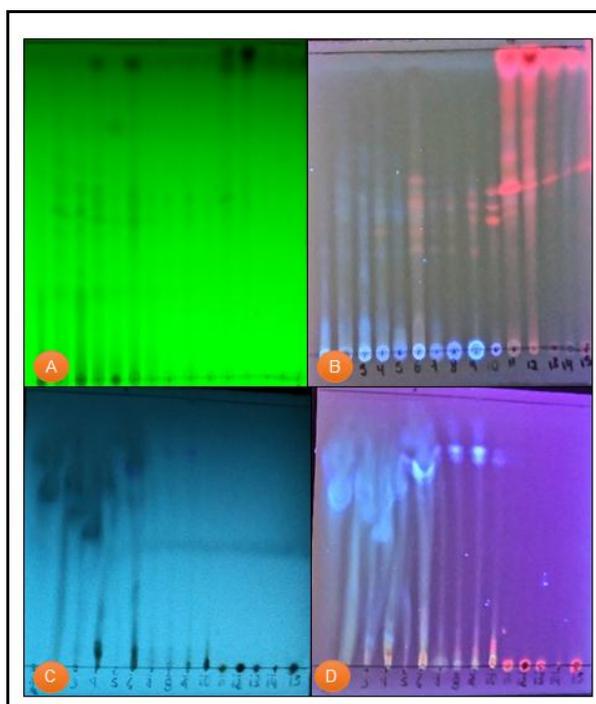


Figura 8. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la desclorofilación del extracto en AcOEt. **(A)** CCF, fase directa bajo luz UV de 254 nm, **(B)** CCF, fase directa bajo luz UV de 365 nm. Polaridad de elución de CCF fase directa: DCM:MeOH (9:1). **(C)** CCF, fase inversa bajo luz UV de 254 nm, **(D)** CCF, fase inversa bajo luz UV de 365 nm. Polaridad de elución de CCF fase inversa: MeOH:H₂O (7:3)

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017

3.6.1. Cromatografía en columna de la fracción D1_AcOEt_2

En base a la CCF realizada de las fracciones obtenidas en la desclorofilación de la fracción F_AcOEt, y al peso mayoritario que presentó la fracción D1_AcOEt_2 (0.81g) se decidió su elución mediante cromatografía en columna con sílice en fase directa, en una relación de empacado de 1:100/Fracción:Sílice, las polaridades de elución fueron proporciones de DCM:MeOH 9.5:0.5, a 5:5, se recolectó un total de 216 separaciones, las que fueron posteriormente unidas mediante la similitud de perfil cromatográfico que presentaron en CCF (ver **Tabla 10**).

Tabla 10. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna la fracción D1_AcOEt_2.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
D1_AcOEt_2_1	1 - 18	8.6	Sólido café claro
D1_AcOEt_2_2	19 - 28	4.3	Sólido café claro
D1_AcOEt_2_3	29 - 52	6.5	Sólido café claro
D1_AcOEt_2_4	53 - 59	4.3	Sólido café claro
D1_AcOEt_2_5	60 - 78	5.7	Sólido café claro
D1_AcOEt_2_6	79 - 80	3.2	Sólido café claro
D1_AcOEt_2_7	81 - 82	8.6	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_8	83 - 111	79.9	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_9	112 - 125	8.2	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_10	126 - 130	12.8	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_11	131	6.4	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_12	132 -136	9.7	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_13	137 – 153	29.0	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_14	154 – 162	18.5	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_15	163 – 168	10.1	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_16	169 – 192	31.8	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_17	193 – 197	14.1	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_18	198 – 201	14.0	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_19	202 – 204	13.3	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_20	205	10.0	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_21	206	12.7	Sólido marrón

D1_AcOEt_2_22	207 - 209	52.0	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_23	210	26.9	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_24	211	25.3	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_25	212	22.7	Sólido marrón
D1_AcOEt_2_26	213 - 216	82.3	Sólido marrón

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7. Desclorofilación del extracto obtenido en DCM:MeOH.

Debido a que el extracto en DCM:MeOH, presentó actividad en la inhibición del crecimiento de células tumorales y sobre la movilidad de larvas L3 de *S. venezuelensis*, y en previa evaluación mediante CCF mostró presencia de clorofilas se decidió su desclorofilación, para que permita facilitar el aislamiento de sus componentes mayoritarios y posterior elución mediante CC.

La desclorofilación del extracto en DCM:MeOH se realizó por tres ocasiones con la finalidad de obtener una óptima cantidad para su evaluación mediante técnicas cromatográficas, en todos los casos se usó una proporción de empacado 1:20/Extracto;Sílice RP18, la elución se la hizo en una mezcla MeOH:H₂O (8:2), los eluatos recolectados se los concentró mediante rotaevaporación. En la **Tabla 11** se presenta los datos correspondientes a las tres desclorofilaciones realizadas al extracto.

Tabla 11. Fracciones obtenidas en cada desclorofilación del extracto en DCM:MeOH de la especie *E. pachanoi*.

Número de desclorofilación	Peso extracto (g)	Número de fracción	Peso (g)
Primera	8	1	1.99
		2	1.62
		3	0.38
		4	0.2
		5	0.04
		6	0.07
		7	0.03
		8	0.08
		9	0.01
		10	0.05
		11	0.2

		12	0.29
		13	0.2
Segunda	6.06	1	0.77
		2	2.33
		3	0.94
		4	0.21
		5	0.14
		6	0.09
		7	0.03
		8	0.03
		9	0.07
		10	0.06
		11	0.06
		12	0.02
		13	0.03
Tercera	10.09	1	2.75
		2	3.57
		3	0.39
		4	0.38
		4*	0.31
		5	0.14
		6	0.07
		7	0.03
		8	0.06
		9	0.05
		10	0.38
		11	0.19
		12	0.18
		13	0.04
14	0.04		

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

Se realizó cromatografía en capa fina de todas las fracciones obtenidas en cada desclorofilación, para evaluar su similitud en el perfil cromatográfico y riqueza fitoquímica (ver **Figura 9**).

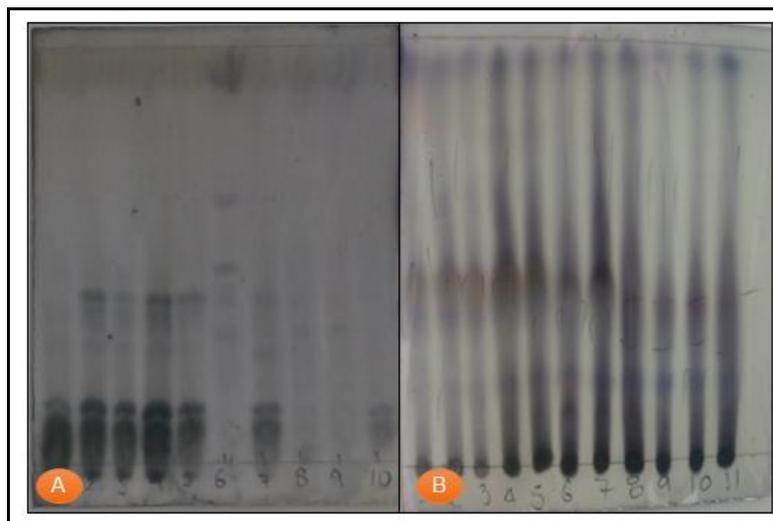


Figura 9. Cromatografía en capa fina de las fracciones desclorofiladas del extracto en DCM:MeOH de *E. pachanoi* reveladas con una solución de ácido sulfúrico y vainillina. **(A)** Polaridad de elución: AcOEt:MeOH:H₂O (77:13:10), **(B)** Polaridad de elución MeOH:H₂O (1:1)

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017

En base a la similitud presentada en CCF de las fracciones analizadas se realizó su unión, en la **Tabla 12.** se muestra el detalle de las fracciones reunidas.

Tabla 12. Unión de fracciones desclorofiladas del extracto en DCM:MeOH obtenido de la especie *E. pachanoi*.

Código	Descripción	Peso (g)	Aspecto físico
F(1)EP	Primera fracción de todas las desclorofilaciones realizadas.	5.5	Sólido café
F(2)EP	Fracciones 2 a 4 de la primera desclorofilación.	4.3	Sólido café
F(3)EP	Fracción 2 de la segunda desclorofilación.	2.3	Sólido café
F(4)EP	Fracción 2 de la tercera desclorofilación.	3.6	Sólido café
F(5)EP	Fracción 3 de la segunda desclorofilación.	0.9	Sólido café
F(6)EP	Fracciones 4 a 6 de la segunda desclorofilación y 3, 4 y 4* de la tercera desclorofilación.	1.5	Sólido café
F(7)EP	Fracciones de la 5 a 8 de la primera desclorofilación.	0.2	Sólido café
F(8)EP	Fracciones 5 a 8 de la tercera desclorofilación.	0.3	Sólido café
F(9)EP	Fracciones 7 y 8 de la segunda desclorofilación.	0.05	Sólido café

F(10)EP	Fracción 9 de la primera y tercera desclorofilación.	0.06	Sólido café
F(11)EP	Fracción 9 de la segunda desclorofilación.	0.07	Sólido café
F(12)EP	Fracciones 10 y 11 de todas las desclorofilaciones.	0.9	Sólido café
F(13)EP	Fracción 12 de la primera y segunda desclorofilación.	0.3	Semisólido verde oscuro
F(14)EP	Fracción 12 de la tercera desclorofilación.	0.2	Semisólido verde oscuro
F(15)EP	Corresponde a la fracción 13 de la primera desclorofilación.	0.2	Semisólido verde oscuro
F(16)EP	Corresponde a la fracción 13 de la segunda desclorofilación.	0.03	Semisólido verde oscuro
F(17)EP	Corresponde a la fracción 13 de la tercera desclorofilación.	0.04	Semisólido verde oscuro
F(18)EP	Corresponde a la fracción 14 de la tercera desclorofilación.	0.04	Semisólido verde oscuro

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

Luego de la unión de las fracciones desclorofiladas se decidió trabajar con las fracciones: F(2)EP, F(3)EP, F(6)EP, F(7)EP, F(13)EP y F(14)EP, debido a que en previo análisis mediante CCF de sílice inversa RP18, sílice directa, y evaluado el fraccionamiento en diferentes polaridades, presentaron un buen fraccionamiento que hizo suponer la posibilidad del aislamiento de alguno de sus componentes mayoritario.

3.7.1. Cromatografía en columna de la fracción F(2)EP.

A partir de la fracción F(2)EP obtenida de la desclorofilación del extracto en DCM:MeOH, con un peso de 2.8 g se decidió su elución mediante CC con sílice en fase directa, con una relación de empacado de 1:35/Fracción:Sílice, como polaridades de elución se usó un gradiente de disolventes: HEX (100%), mezclas de HEX:AcOEt en proporciones 9:1 a 1:9, AcOEt (100%), AcOEt:MeOH (9:1 a 1:9) y MeOH (100%). Se obtuvieron un total de 301 separaciones, de las cuales se realizó cromatografía en capa fina para evaluar la riqueza fitoquímica y la similitud del perfil cromatográfico, se unió las separaciones de similar perfil cromatográfico (ver **Tabla 13**).

Tabla 13. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de la fracción F(2)EP.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F(2)EP_1	1 - 27	23.1	Sólido café claro
F(2)EP_2	28 - 30	8.6	Sólido café claro
F(2)EP_3	31 - 43	28.3	Sólido café claro
F(2)EP_4	44 - 49	19.8	Sólido café claro
F(2)EP_5	50 - 63	40.4	Sólido café claro
F(2)EP_6	64 - 68	15.9	Sólido café claro
F(2)EP_7	69 - 71	16.5	Sólido café claro
F(2)EP_8	72 - 75	9.4	Sólido café claro
F(2)EP_9	76 - 86	15.8	Sólido café claro
F(2)EP_10	87 - 92	30.9	Semisólido marrón
F(2)EP_11	93 - 98	24.6	Sólido café claro
F(2)EP_12	99 - 127	53.2	Sólido café claro
F(2)EP_13	128 - 165	70.6	Sólido café claro
F(2)EP_14	166 - 172	23.0	Sólido café claro
F(2)EP_15	173 - 203	95.2	Sólido café claro
F(2)EP_16	204 - 247	75.6	Sólido café claro
F(2)EP_17	248 - 277	80.8	Sólido café claro
F(2)EP_18	278 - 280	38.0	Sólido café claro
F(2)EP_19	281 - 292	54.1	Sólido café claro
F(2)EP_20	293	28.9	Sólido café claro
F(2)EP_21	294 - 300	43.3	Semisólido marrón
F(2)EP_22	301	105.8	Semisólido marrón

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7.2. Cromatografía en columna de la fracción F(3)EP.

La fracción F(3)EP obtenida de la desclorofilación del extracto en DCM:MeOH de la especie *E. pachanoi*, con un peso de 710.4 mg fue eluida mediante cromatografía en columna con sílice en fase inversa, con una relación de empacado de 1:70/Fracción:Sílice, como polaridad de elución se usó: MeOH:H₂O en proporción (1:1). Se obtuvieron un total de 174 separaciones, de las cuales se realizó cromatografía en capa fina para unir aquellas fracciones que presentaran perfil cromatográfico similar. En la **Tabla 14** se presenta datos correspondientes a las fracciones obtenidas de la fracción F(3)EP.

Tabla 14. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de la fracción F(3)EP.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F(3)EP_1	1 - 14	25.7	Sólido café claro
F(3)EP_2	15 - 36	126.6	Sólido café claro
F(3)EP_3	37 - 79	183.9	Sólido blanquecino
F(3)EP_4	80 - 93	28.9	Sólido café claro
F(3)EP_5	94 - 101	22.1	Sólido café claro
F(3)EP_6	102 - 134	72.6	Sólido café claro
F(3)EP_7	135 - 169	39.3	Sólido café claro
F(3)EP_8	170 - 174	4.8	Sólido marrón
F(3)EP_9	175	28.4	Sólido marrón

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7.2.1. Cromatografía en columna de la fracción F(3)EP_3.

De las fracciones obtenidas en la elución en columna cromatográfica de la fracción F(3)EP la fracción F(3)EP_3 con un peso de 176 mg, presentó en CCF el fraccionamiento de cuatro manchas, posibles compuestos, por lo que se decidió eluirla mediante cromatografía en columna con sílice en fase directa, en una relación de empacado de 1:200/Fracción:Sílice, y utilizar como mezcla eluyente CHCl₃:MeOH:H₂O:Ac. Fórmico (80:25:4:1). Se obtuvieron 410 separaciones de las cuales se realizó CCF (ver **Figura 10**).

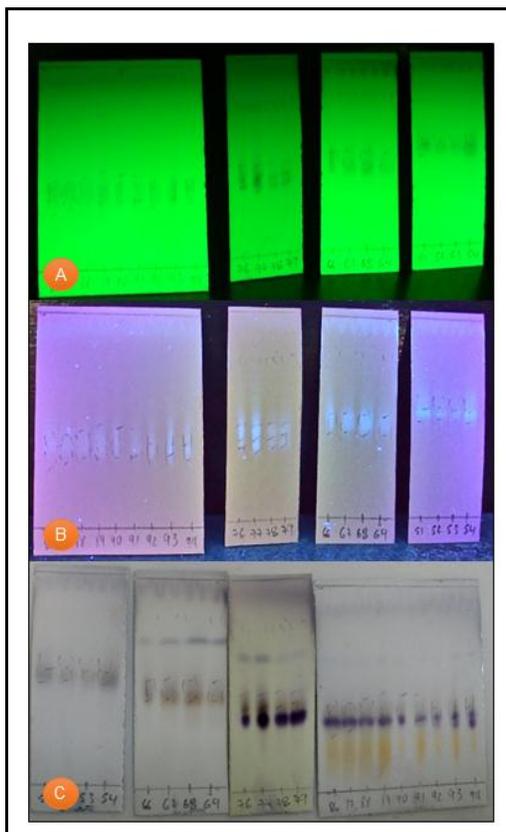


Figura 10. Cromatografía en capa fina en sílice de fase directa de las fracciones obtenidas en la elución cromatográfica de la fracción F(3)EP_3. (A) CCF bajo luz de 254nm, (B) CCF bajo luz de 365nm, (C) CCF revelado con una solución de ácido sulfúrico y vainillina. Polaridad de elución: AcOEt:MeOH:H₂O (77:13:10)

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

En base a la similitud en el perfil cromatográfico presentado por las separaciones analizadas se decidió unirlos, en la **Tabla 15** se presentan los datos correspondientes a las fracciones unidas.

Tabla 15. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de la fracción F(3)EP_3.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F(3)EP_3_1	1 - 20	0.8	Sólido cristalino
F(3)EP_3_2	21 - 30	1.3	Sólido cristalino
F(3)EP_3_3	31 - 33	0.9	Sólido cristalino
F(3)EP_3_4	34 - 41	0.4	Sólido café claro
F(3)EP_3_5	42 - 61	1.6	Sólido café claro
F(3)EP_3_6	62 - 65	0.7	Sólido café claro
F(3)EP_3_7	66 - 137	0.8	Sólido cristalino
F(3)EP_3_8	138 - 185	94.3	Sólido cristalino
F(3)EP_3_9	186 - 217	23.5	Sólido cristalino
F(3)EP_3_10	218 - 247	12.5	Sólido cristalino
F(3)EP_3_11	248 - 341	24.5	Sólido cristalino
F(3)EP_3_12	342 - 410	27.1	Sólido café claro

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7.2.1.1. Cromatografía en capa fina preparativa de la fracción F(3)EP_3_8.

En cromatografía en capa fina de la fracción F(3)EP_3_8, obtenida de la elución en CC de la fracción F(3)EP_3, se observó la presencia de dos únicas manchas, por lo que se realizó cromatografía en capa fina preparativa para su aislamiento, el sistema de elución fue CHCl₃:MeOH:H₂O:Ac. Fórmico (65:25:4:1), obteniéndose 15 mg de un polvo blanquecino (**Compuesto 2**), del que se realizó CCF en donde se pudo observar una sola mancha que presentó un RF de 0.28 (ver **Figura 11**), punto de fusión de 210 - 212 ° C y solubilidad en MeOH,



Figura 11. Cromatografía en capa fina del **compuesto 2**, revelada con una solución de ácido sulfúrico y vainillina. Polaridad de elución: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{Ac. Fórmico}$ (65:25:4:1)

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7.3. Cromatografía en columna de la fracción F(6)EP

La fracción F(6)EP obtenida de la desclorofilación del extracto en $\text{DCM}:\text{MeOH}$, presentó un peso de 1.52 g fue eluida mediante cromatografía en columna con sílice en fase inversa, en una relación de empacado de 1:200/Fracción:Sílice, las polaridades de elución fueron mezclas de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ en proporciones 4:6, 5:5, 6:4 y 8:2. Se obtuvo un total de 164 separaciones las que fueron unidas en base a la similitud del perfil cromatográfico evaluado mediante CCF, en la **Tabla 16** se muestran los datos de las fracciones unidas.

Tabla 16. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de F(6)EP.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F(6)EP_1	1	10.1	Sólido café claro
F(6)EP_2	2 - 42	919.0	Sólido café claro
F(6)EP_3	43 - 92	211.2	Sólido café claro

F(6)EP_4	93 - 108	74.3	Sólido café claro
F(6)EP_5	109 - 122	53.6	Sólido café claro
F(6)EP_6	123 - 138	56.2	Sólido marrón
F(6)EP_7	139 - 147	50.4	Sólido marrón
F(6)EP_8	148 - 157	19.3	Sólido marrón
F(6)EP_9	158 - 164	7.1	Sólido marrón

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7.4. Cromatografía en columna de la fracción F(7)EP

La fracción F(7)EP que fue obtenida de la desclorofilación del extracto en DCM:MeOH, presentó un peso de 0,22 g, se realizó cromatografía en columna con sílice en fase inversa, en una relación de empacado de 1:200/Fracción:Sílice, la elución se la realizó con mezclas de MeOH:H₂O en proporciones 4:6 y 5:5, de la elución en CC fueron obtenidas un total de 63 separaciones las que fueron unidas en base a la similitud del perfil cromatográfico evaluado mediante CCF (ver **Tabla 17**).

Tabla 17. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna de F(7)EP.

Código	Número de separaciones	Peso (mg)	Aspecto físico
F(7)EP_1	1 - 4	42.9	Sólido marrón
F(7)EP_2	5 - 19	120.1	Sólido marrón
F(7)EP_3	20 - 30	15.1	Sólido marrón
F(7)EP_4	31 - 39	25.2	Sólido marrón
F(7)EP_5	40 - 63	10.6	Sólido marrón

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

3.7.5. Cromatografía en capa fina de la fracción F(13)EP.

La fracción F(13)EP obtenida de la desclorofilación del extracto en DCM:MeOH, fue purificada mediante lavados con disolventes de diferente polaridad obteniéndose cuatro fracciones (ver **Tabla 18**).

Tabla 18. Fracciones obtenidas de la fracción F(13)EP.

Código	Número de fracción	Peso (mg)	Solubilidad	Aspecto físico
F(13)EP_DCM	1	4 mg	MeOH	Polvo blanquecino
F(13)EP_CHCl ₃	2	8 mg	Benceno	Polvo blanquecino
F(13)EP_MeOH	3	2 mg	Benceno	Polvo blanquecino
F(13)EP_Piridina	4	3 mg	Piridina	Polvo amarillento

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017.

La cromatografía en capa fina de: F(13)EP_DCM (**Figura 12**), F(13)EP_MeOH y F(13)EP_Piridina presentó una sola mancha, por lo que podría tratarse de la presencia de un solo compuesto, sin embargo debido a la poca cantidad obtenida de estas fracciones y el no disponer de benceno y piridina deuterados no permitió su identificación.



Figura 12. Cromatografía en capa fina de la fracción F(13)EP_DCM revelada con una solución de ácido sulfúrico y vainillina.. Polaridad de elución: DCM:MeOH (9:1).

Fuente: Castillo, P., 2017.

Elaborado por: Castillo, P., 2017

3.7.6. Cromatografía en capa fina de la fracción F(14)EP.

Mediante purificación con diferentes solventes de la fracción F(14)EP obtenida de la desclorofilación del extracto en DCM:MeOH, fue posible obtener 5 mg de un polvo blanquecino, el cual en cromatografía en capa fina se observó como una sola mancha, sin embargo en el análisis mediante EM/CG se obtuvo diferentes tiempos de retención, lo que indica que la mancha observada en CCF no corresponde a la presencia de un solo compuesto.



Figura 13. Cromatografía en capa fina de la fracción F(14)EP_MeOH observada bajo luz UV de 354 nm. Polaridad de elución: HEX (100 %) **Fuente:** Castillo, P., 2017. **Elaborado por:** Castillo, P., 2017.

Para el aislamiento de compuestos presentes en el extracto y fracciones obtenidas de la especie *Echinopsis pachanoi*, se emplearon técnicas cromatográficas convencionales como cromatografía en columna y cromatografía en capa fina. La cromatografía en columna se la aplica con la finalidad de aislar y purificar alguno de los componentes presentes, la separación mediante esta técnica se supone es mucho más completa que la obtenida mediante otras técnicas como la recristalización, sin embargo presenta desventajas como: una lenta separación, adsorción irreversible de los solutos, incompatibilidad granulométrica por la presencia de pequeñas partículas además de ser

un método altamente empírico, que con frecuencia para establecer condiciones eficientes de aislamiento requiere de la aplicación de varios ensayos previos, además de no ser adecuado para la purificación de cantidades significativas de un compuesto debido a que las columnas de tamaño razonable solamente permite el aislamiento de pequeñas cantidades, que muchas veces resulta insuficiente para la identificación y caracterización del compuesto aislado, en general, estas técnicas no presentan una alta selectividad y especificidad para el aislamiento de compuestos presentes en pocas cantidades, por lo general ayudan en la obtención de aquellos componentes mayoritarios presentes en las muestras analizadas (Ault, 1998; Fetterwolf, 2009; Hostettmann, Hostettmann, & Marston, 2013; Smart & Clark, 2007), razón por la que en la presente investigación no se obtuvo el aislamiento de más componentes presentes en el extracto y fracciones analizadas, sin embargo, se podría obtener un aislamiento más eficiente empleado técnicas de mayor selectividad y eficiente aislamiento como: equipo de cromatografía FLASH, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) entre otras, que representan una alternativa a técnicas convencionales de cromatografía como la cromatografía en columna abierta.

CONCLUSIONES

De la especie *Echinopsis pachanoi* se obtuvo un extracto en DCM:MeOH con rendimiento del 15.77% y mediante partición líquido-líquido se obtuvieron 3 fracciones una miscible en hexano (F_HEX) con un rendimiento del 7.9%, una miscible en acetato de etilo (F_AcOEt) con rendimiento de 78.9% y una fracción insoluble (F_INS) con rendimiento del 20%.

La fracción miscible en acetato de etilo (F_AcOEt), obtenida mediante partición líquido-líquido del extracto en DCM:MeOH de la especie *Echinopsis pachanoi*, presentó una mayor actividad citotóxica con un porcentaje de inhibición del crecimiento celular del 51.0%, 50.0%, 43.9% y 50.5% para las líneas celulares evaluadas: MCF-7, PC3, RKO y D-384, respectivamente.

A partir de la fracción miscible en acetato de etilo (F_AcOEt) se obtuvo un compuesto identificado como Éster metílico del ácido linolénico (1), la presencia de este compuesto en la especie constituye en el primer reporte para la especie *Echinopsis pachanoi*.

El extracto obtenido en DCM:MeOH presentó actividad en la motilidad larval a las dosis evaluadas de 600 y 1000 µg/ml, a 24 y 48 horas de administrado el extracto, los porcentajes de inmovilidad de larvas L3 de *Srongyloides venezuelensis* fueron del 54.9 y 81.3% a 24 horas y de 47.9 y 85.9% a las 48 horas.

El extracto obtenido en DCM:MeOH a partir de la especie *E. pachanoi*, presentó tanto actividad sobre la inhibición del crecimiento de células de cáncer de próstata, como actividad en la motilidad de larvas L3 de *S. venezuelensis*, esto podría deberse a la presencia de compuestos de tipo alcaloide, presentes en este extracto de acuerdo a los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico.

RECOMENDACIONES

Persistir con el estudio de otras especies de plantas nativas del país, para contribuir a la validación del uso ancestral que estas presenten.

Recurrir a técnicas cromatográficas que posean una mayor selectividad de análisis como, por ejemplo: cromatografía flash, HPLC preparativa, entre otras, de manera que estas permitan una separación más eficiente de los componentes presentes en el extracto y fracciones obtenidas de la especie, con la finalidad de obtener compuestos de mayor interés que puedan ser la razón de la actividad citotóxica y antihelmíntica que ha presentado la especie.

Realizar estudios para conocer el mecanismo de acción de los extractos y fracciones que muestran las dos actividades evaluadas en la presente investigación: antitumoral y antihelmíntica.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajayi, G. O., Olagunju, J. A., Ademuyiwa, O., & Martins, O. C. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry analysis and phytochemical screening of ethanolic root extract of *Plumbago zeylanica*, Linn. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(9), 1756–1761. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>
- American Brain Tumor Association. (2014). Astrocytoma. Retrieved July 13, 2017, from <http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/astrocytoma.html?referrer=https://www.google.com.ec/>
- American Cancer Society. (2016a). About Prostate Cancer, 0–12. Retrieved from <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html>
- American Cancer Society. (2016b). What Is Breast Cancer? Retrieved July 13, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
- American Cancer Society. (2017). What Is Colorectal Cancer? Retrieved July 13, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Tobar, V., & De Witte, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 89–97. Retrieved from [http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/40/12\nfile:///C:/Users/Sony-PC/Desktop/Cursos 2013/Curso escritura articulo/Revision bibliografica/Para el art/Estudio preliminar de plantas medicinales utilizadas Azuay, Ca?a y Loja.pdf\nhtt](http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/40/12\nfile:///C:/Users/Sony-PC/Desktop/Cursos%202013/Curso%20escritura%20articulo/Revision%20bibliografica/Para%20el%20art/Estudio%20preliminar%20de%20plantas%20medicinales%20utilizadas%20Azuay,%20Ca%20a%20y%20Loja.pdf\nhtt)
- Aparecida, L., Bastos, D., Ueta, M. T., Garcia, V. L., Oliveira, R. N. De, Pinto, M. C., ... Allegretti, S. M. (2017). Ethanolic extracts of different fruit trees and their activity against *Strongyloides venezuelensis*. *International Journal of Modern Biological Research*, 5(April), 1–7.
- Aparicio Rodrigo, M., & Tajada Alegre, P. (2007). Parasitosis intestinales. *Pediatría Integral*, 11(2), 149–160. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(11\)70035-X](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(11)70035-X)
- Ault, A. (1998). *Techniques and Experiments For Organic Chemistry*. (University Science Books, Ed.) (Ilustrada,). University Science Books. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=UbPpoeV-v1sC>
- Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., Hassanzadazar, H., Saki, K., Karamati, S. A., & Delfan, B. (2014). A review on most important herbal and synthetic antihelmintic drugs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), S29–S33. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60200-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60200-5)

- Bahmani, M., Zargaran, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Identification of medicinal plants of urmia for treatment of gastrointestinal disorders. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *24*(4), 468–480. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.08.001>
- Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., & Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, *24*(6), 2283–2296. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7>
- Banco Interamericano de Desarrollo, Organización Panamericana de la Salud, & Instituto de Vacunas Sabin. (2011). Un Llamado a la Acción: Hacer frente a helmintos transmitidos por el suelo en América Latina y el Caribe.
- Bunel, V., Ouedraogo, M., Nguyen, A. T., Stévigny, C., & Duez, P. (2014). Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. *Planta Medica*, *80*(14), 1210–1226. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1360273>
- Butler, M. S., Robertson, A. a. B., Cooper, M. a., Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., ... Sturm, K. (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.*, *31*(11), 1612–1661. <https://doi.org/10.1039/C4NP00064A>
- Cancer research Uk. (2016). Bowel cancer | Cancer Research UK. Retrieved July 13, 2017, from <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/bowel-cancer/risks-causes>
- Cancer Research UK. (2016). Breast cancer | Cancer Research UK. Retrieved July 13, 2017, from <http://about-cancer.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/risks-causes/risk-factors>
- Cancer Research Uk. (2016). Prostate cancer | Cancer Research UK. Retrieved July 13, 2017, from <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/prostate-cancer/about>
- Carvalho, C. O., Chagas, A. C. S., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L. G., Chaves, F. C. M., ... Amarante, A. F. T. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, *183*(3-4), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.051>
- Chavez-Santoscoy, R. A., Gutierrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2009). Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, *64*(2), 146–152. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0117-0>
- Chivian, E., & Bernstein, A. (2010). How Our Health Depends on Biodiversity. *Center for Health and the Global Environment*, *24*.
- Cho, K. S., Lim, Y. R., Lee, K., Lee, J., Lee, J. H., & Lee, I. S. (2017). Terpenes from forests and human health. *Toxicological Research*, *33*(2), 97–106. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.2.097>

- Cordell, G. a. (2015). Phytochemistry and traditional medicine - The revolution continues. *Phytochemistry Letters*, 10(4), xxviii–xl. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.06.002>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Cruz-Vega, D., Verde-Star, M. J., Salinas-Gonzalez, N. R., Rosales-Hernandez, B., Estrada-Garcia, I., Mendez-Aragon, P., ... Castro-Garza, J. (2009). Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 22(April 2008), 557–559. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- CSLS/The University of Tokyo. (n.d.). Factors of Carcinogenesis, Oncogenes, and Tumor Suppressor Genes | Introduction to Life Science | University of Tokyo. Retrieved July 14, 2017, from http://csls-text2.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/07_03.html
- Delgado, P. G. (1961). Diagnosis of Strongyloidiasis: Importance of Baermann's Method, 6(9), 899–904.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 687–699. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>
- Elbel, K. M., Guizzunti, G., Theodoraki, M. a, Xu, J., Batova, A., Dakanali, M., & Theodorakis, E. a. (2013). A-ring oxygenation modulates the chemistry and bioactivity of caged Garcinia xanthonones. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(20), 3341–8. <https://doi.org/10.1039/c3ob40395e>
- Fard, J. K., Jafari, S., & Eghbal, M. A. (2015). A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 447–454. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>
- Féboli, A., Laurentiz, A. C., Soares, S. C., Augusto, J. G., Anjos, L. A., Magalhães, L. G., & Laurentiz, R. S. (2016). Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 226, 64–68.
- Fetterwolf, D. M. (2009). Column chromatography. *Journal of Validation Technology*, 15(2), 43–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7204-4213-7.50009-X>
- Fomum, S. W., & Nsahlai, I. V. (2017). In vitro nematicidal activity of plant species possessing alkaloids and tannins. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1334295>
- GAD, M. de L. (n.d.). Parroquias | Municipio de Loja. Retrieved July 14, 2017, from <http://www.loja.gob.ec/contenido/parroquias>
- González, Y., Torres-Mendoza, D., Jones, G. E., & Fernandez, P. L. (2015). Marine Diterpenoids as Potential Anti-Inflammatory Agents. *Mediators of Inflammation*, 2015(2015), 263543. <https://doi.org/10.1155/2015/263543>

- Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9(12), 767–776. <https://doi.org/10.1007/s12094-007-0138-9>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harlev, E., Nevo, E., Solowey, E., & Bishayee, A. (2013). Cancer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: A review. *Planta Medica*, 79(9), 713–722. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328632>
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. (2013). *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*. (Springer Science & Business Media, Ed.) (Ilustrada). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=9TzzCAAAQBAJ>
- Irulandi, K., Geetha, S., Tamilselvan, A., & Mehalingam, P. (2016). Phytochemical characterization and GC-MS analysis of methanolic leaf extracts of *Coscinium fenestratum* (Gaertn .) Colebr. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 6(December 2015), 24–29.
- Ishii, I., Harada, Y., & Kasahara, T. (2012). Reprofilng a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. *Frontiers in Oncology*, 2(October), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00137>
- Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., ... Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(45), 1310–1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Jiang, Q. W., Chen, M. W., Cheng, K. J., Yu, P. Z., Wei, X., & Shi, Z. (2016). Therapeutic Potential of Steroidal Alkaloids in Cancer and Other Diseases. *Medicinal Research Reviews*, 36(1), 119–143. <https://doi.org/10.1002/med>
- Joshi, P., Vishwakarma, R. a., & Bharate, S. B. (2017). Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.047>
- K, M., & N, C. (2016). Phytochemical Investigations of Methanol Leaf Extracts of *Randia spinosa* Using Column Chromatography, HPTLC and GC-MS. *Natural Products Chemistry & Research*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000202>
- Karim, A., & M, A. K. (2017). GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity of Fixed Oil from Saudi *Negella sativa* (Ranunculaceae). *Journal of Medical Pharmaceutical And Allied Sciences*, (2320).
- Kittakoop, P. (2015). *Anticancer drugs and potential anticancer leads inspired by natural products*. *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 44). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63460-3.00005-5>

- Kotze, a. C., Clifford, S., O'Grady, J., Behnke, J. M., & Mccarthy, J. S. (2004). An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 608–616. <https://doi.org/71/5/608> [pii]
- Kudryavtseva, A., Krasnov, G., Lipatova, A., Alekseev, B., Maganova, F., Shaposhnikov, M., ... Moskalev, A. (2016). Effects of *Abies sibirica* terpenes on cancer- and aging-associated pathways in human cells. *Oncotarget*, 7(50), 83744–83754. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13467>
- Kvist, L., & Moraes, M. (2006). Plantas psicoactivas. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 19. Retrieved from <http://sites.google.com/site/monicamoraes45/BEISA19.pdf>
- Laguna, E., Ferrer-gallego, P. P., Deltoro, V., Ferrerando, I., & Guillot Ortiz, D. (2013). *Echinopsis pachanoi* (Britton & Rose) H. Friedrich & G D. Rowley (Cactaceae) primera cita como alóctona en España. *Bouteloua*, (January), 34–36.
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Quito: Publicaciones del Herbario QCA.
- Leonardo, F. G. (2006). *El cactus san pedro: su función y significado en Chavín de Huántar y la tradición religiosa dde los andes centrales*. UNIVERSIDAD MACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Loaiza, C., Aguirre, Z., & Jadán, O. (2009). Estado del conocimiento de la familia Cactaceae en el Ecuador. *Boletín de La Sociedad Latinoamericana Y Del Caribe de Cactáceas Y Otras Suculentas*, 6(3), 11–22.
- Macias-Ceja, D. C., Cos??n-Roger, J., Ortiz-Masi??, D., Salvador, P., Hern??ndez, C., Calatayud, S., ... Barrachina, M. D. (2016). The flesh ethanolic extract of *Hylocereus polyrhizus* exerts anti-inflammatory effects and prevents murine colitis. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1333–1339. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.02.013>
- Madsen, J. E. (2000). Fitogeografía de las cactáceas del Ecuador. In *Memorias del Tercer Congreso Ecuatoriano de Botánica*. Quito (pp. 21–22).
- Mafud, A. C., Silva, M. P. N., Monteiro, D. C., Oliveira, M. F., Resende, J. G., Coelho, M. L., ... De Moraes, J. (2016). Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. *Chemico-Biological Interactions*, 244, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.003>
- Malang, K. S., Nafarnda, W. D., & Obeta, S. (2012). In-vivo Evaluation for anthelmintic effect ok alkaloids extracted from the stem bark of *Azelia africana* in rats. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3.
- Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Qualitative Phytochemical Screening. In Academic Press (Ed.), *Essentials of Botanical Extraction* (pp. 173–185). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802325-9.00009-4>

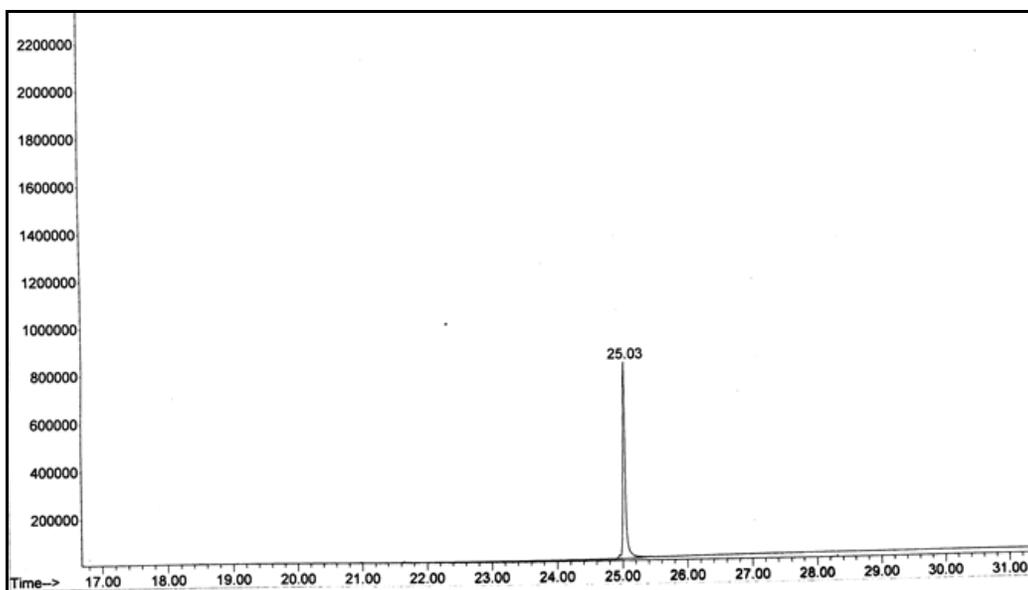
- Manju, K., R.K., J., & Anju, G. (2012). A review on medicinal plants used as a source of anticancer agents. *International Journal of Drug Research and Technology*, 2(3), 231–238.
- Manke, M. B., Dhawale, S. C., & Jamkhande, P. G. (2015). Helminthiasis and medicinal plants: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 175–180. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60648-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60648-4)
- Martins, C., Oliveira, R., Filho, C. V. M., Lopes, L. T., Silveira, R. A., de Silva, J. A. P., ... Antonini, Y. (2016). Reproductive biology of *Cipocereus minensis* (Cactaceae)-A columnar cactus endemic to rupestrian fields of a Neotropical savannah. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 218, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.010>
- Miranda, M., & Cuellar, A. (2001). Farmacognosia y productos naturales. *La Habana: Editorial Félix Varela*, 141.
- Necchi, R. M. M., Alves, I. a, Alves, S. H., Manfron, M. P., & Farmacêuticas, D. P. C. (2012). In vitro antimicrobial activity , total polyphenols and flavonoids contents of *Nopalea cochenillifera* (L .) Salm-Dyck (Cactaceae), 2(3), 1–7.
- NIST Standard Reference Data. (2014). Methyl linolenate. Retrieved July 15, 2017, from <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C301008&Mask=200>
- Ogunbodede, O., McCombs, D., Trout, K., Daley, P., & Terry, M. (2010). New mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of *Echinopsis* spp. (Cactaceae) (“ San Pedro”) and their relevance to shamanic practice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.021>
- Oliveira, A. F., Costa Junior, L. M., Lima, A. S., Silva, C. R., Ribeiro, M. N. S., Mesquista, J. W. C., ... Vilegas, W. (2017). Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. *Veterinary Parasitology*, 236, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.005>
- Olsen, S. N., Schumann, T., Pedersen, A., & Eriksen, L. (2003). Recovery of live immature cyathostome larvae from the faeces of horses by Baermann technique. *Veterinary Parasitology*, 116(3), 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.006>
- Ononye, S. N., Vanheyst, M. D., Oblak, E. Z., Zhou, W., Ammar, M., Anderson, A. C., & Wright, D. L. (2013). Tropolones As Lead-Like Natural Products: The Development of Potent and Selective Histone Deacetylase Inhibitors, 8–12.
- Pérez-Escobar, O. A., Chomicki, G., Condamine, F. L., Karremans, A. P., Bogarín, D., Matzke, N. J., ... Antonelli, A. (2017). Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world’s richest plant biodiversity hotspot. *New Phytologist*, 215(2), 891–905. <https://doi.org/10.1111/nph.14629>
- Rafieian-kopaei, M. (2012). Medicinal plants and the human needs. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 1(1), 1–2. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60708-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60708-8)

- Ramos-Zúñiga, R., Pérez-Gómez, H. R., Jáuregui-Huerta, F., Del Sol López-Hernández, M., Valera-Lizárraga, J. E., Paz-Vélez, G., & Becerra-Valdivia, A. (2013). Incidental consequences of antihelminthic treatment in the central nervous system. *World Neurosurgery*, 79(1), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.01.060>
- Rios, M., Koziol, M. J., Borgtoft, H., & Granda, G. (2007). *USEFUL PLANTS OF ECUADOR: APPLICATIONS, CHALLENGES, AND PERSPECTIVES*. (A.- Yala, Ed.) (1st ed.). Quito.
- Riss, T. L., Moravec, R. a, Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. a, Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- Rocha, J. a., Andrade, I. M., Véras, L. M. C., Quelemes, P. V., Lima, D. F., Soares, M. J. S., ... Leite, J. R. S. a. (2017). Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. *Phytotherapy Research*, 31(4), 624–630. <https://doi.org/10.1002/ptr.5771>
- Romero-Benavides, J. C., Ruano, A. L., Silva-Rivas, R., Castillo-Veintimilla, P., Vivanco-Jaramillo, S., & Bailon-Moscoso, N. (2017). Medicinal plants used as anthelmintics : Ethnomedical , pharmacological , and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 129, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005>
- Sermakkani, M., & Thangapandian, V. (2012). GC-MS analysis of *Cassia italica* leaf methanol extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2), 90–94.
- Silva, M. P., de Oliveira, R. N., Mengarda, A. C., Roquini, D. B., Alegretti, S. M., Salvadori, M. C., ... de Moraes, J. (2017). Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.06.005>
- Silva-Hughes, A. F., Wedge, D. E., Cantrell, C. L., Carvalho, C. R., Pan, Z., Moraes, R. M., ... Rosa, L. H. (2015). Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, 175, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.007>
- Smart, L., & Clark, G. (2007). *The molecular world. Separation, Purification and Identification*. (R. S. of Chemistry, Ed.). Royal Society of Chemistry. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=UnEoDwAAQBAJ>
- Soto-Cabrera, D., Torres-Olvera, M., Salazar, J. R., Cerón-Nava, A., & Rosales-Guevara, J. (2014). ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS DE *Stenocereus* sp. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, (October). <https://doi.org/10.13140/2.1.4510.9765>
- Sri Nurestri, A. M., Wahab, N. A., Yaacob, H., Shin, S. K., Lai, H. S., Serm, L. G., & Rahman, S. N. S. A. (2010). Cytotoxic activity of *Pereskia bleo* (Cactaceae) against

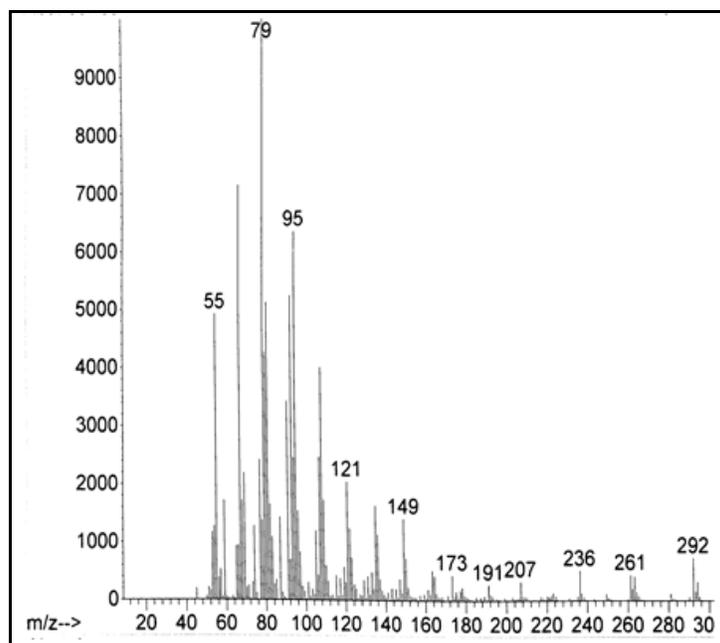
- selected human cell lines. *International Journal of Cancer Research (USA)*, 6(3), 180–187.
- Tan, M. L., Sulaiman, S. F., Najimuddin, N., Samian, M. R., & Muhammad, T. S. T. (2005). Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.025>
- Taylor, M. a., Hunt, K. R., & Goodyear, K. L. (2002). Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103(3), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00604-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00604-5)
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>
- Tropicos. (n.d.). *Echinopsis pachanoi* (Britton & Rose) Friedrich & G.D. Rowley. Retrieved July 14, 2017, from <http://www.tropicos.org/Name/5102168>
- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29(2), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>
- Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). Anthelmintics. *Synthesis of Best-Seller Drugs*, 749–764. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-4111492-0.00036-5>
- Vatta, a. F., Kandu-Lelo, C., Ademola, I. O., & Eloff, J. N. (2011). Direct anthelmintic effects of *Cereus jamacaru* (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: In vivo studies. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.025>
- Vdatos | Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2015). Principales Causas de Mortalidad. Retrieved January 25, 2017, from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/>
- Viney, M. (2007). *Strongyloides* spp. *WormBook*, 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.1>
- Wink, M. (2016). Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00263-8>
- World Health Organization. (2010). WHO | Medicina tradicional. *WHO*. Retrieved from http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- World Health Organization. (2012). WHO | Biodiversity. *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/en/>
- World Health Organization. (2014). Cancer Mortality Profile. Retrieved from http://www.who.int/cancer/country-profiles/ecu_en.pdf?ua=1

- World Health Organization. (2015a). Cancer. Retrieved January 25, 2017, from <http://www.who.int/topics/cancer/en/>
- World Health Organization. (2015b). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. *Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Diseases*, 191. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 156486 1](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%20156486%201)
- World Health Organization. (2017a). Cáncer. Retrieved from <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- World Health Organization. (2017b). Cáncer, datos y cifras. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- World Health Organization. (2017c). WHO | Cancer Key facts. *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Yamuna, P., Abirami, P., Vijayashalini, P., & Sharmila, M. (2017). GC-MS analysis of bioactive compounds in the entire plant parts of ethanolic extract of *Gomphrena decumbens* Jacq. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(3), 31–37.
- Yehya, A. H., Asif, M., Tan, Y. J., Sasidharan, S., Majid, A. M. A., & Oon, C. E. (2017). Broad spectrum targeting of tumor vasculature by medicinal plants: An updated review. *Journal of Herbal Medicine*.
- Yoon, J. A., Hahm, S. W., Park, J. E., & Son, Y. S. (2009). Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(12), 1679–1684. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2009.38.12.1679>
- Yu, K., Wang, T., Li, Y., Wang, C., Wang, X., Zhang, M., ... Ye, T. (2017). Niclosamide induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in human thyroid cancer in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.097>
- Zhang, T., Li, Y., Yu, Y., Zou, P., Jiang, Y., & Sun, D. (2009). Characterization of celastrol to inhibit Hsp90 and Cdc37 interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35381–35389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051532>
- Zorgui, L., Ayed-Boussema, I., Ayed, Y., Bacha, H., & Hassen, W. (2009). The antigenotoxic activities of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes against the mycotoxin zearalenone in Balb/c mice: Prevention of micronuclei, chromosome aberrations and DNA fragmentation. *Food and Chemical Toxicology*, 47(3), 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.031>

ANEXOS



Espectro N° 1. Espectro de cromatografías de gases correspondiente al compuesto identificado como Éster metílico del ácido linolénico (**1**) ($C_{19}H_{32}O_2$) compuesto aislado de la fracción miscible en acetato de etilo obtenida mediante partición líquido-líquido a partir del extracto en DCM:MeOH de la especie *Echinopsis pachanoi*, se muestra un tiempo de retención de 25.03 min.



Espectro N° 2. Espectro de espectrofotometría de masas correspondiente al compuesto identificado como Éster metílico del ácido linolénico (**1**) ($C_{19}H_{32}O_2$) compuesto aislado de la fracción miscible en acetato de etilo obtenida mediante partición líquido-líquido a partir del extracto en DCM:MeOH de la especie *Echinopsis pachanoi*, se muestra un ion de 292 m/z.