

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y
ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE
DIFERENTES PARTES ANATÓMICAS DE *IMPATIENS HAWKERI*
(BALSAMINACEAE)**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas
para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con
Énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular**

FABIÁN DELGADO RODRÍGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuela, Jovita Zeledón Oviedo, quien inspiró mi interés por las plantas desde mi niñez.

A mi madre, Verena Rodríguez Zeledón, y a mi padre, Vinicio Delgado Quintana, por su apoyo a lo largo de mi formación académica y vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Comité Asesor, por su anuencia a aceptar el tema de investigación como Trabajo Final de Graduación y por todo su apoyo logístico y recomendaciones aportadas a lo largo de la ejecución del presente trabajo.

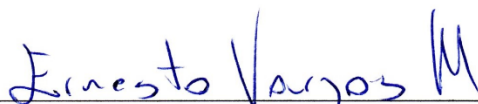
A la Vicerrectoría de Investigación (UCR), el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (Facultad de Farmacia, UCR) y al Laboratorio de Investigación en Bioquímica (Departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina, UCR), por el apoyo logístico, técnico y/o financiero al proyecto de investigación bajo cuyo marco se desarrolló el presente Trabajo Final de Graduación.

Al Laboratorio de Farmacognosia (Facultad de Farmacia, UCR), y al Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas (Escuela de Medicina, UCR) por su apoyo logístico y/o financiero al presente Trabajo Final de Graduación.

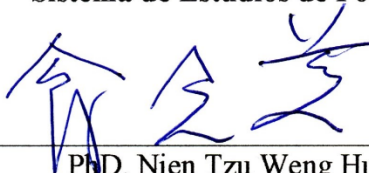
Al señor Alexis Torres y a las señoras Ana Lorena Torres y María Fernanda Morales, por su ayuda técnica a lo largo de la ejecución del presente trabajo.

A los animales de investigación, cuyo sacrificio fue trascendental para la generación de parte de los resultados de este estudio, así como de todos aquellos cuya vida ha sido trascendental para el progreso de la Ciencia y la Tecnología.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con Énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular”



PhD. Ernesto Vargas Méndez
**Representante de la Decana del
Sistema de Estudios de Posgrado**



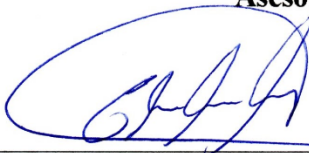
PhD. Nien Tzu Weng Huang
Director de Tesis



PhD. Gabriela Azofeifa Cordero
Asesora



PhD. Silvia Quesada Mora
Asesora



PhD. Elvira Salas Hidalgo
**Representante de la Directora del
Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas**



Fabián Delgado Rodríguez
Sustentante

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	iv
Tabla de contenidos	v
Resumen	ix
Abstract	x
Lista de cuadros	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Lista de ecuaciones	xxii
1. Introducción	1
1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) y el estrés oxidativo	1
1.1.1. Principales fuentes de ROS y RNS	1
1.1.2. Sistemas antioxidantes y definición de estrés oxidativo.....	3
1.1.3. Estrés oxidativo y su relación con patologías	6
1.2. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos de origen vegetal .	14
1.3. Infecciones bacterianas y la necesidad de nuevos agentes antibacterianos .	19
1.4. Las plantas como fuente de moléculas antibacterianas	26
2. Justificación	29

3. Hipótesis y objetivos	31
3.1. Hipótesis	31
3.2. Objetivos.....	31
3.2.1. Objetivo general	31
3.2.2. Objetivos específicos	31
4. Materiales y métodos	33
4.1. Recolección y procesamiento del material vegetal	33
4.2. Preparación de los extractos hidroalcohólicos	34
4.3. Análisis de los extractos mediante cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC)	35
4.3.1. Condiciones cromatográficas generales	35
4.3.2. Condiciones para la determinación simultánea de quercetina y kaempferol	37
4.3.3. Condiciones para la determinación simultánea de rutina e isoquercetina	38
4.3.4. Condiciones para la determinación simultánea de lawsona y 2-MNQ	38
4.3.5. Condiciones para la determinación de escopoletina	39
4.4. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (TPC)	40
4.5. Determinación del contenido de flavonoides totales (TFC)	41
4.6. Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales (TMA)	42
4.7. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante mediante ensayos químicos	43
4.7.1. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)	43
4.7.2. Actividad barredora sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	45
4.7.3. Potencial antioxidante reductor férrico (FRAP)	46

4.7.4. Determinación de la actividad quelante sobre el ion hierro II (FIC)	47
4.8. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante mediante ensayos biológicos	48
4.8.1. Inhibición de la peroxidación lipídica de homogenizados de hígado de rata (LPO)	48
4.8.2. Actividad antioxidante celular de eritrocitos (ERYCA)	51
4.8.3. Determinación de la capacidad de estabilización de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares	52
4.8.3.1. Determinación preliminar de la citotoxicidad de los extractos	52
4.8.3.2. Determinación del potencial reductor de ROS a nivel intracelular	53
4.9. Determinación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	55
4.10. Análisis estadístico de resultados	57
5. Resultados y discusión	59
5.1. Determinación de compuestos biológicos bioactivos por cromatografía HPTLC	59
5.2. Cuantificación colorimétrica de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y antocianinas monoméricas totales (TMA)	73
5.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante mediante ensayos químicos	79
5.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante mediante ensayos biológicos	87
5.5. Determinación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	96
5.6. Resultados de los análisis de correlación y PCA	102
6. Conclusiones y recomendaciones	110
7. Referencias	113

8. Anexos	163
8.1. Estimación del porcentaje del peso total de las plantas de <i>I. hawkeri</i> correspondiente a cada sección anatómica	163
8.2. Pérdida de humedad del material vegetal durante la fase de secado	164
8.3. Rendimiento de extracción	165
8.4. Parámetros analíticos de los ensayos por cromatografía HPTLC	166
8.5. Ejemplos de densitogramas procesados en los análisis por cromatografía HPTLC	168
8.6. Gráfico de tendencias dosis respuesta observada en el ensayo de determinación de la inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular	189
8.7. Valores para las variables SCF e IAB empleadas para los análisis de correlación y PCA	190
8.8. Resultados de análisis PCA establecido mediante la selección de los tres componentes principales con mayor varianza	191

RESUMEN

Los extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos se caracterizan por su capacidad antioxidante, lo que plantea que su consumo puede reducir la incidencia y progresión de patologías asociadas al estrés oxidativo. Además, este tipo de sustancia puede presentar actividad antibacteriana, la cual puede ser aprovechada para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

El género *Impatiens* presenta plantas cuyos extractos y metabolitos fenólicos han demostrado previamente actividad antioxidante y antibacteriana. Por este motivo y por la relevancia de hallar agentes antibacterianos y antioxidantes, se realizó el estudio comparativo de la composición de compuestos fenólicos y de las actividades antibacteriana y antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de diferentes partes anatómicas de *Impatiens hawkeri*. Además, se estudió el efecto de la técnica de secado de las hojas sobre los mismos parámetros.

Entre los compuestos bioactivos identificados de manera tentativa en los extractos mediante cromatografía de capa fina de alto desempeño (HPTLC) se encuentran quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, lawsona y escopoletina. Los resultados de ensayos de cuantificación indican que las hojas y flores son la fuente más rica en compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas. Los extractos de estas partes de la planta presentan la mayor actividad antioxidante y el mayor efecto antibacteriano. El secado de las hojas influye en la concentración de metabolitos fenólicos, y en las actividades antioxidante y antibacteriana de sus extractos hidroalcohólicos. Los extractos con actividad antibacteriana presentan un efecto inhibitorio débil sobre el crecimiento de bacterias Gram-positivas. Los análisis de correlación y de componentes principales revelan la existencia de una asociación entre las actividades antioxidante y antibacteriana de los extractos con las cantidades de compuestos fenólicos y flavonoides. Los resultados demuestran que el extracto obtenido de hojas liofilizadas es el que presenta mayor capacidad antioxidante, mientras que el extracto de hojas secadas al horno presenta un mejor perfil de actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Plant extracts rich in phenolic compounds are characterized by their antioxidant capacity. It has been proposed that their consumption can reduce the incidence and progression of oxidative stress associated illnesses. In addition, this kind of metabolites can show antibacterial activity and are considered as a potential source of new antimicrobials.

There are previous reports of extracts and phenolic metabolites derived from *Impatiens* genus that have demonstrated antioxidant and antibacterial activity. Considering this background and the relevance of the research for the discovery of antibacterial and antioxidant agents, a comparative study of the composition of phenolic compounds and the antibacterial and antioxidant activities of the hydroalcoholic extracts from different anatomical parts of *Impatiens hawkeri* was carried out. Additionally, the effect of drying technique applied to leaves on the same properties was also studied.

Quercetin, kaempferol, rutin, isoquercetin, lawsone, and scopoletin are among the bioactive compounds tentatively identified in the extracts by high performance thin layer chromatography (HPTLC). The results of quantification assays indicate that leaves and flowers are the richest sources of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins. The extracts of these parts of the plant have the highest antioxidant activity and the highest antibacterial effect. The drying technique applied on leaves influences the concentration of phenolic compounds, and the antioxidant and antibacterial activities of their hydroalcoholic extracts. Extracts with antibacterial activity have a weak inhibitory effect on Gram-positive bacteria growth. Correlation and principal component analyzes demonstrated an association between the antioxidant and antibacterial activities of the extracts with their contents of phenolic compounds and flavonoids. The results show that the extract obtained from freeze-dried leaves is the one with the highest antioxidant capacity, while the extract from oven-dried leaves has the best antibacterial activity profile.

LISTA DE CUADROS

Cuadro I. Principales factores generadores de ROS y RNS a nivel celular	2
Cuadro II. Principales sistemas antioxidantes endógenos	4
Cuadro III. Principales infecciones provocadas por las especies de bacterias patógenas sobre las que se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos de <i>I. hawkeri</i>	25
Cuadro IV. Códigos asignados a los diferentes extractos hidroalcohólicos de <i>I. hawkeri</i> sujetos a estudio.....	35
Cuadro V. Contenido de compuestos fenólicos bioactivos en los extractos de diferentes partes anatómicas de <i>I. hawkeri</i>	65
Cuadro VI. Contenido de compuestos fenólicos bioactivos en los extractos de hojas de <i>I. hawkeri</i> sometidas a secado bajo diferentes técnicas	68
Cuadro VII. Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y antocianinas monoméricas totales (TMA) en los extractos de diferentes partes anatómicas de <i>I. hawkeri</i>	74
Cuadro VIII. Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y antocianinas monoméricas totales (TMA) en los extractos de hojas de <i>I. hawkeri</i> sometidas a secado mediante diferentes técnicas	76
Cuadro IX. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos de diferentes partes anatómicas de <i>I. hawkeri</i>	81
Cuadro X. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos de hojas de <i>I. hawkeri</i> sometidas a secado mediante diferentes técnicas	83
Cuadro XI. Valores de CMI determinados para los extractos de diferentes partes anatómicas de <i>I. hawkeri</i> sobre las distintas bacterias de prueba	97
Cuadro XII. Valores de CMI determinados para los extractos de hojas de <i>I. hawkeri</i> sometidas a secado mediante diferentes técnicas	99
Cuadro A1. Porcentaje del peso promedio de la planta de <i>I. hawkeri</i> que corresponde a cada parte o sección anatómica	163

Cuadro A2. Pérdida de humedad del material vegetal durante la fase de secado	164
Cuadro A3. Porcentaje de rendimiento para los procesos de extracción con los diferentes tipos de material vegetal de <i>I. hawkeri</i>	165
Cuadro A4. Parámetros analíticos de los métodos empleados para la determinación de compuestos fenólicos bioactivos	167
Cuadro A5. Valores de las variables SCF e IAB para cada extracto	190

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de ejemplos de los principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal	14
Figura 2. Esquema de los mecanismos químicos de actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	18
Figura 3. Cromatogramas para la determinación de quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, lawsona, 2-MNQ y escopoletina	62
Figura 4. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica (LPO) de homogenizados de hígado de rata	88
Figura 5. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo ERYCA ...	90
Figura 6. Prueba de citotoxicidad sobre células Vero preliminar al ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular	92
Figura 7. Ensayo de inhibición de la producción de ROS (IROS) a nivel intracelular en células Vero	93
Figura 8. Matriz de correlación de Spearman entre los diferentes parámetros determinados para los nueve extractos estudiados	102
Figura 9. Análisis PCA bidimensional para los diferentes parámetros evaluados en los extractos sujetos a estudio	105
Figura A1. Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 1	168
Figura A2. Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 1 y 2	169

Figura A3. Densitogramas de absorbancia para la determinación de rutina (1) e isoquercetina (2) obtenidos a 365 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 3	174
Figura A4. Densitogramas de absorbancia para la determinación de lawsona (1) y 2-MNQ (2) obtenidos a 275 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 4 y 5	179
Figura A5. Densitogramas de fluorescencia para la determinación de escopoletina (1) obtenidos a una longitud de onda excitación de 302 nm y con la lectura de la intensidad de fluorescencia emitida con filtro de detección K400 después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 6 y 7	184
Figura A6. Tendencia dosis respuesta observada con los extractos y quercetina en el ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular. Las barras de error corresponden al error estándar	189
Figura A7. Análisis PCA tridimensional para los diferentes parámetros evaluados en los extractos sujetos a estudio	191

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-MNQ: 2-metoxi-1,4-naftoquinona.
- $A_{520\text{nm}}$: Absorbancia a 520 nm a pH 1,0.
- $A'_{520\text{nm}}$: Absorbancia a 520 nm a pH 4,5.
- $A_{700\text{nm}}$: Absorbancia a 700 nm a pH 1,0.
- $A'_{700\text{nm}}$: Absorbancia a 700 nm a pH 4,5.
- AAPH: Diclorhidrato de 2,2-azobis-2-amidinopropano.
- A_B : Absorbancia promedio del blanco.
- ABC_B : Es el área bajo la curva obtenida para el blanco.
- ABC_C : Área bajo la curva del control.
- ABC_M : Área bajo la curva total obtenidos para las soluciones de prueba de los extractos o para las soluciones de estándar antioxidante.
- ABC_N : Área bajo la curva neta.
- ABC_{NE} : Área bajo la curva neta obtenida con la solución de prueba de extracto.
- ABC_{NT} : área bajo la curva neta obtenida con una solución estándar de trolox.
- A_{BM} : Absorbancia promedio del blanco de muestra.
- A_C : Absorbancia promedio del control.
- ACAT1: *Acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1*.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AGE: Productos finales de glicación avanzada.
- AhR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*.
- AKT: Proteína quinasa B.
- ALK1: *Activin receptor-like kinase 1*.
- A_M : Absorbancia promedio obtenida con las diluciones de prueba del extracto.
- AMPK: *AMP-activated protein kinase*.
- ANOVA: Análisis de varianza.
- APP: Proteína precursora amiloide.
- AR: Absorbancia relativa.
- ASC: *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*.

ASK1: *Apoptosis signal-regulating kinase*.
ATCC: *American Type Culture Collection*.
A β : Péptido β -amiloide.
Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*.
C3GE: Equivalentes de cianidina-3-O-glucósido.
CAT: Catalasa.
CCL-2: *Monocyte chemoattractant protein-1*.
CDC: Centro de Control de Enfermedades.
CD36: *Cluster of differentiation 36*.
C_E: Concentración de prueba del extracto.
CICUA: Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales.
CMB: Concentración mínima bactericida.
CMI: Concentración mínima inhibitoria.
CO₂: Dióxido de carbono.
C_T: Concentración de solución estándar de trolox.
DER: Desviación estándar relativa.
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
DUOX: Oxidasa dual.
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
EDTAE: Equivalentes de EDTA.
ERYCA: Actividad antioxidante celular de eritrocitos.
FADH₂: Flavín adenín dinucleótido, forma reducida.
F_C: Intensidad de fluorescencia medida a los pozos control.
FIC: Capacidad quelante sobre el ion ferroso.
FL-20: Extracto de flores liofilizadas de *I. hawkeri* (recolección: febrero de 2020).
F_M: Intensidad de fluorescencia de los pozos de las células tratadas con extractos o quercetina.
FR: Fluorescencia relativa.
FRAP: Poder antioxidante reductor férrico.

GAE: Equivalentes de ácido gálico.

GATA4: *Transcription factor GATA-4*.

GPx: Glutación peroxidasa.

H2DCFDA: Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína.

H₂O: Agua.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HAT: Transferencia de átomos de hidrógeno.

HH-20: Extracto de hojas de *I. hawkeri* secadas al horno a 70 °C (recolección: febrero de 2020).

HH-21: Extracto de hojas de *I. hawkeri* secadas al horno a 70 °C (recolección: febrero de 2021).

HIF-1 α : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*.

HIFs: *Hypoxia-inducible factors*.

HL-21: Extracto de hojas liofilizadas de *I. hawkeri* (recolección: febrero de 2021).

HO: Heme oxigenasa.

HOCl: Ácido hipocloroso.

HPLC: Cromatografía líquida de alto desempeño.

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alto desempeño acoplado a detector de arreglo de diodos.

HPLC-DAD-MS: Cromatografía líquida de alto desempeño acoplada a detector de arreglo de diodos y espectrómetro de masas.

HPTLC: Cromatografía de capa fina de alto desempeño.

HS-21: Extracto de hojas de *I. hawkeri* secadas a la sombra (recolección: febrero de 2021).

IAB: Índice de actividad antibacteriana.

IC_{50DPPH}: Concentración de antioxidante que inhibe o estabiliza el 50 % del radical DPPH.

IC_{50LPO}: Concentración que produce la inhibición del 50 % de la peroxidación lipídica.

IL: Interleucina.

IROS: Inhibición de la generación de ROS a nivel intracelular.

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*.

LD: Limite de detección.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LDLR: Receptores de LDL.

LEBI: Laboratorio de Ensayos Biológicos.

LOX-1: *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*.

LPO: Ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica.

LQ: Limite de cuantificación.

MARCO: *Macrophage receptor with collagenous structure*.

MAPKs: *Mitogen-activated protein kinases*.

MEM: Medio esencial mínimo.

MHC: *Contexto mayor de histocompatibilidad*.

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*.

NAD⁺: Nicotianamina adenina dinucleótido, forma oxidada.

NADH: Nicotianamina adenina dinucleótido, forma reducida.

NADP⁺: Fosfato de nicotianamina adenina dinucleótido, forma oxidada.

NADPH: Fosfato de nicotianamina adenina dinucleótido, forma reducida.

NF-κB: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

NK: Células asesinas naturales.

NLRP3: *NLR family pyrin domain containing 3*.

NO[•]: Radical óxido nítrico.

NO₂[•]: Radical dióxido de nitrógeno.

NO₃⁻: Nitrato.

NOX: NADPH oxidasas.

NQO1: NAD(P)H: quinona oxidoreductasa.

NQO2: N-ribosildihidronicotinamida: quinona reductasa 2.
Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*.
•OH: Radical hidroxilo.
¹O₂: Oxígeno singlete.
O₂: Oxígeno molecular.
O₂^{•-}: Radical superóxido.
ONOO⁻: Peroxinitrito.
ONOOH: Ácido peroxinitroso.
ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.
p38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinases*.
PAH-20: Extracto de partes áreas de *I. hawkeri* secadas al horno a 70 °C (recolección: febrero de 2020).
PBS: Solución amortiguadora salina de fosfatos.
PC: Componente principal.
PCA: Análisis de componentes principales.
PEH-20: Extracto de plantas enteras de *I. hawkeri* secadas al horno a 70 °C (recolección: febrero de 2020).
PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*.
QE: Equivalentes de quercetina.
Raf: *rapidly accelerated fibrosarcoma kinase*.
RAGE: Receptor de AGE
REDOX: Reacciones de oxidorreducción.
Rf: Coeficiente de retención.
RFC: Reactivo de Folin-Ciocalteu.
RH-20: Extracto de raíces de *I. hawkeri* secadas al horno a 70 °C (recolección: febrero de 2020).
RNS: *Reactive nitrogen species*.
RO[•]: Radical alcoxilo.
ROO[•]: Radical peróxilo.

ROOH: Peróxidos orgánicos.

ROS: *Reactive oxygen species*.

RSA: Porcentaje de la actividad barredora del radical DPPH.

SCF: Sumatoria de compuestos fenólicos cuantificados mediante ensayos HPTLC.

SE. Solución de estándar o estándares.

SET: Transferencia de un electrón.

SLUG: *Neural crest transcription factor Slug*.

SMAD: *Mothers against decapentaplegic homolog*.

sMaf: *Small Maf*.

SNAIL: *Protein snail homolog*.

SOD: Superóxido dismutasa.

SR-AI: *Scavenger receptor class AI*.

SR-BI: *Scavenger receptor class B type I*.

SREC1: *Scavenger receptor expressed by endothelial cells 1*.

SR-PSOX: *Scavenger receptor for phosphatidylserine and ox-LDL*.

T_B: Nivel basal de TBARS del homogenizado de hígado de rata.

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TBHP: Hidroperóxido de *tert*-butilo.

T_C: Nivel de TBARS del control al 100 % de producción de TBARS en homogenizado de hígado de rata.

TE: Equivalentes de trolox.

TFC: Contenido de flavonoides totales.

TH-20: Extracto de tallos de *I. hawkeri* secadas al horno a 70 °C (recolección: febrero de 2020).

TLR: *Toll-like receptors*.

T_M: Nivel de TBARS obtenidos al tratar el homogenizado de hígado de rata con extracto o quercetina.

TMA: Cantidad de antocianinas monoméricas totales.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TPC: Contenido de compuestos fenólicos totales.

TWIST: *Twist-related protein*.

TXNIP: *Thioredoxin-interacting protein*.

UCI: Unidades de cuidados intensivos.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

UV: Ultravioleta.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

ZEB: *Zinc finger E-box-binding homeobox*.

ϵ : Constante de absortividad molar.

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo de TMA mediante el método colorimétrico de pH diferencial	43
Ecuación 2. Cálculo del área bajo la curva neta de los gráficos de decaimiento de la fluorescencia relativa	44
Ecuación 3. Fórmula para la determinación del valor ORAC de los extractos	44
Ecuación 4. Fórmula para la determinación del porcentaje de actividad secuestrante del radical DPPH de los extractos	46
Ecuación 5. Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición de la producción de TBARS en los homogenizados de hígado de rata sometidos a peroxidación lipídica	50
Ecuación 6. Fórmula para la determinación del porcentaje de viabilidad celular de las células Vero expuestas a los extractos o a la quercetina	53
Ecuación 7. Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición de la generación de ROS (IROS) a nivel intracelular en células Vero	55

1. Introducción:

1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) y el estrés oxidativo:

1.1.1. Principales fuentes de ROS y RNS:

Los términos ROS y RNS hacen referencia a especies químicas con átomos oxígeno y nitrógeno, respectivamente, las cuales pueden ser radicales libres o precursoras de este tipo de compuesto. Por su parte, un radical libre corresponde a entidades químicas que se caracterizan por la presencia de orbitales con electrones desapareados lo cual les confiere una alta reactividad química. La alta reactividad química de los radicales libres hace que los mismos puedan tener efectos deletéreos sobre macromoléculas en sistemas biológicos, incluyendo lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas. Entre los ROS más comunes en sistemas biológicos se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$), el oxígeno singlete (1O_2), peróxidos orgánicos ($ROOH$) y los radicales libres anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($RO\cdot$) y peroxilo ($ROO\cdot$). Por su parte, los RNS más importantes incluyen al peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido peroxinitroso ($ONOOH$) y a los radicales libres óxido nítrico ($NO\cdot$) y dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$) (1-3).

Las mitocondrias constituyen el principal sitio de producción de ROS a nivel celular, especialmente de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . La cadena respiratoria es un proceso responsable de la producción de ROS, entre 0,2 % y 2 % de la transferencia de electrones no sigue su ruta normal dirigida a la generación del gradiente de protones que promueve la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) mediante la fosforilación oxidativa, estos electrones reaccionan con oxígeno molecular (O_2) dando origen a la producción de $O_2^{\cdot-}$ que por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se convierte en H_2O_2 , esta última molécula es transformada a agua por la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) (1,4-6).

Existen otras fuentes de ROS y RNS, entre las que se encuentran el catabolismo de purinas y los procesos de degradación de D-aminoácidos y ácidos grasos los cuales tienen lugar en los peroxisomas (7). Además, los ROS y RNS son

compuestos que actúan como reguladores de la señalización celular e incluso son producidos como parte de la respuesta de células del sistema inmune ante patógenos contra los cuales actúan promoviendo su daño y degradación. Además, la exposición a agentes externos como los xenobióticos, la radiación ultravioleta, la energía ionizante, el humo del cigarrillo y los metales pesados representa un factor promotor de la formación de radicales libres en sistemas biológicos y con ello la posibilidad de desarrollar estrés oxidativo (8). En el cuadro I se resumen los principales factores endógenos generadores de ROS y RNS a nivel celular.

Cuadro I. Principales factores generadores de ROS y RNS a nivel celular.

Factor generador de ROS o RNS	Principales ROS y RNS producidos	Referencias
Cadena respiratoria	$O_2^{\cdot-}$	1,4,5
Xantina oxidasa	$O_2^{\cdot-}$	1
Deshidrogenasas de 2-oxoácidos	$O_2^{\cdot-}$	1,4
Monoamino oxidasas A y B	H_2O_2	1
Procesos de catabolismo en peroxisomas	$O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2	1,9
Óxido nítrico sintasas (NOS)	NO^{\cdot}	1,9,10
Reconocimiento de antígenos por el sistema inmune y reacción espontánea entre NO^{\cdot} y $O_2^{\cdot-}$	$ONOO^{\cdot}$ y $ONOOH$	11-15
Degradación de $ONOOH$: Espontánea o por acción peroxidadas y superóxido dismutasas dependientes de cobre y zinc	NO_2^{\cdot} , $^{\cdot}OH$ y NO_3^{\cdot}	11-15
Reacciones de Fenton y Haber-Weiss mediadas por el hierro liberado por la degradación de la ferritina en lisosomas	$^{\cdot}OH$	1,11,16-18

Cuadro I (continuación). Principales factores generadores de ROS y RNS a nivel celular.

Factor generador de ROS o RNS	Principales ROS y RNS producidos	Referencias
NADPH oxidasas (NOX)	$O_2^{\cdot-}$	1,19,20
Oxidasas duales (DUOX)	H_2O_2	1,19,20
Monooxigenasas del citocromo P450	$O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2	1,21
Mieloperoxidasas	HOCl	22
Cadena de transporte de electrones de lisosomas	$O_2^{\cdot-}$	17
Exposición de la piel a la radiación ultravioleta en presencia de agentes fotosensibilizantes en la piel (porfirina, bilirubina, flavinas, melanina, entre otros)	1O_2	23
Lipoxigenasas y ciclooxigenasas	$O_2^{\cdot-}$	1,24,25
Peroxidación lipídica	ROOH, ROO $^{\cdot}$	24,25
Reacciones de ROOH y ROO $^{\cdot}$ con trazas de metales de transición	RO $^{\cdot}$ y ROO $^{\cdot}$	24,25

1.1.2. Sistemas antioxidantes y definición de estrés oxidativo:

El organismo presenta una serie de sistemas enzimáticos y de vías de señalización que se activan como respuesta a incrementos en los niveles de ROS y RNS los cuales se enlistan en el cuadro II. Estos contribuyen a la homeostasis ante aumentos en dichas especies prooxidantes. Adicionalmente a los sistemas antioxidantes endógenos, existen factores externos que pueden contribuir a la estabilización de ROS

y RNS. Entre ellos se pueden mencionar a la vitamina C, a la vitamina E y a metabolitos secundarios de origen vegetal, como los compuestos fenólicos y los carotenoides, los cuales pueden ser obtenidos a través de la dieta. Dichos compuestos se caracterizan porque pueden reaccionar con los radicales libres fomentando su estabilización por mecanismos como la reducción por transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno (8,26,27).

Cuadro II. Principales sistemas antioxidantes endógenos.

Sistema	Mecanismo antioxidante	Referencias
Superóxido dismutasa (SOD)	Convierte a $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 .	28,29
Catalasa (CAT)	Convierte a H_2O_2 en O_2 y agua (H_2O).	28,29
Glutation peroxidasa (GPx)	Convierte a H_2O_2 en O_2 y H_2O . Reducción de peróxidos orgánicos.	28,29
Glutación reductasa (GR)	Convierte al glutatión oxidado a glutatión reducido, el cual participa como cosustrato en las reacciones catalizadas por GPx.	28,29
Glutarredoxinas	Reducen enlaces disulfuro de proteínas.	28,29
Tiorredoxinas	Reducen enlaces disulfuro de proteínas.	28,29
Tiorredoxina reductasa	Reducen a las tiorredoxinas oxidadas. La forma reducida de las tiorredoxinas es la que reacciona con enlaces disulfuro de proteínas.	28,29
Heme oxigenasas (HO)	Median la conversión de los grupos heme libres del citosol a biliverdina, monóxido de carbono, agua y a ion hierro II en su forma libre. Los grupos heme libre pueden participar en reacciones de Fenton y Haber-Weiss productoras de ROS.	28-30

Cuadro II (continuación). Principales sistemas antioxidantes endógenos.

Sistema	Mecanismo antioxidante	Referencias
Ferritina	Capturan iones de hierro limitando su participación en reacciones de Fenton y Haber-Weiss productoras de ROS.	31
NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1) y la N-ribosildihidronicotinamida: quinona reductasa 2 (NQO2)	Catalizan la conversión de quinonas a hidroquinonas mediante la transferencia de dos electrones sin que haya un radical semiquinona como intermediario, aspecto que las diferencian de otras enzimas, como las NADPH citocromo P450 reductasas o el citocromo b5 reductasa, que reducen quinonas por transferencias consecutivas de un solo electrón, dándose la formación de radicales semiquinona como intermediarios y la producción de ROS.	32
<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> (Nrf2)	La activación de la proteína Nrf2 por ROS y RNS hace que esta actúe como factor de transcripción y promueva la expresión de genes antioxidantes: SOD, HO-1, NQO1, GPx, GR, tiorredoxina, tiorredoxina peroxidasa, tiorredoxina reductasa, ferritina y glutamato cisteína ligasa.	11,33-38
<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> (AhR)	La activación de la proteína AhR hace que esta actúe como factor de transcripción y promueva la expresión de las proteínas Nrf2, NQO1 y enzimas del grupo del citocromo P450. El metabolismo oxidativo de enzimas del grupo del citocromo P450 produce ROS los cuales como mecanismo de retrocontrol activan la vía de la proteína Nrf2.	38,39

Por otra parte, cuando la actividad de las defensas antioxidantes endógenas y el aporte nutricional de sustancias con capacidad antioxidante no permiten mantener la homeostasis ante un incremento en la generación de ROS y RNS, se establece una condición conocida como estrés oxidativo. Esta condición puede deberse a la exposición a factores externos, o bien, puede presentarse como una consecuencia de procesos patológicos. Los niveles elevados de ROS y RNS tienen efectos deletéreos sobre la integridad de macromoléculas, lo cual a su vez puede tener impactos negativos para la salud, al punto de que el estrés oxidativo se relaciona con la incidencia y/o progresión de múltiples patologías entre las que encuentran: cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis, falla cardíaca, diabetes, procesos inflamatorios, entre otros (8,40).

1.1.3. Estrés oxidativo y su relación con patologías:

El estrés oxidativo puede ser un factor causante de inflamación. En macrófagos se ha observado que un incremento en la producción de ROS por parte de las mitocondrias promueve que las proteínas *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3), *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) y procaspasa 1 sean reclutadas por la membrana del retículo endoplasmático asociada a mitocondrias. A continuación, se da la asociación entre dichas proteínas, lo que da origen al inflamasoma NLRP3, en el cual la procaspasa 1 se convierte a caspasa 1. Esta última proteína tiene la actividad proteolítica del inflamasoma NLRP3 que convierte a las prointerleucinas 1 β y 18 a su forma activa, IL-1 β e IL-18. Ambas proteínas corresponden a conocidas citoquinas proinflamatorias (41,42).

La manera exacta de como los ROS promueven la asociación de proteínas para la conformación del inflamasoma NLRP3 es un tema de debate, se ha propuesto que los ROS pueden activar a proteínas como *rapidly accelerated fibrosarcoma kinase* (Raf), *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) y *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), cuyas vías de señalización estimulan el ensamblaje del complejo inflamasoma NLRP3. También se ha planteado que un incremento de especies prooxidantes a nivel intracelular estimula la disociación del complejo de la tiorredoxina 1 con la proteína

thioredoxin-interacting protein (TXNIP), esta última en su forma libre puede asociarse con la proteína NLRP3, evento que promueve la integración del inflamasoma NLRP3 (42).

La acumulación excesiva de hierro en el tejido hepático, como la que puede presentarse en hemocromatosis hereditarias o secundarias, favorece el desarrollo de lesiones oxidativas vinculadas con la producción de ROS a través de reacciones de Fenton y Haber-Weiss. En células de Kuffer, la elevación en la producción de ROS puede promover la activación de la proteína *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) y la consecuente expresión de citoquinas inflamatorias, entre las que se encuentran IL-6, IL-1 β y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Además, el exceso de hierro a nivel hepático es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular (43). Por otra parte, en modelos *in vivo* con ratones diabéticos, se ha observado que las dietas con hierro excesivo fomentan estrés oxidativo y la activación del inflamasoma NLRP3 a nivel hepático (44).

Los ROS y RNS son factores que pueden comprometer la integridad química del ácido desoxirribonucleico (ADN), sobre el cual pueden desencadenar reacciones de hidrólisis de bases nitrogenadas, oxidación de bases nitrogenadas, entrecruzamientos entre bases nitrogenadas y rotura de hebras de ADN (45). Las modificaciones del ADN producidas por reacciones oxidativas y/o radicalarias pueden promover mutagénesis, lo cual puede resultar en la transformación de células normales a células de cáncer (11,46). Inclusive, productos secundarios del daño oxidativo del ADN, poliaminas, aminoácidos, carbohidratos y lípidos, como las bases de propenal, el metilglioxal, la acroleína y el malondialdehído, pueden fungir como inductores de mutaciones al participar en reacciones de alquilación de bases nitrogenadas. Estas reacciones pueden tener como consecuencia la inducción de carcinogénesis (47-52).

Con respecto a la producción de ROS y RNS durante la progresión del cáncer y el desarrollo de metástasis, existe dualidad en sus efectos. Por ejemplo, un aumento de la producción de ROS por parte del sistema inmune puede tener efectos citotóxicos sobre las células de cáncer durante la progresión de la enfermedad, además, en algunos

tipos de cáncer, la exposición de células neoplásicas a niveles elevados de oxígeno puede inducir apoptosis (48). Inclusive, hay terapias farmacológicas y otras como la radioterapia que actúan mediante la inducción de estrés oxidativo en las células de cáncer (53). Además, hay resultados de estudios en modelos animales de progresión del cáncer que señalan que la administración de antioxidantes puede favorecer el desarrollo de metástasis (54).

Sin embargo, las especies oxidantes también pueden favorecer la progresión del cáncer. Se han planteado diferentes mecanismos que pueden explicar este fenómeno. Células del estroma asociado al tumor pueden producir citoquinas, factores de crecimiento y ROS que estimulan a las células de cáncer en fases iniciales de transformación (células precancerosas). Las citoquinas y factores de crecimiento, al ser reconocidos por sus receptores, pueden desencadenar mecanismos de transducción de señales que conducen a un aumento en la expresión de enzimas NOX, las cuales son reconocidas por su actividad generadora de ROS (48).

Los ROS producidas en el interior de las células precancerosas o provenientes de macrófagos asociados al tumor, pueden activar vías y proteínas de señalización que incluyen a Raf/MAPK, PI3K/proteína quinasa B (AKT)/*mammalian target of rapamycin* (mTOR), *mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD), NF- κ B e *hypoxia-inducible factors* (HIFs). Una de las consecuencias de activar dichos procesos de señalización es la expresión de genes que están implicados en la transición de célula epitelial a mesenquimal, evento que promueve la transición de una célula relativamente diferenciada a otra con un fenotipo mesenquimal con mayor potencial de migración, invasividad y de evasión de la apoptosis. Entre dichos genes se pueden mencionar a: *Protein snail homolog* (SNAIL), *Twist-related protein* (TWIST), *Neural crest transcription factor Slug* (SLUG) y *Zinc finger E-box-binding homeobox* (ZEB) (48,55,56)

Por otra parte, las células supresoras derivadas de línea mieloide, las cuales forman parte del estroma asociado al tumor, pueden producir ONOO⁻ el cual puede nitrar residuos de tirosina del receptor CD8 de linfocitos T citotóxicos. Esto evita el

reconocimiento de antígenos presentados en el contexto mayor de histocompatibilidad (MHC) por parte de los linfocitos T, lo que reduce su actividad citotóxica sobre las células de cáncer. El ONOO^- también puede nitrar e inactivar a quimiocinas como a *monocyte chemoattractant protein-1* (CCL-2), reduciendo con ello la migración de linfocitos T y células asesinas naturales (NK) hacia los focos de crecimiento tumoral (48).

Por la relevancia de los ROS y RNS como un factor que contribuye a la progresión del cáncer, se han realizado investigaciones para definir si agentes antioxidantes pueden contribuir a la eficacia de los tratamientos contra dicha enfermedad. Existen estudios en animales que demuestran que la combinación de fármacos antineoplásicos con agentes antioxidantes puede ser más eficaz que el tratamiento en el que solo se administran los fármacos antineoplásicos (57). Por lo tanto, se puede decir que los antioxidantes pueden fomentar o mitigar la progresión del cáncer, lo cual posiblemente este determinado por los eventos celulares y las características moleculares específicas de los diferentes tipos de célula de cáncer, de modo que no se puede establecer una generalización al respecto.

En condiciones de hiperglicemia, como la experimentada en la diabetes mellitus, puede tener lugar la autooxidación de la glucosa en la cual pueden producirse ROS. Además, el exceso de glucosa y de lípidos (como en el caso de las dislipidemias) favorece una mayor disponibilidad de NADH y FADH_2 a nivel celular en comparación con condiciones fisiológicas normales. En la mitocondria, el exceso de estos compuestos contribuye a la fuga de electrones a O_2 a nivel de la cadena de transporte de electrones dando origen a la producción de ROS, particularmente $\text{O}_2^{\cdot-}$. El incremento de los niveles de ROS activa a la proteína *AMP-activated protein kinase* (AMPK), esta proteína puede inhibir a mTOR, lo que tiene como consecuencia una reducción en la producción de insulina en las células pancreáticas β . Además, los ROS pueden activar al inflammasoma NLRP3 a través de una mayor expresión de TXNIP, produciendo daño en el tejido pancreático. Incluso, la elevación de ROS puede modular positivamente a la proteína *apoptosis signal-regulating kinase* (ASK1), que

por fosforilación activa las vías de p38 MAPK y c-Jun N-terminal kinase (JNK), capaces de inhibir a proteínas *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) antiapoptóticas y de activar proteínas Bcl-2 proapoptóticas, dando lugar al compromiso de la integridad membrana mitocondrial externa y la consecuente activación de la apoptosis. Estos cambios pueden fomentar una pérdida de las células pancreáticas β , lo cual contribuye a la progresión de la diabetes mellitus (58-60).

Por otra parte, el glioxal, el metilglioxal y la 3-desoxiglucosona, producidos por la autooxidación de la glucosa en condiciones de hiperglicemia, pueden formar productos finales de glicación avanzada (AGE), los cuales consisten en la modificación covalente de proteínas y lípidos con compromiso en sus funciones biológicas. Este fenómeno está relacionado con el desarrollo de neuropatía, retinopatía y nefropatía durante la progresión de la diabetes mellitus (58,61).

En circunstancias de niveles plasmáticos elevados de lipoproteínas que contienen apoproteína B, como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), estas sustancias son captadas por las células endoteliales debido a su reconocimiento por los receptores de LDL (LDLR) (en barrera hematoencefálica) o por la proteína *scavenger receptor class B type I* (SR-BI), posteriormente, los receptores LDLR o las proteínas caveolina 1 y *activin receptor-like kinase 1* (ALK1) median la transcitosis de las lipoproteínas a lo interno de la túnica íntima de vasos sanguíneos (62).

En el espacio subendotelial, las lipoproteínas pueden ser retenidas por su afinidad por proteoglicanos de la matriz extracelular. Los ROS y RNS producidos por la presencia de trazas de iones de hierro II, por la actividad de enzimas oxidativas, como lipoxigenasas y mieloperoxidasas, o por células de endotelio, músculo liso y del sistema inmune, promueven la oxidación de las lipoproteínas, las cuales pueden agregarse y cristalizar (63). Las lipoproteínas oxidadas son captadas por macrófagos a través de su reconocimiento por diversas proteínas, entre las que se encuentran *scavenger receptor class A1* (SR-A1), *macrophage receptor with collagenous structure* (MARCO), *cluster of differentiation 36* (CD36), SR-B1, *lectin-like oxidized low-*

density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), *Scavenger receptor expressed by endothelial cells 1* (SREC1) y *scavenger receptor for phosphatidylserine and ox-LDL* (SR-PSOX) (64,65).

Los macrófagos procesan a las lipoproteínas que han captado en los lisosomas, formando ácidos grasos y colesterol libres. En el retículo endoplásmico, el colesterol libre es reesterificado por la *acetyl-coenzyme A: acetyltransferase 1* (ACAT1), sin embargo, el exceso de colesterol provoca que este proceso no se complete, quedando colesterol remanente no esterificado, el cual cristaliza dando origen a las “células espumosas” que pueden entrar en necrosis producto del colesterol no esterificado. Por otra parte, los macrófagos producen citoquinas como TNF- α , IL-1 β e IL-18 debido al reconocimiento de las lipoproteínas oxidadas por parte de *Toll-like receptors* (TLRs) y la activación del inflammasoma NLRP3. Adicionalmente, las citoquinas pueden promover el reclutamiento de otras células de la inmunidad innata, como neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y mastocitos (64,66).

La inflamación crónica y el aclaramiento deficiente de las células necróticas dan origen a la placa arteriosclerótica. Además, las lipoproteínas alteradas pueden ser presentadas por células presentadoras de antígenos a linfocitos CD4, lo cual estimula a células de la inmunidad adquirida. Las células inmunes reclutadas en la placa arteriosclerótica secretan proteasas que comprometen la integridad local de la matriz extracelular y del colágeno de la túnica íntima, esto sumado al crecimiento de los depósitos lipídicos en forma de células espumosas, puede favorecer la ruptura de vasos sanguíneos, lo cual puede desencadenar el desarrollo de tromboembolismo, factor promotor de accidentes cerebrovasculares y de infartos agudos al miocardio (64,66).

Otra enfermedad cardiovascular en la que el estrés oxidativo tiene injerencia es la falla cardíaca. Los niveles excesivos de ROS y RNS en los cardiomiocitos puede inducir su apoptosis a través de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). Modelos *knockout* en ratones demuestran que la no expresión de SOD favorece la degeneración de los cardiomiocitos y la dilatación ventricular. Por otra parte, en ratones transgénicos con sobreexpresión de GPx se ha observado que la

inducción de infartos al miocardio promueve una menor dilatación del ventrículo izquierdo, un menor decaimiento de la presión diastólica y una menor incidencia de hipertrofia cardiaca, apoptosis y fibrosis intersticial en comparación con ratones normales o de tipo silvestre (67,68).

El estrés oxidativo también está relacionado con la cardiotoxicidad y desarrollo de falla cardiaca por exposición a xenobióticos prooxidantes como la doxorrubicina. La producción de ROS inducida con doxorrubicina puede promover la peroxidación de lípidos de la membrana de cardiomiocitos, comprometiendo a su vez la actividad de las proteínas de membrana. La actividad de la proteína *transcription factor GATA-4* (GATA4) se ve disminuida en condiciones de estrés oxidativo inducido con doxorrubicina, lo cual se asocia al deterioramiento de las miofibrillas y una reducción de la fuerza de contracción del musculo cardiaco. Además, las especies oxidantes pueden promover la apoptosis a través de la activación de la proteína p53 y de las vías de las proteínas p38 MAPK y JNK (67,69).

El estrés oxidativo está involucrado en la progresión de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. El péptido β -amiloide ($A\beta$) puede acumularse en las mitocondrias mediante la acción de la translocasa de la membrana externa o del receptor de AGE (RAGE), sitio donde puede comprometer el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y con ello inducir la producción de ROS. Además, la presencia de $A\beta$ a nivel mitocondrial se relaciona con una disminución en la actividad de SOD. Por otro parte, en los depósitos o placas de $A\beta$ se ha determinado la presencia de iones de hierro y cobre los cuales pueden participar en reacciones de Fenton y Haber-Weiss generadoras de ROS. Adicionalmente, las células gliales pueden reconocer a $A\beta$ y desencadenar una reacción inflamatoria con la producción de ROS y RNS. La inflamación puede tornarse más severa debido a la capacidad de los ROS y RNS de activar al inflamasoma NLRP3 (70,71).

Se ha observado que bajo condiciones de estrés oxidativo se da una mayor expresión de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, cuya actividad proteolítica sobre la

proteína precursora amiloide (APP) genera A β . Por otro lado, los ROS pueden activar a *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), el cual es un factor de transcripción que promueve la expresión de γ -secretasa. Tanto A β como los ROS y RNS son factores con la capacidad de inducir apoptosis a nivel neuronal (71-73).

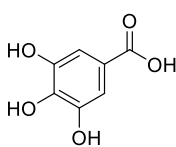
El estrés oxidativo también se ha relacionado con el desarrollo y progresión de la enfermedad de Parkinson. La dopamina es una molécula inestable que puede autooxidarse formando una quinona y ROS. Este proceso puede ser facilitado por la presencia de trazas de metales de transición y la acción de enzimas como la tirosinasa. Esto provoca que las neuronas dopaminérgicas, como las presentes en la *substantia nigra*, sean más susceptible al desarrollo de estrés oxidativo con la posibilidad de que el daño inducido por las especies oxidantes promueva la apoptosis de estas células. Además, las neuronas que presentan estrés oxidativo pueden secretar productos del daño oxidativo de proteínas y lípidos, los cuales pueden estimular a la microglía. Estas células como respuesta pueden secretar NO \cdot , lo cual puede fomentar mayor estrés oxidativo y neurotoxicidad (74,75).

El estrés oxidativo promueve la peroxidación lípidos de las membranas de las neuronas, entre los productos de este proceso se encuentran el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales pueden dañar la integridad de proteínas y del ADN, promoviendo con ello la apoptosis de las neuronas. La implicación de estos eventos en la progresión de la enfermedad de Parkinson ha sido propuesta con base a la observación *post mortem* de una mayor cantidad de productos de la peroxidación lipídica en la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson. Además, se ha planteado que la disfunción mitocondrial y la consecuente producción de ROS están relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Esto se ha basado en el parkinsonismo observado en animales experimentales y en pacientes expuestos a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una toxina capaz de inhibir al complejo mitocondrial I (74,76,77).

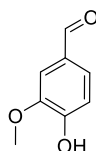
1.2. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos de origen vegetal:

Los compuestos fenólicos de origen vegetal son un conjunto muy heterogéneo de metabolitos secundarios, tanto por sus diferencias estructurales como por su origen biosintético. En la figura 1 se presentan ejemplos de compuestos pertenecientes a las diferentes categorías estructurales que presentan los compuestos fenólicos de origen vegetal. Adicionalmente a los compuestos no glicosídicos mostrados en la figura 1, en la naturaleza también es posible encontrar compuestos fenólicos con unidades de azúcar en su estructura formando glicósidos. Los compuestos fenólicos se pueden extraer de material vegetal principalmente mediante el uso de solventes orgánicos polares, como el metanol, etanol, acetona y acetato de etilo (26).

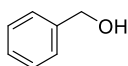
Bencenoides:



Ácido
Ácido gálico

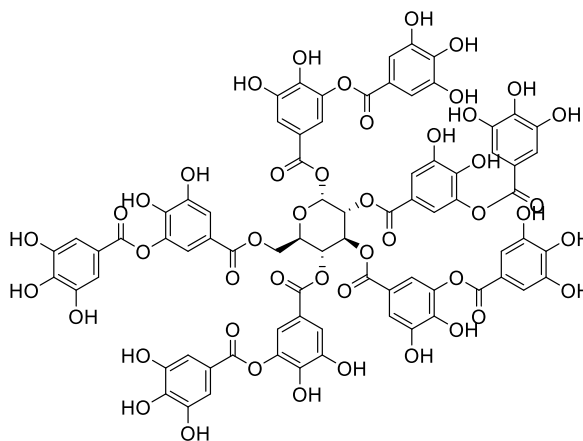


Aldehído
Vainillina

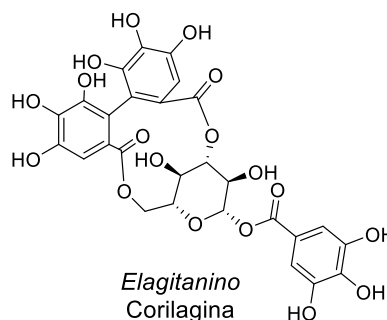


Alcohol
Alcohol bencílico

Taninos hidrolizables:



Galotanino
Ácido tánico



Elagitanino
Corilagina

Figura 1. Estructura química de ejemplos de los principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal. En *itálica* se indica el nombre de la subclasificación.

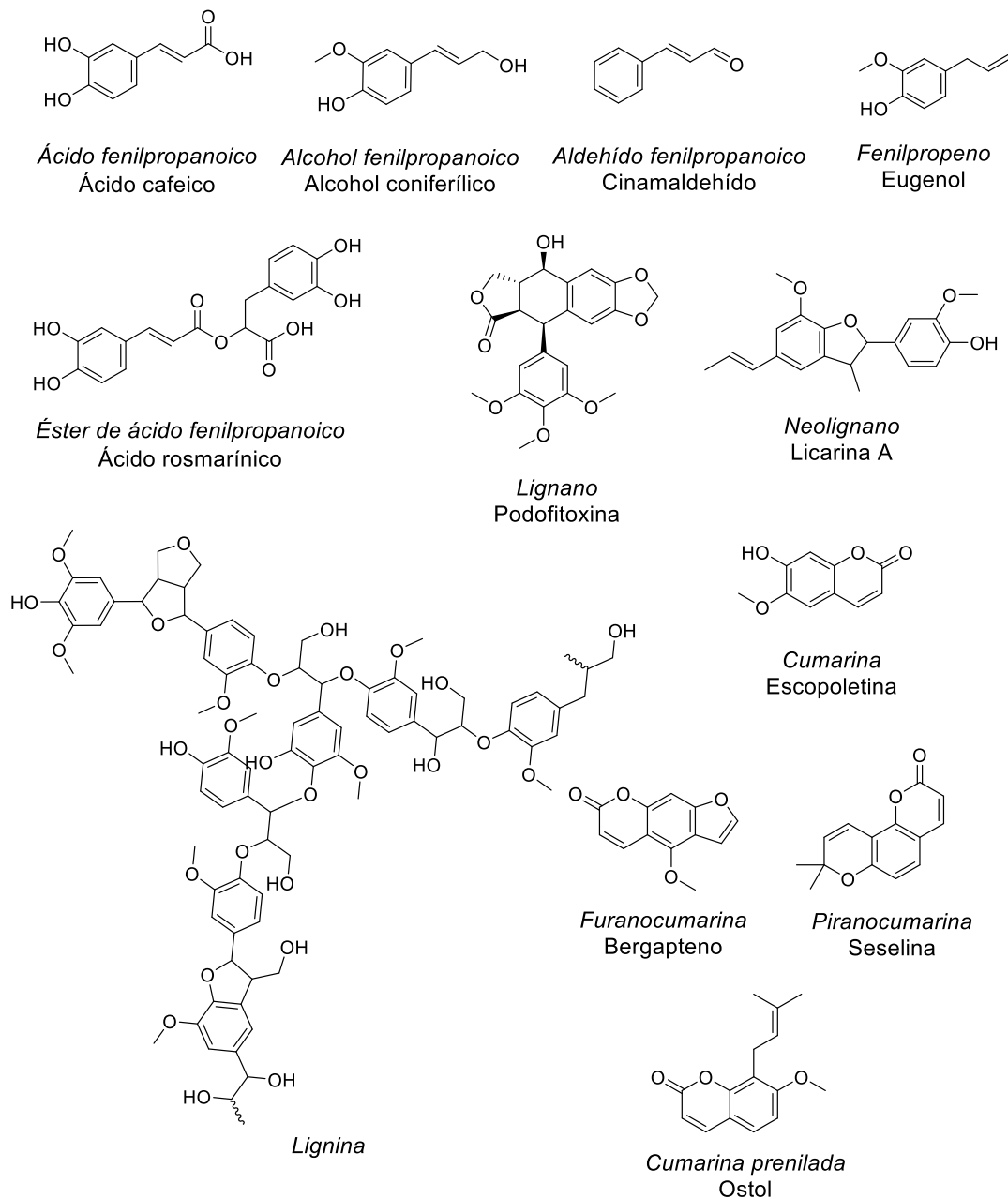
Fenilpropanoides:

Figura 1 (continuación). Estructura química de ejemplos de los principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal. En itálica se indica el nombre de la subclasificación.

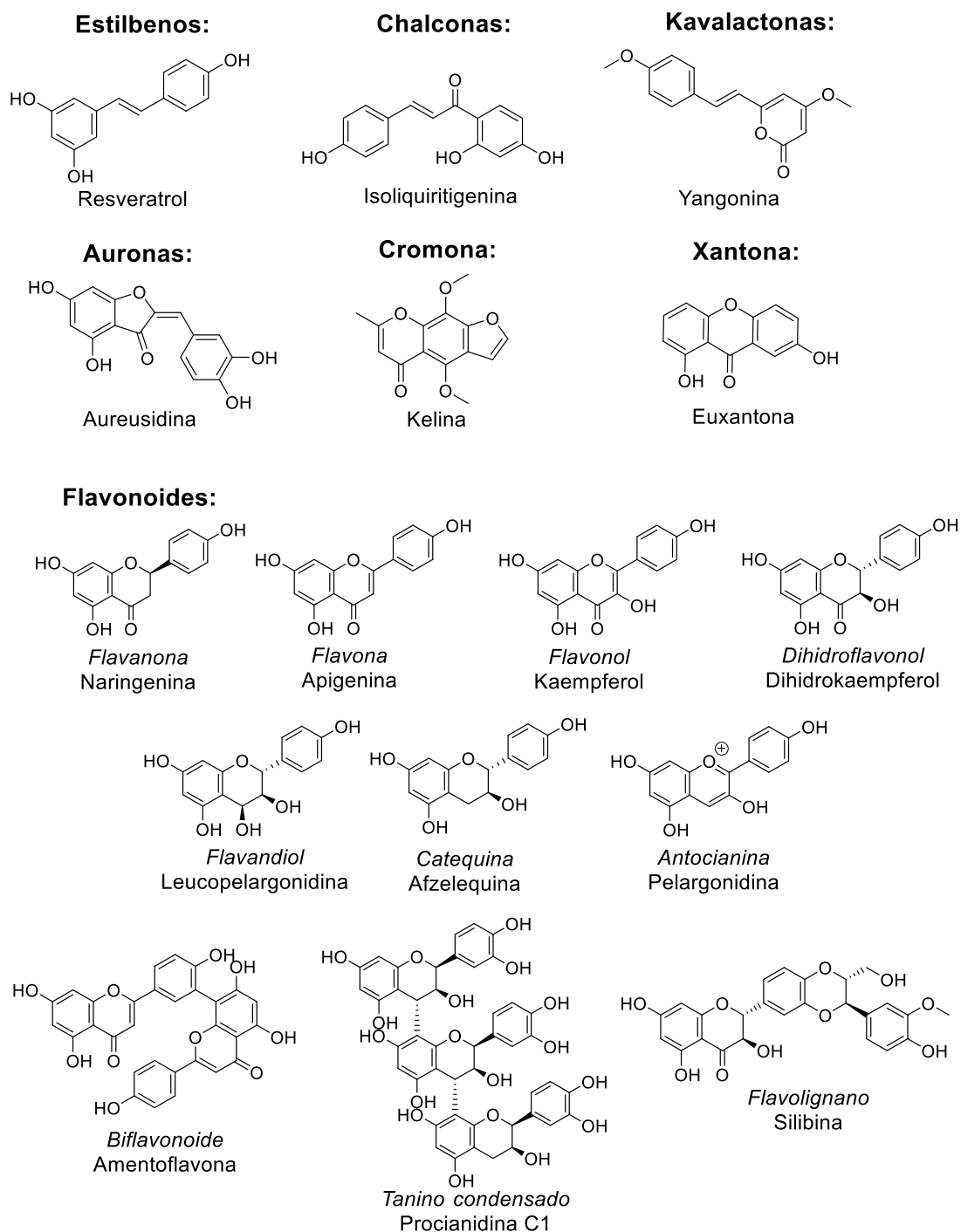
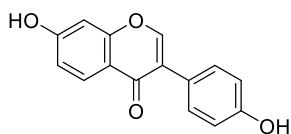
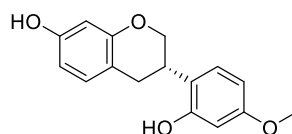


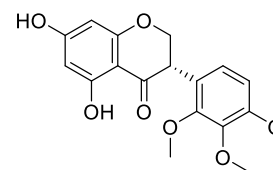
Figura 1 (continuación). Estructura química de ejemplos de los principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal. En *itálica* se indica el nombre de la subclasificación.

Isoflavonoides:

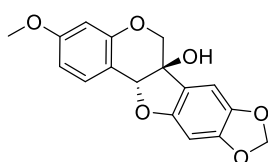
Isoflavona
Daizeína



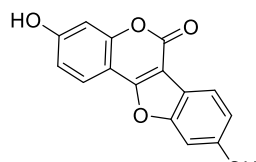
Isoflavano
Vestitol



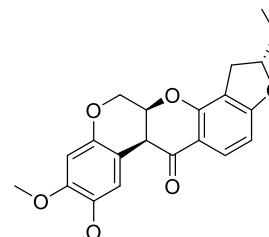
Isoflavanona
5,7-dihidroxi-2',3',4'-trimetoxi-
isoflavanona



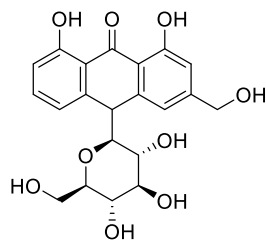
Pterocarpano
Pisatina



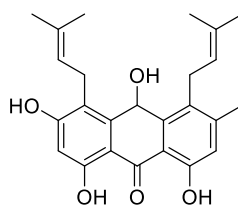
Cumestano
Cumestrol



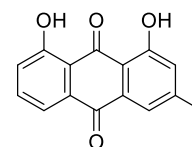
Rotenoide
Rotenona

Compuestos antracénicos:

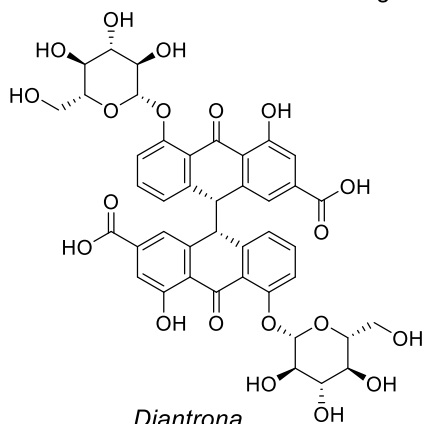
Antrona
Aloína A



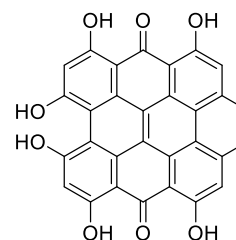
Oxantrona
Kengantranol A



Antraquinona
Crisofanol



Diantrona
Senósido A



Naftodiantrona
Hipericina

Figura 1 (continuación). Estructura química de ejemplos de los principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal. En itálica se indica el nombre de la subclasificación.

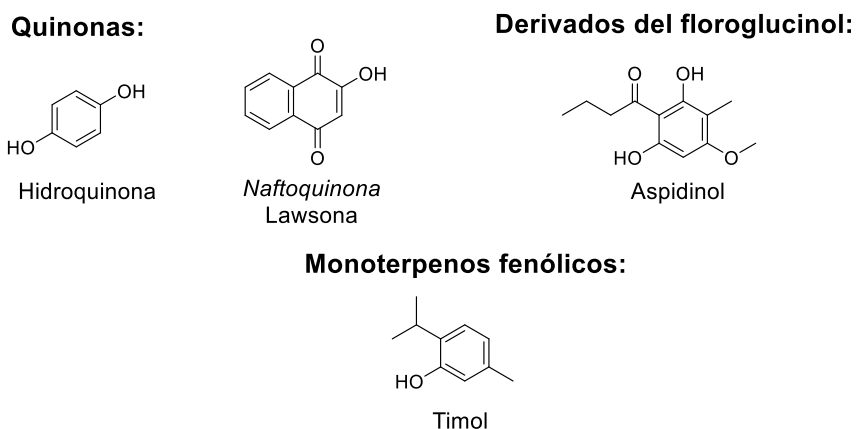


Figura 1 (continuación). Estructura química de ejemplos de los principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal.

Los compuestos fenólicos se caracterizan porque pueden presentar actividad antioxidante a través de diferentes mecanismos químicos y biológicos (activación de vías de señalización antioxidantes). Entre los mecanismos químicos de actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, se encuentran la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), la transferencia de un electrón (SET) y la actividad quelante sobre iones de metales de transición. En la figura 2, se ilustran estos mecanismos de actividad antioxidante (26,78-79).

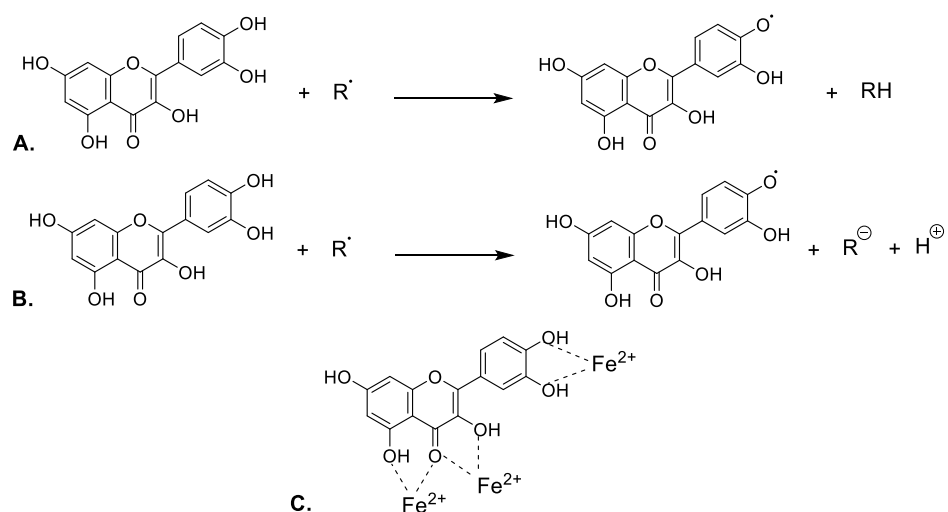


Figura 2. Esquema de los mecanismos químicos de actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. A. Mecanismo HAT, B. Mecanismo SET, C. Mecanismo por acción quelante. R[•]: radical libre.

En el mecanismo HAT, los compuestos fenólicos transfieren un átomo de hidrógeno a los radicales libres, lo cual convierte a estos últimos en una especie más estable debido a la formación de un enlace simple por el aporte de un electrón del átomo de hidrógeno y el electrón desapareado del radical. En el mecanismo SET, el compuesto fenólico transfiere directamente un electrón, reduciendo al radical a un anión. Tanto en el mecanismo HAT como SET se da la formación de radicales fenilos, los cuales, gracias a su resonancia, son más estables en comparación con radicales libres correspondientes a ROS y RNS. Adicionalmente, los radicales fenilos pueden ser estabilizados a través de reacciones de acople oxidativo o radicalario en las cuales se forman compuestos fenólicos diméricos. En el caso de la actividad quelante, su relevancia antioxidante radica en el hecho de que los complejos formados entre iones de metales de transición, como el ion hierro II o ion ferroso, con los compuestos fenólicos limitan la disponibilidad de los primeros, reduciendo la posibilidad de que participen en reacciones de Fenton y Haber-Weiss generadoras de ROS (26,78-80).

Con respecto a los mecanismos biológicos, diferentes compuestos fenólicos pueden activar vías de señalización relevantes que median la expresión de factores antioxidantes endógenos. Por ejemplo, los compuestos quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, escopoletina y 2-metoxi-1,4-naftoquinona (2-MNQ) pueden activar la vía de la proteína Nrf2 (34,81-84), mientras que los compuestos quercetina y lawsona son capaces de modular positivamente a la vía de la proteína AhR (85-87).

1.3. Infecciones bacterianas y la necesidad de nuevos agentes antibacterianos:

Los fármacos antibacterianos han tenido una alta relevancia para el progreso de la medicina, haciendo posible el tratamiento de enfermedades infecciosas y minimizando los riesgos de desarrollo de infecciones producto de intervenciones quirúrgicas, traumatismos y cuadros de inmunosupresión relacionados a trastornos del sistema inmune o como consecuencia de tratamientos para evitar el rechazo de órganos trasplantados y de terapias contra el cáncer (88,89).

Producto de las malas prácticas en el uso de los antibióticos durante décadas, actualmente se observa un incremento de cepas bacterianas con factores de resistencia o con características de tolerancia o persistencia ante el tratamiento con antibióticos. El uso inadecuado de los antibióticos ha provocado que ejerzan un papel como factores de presión selectiva que fomenta la proliferación de aquellas poblaciones bacterianas con características que facilitan su sobrevivencia (89-92).

Las infecciones bacterianas son un problema creciente para la salud pública. Estas pueden complicar la salud de los pacientes hospitalizados, haciendo más difícil su recuperación, lo que en primera instancia afecta la salud de los pacientes, pero a su vez implica un mayor costo para los sistemas de atención sanitaria (93). Un ejemplo reciente de esto es el incremento del tiempo de recuperación y el mayor riesgo de muerte debido a infecciones bacterianas secundarias observado en pacientes hospitalizados con enfermedad por coronavirus (COVID-19) (94,95). Sin embargo, las infecciones debidas a bacterias patógenas con multirresistencia a los antibióticos no se limitan al contexto hospitalario, siendo posible su propagación a nivel comunitario con una alta tasa de mortalidad en ambos casos (96). Incluso, se ha proyectado que para el año 2050 se puedan dar alrededor de 10 millones de muertes anuales debidas a infecciones bacterianas (97).

Dado el impacto de las infecciones bacterianas en la salud pública, la Organización Mundial de la Salud ha definido una serie de microorganismos cuyas infecciones requieren el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos de manera prioritaria, dado la creciente ineficacia de los agentes terapéuticos disponibles actualmente a nivel clínico. Entre dichos microorganismos se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias resistentes a β -láctamicos portadoras de carbapenemasas, contra las cuales se considera crítico el desarrollo de nuevos antimicrobianos. En el caso de *Salmonella spp.* resistente a fluoroquinolonas y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina o a vancomicina, estas bacterias se reconocen como de prioridad alta para el descubrimiento de antibacterianos que sean capaces de contrarlar sus infecciones (98).

De acuerdo con estadísticas de los Estados Unidos, *P. aeruginosa* presenta una prevalencia de entre 7,1 % y 7,3 % de las infecciones adquiridas en centros de salud, siendo la neumonía la principal forma de infección por este microorganismo. Con respecto a las infecciones respiratorias adquiridas en unidades de cuidados intensivos (UCI), *P. aeruginosa* presenta una prevalencia del 23 %. El principal factor que promueve este tipo de infecciones en pacientes de UCI son los dispositivos de ventilación mecánica. Se estima que la mortalidad asociada a estas infecciones es de entre el 32 % y 44 %. *P. aeruginosa* también es uno de los principales patógenos responsables de infecciones del tracto urinario asociadas al uso de catéteres, se estima que un 10 % de los casos de infección del tracto urinario en pacientes hospitalizados se debe a *P. aeruginosa*. Según el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), *P. aeruginosa* es responsable del 5,7 % de las infecciones en sitios quirúrgicos. También se ha determinado que *P. aeruginosa* constituye al microorganismo con mayor prevalencia en infecciones de lesiones debidas a quemaduras. Además, esta bacteria es una causa predominante de las complicaciones asociadas al padecimiento de fibrosis quística, entre las que se encuentran infecciones respiratorias crónicas y bronquiectasias. La septicemia por *P. aeruginosa* presenta una tasa de mortalidad estimada de entre el 43,3 % y el 58,8 % de los casos (99).

P. aeruginosa puede presentar factores de resistencia a los antibióticos, como bombas de eflujo, carbapenemasas, β -lactamasas de espectro extendido y enzimas de modificación de aminoglicósidos. Además, este patógeno puede producir biopelículas, las cuales están constituidas por células bacterianas agregadas e inmersas en una matriz extracelular de exopolisacáridos, proteínas, metabolitos y ADN extracelular que limita el contacto entre las bacterias y los antibióticos. Como consecuencia, las probabilidades de sobrevivencia del microorganismo aumentan a pesar de la presencia de antibióticos en su entorno, incluso, para ello no es necesario la expresión de factores de resistencia específicos como los mencionados anteriormente (100).

En Estados Unidos se ha determinado que el principal tipo de infección ocasionada por *Escherichia coli* en pacientes atendidos a nivel hospitalario

corresponde a infecciones del tracto urinario (66 %) seguido por bacteriemia (22 %) (101). Los casos de bacteriemia por *E. coli* suelen estar asociados a infecciones del tracto urinario en un 53 % de los casos y presentan un porcentaje de mortalidad del 12 % (102). De manera similar a *P. aeruginosa* y a otras enterobacterias, *E. coli* puede expresar el mismo tipo de factores de resistencia a los antibióticos (103). Las enzimas metalo- β -lactamasas de Nueva Delhi se encuentran entre las carbapenemasas halladas con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* con resistencia a fármacos β -lactámicos (104). Vale la pena destacar que en el año 2019 *E. coli* fue el patógeno de mayor prevalencia entre los casos de mortalidad debida a infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos (97).

Klebsiella pneumoniae corresponde a otra enterobacteria de alta relevancia epidemiológica, sobre todo por la alta mortalidad debida a bacteriemia e infecciones del tracto urinario en pacientes de UCI o que han recibido trasplantes de órganos. Se estima que la mortalidad es de alrededor del 42 % en el caso de infecciones por cepas portadoras de carbapenemasas y del 21 % cuando las cepas son sensibles a carbapenemos (105). Según estadísticas de Estados Unidos, se estima que *K. pneumoniae* es responsable de cerca del 10 % de las infecciones nosocomiales, la tasa de mortalidad por neumonía adquirida a nivel intrahospitalario debida a este patógeno se estima en un 50 % (106).

En el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, este patógeno suele producir infecciones a nivel gastrointestinal debidas a la ingesta de alimentos contaminados, que en la mayoría de los casos corresponden a cuadros de diarrea autolimitante. Esta serovariedad es responsable de alrededor del 12 % de las infecciones debidas a *Salmonella* a nivel mundial, sin embargo, en África y Norteamérica puede alcanzar una prevalencia del 25 % y 29 %, respectivamente. La salmonelosis por serovariedades no Typhi representa la principal causa de muerte debida a infecciones adquiridas a través del consumo de alimentos contaminados en los Estados Unidos, representando alrededor del 39 % de dichas muertes (107). Además, en países en vías de desarrollo, principalmente en África, se ha observado

aumentos en la incidencia de septicemia por salmonela no Typhi con una alta tasa de mortalidad (107,108).

S. aureus es un patógeno Gram-positivo que puede participar en infecciones en múltiples sitios anatómicos, entre las infecciones más comunes que puede provocar se encuentran infecciones del tracto respiratorio (tanto inferior como superior), infecciones de piel y tejidos blandos y endocarditis. La bacteriemia es una complicación que se presenta con mayor incidencia en el caso infecciones de piel y tejidos blandos, entre el 9,4 al 34 % de los casos de bacteriemia por *S. aureus* a nivel mundial se derivan de este tipo de infección. De acuerdo con los resultados de diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintos países, la bacteriemia por *S. aureus* presenta una incidencia que varía entre 2,6 y 65 casos por cada 100 000 habitantes (109). El porcentaje mortalidad estimado para este tipo de cuadro infeccioso es de entre el 10 % y el 30 % (110). Uno de los factores que promueve mayor mortalidad por bacteriemia por *S. aureus* es la resistencia a los antibióticos, siendo principalmente relevantes las cepas con resistencia a meticilina y a vancomicina (111,112). Además, el desarrollo de biopelículas constituye otro elemento que complica el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (113,114).

Otros microorganismos patógenos que han ganado relevancia debido al impacto de sus infecciones son *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis*. En el caso de *S. epidermidis*, este microorganismo es una causa común de infecciones intrahospitalarias del torrente sanguíneo asociadas con el uso de catéteres e implantes ortopédicos, así como endocarditis asociada a válvulas cardíacas protésicas y marcapasos (115,116). De acuerdo con un estudio retrospectivo observacional llevado a cabo en Albania, el 22 % de las infecciones asociadas a catéteres se deben a *S. epidermidis*, siendo el principal agente etiológico de dichas infecciones (117).

E. faecalis corresponde a un microorganismo importante debido a la incidencia de infecciones nosocomiales relacionadas principalmente a procedimientos invasivos como la colocación de catéteres. Entre las infecciones que provoca este patógeno se encuentran septicemia, endocarditis, infecciones intraabdominales e

infecciones urinarias (118,119). De acuerdo con un estudio de casos y controles llevado a cabo en Detroit Medical Center de la ciudad de Michigan, el porcentaje de mortalidad en pacientes hospitalizados con bacteriemia por *E. faecalis* es de 9,8 % y 7,4 %, en casos de cepas resistentes y no resistentes a vancomicina, respectivamente (120).

Actualmente es imperativo el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos resistentes a los medicamentos disponibles para uso clínico (96,121,122). Aspecto que gana relevancia si se considera que la velocidad con la que se desarrollan nuevos fármacos antibacterianos es inadecuada dada la rapidez del proceso de desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de microorganismos infecciosos (122,123). Esto puede ser explicado por el hecho de que el desarrollo de fármacos antibacterianos seguros y eficaces es un proceso lento debido a la necesidad de que estos demuestren un amplio espectro de actividad sobre bacterias patógenas relevantes desde el punto de vista epidemiológico, así como una baja toxicidad para el ser humano (124).

El descenso en la eficiencia de las terapias antibacterianas actuales y la escasez de nuevos tipos de moléculas capaces de sustituir o complementar sus terapias, son factores que han promovido un mayor impulso de la investigación para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. Inclusive, esta línea de investigación se considera como uno de los principales retos para las disciplinas involucradas en el desarrollo de nuevos fármacos durante el presente siglo (125).

En el cuadro III, se presenta un resumen de las principales infecciones provocadas por las especies de bacterias patógenas sobre las cuales se sometió a prueba la actividad antibacteriana de los extractos *I. hawkeri* en el presente estudio. Los antecedentes aportados anteriormente demuestran que es relevante el proceder con la investigación para el descubrimiento de posibles fuentes de moléculas bioactivas que sean útiles para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de infecciones debidas a dichos microorganismos.

Cuadro III. Principales infecciones provocadas por las especies de bacterias patógenas sobre las que se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos de *I. hawkeri*.

Especie bacteriana	Principales infecciones	Referencias
<i>Enterococcus faecalis</i>	Infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales, endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia.	118,119,126
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea aguda o crónica, diarrea enterohemorrágica, infecciones del tracto urinario, meningitis, bacteriemia.	127
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, meningitis, bacteriemia.	128-130
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia.	99
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Diarrea.	131
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones del tracto respiratorio superior, neumonía, endocarditis, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, meningitis, bacteriemia.	109,132-135
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia.	115,136

1.4. Las plantas como fuente de moléculas antibacterianas:

Existen varias estrategias utilizadas para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibacterianos, entre ellas se encuentra la modificación estructural fármacos aprobados (137). Sin embargo, los productos naturales son la fuente más importante de moléculas con actividad antimicrobiana, superando en número a los de origen completamente sintético (138). Alrededor de un 65 % de los fármacos aprobados como antibacterianos son productos naturales o derivados semisintéticos de estos (139). Los productos naturales más relevantes en el desarrollo de agentes antibacterianos han sido los metabolitos secundarios sintetizados por bacterias y microorganismos fúngicos (137,140,141). El mejor perfil de actividad de los productos naturales sobre las sustancias sintéticas puede estar relacionado con que estas últimas pueden tener limitaciones para permear las membranas bacterianas, mientras las moléculas bioactivas de origen natural corresponden a compuestos evolutivamente seleccionados para permear las membranas de los microorganismos (138).

El aislamiento y purificación de compuestos naturales activos contra microorganismos puede tener obstáculos como una baja producción por parte de los organismos que los sintetizan, el riesgo de que estos pierdan la capacidad de sintetizarlos, la inestabilidad química y una baja eficacia clínica (137). Sin embargo, esta última limitante podría solucionarse a través de la modificación de su estructura química para producir moléculas con un mejor perfil actividad y de espectro antibacteriano (139).

Considerando la importancia de desarrollar nuevos agentes antibacterianos por la relevancia que ha ganado la resistencia a los antibióticos, se ha considerado la posibilidad de explorar otras fuentes naturales de moléculas bioactivas alternativas a los microorganismos, los cuales han sido el origen más común de agentes antibacterianos. Entre estas fuentes se han considerado las plantas como un recurso que puede ser explorado (142-144). Inclusive, se ha planteado la posibilidad de que las moléculas derivadas de plantas puedan actuar en sinergia con los fármacos

antimicrobianos, de modo que bacterias resistentes a estos puedan ser nuevamente susceptibles (144,145).

Entre los productos naturales derivados de plantas, los compuestos fenólicos han sido reconocidos como metabolitos con capacidad inhibir la proliferación bacteriana a través de diversos mecanismos. Los flavonoides, como el galato de epigallocatequina, y los taninos pueden unirse al peptidoglicano y comprometer la integridad de la pared celular. Se ha planteado que las antocianinas se pueden asociar con alta afinidad con los lipopolisacáridos de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, lo cual reduce la posibilidad de que estas colonicen nuevos tejidos al limitar la adhesión de las bacterias con las células del huésped. Los flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos y monoterpenos fenólicos pueden unirse a la membrana celular bacteriana alterando su integridad y haciéndola más permeable (146,147).

El metabolismo bacteriano de compuestos fenólicos como el ácido gálico, el ácido rosmarínico, la quercetina, la epigallocatequina y el galato de epigallocatequina puede generar H_2O_2 como subproducto, lo cual puede inducir muerte por estrés oxidativo en las células bacterianas. Además, los compuestos fenólicos pueden inhibir enzimas bacterianas, como es el caso de la inhibición de la dihidrofolato reductasa por parte del galato de epigallocatequina y de la ADN girasa por flavonoides como la quercetina. Flavonas, como la miricetina, pueden inhibir a las enzimas helicasas. A nivel intracelular, los ácidos fenólicos pueden inducir reducciones del pH lo cual puede promover la desnaturalización de proteínas microbianas. El ácido *p*-cumárico puede unirse al ADN bacteriano induciendo cambios en su organización estructural con los que se compromete el metabolismo de ácido nucleicos. Los taninos pueden actuar como agentes quelantes del hierro, limitando la disponibilidad de este importante cofactor enzimático para las células bacterianas (148).

Los compuestos fenólicos derivados de plantas con actividad antibacteriana han servido de base en la investigación para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Por ejemplo, el compuesto 3',4'-difluoroquercetina, un derivado semisintético de la quercetina, tiene actividad frente a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a

carbapenemasas, inclusive, ha demostrado sinergia en combinación con ceftazidima en modelos de infección murinos (149). A partir de los monoterpenos fenólicos timol, carvacrol, guayacol y eugenol se han derivado moléculas semisintéticas con una mejoría en su perfil antibacteriano en comparación con los compuestos naturales de partida (150).

2. Justificación:

Dada la relevancia del estrés oxidativo como una condición promotora de diferentes enfermedades, así como el impacto de las infecciones bacterianas en la salud pública, se propone la investigación para determinar el potencial antioxidante y antibacteriano *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos producidos a partir de *I. hawkeri*. Esto ante el descubrimiento de extractos y metabolitos con dichas actividades en otras plantas del género *Impatiens* y a la amplia explotación agrícola de *I. hawkeri*. Vale la pena destacar que estudios preliminares han demostrado que la actividad antioxidante y antibacteriana para extractos de planta entera de *I. hawkeri* cultivada en territorio costarricense presenta diferencias en sus propiedades en comparación con plantas del mismo género cultivadas en otras latitudes, posiblemente por diferencias de especie y de condiciones ambientales y agronómicas. Lo cual respalda la relevancia de estudiar la actividad de extractos de plantas de este género cultivadas en Costa Rica.

La actividad biológica de los extractos derivados de plantas puede variar en función de la parte anatómica de la planta utilizada para su producción, por lo que los extractos, que se propone estudiar serán elaborados a partir de toda la planta, las partes aéreas (hojas, flores y tallos en conjunto), la raíz, las hojas y el tallo. En primera instancia no se plantea la investigación de flores o frutos aislados por ser órganos cuya cantidad es reducida, considerándose poco viable obtener cantidades suficientes para su estudio.

La revisión de antecedentes señala a los compuestos fenólicos como los principales componentes activos en plantas del género *Impatiens*. Por lo tanto, se plantea la cuantificación de los contenidos de fenoles totales, flavonoides totales y antocianinas monoméricas totales de los extractos de *I. hawkeri*. Asimismo, se propone la determinación de compuestos fenólicos bioactivos reportados en otras plantas del género en cuestión, correspondientes a quercetina, kaempferol, quercetina 3-*O*- β -D-rutinósido (conocido como rutina), quercetina 3-*O*- β -D-glucósido (conocido como isoquercetina), lawsona, 2-MNQ y escopoletina.

Mediante la investigación propuesta se pretende determinar la existencia de variaciones en la actividad antioxidante y antibacteriana en función de la sección de la planta *I. hawkeri* utilizada y a su vez correlacionar con los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos. Con los resultados obtenidos se espera establecer un antecedente sólido que defina cual sección anatómica de *I. hawkeri* presenta mayor potencial como fuente de extractos con las actividades biológicas evaluadas, ya sea para la investigación posterior de su actividad en modelos *in vivo* o para la identificación, aislamiento y elucidación estructural de sus componentes activos.

3. Hipótesis y objetivos:

3.1. Hipótesis:

La magnitud de las actividades antioxidante y antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de *I. hawkeri* varía en función de la parte anatómica de la planta utilizada debido a las diferencias en su contenido de compuestos fenólicos.

3.2. Objetivos:

3.2.1. Objetivo general:

Evaluar las actividades antioxidante y antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos elaborados a partir de plantas enteras, partes áreas (tallo, hojas y flores en conjunto), hojas, tallos y raíces de *Impatiens hawkeri* mediante ensayos *in vitro*, así como la correlación de dichas actividades con la presencia de compuestos fenólicos bioactivos.

3.2.2. Objetivos específicos:

3.2.2.1. Caracterizar los extractos hidroalcohólicos de las distintas partes anatómicas de *I. hawkeri* a través de ensayos químicos de detección y cuantificación de compuestos fenólicos bioactivos.

3.2.2.2. Comparar la actividad barredora de radicales libres *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de las distintas partes anatómicas de *I. hawkeri*.

3.2.2.3. Estimar la capacidad inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes secciones anatómicas de *I. hawkeri* sobre la peroxidación lipídica inducida en homogenizados de tejido hepático y eritrocitos.

3.2.2.4. Determinar la actividad estabilizadora de los extractos hidroalcohólicos de las distintas partes anatómicas de *I. hawkeri* sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes a nivel intracelular.

3.2.2.5. Identificar la sección anatómica de *Impatiens hawkeri* que permite la obtención del extracto hidroalcohólico con mayor potencia antibacteriana *in vitro* definida sobre cepas de bacterias patógenas.

4. Materiales y métodos:

4.1. Recolección y procesamiento del material vegetal:

La especie *Impatiens hawkeri* fue identificada previamente por el Dr. Carlos Morales, botánico del Herbario Dr. Luis A. Fournier Origgi, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Lo anterior mediante el depósito de un espécimen de referencia a la colección del herbario con el código USJ-110 989 (151). El material vegetal recolectado corresponde a plantas cultivadas las cuales fueron obtenidas comercialmente en el vivero Casa Verde ubicado en Grecia, Alajuela. Se utilizarán plantas de mes y medio de crecimiento procedentes de la Garita de Alajuela (coordenadas: 9°59'33" Norte; 84°19'00" Oeste). Se llevaron a cabo dos recolecciones de material vegetal, una durante febrero de 2020 y otra en febrero de 2021.

Con el material de la primera recolección se prepararon cinco tipos de muestras: plantas enteras (incluyen todos los órganos de la planta: raíz, tallo, hojas y flores), partes áreas (incluyen flores, tallos y hojas en conjunto), raíces, tallos y hojas. Adicionalmente a las cinco muestras anteriores fue posible conseguir una cantidad de flores suficiente para la preparación de una cantidad adecuada de extracto hidroalcohólico. El material de las distintas muestras fue lavado con agua potable para remover material extraño: tierra, polvo y piedras adheridas a las raíces. Posteriormente, las muestras se sometieron a secado a 70 °C mediante horno (152). Sin embargo, en el caso particular de la muestra de flores, se empleó la técnica de liofilización como método de secado dado lo delicado del material y a la rápida decoloración que sufre mediante el secado por la aplicación de calor.

Se realizó una segunda recolección de hojas de *I. hawkeri* en febrero de 2021. Este material fue utilizado para evaluar el efecto de la técnica de secado sobre la composición y las actividades de los extractos producidos a partir de ellas. Dicho material se dividió en tres muestras, cada una de las cuales fue sometida a un método distinto de secado: liofilización a -50 °C, secado al horno a 70 °C o secado a la sombra a temperatura ambiental (24±7 °C). Las distintas muestras secas (tanto del 2020 como

del 2021) fueron sujetas a molienda con procesador de alimentos hasta un tamaño de partícula inferior a 2 mm de espesor. El polvo obtenido de cada muestra fue utilizado para elaborar los distintos extractos hidroalcohólicos.

4.2. Preparación de los extractos hidroalcohólicos:

Para la preparación de los extractos hidroalcohólicos de cada muestra se siguió el método de extracción descrito por Kang *et al.* (153) con modificaciones. En la primera etapa, el material seco y molido fue sometido a maceración en proporción 1:10 g/mL con etanol al 80 % v/v (154) durante dos semanas a temperatura ambiente en recipientes de vidrio ámbar. Posteriormente, el extracto hidroalcohólico fue retirado por decantación y filtrado al vacío utilizando un filtro Whatman N°4 (diámetro de poro de 20-25 μm). El extracto obtenido de la primera etapa fue almacenado a temperatura ambiente bajo protección de la luz. En la segunda etapa, el material vegetal contenido en el recipiente ámbar fue sometido nuevamente a maceración en proporción 1:15 g/mL de etanol al 80 % v/v durante una semana adicional a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de la segunda maceración, el extracto hidroalcohólico resultante fue retirado por decantación y filtrado al vacío utilizando un filtro Whatman N°4. Los filtrados de la primera y segunda etapa de maceración se combinaron y se sometieron a filtración nuevamente con filtro de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro. El etanol del extracto resultante fue eliminado por evaporación al vacío y la suspensión acuosa resultante se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas. Luego, el agua fue eliminada mediante liofilización hasta obtener un extracto seco. Los extractos secos de cada muestra se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Bajo las metodologías descritas anteriormente se obtuvieron un total de 9 extractos cuyo códigos y características se resumen en el cuadro IV.

Cuadro IV. Códigos asignados a los diferentes extractos hidroalcohólicos de *I. hawkeri* sujetos a estudio.

Código	Material vegetal	Técnica de secado	Período de recolección del material vegetal
PEH-20	Plantas enteras	Horno a 70 °C	Febrero de 2020
PAH-20	Partes áreas	Horno a 70 °C	Febrero de 2020
HH-20	Hojas	Horno a 70 °C	Febrero de 2020
FL-20	Flores	Liofilización a -50 °C	Febrero de 2020
TH-20	Tallos	Horno a 70 °C	Febrero de 2020
RH-20	Raíces	Horno a 70 °C	Febrero de 2020
HL-21	Hojas	Liofilización a -50 °C	Febrero de 2021
HH-21	Hojas	Horno a 70 °C	Febrero de 2021
HS-21	Hojas	Sombra (temperatura ambiente)	Febrero de 2021

4.3. Análisis de los extractos mediante cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC):

4.3.1. Condiciones cromatográficas generales:

Para los diferentes ensayos cromatográficos se emplearon placas de vidrio de 20x10 cm para cromatografía HPTLC recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ o 60 F_{254S}. Los estándares o sustancias de referencia de quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, lawsona, 2-MNQ y escopoletina se disolvieron adecuadamente en metanol hasta una concentración exactamente conocida y se colocaron en viales ámbar para los análisis cromatográficos. De manera similar, se prepararon soluciones en

metanol de cada uno de los extractos a una concentración de 10 mg/mL las cuales también fueron transferidas a viales ámbar para su correspondiente análisis.

Las soluciones de los estándares o de los extractos se aplicaron desde los viales en las placas para análisis HPTLC con ayuda del automuestreador ATS4 (CAMAG). El contenido de las soluciones estándar o de las muestras se aplicó en modo aerosol o *spray*, empleando nitrógeno como gas propelente a una velocidad de 150 nL/s, en forma de bandas de 8 mm de longitud y 1 mm de espesor a una distancia de 10 mm desde el fondo de la placa. La separación entre bandas fue de 3 mm. La distancia desde el borde lateral izquierdo hasta la primera banda aplicada se fijó en 20 mm. El frente de solvente se estableció a 80 mm desde el fondo de las placas de cromatografía. La cantidad máxima de muestra de extracto aplicada en cada placa fue de 1 mg/banda.

Una vez finalizada la aplicación de los estándares o muestras en las placas cromatográficas, se procedió al presecado de las mismas durante 1 minuto, posteriormente se procedió a saturar la cámara de desarrollo cromatográfico con la correspondiente fase móvil y al desarrollo o elución de las placas de cromatografía. Al final de cada proceso de elución, las placas fueron sometidas a secado durante 5 minutos. Los procesos de presecado, saturación, elución y secado fueron realizados con la cámara de desarrollo automática ADC2 (CAMAG). La elución de las placas cromatográficas fue llevada a cabo a temperatura (24 ± 3 °C) y humedad (51 ± 3 %) ambiental.

Las imágenes de los cromatogramas fueron obtenidas mediante la aplicación de luz ultravioleta (UV) con una longitud de onda de 254 nm o 366 nm. Para este fin se utilizó el equipo TLC Visualizar (CAMAG). La generación de densitogramas fue llevada a cabo con el equipo TLC Scanner 4 (CAMAG), para esto se aplicó una velocidad de escaneo de 20 mm/s, una resolución de 100 μm /paso y una ranura de 4x0,1 mm. Para las determinaciones de absorbancia se utilizó la lámpara de deuterio del equipo mientras que para las determinaciones en modo fluorescencia se utilizó la lámpara de mercurio como fuente de la radiación de excitación y el filtro de K400 para la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida.

El procesamiento y análisis de las imágenes de los cromatogramas y densitogramas fueron realizadas con el software VisionCATS 3.1. Los datos de absorbancia o fluorescencia medidos a los picos cromatográficos ubicados en los rangos de coeficiente de retención (Rf) correspondiente a cada compuesto analizado fueron utilizados para la construcción de rectas de calibración en función de la cantidad de sustancia por banda de los diferentes estándares. Estas rectas fueron utilizadas para determinar por interpolación la concentración de los compuestos bajo análisis en los extractos en miligramos por gramo. Los experimentos de determinación de los compuestos se realizaron al menos por triplicado para cada extracto evaluado. Los resultados se reportan como el promedio con su respectivo error estándar.

4.3.2. Condiciones para la determinación simultánea de quercetina y kaempferol:

Para la determinación de quercetina y kaempferol se preparó una solución de ambos estándares (SE) con concentraciones de 120 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se colocaron distintas bandas en las placas para análisis HPTLC con contenidos para ambas sustancias de referencia en los rangos de 120-480 ng/banda, para la quercetina, y 100-400 ng/banda, para el kaempferol. Estas bandas fueron utilizadas para la construcción de rectas de calibración.

Para la determinación de ambos compuestos en el extracto FL-20 se empleó como fase móvil a la mezcla tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (60:45:3 v/v/v) (fase móvil 1) con un tiempo de saturación de 10 minutos previo a la elución. Para el resto de los extractos se utilizó un sistema de doble elución, las placas fueron eluidas inicialmente con la fase móvil 1 y posteriormente con la fase móvil tolueno: acetato de etilo: *n*-hexano: ácido fórmico (60:30:10:3 v/v/v/v) (fase móvil 2) con períodos de saturación de 10 minutos antes de cada fase de elución. Las diferentes condiciones aplicadas para FL-20 con respecto al resto de extractos se debe a que con ello la separación de las bandas de los componentes es más adecuada para dicho extracto.

Una vez finalizados los procesos de elución se procedió a la generación de imágenes de los cromatogramas a 366 nm y de densitogramas a 380 nm. En el sistema

empleado para la determinación de quercetina y kaempferol en FL-20 se utilizaron los datos de absorbancia medidos a picos cromatográficos presentes en los rangos de Rf de $0,410 \pm 0,017$ y $0,553 \pm 0,010$, respectivamente. Para el sistema empleado durante la determinación de ambos compuestos en el resto de los extractos se utilizaron los valores de absorbancia establecidos en picos cromatográficos ubicados en los rangos de Rf de $0,504 \pm 0,020$ y $0,713 \pm 0,017$, respectivamente.

4.3.3. Condiciones para la determinación simultánea de rutina e isoquercetina:

Para la determinación de rutina e isoquercetina se preparó una solución de ambos estándares (SE) con concentraciones de 280 $\mu\text{g/mL}$. Se colocaron distintas bandas en las placas para análisis HPTLC con contenidos para ambos compuestos de referencia de entre 280 y 980 ng/banda. Estas bandas fueron utilizadas para la construcción de rectas de calibración.

Para la determinación de rutina e isoquercetina en los extractos se utilizó un sistema de elución con la fase móvil butan-2-ol: *n*-butanol: acetato de etilo: ácido fórmico (60:40:15:10 v/v/v/v) (fase móvil 3) con un período de saturación de 20 minutos antes del proceso de elución.

Una vez finalizada la etapa de elución cromatográfica se procedió a la generación de imágenes de los cromatogramas a 254 nm y de densitogramas a 365 nm. Los datos de absorbancia utilizados para la determinación de rutina e isoquercetina fueron medidos a los picos cromatográficos presentes en los rangos de Rf de $0,346 \pm 0,023$ y $0,620 \pm 0,021$, respectivamente.

4.3.4. Condiciones para la determinación simultánea de lawsona y 2-MNQ:

Para la determinación de lawsona y 2-MNQ se preparó una solución de ambos estándares (SE) con concentraciones de 220 y 340 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se colocaron distintas bandas en las placas para análisis HPTLC con contenidos para ambas sustancias de referencia en los rangos de 220-440 ng/banda, para la lawsona, y 340-640 ng/banda, para 2-MNQ. Estas bandas fueron utilizadas para la construcción de rectas de calibración.

Para la determinación de lawsona y 2-MNQ en los extractos se utilizó un sistema doble elución. La primera etapa de elución se llevó a cabo con la fase móvil tolueno: acetato de etilo: ácido acético (80:30:3 v/v/v) (fase móvil 4), mientras que en la segunda etapa se utilizó la fase móvil tolueno: acetato de etilo: *n*-hexano: ácido acético (80:30:20:10 v/v/v/v) (fase móvil 5) con un período de saturación de 10 minutos antes de cada fase de elución.

Una vez finalizados los procesos de elución cromatográfica se procedió a la generación de imágenes de los cromatogramas a 254 nm y de densitogramas a 275 nm. Los datos de absorbancia utilizados para la determinación de lawsona y 2-MNQ fueron medidos a los picos cromatográficos presentes en los rangos de R_f de $0,719 \pm 0,018$ y $0,848 \pm 0,010$, respectivamente.

4.3.5. Condiciones para la determinación de escopoletina:

Para la determinación de escopoletina se preparó una solución de estándar (SE) de 300 $\mu\text{g/mL}$. Se colocaron distintas bandas en las placas para análisis HPTLC con contenidos para la sustancia de referencia en el rango de 30-300 ng/banda. Estas bandas fueron utilizadas para la construcción de la recta de calibración.

Para la determinación de escopoletina en los extractos se utilizó un sistema doble elución. La primera etapa de elución se llevó a cabo con la fase móvil cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico (60:30:10 v/v/v) (fase móvil 6), mientras que en la segunda etapa se utilizó la fase móvil cloroformo: acetato de etilo (60:40 v/v) (fase móvil 7) con un período de saturación de 10 minutos antes de cada fase de elución.

Una vez finalizados los procesos de elución cromatográfica se procedió a la generación de imágenes de los cromatogramas a 366 nm y a la generación de densitogramas mediante el análisis por fluorescencia, empleando una longitud de onda de excitación de 302 nm y realizando las lecturas de la intensidad de fluorescencia emitida con el filtro de detección K400. Los datos de fluorescencia utilizados para la determinación de escopoletina fueron medidos a los picos cromatográficos presentes en el rango de R_f de $0,623 \pm 0,037$.

4.4. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (TPC):

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se estableció mediante el método Folin-Ciocalteu, el cual consiste en la transformación de complejos de fosfomolibdato VI a fosfomolibdato V de color azul por la acción reductora de los compuestos fenólicos presentes en el medio en que tiene lugar la reacción. El ensayo se efectuó de acuerdo con el procedimiento descrito por Bobo-García *et al.* (155). Para la construcción de la recta de calibración de ácido gálico se empleó soluciones estándar con concentraciones de 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Además, se prepararon soluciones de prueba de los extractos con una concentración adecuada para su análisis por interpolación en la recta estándar ácido gálico.

Para el análisis se tomaron alícuotas de 20 μL de las soluciones estándar o de las soluciones de los extractos liofilizados y se colocaron en pozos independientes de una microplaca de poliestireno de 96 pozos. Posteriormente se procedió a añadir 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) 0,4 N a cada uno de los pozos seguido de la adición de 75 μL de carbonato de sodio 100 g/L. La placa se agitó durante 30 segundos y se mantuvo en reposo en el interior del lector de microplacas por 2 horas a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Después del período de reposo, se procedió a la lectura de la absorbancia a 750 nm.

La absorbancia obtenida con las soluciones estándar de ácido gálico fue corregida mediante la sustracción de la absorbancia del blanco correspondientes a 20 μL de agua destilada sometidos al procedimiento de análisis. Adicionalmente, la absorbancia obtenida con las soluciones de los extractos fue corregida mediante la sustracción de la absorbancia obtenida con el blanco de muestra, correspondiente a 20 μL de la disolución de extractos sometidos a análisis sustituyendo los 100 μL de RFC 0,4 N por 100 μL de agua destilada. De este modo se corrigió la interferencia debida a la absorbancia intrínseca de las soluciones de los extractos. La cantidad de TPC en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg GAE/g) se determinó por interpolación de la absorbancia corregida de las soluciones de los extractos sujetas a análisis en la recta estándar obtenida de la regresión lineal de la absorbancia en función de la concentración de ácido gálico. El experimento se repitió

por triplicado para cada extracto. Los resultados se reportan como el promedio con su respectivo error estándar.

4.5. Determinación del contenido de flavonoides totales (TFC):

La cuantificación colorimétrica de flavonoides se efectuó mediante el ensayo de formación de complejos de los flavonoides con cloruro de aluminio. Para ello se siguió el método descrito por Magalhães *et al.* (156) con modificaciones. La quercetina se empleó como el compuesto de referencia para la cuantificación de flavonoides presentes en los extractos liofilizados. Para la construcción de la recta estándar se utilizaron soluciones de quercetina con concentraciones de 20 µg/mL a 60 µg/mL en metanol. Además, se prepararon soluciones de prueba de concentración adecuada para la cuantificación de flavonoides con cada uno de los extractos liofilizados empleando agua como solvente.

Con respecto al procedimiento del análisis, se tomaron alícuotas de 50 µL de las soluciones estándar de quercetina y de las soluciones de los extractos. Estas se colocaron en pozos independientes de una microplaca de poliestireno de 96 pozos. Posteriormente se añadieron 50 µL de nitrito de sodio 6 g/L a cada uno de los pozos, seguido de un período de reposo de 5 minutos en el interior del equipo lector de microplacas. Después de transcurrido este lapso, se procedió a añadir 50 µL de una solución acuosa de cloruro de aluminio hexahidratado 22 g/L. Seguidamente, la placa se dejó en reposo por 6 minutos. A continuación, se procedió con la adición de 50 µL de una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,8 M a cada pozo. La placa se agitó con ayuda del lector de microplacas por 30 segundos para luego proceder a la lectura inmediata de la absorbancia a 510 nm. El procedimiento se llevó a cabo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

La absorbancia obtenida con las soluciones de quercetina se corrigió mediante la sustracción de la absorbancia del blanco correspondiente a 50 µL de metanol sometidos al procedimiento de análisis. Adicionalmente, la absorbancia obtenida con las soluciones de los extractos se corrigió mediante la sustracción de la absorbancia obtenida con el blanco de muestra, correspondiente a 50 µL de la disolución de

extractos sometidos a análisis, sustituyendo los 50 μL de cloruro de aluminio hexahidratado 22 g/L por 50 μL de agua destilada. De este modo se corrigió la interferencia debida a la absorbancia intrínseca de las soluciones del extracto. La cantidad de TFC en miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg QE/g) se determinó por interpolación de la absorbancia corregida de las soluciones de los extractos sujetas a análisis en la recta estándar obtenida de la regresión lineal de la absorbancia en función de la concentración de quercetina. El experimento se repitió por triplicado para cada extracto. Los resultados se reportan como la media con su respectivo error estándar.

4.6. Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales (TMA):

La cantidad de antocianinas monoméricas totales (TMA) se midió en los extractos a través del método colorimétrico de pH diferencial descrito por Lee, Durst, & Wrolstad (157) en el cual se determina la cantidad de antocianinas dada la propiedad de dichas sustancias de cambiar de color en función del pH del medio en que se encuentran.

Con respecto al procedimiento de análisis, se prepararon diluciones de prueba con una concentración adecuada de los extractos, tanto en una solución amortiguadora de cloruro de potasio 0,025 M/ácido clorhídrico (pH = 1,0) como en una solución amortiguadora de acetato de sodio 0,4 M/ácido clorhídrico (pH = 4,5). La absorbancia de ambas diluciones preparadas al mismo nivel de concentración se midió con espectrofotómetro a 520 nm y 700 nm después de un período de reposo de 40 minutos desde su preparación en los medios con los pH indicados. Como blanco se utilizó agua destilada.

Con los datos de absorbancia se procedió al cálculo de la cantidad de TMA en los extractos expresada como miligramos equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido por gramo de extracto (mg C3GE/g). Para ello se utilizó la ecuación 1. El experimento se repitió por triplicado para cada extracto. Los resultados se reportan como la media con su respectivo error estándar.

$$\text{TMA (mg C3GE/g)} = \{[(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) - (A'_{520\text{nm}} - A'_{700\text{nm}})] \cdot 449,2 \cdot 1000\} / (26\,900 \cdot l \cdot C_E)$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo de TMA mediante el método colorimétrico de pH diferencial.

En la ecuación 1 $A_{520\text{nm}}$ es la absorbancia a 520 nm a pH 1,0; $A_{700\text{nm}}$ es la absorbancia a 700 nm a pH 1,0; $A'_{520\text{nm}}$ es la absorbancia a 520 nm a pH 4,5; $A'_{700\text{nm}}$ es la absorbancia a 700 nm a pH 4,5; 449,2 es el peso molecular en gramos por mol de la cianidina-3-*O*-glucósido (C3G); l es el espesor de la cubeta en centímetros; 26 900 es la constante de absortividad molar (ϵ) de C3G en $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$; C_E es la concentración de prueba del extracto utilizada para el análisis en gramos por litro (g/L) y 1 000 corresponde al factor de conversión de gramos a miligramos aplicado para C3G.

4.7. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante mediante ensayos químicos:

4.7.1. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC):

El ensayo ORAC permite evaluar la capacidad de un antioxidante de inhibir la degradación de la fluoresceína por la acción oxidante de radicales libres en condiciones de pH (7,4) y temperatura (37 °C) que simulan las condiciones de sistemas biológicos. El valor ORAC de los extractos se determinó mediante el método descrito por Kenny, Brunton & Smyth (158) con modificaciones. Se prepararon soluciones estándar de trolox con concentraciones de 20 μM a 60 μM en una solución amortiguadora de fosfatos 75 mM (pH 7,4) como solvente. Estas soluciones estándar fueron utilizadas para construir una recta estándar mediante regresión lineal. Las soluciones de prueba de los extractos y quercetina (control positivo) a analizar se prepararon en la misma solución amortiguadora de fosfatos a una concentración adecuada para su análisis por interpolación en la recta estándar de trolox.

Con respecto al procedimiento experimental, 25 μL de cada solución estándar de trolox o de las soluciones de prueba de los extractos y del control positivo se colocaron en uno de los pozos de una microplaca negra de poliestireno de 96 pozos para análisis por fluorescencia. Luego, se añadieron 150 μL de fluoresceína disódica 72 nM preparada en solución de fosfatos, seguido de un período de reposo de 30

minutos a 37 ± 1 °C dentro del lector de microplacas. Posteriormente se procedió a la adición de 25 μ L de diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) 153 mM en solución de fosfatos y a la agitación de la placa por 15 segundos. Inmediatamente después se procedió a la lectura de la fluorescencia de los pocillos cada minuto durante una hora conservando la temperatura a 37 ± 1 °C. Para esta determinación se emplearon longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 528 nm, respectivamente.

Los datos de fluorescencia obtenidos con cada pozo se transformaron de acuerdo con Ou, Hampsch-Woodill & Prior (159). En primera instancia, los valores de fluorescencia se normalizaron mediante la división de la fluorescencia de cada determinación consecutiva entre la fluorescencia inicial (fluorescencia a tiempo cero), obteniéndose valores de fluorescencia relativa (FR). Estos valores se graficaron en función del tiempo para obtener curvas de decaimiento. El área bajo la curva total de dichos gráficos obtenidos para las soluciones de prueba de los extractos o para las soluciones estándar de trolox (ABC_M) se calculó mediante integración. Con la ecuación 2 se procedió al cálculo del área bajo la curva neta (ABC_N) para cada gráfico de decaimiento, donde ABC_B es el área bajo la curva obtenida para el blanco (25 μ L de solución de fosfatos sujetos al proceso de análisis).

$$ABC_N = ABC_M - ABC_B$$

Ecuación 2. Cálculo del área bajo la curva neta de los gráficos de decaimiento de la fluorescencia relativa.

Los valores de ABC_N obtenidos con cada solución estándar fueron graficados en función de la concentración de trolox y mediante regresión lineal se obtuvo la recta estándar para confirmar el ajuste de los datos a una línea recta. Para el cálculo del valor ORAC de los extractos en micromoles de trolox por gramo de extracto liofilizado (μ mol trolox/g) se utilizó la ecuación 3.

$$ORAC = (ABC_{NE} \cdot C_T) / (ABC_{NT} \cdot C_E \cdot 1000)$$

Ecuación 3. Fórmula para la determinación del valor ORAC de los extractos.

En la ecuación 3 ABC_{NE} es el área bajo la curva neta obtenida con la solución de prueba de extracto, ABC_{NT} corresponde al área bajo la curva neta obtenida con una solución estándar de trolox de concentración C_T correspondiente al punto central de la recta estándar de trolox, C_E es la concentración de la solución de prueba del extracto en gramos por litro (g/L) y 1000 es el factor de conversión de micromoles a milimoles. El experimento se repitió por triplicado para cada extracto y la quercetina. Se reporta el valor promedio ORAC de los extractos y de quercetina en milimoles equivalentes de trolox por gramo de extracto liofilizado (mmol de TE/g) con su respectivo error estándar.

4.7.2. Actividad barredora sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH):

El DPPH representa un radical libre cuyas soluciones se decoloran a medida que es estabilizado por la transferencia de electrones y átomos de hidrógeno procedentes de un antioxidante. La concentración efectiva que permite la estabilización del 50 % del radical DPPH (IC_{50DPPH}) se midió mediante el método reportado por Kenny, Brunton & Smyth (158) con modificaciones. Se prepararon soluciones dobles seriadas de los extractos liofilizados y quercetina (control positivo) de diferente concentración en agua o en metanol al 80 % v/v, respectivamente. Se tomaron alícuotas de 50 μ L de cada una de las diluciones de quercetina o de los extractos liofilizados. Estas se colocaron en pozos independientes de una microplaca de poliestireno de 96 pozos. Posteriormente se añadieron 50 μ L de una solución de DPPH 0,12 mM en metanol. Seguidamente, la microplaca se agitó por 30 segundos y dejó en reposo por 30 minutos bajo protección de la luz en el interior del equipo lector de microplacas. Inmediatamente después del lapso de reposo, se procedió a la lectura de la absorbancia de cada pozo a 515 nm. El procedimiento se llevó a cabo a 25 ± 1 °C.

Con los datos de absorbancia se calculó el porcentaje de la actividad barredora del radical DPPH (RSA) para cada una de las concentraciones de prueba con la ecuación 4. Donde A_C es la absorbancia promedio de tres réplicas de los pozos control (50 μ L de solvente de las soluciones de prueba de quercetina o de los extractos a los que se le añadirán 50 μ L de DPPH 0,12 mM), A_B es la absorbancia promedio del blanco

(pozos con 100 μL de metanol), A_M es la absorbancia promedio obtenida con las diluciones de prueba, A_{BM} es la absorbancia promedio de tres réplicas del blanco de muestra, correspondiente a 50 μL de la solución del extracto o quercetina al que se le añaden 50 μL de metanol en sustitución de la solución de DPPH 0,12 mM.

$$\% \text{ RSA} = [(A_C - A_B) - (A_M - A_{BM})] \cdot 100 / (A_C - A_B)$$

Ecuación 4. Fórmula para la determinación del porcentaje de actividad secuestrante del radical DPPH de los extractos.

A partir de los valores de RSA, se procedió a la construcción de una curva dosis respuesta de acuerdo con el modelo matemático de Hill. Para ello se graficaron los valores de RSA en función del logaritmo decimal de la concentración de los extractos o de quercetina. Con dichos gráficos se procedió a estimar por interpolación el valor $\text{IC}_{50\text{DPPH}}$ de cada uno de los extractos en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (160). El análisis se repitió tres veces para cada uno de los extractos y la quercetina (construcción de tres curvas de dosis respuesta independientes). Los resultados se reportan como el $\text{IC}_{50\text{DPPH}}$ promedio con su respectivo error estándar.

4.7.3. Potencial antioxidante reductor férrico (FRAP):

Mediante el ensayo FRAP se valora colorimétricamente la capacidad de los extractos de reducir al ion hierro III a hierro II. La determinación del valor FRAP de los extractos en micromoles de trolox por gramo de extracto liofilizado (μmol de trolox/g) se estableció adaptando la metodología descrita por Işıl Berker *et al.* (161) para su ejecución en microplacas de 96 pozos. Se prepararon soluciones estándar de trolox de 20 μM a 100 μM en metanol que se utilizaron para la construcción de una recta estándar mediante regresión lineal. Se prepararon soluciones de los extractos o quercetina (control positivo) con una concentración adecuada para su análisis por interpolación en la recta estándar de trolox. Estas soluciones se prepararon en agua y metanol, respectivamente.

Con respecto al procedimiento de análisis, se tomaron alícuotas de 20 μL de las soluciones estándar de trolox o de las diferentes soluciones de los extractos y

quercetina. Estas se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pozos, seguido de la adición de 130 μL de ácido clorhídrico 30 mM a cada pocillo. Luego se añadieron 25 μL de ferricianuro de potasio al 1,2 % y 25 μL de cloruro férrico hexahidratado al 0,1 %. Como blanco se utilizaron pozos con 20 μL de metanol tratados del mismo modo que los pozos con estándar. Como blanco de muestra, se utilizaron alícuotas de 20 μL de las soluciones de muestra a las que se añadieron 130 μL de ácido clorhídrico 30 mM, 25 μL de agua destilada y 25 μL de cloruro férrico hexahidratado al 0,1 %. Posteriormente, la placa se agitó por 30 segundos con ayuda del lector de microplacas, seguido de un lapso de reposo de 40 minutos a 25 ± 1 °C. Después del período de reposo, se procedió a la lectura de la absorbancia a 700 nm. El valor FRAP de los extractos se determinó por interpolación de su absorbancia corregida por la sustracción de la absorbancia del blanco de muestra en la recta estándar obtenida con el trolox. El experimento se repitió por triplicado para cada extracto. Se reporta el valor promedio FRAP de los extractos y de quercetina en milimoles equivalentes de trolox por gramo de extracto liofilizado (mmol de TE/g) con su respectivo error estándar.

4.7.4. Determinación de la actividad quelante sobre el ion hierro II (FIC):

Este método consiste en determinar la actividad quelante de los extractos al inhibir la formación de complejos de hierro II o ion ferroso con ferrozina, debido a las diferencias de afinidad entre los componentes del extracto y la ferrozina por el ion hierro II para la formación complejos. El ion hierro II puede participar en reacciones de Fenton generadoras de radicales libres que pueden ser evitadas mediante la formación de complejos con dicho ion (80).

La actividad quelante sobre el ion hierro II se evaluó mediante el método colorimétrico descrito por Sousa Santos, Alvarenga Brizola & Granato (80) con modificaciones. Se prepararon soluciones estándar de EDTA de 25 μM a 100 μM en agua que se utilizaron para la construcción de una recta estándar mediante regresión lineal. Se prepararon soluciones de los extractos o quercetina (control positivo) con una concentración adecuada para su análisis por interpolación en la recta estándar de EDTA. Estas soluciones se prepararon en agua y metanol, respectivamente.

Se tomaron 50 μL de las soluciones de estándar, extractos o quercetina estos se colocaron en un pozo de una microplaca de poliestireno de 96 pozos. Posteriormente, se añadieron 160 μL de agua destilada a cada pozo seguidos por 20 μL de cloruro de hierro II (0.3 mM). A continuación, se dejó reposar la mezcla por 5 minutos y por último se agregaron 30 μL de ferrozina (0,8 mM). La mezcla se dejó en reposo bajo oscuridad dentro del lector de microplacas por 15 minutos y luego se midió la absorbancia a 562 nm. Como blanco se utilizó la absorbancia promedio de pozos en los que se sustituyó la alícuota de 50 μL de la solución muestra o estándar por agua destilada. Como blanco para la corrección de la interferencia en la absorbancia debida a la coloración intrínseca de los extractos (blanco de muestra) se utilizó el mismo procedimiento sustituyendo los 30 μL de ferrozina 0,8 mM con 30 μL de agua destilada. La actividad quelante de los extractos y la quercetina se determinó por interpolación de las absorbancias corregidas en la recta estándar. El experimento se repitió por triplicado para cada extracto y la quercetina. Se reporta el valor promedio de la actividad quelante en términos de micromoles equivalentes de EDTA por gramo de extracto ($\mu\text{mol EDTAE/g}$) con su respectivo error estándar.

4.8. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante mediante ensayos biológicos:

4.8.1. Inhibición de la peroxidación lipídica de homogenizados de hígado de rata (LPO):

El ensayo consiste en determinar la capacidad de los extractos para reducir la peroxidación lipídica de homogenizados obtenidos de hígado de rata expuestos a hidroperóxido de *tert*-butilo (TBHP). Esto se establece a través de la determinación de la reducción en la generación de especies reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) derivadas de la peroxidación de lípidos presentes en el homogenizado.

El uso de los animales para poder llevar a cabo este ensayo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA) según el oficio CICUA-018-2022. Los animales se adquirieron del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBI). Los hígados se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley macho de 7 semanas de edad (peso

promedio \pm desviación estándar: 221 ± 25 g). Antes del procedimiento de extracción del tejido hepático, los animales tuvieron una semana de aclimatación a 20-30 °C, 60-70 % de humedad relativa, y con ciclos de iluminación y oscuridad de 12 horas con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Luego de este período, los animales fueron anestesiados con cámara dióxido de carbono (CO₂) y sometidos a eutanasia por decapitación, seguido de la extracción de los hígados.

La preparación de los homogenizados de cada hígado y la evaluación de la capacidad de los extractos para inhibir su peroxidación lipídica se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Azofeifa *et al.* (162). Cinco gramos de hígado se homogenizaron con 20 mL de solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS). Luego mediante centrifugación a 9000 xg por 15 minutos se eliminaron las partículas sólidas y se continuó trabajando con el sobrenadante (homogenizado al 20 % de tejido). Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de los extractos y quercetina (control positivo) de las cuales 75 μ L se combinaron con 750 μ L de homogenizado de hígado. Como control de 100 % de producción de TBARS, se utilizó la mezcla de 75 μ L de PBS con 750 μ L de homogenizado. Las mezclas anteriores se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, se indujo la peroxidación lipídica de los homogenizados añadiendo TBHP a una concentración final de 1,7 mM. La mezcla se incubó por una hora a 37 °C y a continuación, se procedió a la cuantificación de TBARS como productos de punto final de la peroxidación lipídica.

Para la determinación de TBARS se siguió el procedimiento descrito por Uchiyama & Mihara (163). Una alícuota de 250 μ L de homogenizado de hígado tratado con TBHP y expuesto a extracto, quercetina o a PBS, se mezcló con 250 μ L de ácido tricloroacético al 35 % y con 250 μ L de solución de Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). La mezcla resultante se agitó e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 500 μ L de ácido tiobarbitúrico al 0,75 % y se procedió a calentar a ebullición por 45 minutos. A continuación, se dejó enfriar la mezcla y se le añadieron 500 μ L de ácido tricloroacético al 70 % para proseguir con su centrifugación a 2500 xg por 15 minutos. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 532 nm. Dicha

absorbancia se corrigió sustrayendo la absorbancia de los blancos de muestra correspondientes a mezclas preparadas siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, sustituyendo el homogenizado por PBS. La concentración de TBARS en el sobrenadante se calculó utilizando los datos de absorbancia corregidos y el coeficiente de absortividad molar del aducto formado por la reacción de Schiff entre el malondialdehído producido por la peroxidación de los lípidos del homogenizado y el ácido tiobarbitúrico, el cual corresponde a $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. El valor basal de TBARS de cada homogenizado se determinó siguiendo los mismos procedimientos, pero sustituyendo los 75 μL de solución de extracto por PBS y la mezcla no se trató con TBHP.

El porcentaje de inhibición de la producción de TBARS obtenido a los diferentes niveles de concentración de cada tratamiento se calculó con la ecuación 5. En dicha ecuación T_M son los niveles de TBARS obtenidos al tratar el homogenizado con extracto o quercetina, T_C son los niveles de TBARS del control al 100 % de producción de TBARS y T_B es el nivel basal de TBARS del homogenizado utilizado para realizar el ensayo.

$$\% \text{ Inhibición TBARS} = [(T_C - T_B) - (T_M - T_B)] \cdot 100 / (T_C - T_B)$$

Ecuación 5. Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición de la producción de TBARS en los homogenizados de hígado de rata sometidos a peroxidación lipídica.

Mediante la construcción de una curva de dosis respuesta por regresión cuadrática de los valores de porcentaje de inhibición de la producción de TBARS en función de la concentración de los extractos, se determinó la concentración que produce la inhibición del 50 % de la peroxidación lipídica (IC_{50LPO}) inducida en los homogenizados de hígado de rata por la adición de TBHP. El experimento se repitió por cuadruplicado para cada extracto (se realizaron pruebas con cuatro homogenizados de hígado de ratas diferentes). Los resultados se reportan como el promedio del IC_{50LPO} con su respectivo error estándar.

4.8.2. Actividad antioxidante celular de eritrocitos (ERYCA):

El ensayo ERYCA se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por González *et al.* (164). Este ensayo consiste en la evaluación de la capacidad de agentes antioxidantes de inhibir la hemólisis de eritrocitos inducida por la peroxidación lipídica que tiene lugar al incubar estas células en presencia de AAPH (fuente de radicales libres).

Alícuotas de 50 μL de una suspensión de eritrocitos al 2 % en PBS se colocaron en pozos de una microplaca de 96 pozos de poliestireno (concentración final de los eritrocitos en los pozos de 0,45 %). Posteriormente, 100 μL de las soluciones de prueba de los extractos o de las soluciones estándar de quercetina, se añadieron a los pozos con la suspensión de eritrocitos. Se definieron pozos control a los que solo se les añadió 100 μL de PBS en lugar de solución de extractos o de quercetina. Las concentraciones finales de quercetina en los pozos fueron de entre 0 μM a 30 μM . Luego, la microplaca se agitó por 30 segundos dentro del equipo lector de microplacas a una temperatura de $37\pm 0,4$ °C.

Transcurrido el período de agitación, se procedió a añadir 100 μL de AAPH hasta una concentración final de 100 μM a cada pozo con solución de quercetina o de los extractos y también en los pozos control, esto para inducir la peroxidación lipídica de la membrana de los eritrocitos. La hemólisis de los eritrocitos inducida por la peroxidación de su membrana se monitorizó cada 5 minutos por un período de tiempo de 6 horas a 700 nm de longitud de onda. Antes de cada determinación de la absorbancia se procedió a la agitación de la microplaca por 15 segundos.

Para cada uno de los datos de absorbancia obtenidos a diferente tiempo se procedió a su normalización mediante el cálculo de la absorbancia relativa (AR), esto mediante su división con la absorbancia inicial (tiempo cero). El efecto protector de la quercetina y los extractos sobre la membrana de los eritrocitos se determinó como el área bajo la curva total de la muestra (ABC_M) obtenida de graficar AR en función del tiempo. Con dicha área bajo la curva se procedió con el cálculo del área bajo la curva

neto (ABC_N), para ello se le restó a la ABC_M obtenida con las soluciones de los extractos y quercetina el área bajo la curva del control (ABC_C). Los datos ABC_N obtenidos para la quercetina se graficaron en función de la concentración para la obtención de una recta estándar mediante regresión lineal. Dicha recta se utilizó para calcular la actividad protectora de los extractos sobre la membrana de los eritrocitos en términos de milimoles equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mmol QE/g). Se realizaron tres ensayos independientes para cada extracto. Los resultados se reportan como el promedio con su respectivo error estándar.

4.8.3. Determinación de la capacidad de estabilización de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares:

4.8.3.1. Determinación preliminar de la citotoxicidad de los extractos:

Antes de realizar la prueba de determinación de la capacidad estabilizadora de los extractos y la quercetina sobre los ROS intracelulares es necesario definir el rango de concentración de estos que permite una viabilidad celular superior del 80 % sobre la línea celular a utilizar (165). Se emplearon células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano, *American Type Culture Collection* (ATCC) N° CCL-81). La viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo de reducción de resazurina a resorufina, un producto fluorescente, por acción del metabolismo celular (166).

Las condiciones de incubación utilizadas en los distintos experimentos con células Vero fueron las mismas. Para ello se utilizó una temperatura de 37 °C y una atmósfera al 5 % de CO₂. La viabilidad celular se midió de acuerdo con el procedimiento descrito por Gómez-García *et al.* (167) con modificaciones. Las células fueron cultivadas en medio esencial mínimo (MEM) con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (10 %), glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (50 U/mL) y anfotericina B (250 µg/mL) hasta alcanzar una confluencia igual o mayor al 90 %. Posteriormente las células fueron tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,10 %:0.4 %) y resuspendidas en medio de cultivo hasta una concentración de 250 000 células/mL. Se colocaron 100 µL de dicha suspensión de trabajo en los pozos de una microplaca negra

estéril de 96 pozos para análisis por fluorescencia. La microplaca fue incubada durante 22 horas para promover la adhesión de las células al fondo de los pozos.

Una vez finalizado el período de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se les añadieron 100 μ L las soluciones de extractos o quercetina en medio de cultivo a una concentración máxima de 100 μ g/mL y 24 μ g/mL, respectivamente. Se definieron pozos control (viabilidad del 100 %) a los cuales se les añadió 100 μ L de medio de cultivo. A continuación, la microplaca fue incubada durante 22 horas. Una vez terminado el período de incubación, los pozos se lavaron dos veces con PBS y se les añadió una solución de resazurina (44 μ M) en medio de cultivo libre de rojo fenol. La microplaca se incubó nuevamente durante 2 horas. Seguidamente se procedió a medir la fluorescencia de los pozos a una longitud de onda excitación de 540 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la ecuación 6, donde F_M es la intensidad de fluorescencia de los pozos de las células tratadas con extractos o quercetina y F_C es la intensidad de fluorescencia medida a los pozos control. El experimento se repitió por triplicado para cada extracto. Los resultados se reportan como el promedio con su respectivo error estándar.

$$\% \text{ Viabilidad} = (F_M/F_C) \cdot 100$$

Ecuación 6. Fórmula para la determinación del porcentaje de viabilidad celular de las células Vero expuestas a los extractos o a la quercetina.

4.8.3.2. Determinación del potencial reductor de ROS a nivel intracelular:

Mediante este ensayo se determinó la capacidad de los extractos y de la quercetina (control positivo) para estabilizar ROS a nivel intracelular los cuales pueden oxidar a la sonda diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína no fluorescente (H2DCFDA) a 2',7'-diclorofluoresceína, un compuesto fluorescente. La presencia de un agente antioxidante capaz de ser internalizado por las células y de estabilizar los ROS intracelulares favorece menores niveles de fluorescencia debido a una menor oxidación de la sonda (168).

El ensayo se llevó a cabo con células Vero cultivadas en microplacas para análisis por fluorescencia bajo las mismas condiciones utilizadas en el ensayo de viabilidad celular. Una vez finalizado el período de incubación de 22 horas para que las células se adhirieran se procedió a lavar las células dos veces con PBS y seguidamente se añadieron 100 μL de soluciones en medio de cultivo con concentraciones de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos, o 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quercetina (control positivo). Dichas concentraciones se utilizaron luego de determinarse que los extractos y la quercetina a niveles de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, permiten una viabilidad celular superior al 80 %. También se incluyeron pozos control a los cuales se les añadió medio de cultivo sin extractos ni quercetina.

Posteriormente, la microplaca fue incubada durante 22 horas. Luego se procedió a lavar las células dos veces con PBS y se les añadió 100 μL de medio libre de rojo fenol (medio de cultivo utilizado también en los pasos subsecuentes) con la sonda H2DCFDA 100 μM a cada pozo. La placa fue incubada durante 1 hora para promover la internalización y desacetilización de H2DCFDA a nivel intracelular. Seguidamente, las células se lavaron una vez con PBS y se procedió a la adición de 100 μL de medio de cultivo con TBHP (inductor de estrés oxidativo) 150 μM a los pozos con células tratadas con extractos o quercetina y a la mitad de los pozos control con células tratadas únicamente con medio de cultivo (pozos control con 100 % de generación de ROS). La otra mitad de los pozos control fue tratada con 100 μL de medio de cultivo sin TBHP (pozos control del nivel basal de producción de ROS a nivel intracelular). La microplaca fue incubada a 37 °C a una atmósfera al 5 % de CO_2 durante 15 minutos, posteriormente la fluorescencia de los pozos fue medida a una longitud de onda de excitación 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 535 nm.

El valor promedio de la fluorescencia de los pozos control del nivel basal de producción de ROS intracelular se le resta al valor de fluorescencia de los pozos restantes y se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición de ROS (IROS) intracelulares con la ecuación 7. En dicha ecuación F_C es la fluorescencia promedio de

los pozos control con 100 % de generación de ROS inducida, F_M es la fluorescencia promedio de los pozos tratados con extractos o quercetina. La prueba se repitió por quintuplicado. Los resultados se reportan como el promedio de porcentaje de inhibición obtenido a cada concentración de extracto o quercetina con el respectivo valor de error estándar

$$\% \text{ IROS} = [(F_C - F_M) / F_C] \cdot 100$$

Ecuación 7. Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición de la generación de ROS (IROS) a nivel intracelular en células Vero.

4.9. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*:

Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizaron cultivos de 24 horas de las siguientes cepas de prueba: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC BAA-2452), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (conocida como *S. typhimurium*) (ATCC 14028). *E. faecalis* se cultivó en medio agar infusión cerebro corazón mientras el resto de los microorganismos se cultivaron en agar soya tripticasa. Estos cultivos se emplearon para preparar las suspensiones bacterianas utilizadas en los ensayos de microdilución.

Las dos primeras cepas mencionadas corresponden a bacterias productoras de biopelículas. La cepa *E. coli* (ATCC BAA-2452) es portadora de la enzima metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi-1, la cual le confiere resistencia ante los fármacos β -lactámicos, incluidos carbapenemos. Esta cepa de *E. coli* también tiene resistencia reportada contra aminoglicósidos. El resto de las cepas corresponden a bacterias de referencia para medir la actividad de agentes antimicrobianos y su inclusión es de utilidad para el análisis del espectro de actividad de los extractos frente a patógenos oportunistas (169).

Los ensayos de microdilución con cada cepa de prueba se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda (170) con

modificaciones. Alícuotas de 50 μL de una suspensión bacteriana en caldo de cultivo con una densidad de microorganismo de entre 4×10^5 y $1,6 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), se colocaron en pozos de una microplaca de poliestireno de fondo redondo estéril de 96 pozos. Posteriormente se añadieron 50 μL de diluciones dobles seriadas estériles de los extractos para alcanzar una concentración final en los pozos de entre 1,25 y 10 mg/mL. Como control positivo se utilizaron pozos con bacteria a los que se le añadieron 50 μL de diluciones dobles seriadas estériles de ceftriaxona disódica (para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* y *P. aeruginosa*) o clorhidrato de ciprofloxacina (*E. coli* y *E. faecalis*) con concentraciones máximas de prueba de 64 $\mu\text{g/mL}$ y 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Tanto las diluciones de ceftriaxona disódica como la de los extractos se prepararon en caldo de cultivo. Para los ensayos de microdilución con *E. faecalis* se empleó caldo infusión cerebro corazón como medio líquido mientras que para el resto de las cepas se utilizó caldo Müller-Hinton con ajuste catiónico.

Como control de la esterilidad del proceso de preparación de la microplaca se utilizaron pozos a los que se les añadió únicamente 100 μL caldo de cultivo. Una vez preparada, la microplaca se cubrió con su tapa y se incubó por 20 horas a 35 ± 2 °C. Luego del período de incubación, se procedió a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos y de los controles, la cual se define como la concentración final más baja en los pozos que no permite crecimiento bacteriano observable. El ensayo se llevó a cabo al menos por triplicado con cada extracto y con el respectivo control positivo sobre cada una de las cepas de prueba.

De manera consecutiva al ensayo de microdilución, se tomaron alícuotas de 50 μL de aquellos pozos tratados con los extractos sin crecimiento bacteriano observable. Las alícuotas se colocaron en placas de Petri estériles y se les añadieron 20 mL de agar tripticasa soya estéril a $45-55$ °C a cada placa seguido de agitación. Seguidamente, la placa se cubrió y el agar se dejó solidificar a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas. Después del período de incubación, se procedió a la determinación de las UFC en cada placa. La concentración

mínima bactericida (CMB) se define como la concentración mínima del agente antibacteriano analizado en los pozos del ensayo de microdilución que elimina el 99,9 % de las colonias bacterianas colocadas inicialmente en los pocillos (170). Los datos se reportan como el promedio con el correspondiente valor de error estándar.

4.10. Análisis estadístico de resultados:

Los valores de área bajo la curva descritos en los métodos ORAC y ERYCA se calcularon utilizando el programa Gen 5 3.09. Los cálculos de IC_{50} así como los análisis de regresión lineal se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 9.4. Esta última aplicación también se utilizó para calcular los valores promedio y datos de error estándar de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, para la construcción de gráficos relacionados con dichos datos.

Los análisis de comparación de los resultados de los extractos se establecieron mediante pruebas t de Student (comparaciones entre dos grupos o tratamientos) o análisis de varianza (ANOVA) de una vía con pruebas *post hoc* de Tukey (comparaciones de resultados de tres o más tratamientos). En los casos en que no se cumplió la igualdad de varianzas de acuerdo con la prueba de Brown-Forsythe, se utilizó ANOVA de Welch con pruebas *post hoc* T3 de Dunnett. Las comparaciones *post hoc* de los resultados de actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos con respecto a los controles se determinó mediante pruebas de comparación múltiple de Dunnett. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa GraphPad Prism 9.4.

La aplicación GraphPad Prism 9.4 también se utilizó para los análisis de correlación de Spearman entre los datos de determinación de compuestos fenólicos bioactivos mediante HPTLC, cuantificación de compuestos fenólicos (TPC, TFC, TMA) y los resultados de cada ensayo *in vitro* de actividad antioxidante. En el caso específico de la prueba de determinación del potencial reductor de ROS a nivel intracelular, los datos utilizados para el análisis de correlación corresponden al

porcentaje de reducción de los niveles intracelulares de ROS (IROS) a la concentración de prueba de los extractos de 100 µg/mL.

Adicionalmente, para los análisis de correlación se crearon dos variables determinadas para cada extracto correspondientes a la sumatoria de compuestos fenólicos cuantificados mediante ensayos HPTLC (SCF) y el índice de actividad antibacteriana (IAB). La última variable consiste en el cociente de dividir el número o cantidad de cepas de prueba sobre las que el extracto demostró actividad entre el valor promedio de CMI demostrado sobre las cepas susceptibles. Dicho indicador se utilizó como una medición general de la actividad antibacteriana de los extractos. Esta variable se creó con la finalidad de reducir la varianza total de los datos en los análisis de componentes principales (PCA) realizados posteriormente. En el cuadro A5 de los anexos se muestra el valor numérico de SCF y IAB.

La aplicación STATISTICA 8.0 se empleó para la realización de análisis de componentes principales (PCA) sobre las mismas variables incluidas en los análisis de correlación de Spearman. Para ello se utilizó el método de unidades estandarizadas. Para los diferentes análisis estadísticos se utilizó un valor de significancia de $\alpha = 0,05$.

5. Resultados y discusión:

5.1. Determinación de compuestos biológicos bioactivos por cromatografía HPTLC:

En la figura 3 se presentan cromatogramas de referencia para la detección de compuestos fenólicos bioactivos mediante los análisis HPTLC. En la sección 8.5 de los anexos se muestran los densitogramas que confirman la presencia o ausencia de los compuestos sujetos a análisis. En general, los extractos presentan perfiles cromatográficos complejos en términos de la cantidad de bandas de diferentes componentes que son posibles de observar en los cromatogramas. Es debido a esta complejidad que en la mayoría de los casos fue necesario de sistemas cromatográficos con doble fase de elución con el propósito de tener un grado de separación aceptable para las bandas de los compuestos analizados, estrategia que ha sido reportada previamente por otros autores en circunstancias similares (171,172).

La quercetina fue detectable en los extractos PAH-20, HH-20 y FL-20. Mientras que el kaempferol se detectó en PEH-20, PAH-20 y FL-20. Con respecto a los extractos elaborados con las hojas recolectadas en 2021, las cuales fueron sometidas a secado bajo diferentes técnicas, los tres extractos (HL-21, HH-21 y HS-21) resultaron positivos para quercetina y kaempferol. La rutina fue detectada en todos los extractos a excepción de PEH-20 y RH-20, mientras que la isoquercetina pudo detectarse en HH-20 y HL-21.

Los flavonoides quercetina y kaempferol son metabolitos secundarios caracterizados por demostrar diversas actividades biológicas, que incluyen efectos antioxidantes, antibacterianos, antiinflamatorios, antineoplásicos, antiarterioscleróticos y ansiolíticos, entre otros (173-178). La presencia de estos metabolitos ha sido reportada entre diferentes especies del género *Impatiens*, incluyendo a *I. balsamina*, *I. glandulifera*, *I. textori*, *I. walleriana* e *I. noli-tangere*, las cuales son reconocidas como plantas medicinales de interés farmacológico (179). Frutos y otras plantas reconocidas por su alta actividad antioxidante también presentan dichos compuestos, entre las que

se puede mencionar los cítricos, diferentes bayas, como las moras (*Morus spp.*, *Rubus spp.*), los arándanos (*Vaccinium spp.*) y las cerezas (*Pronus spp.*), el té verde (*Camellia sinensis*) y las hojas de *Ginkgo biloba* (180-182). La quercetina puede encontrarse en las plantas del género *Impatiens* en forma de glicósidos, por ejemplo, los compuestos rutina e isoquercetina (179). Dichos metabolitos también se caracterizan por ser relevantes desde el punto de vista farmacológico. Entre sus propiedades reportadas se encuentran su actividad antibacteriana y antioxidante (183-185).

Por otra parte, la lawsona fue detectable únicamente en los extractos HL-21 y HS-2, mientras que 2-MNQ no se detectó en ninguno de los extractos bajo estudio. La lawsona corresponde a una naftoquinona bioactiva identificada en plantas del género *Impatiens* entre las que se incluye a *I. glandulifera*, *I. balsamina*, *I. capensis*, *I. nolitangere*, *I. pallida* e *I. parviflora* (179). Este compuesto se caracteriza por presentar actividad antimicrobiana y antioxidante (186-188). Además, 2-MNQ es una de las principales sustancias activas que han sido identificadas entre diferentes plantas del género *Impatiens* de interés medicinal, entre las que destacan *I. balsamina* e *I. glandulifera* (179). Dicha naftoquinona se caracteriza por su relevante actividad antimicrobiana (188,189).

Existen diferentes factores que podrían explicar la ausencia de 2-MNQ en los extractos analizados entre los que se pueden incluir factores genéticos y epigenéticos de la especie estudiada, estadio fenológico de los especímenes recolectados y factores ambientales. Los genes que codifican para las enzimas implicadas en la biosíntesis completa de 2-MNQ podrían estar ausentes o silenciados mediante mecanismos epigenéticos, la fase de crecimiento de la planta podría no ser la óptima para la expresión del metabolito e inclusive las condiciones ambientales en las que se cultiva la planta podrían tener influencia en dicho proceso. Estos son factores que pueden afectar la expresión de metabolitos secundarios en plantas medicinales y en especies del género *Impatiens* (190-193). Sin embargo, estas hipótesis deben ser verificadas experimentalmente, aspecto que se aleja de los objetivos de la presente investigación.

A pesar de ello los resultados obtenidos pueden sentar la base para justificar futuras investigaciones en la materia.

De las sustancias determinadas mediante los ensayos cromatográficos, la escopoletina fue la única en ser detectada en todos los extractos examinados. La presencia de la cumarina escopoletina ha sido reportada previamente en al menos dieciséis plantas del género *Impatiens* (179,194). Esta molécula ha demostrado diferentes efectos biológicos entre las que se encuentran propiedades antineoplásicas, antioxidantes y antimicrobianas (195,196).

Debe considerarse que los análisis cromatográficos establecidos mediante la técnica HPTLC permiten definir una detección de carácter tentativa basada en los valores de Rf y longitudes de onda de máxima absorbancia o emisión de fluorescencia. Sin embargo, otras técnicas más avanzadas, como las técnicas cromatográficas acopladas a detectores de masas, pese a aportar más información para designar la posible identidad de un compuesto, pueden tener la misma limitación al contribuir con una identificación que es de carácter tentativa con la posibilidad de falsos positivos o falsos negativos, esto pese a ser más sensibles, específicas y tener la posibilidad de ser asistidas con bases datos especializadas en la identificación de compuestos (197-201). A pesar de lo indicado anteriormente, los resultados obtenidos pueden ser de utilidad para orientar estudios posteriores de separación y purificación de los compuestos detectados tentativamente en partes específicas de *I. hawkeri*, esto con el objetivo de realizar estudios espectroscópicos que confirmen su identidad química.

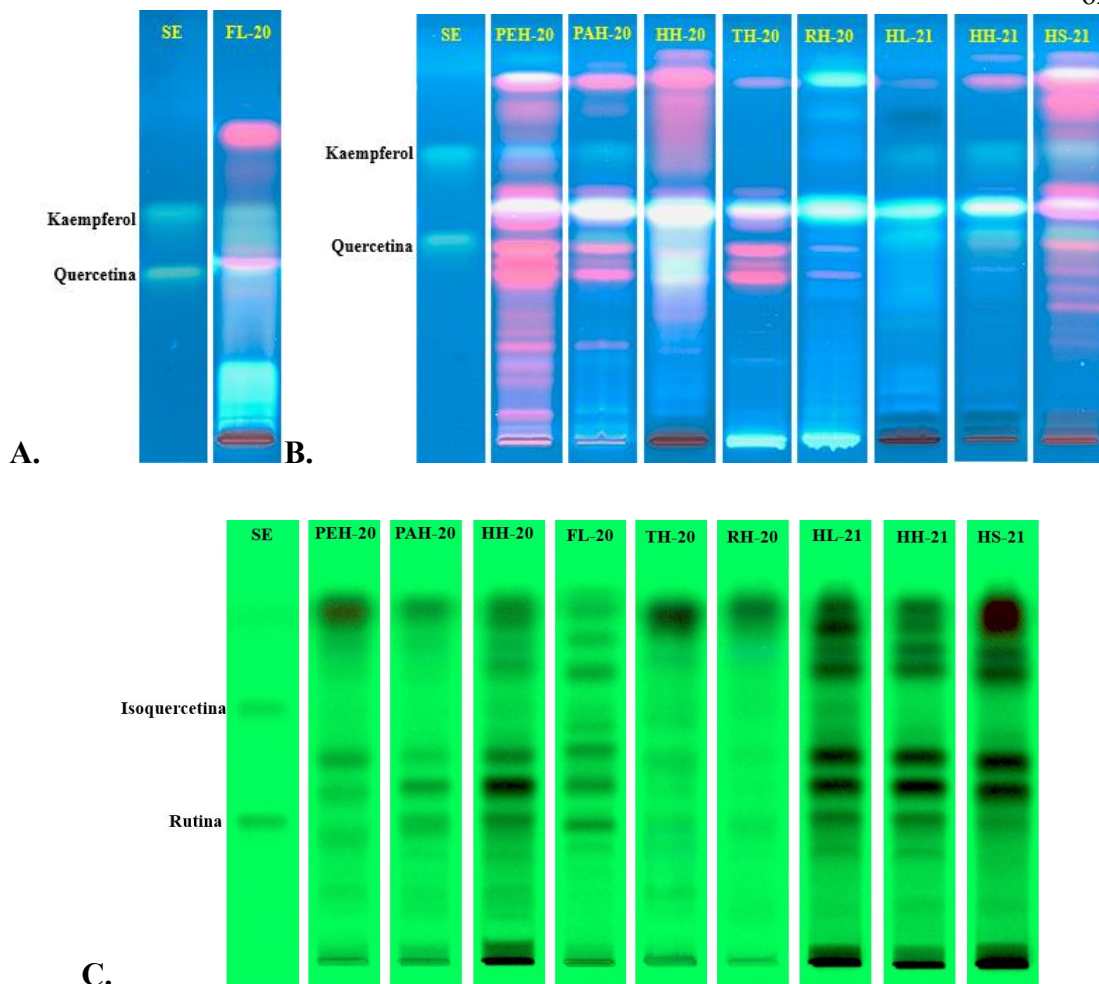


Figura 3. Cromatogramas para la determinación de quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, lawsona, 2-MNQ y escopoletina. A. Cromatogramas observados bajo luz UV de 366 nm de longitud de onda después de desarrollar la placa cromatográfica con la fase móvil 1. B. Cromatogramas observados bajo luz UV de 366 nm de longitud de onda después del desarrollo consecutivo de la placa cromatográfica con la fase móvil 1 y la fase móvil 2. C. Cromatogramas observados bajo luz UV de 254 nm de longitud de onda después del desarrollo de la placa cromatográfica con la fase móvil 3.

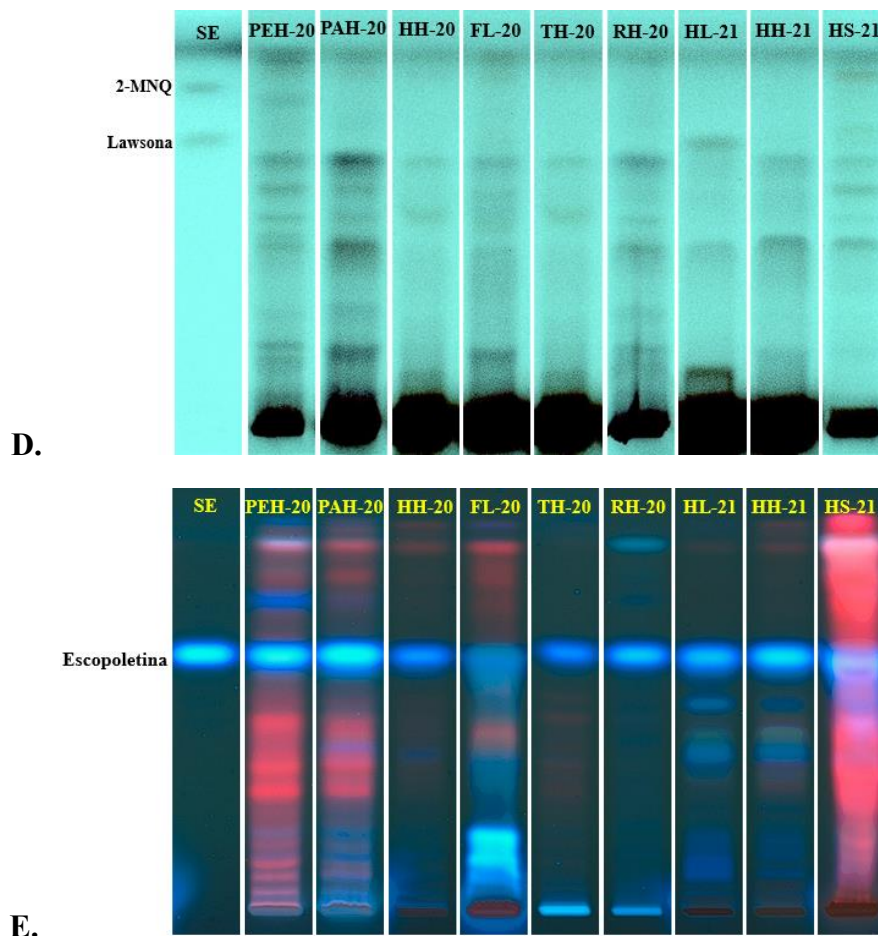


Figura 3 (continuación). Cromatogramas para la determinación de quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, lawsona, 2-MNQ y escopoletina. D. Cromatogramas observados bajo luz UV de 254 nm de longitud de onda después del desarrollo consecutivo con las fases móviles 4 y 5. E. Cromatogramas observados bajo luz UV de 366 nm de longitud de onda después del desarrollo consecutivo con las fases móviles 6 y 7.

Los cromatogramas y densitogramas obtenidos resultan útiles en términos de la información cualitativa que aportan. Sin embargo, para obtener más información en la relación con la distribución de los metabolitos de interés es necesario considerar también las cantidades de estos compuestos presentes en los diferentes extractos. Con este propósito se realizaron ensayos cuantitativos mediante cromatografía HPTLC. En el cuadro A4 de los anexos se presentan parámetros analíticos para los sistemas cromatográficos utilizados.

En el cuadro V se resumen los resultados de la cuantificación de compuestos bioactivos en los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*. Los resultados demuestran que los metabolitos se distribuyen heterogéneamente en las diferentes partes anatómicas de la planta, tanto cualitativamente como cuantitativamente. La quercetina se encontró en mayor concentración en PAH-20. La mayor concentración de quercetina en PAH-20 puede explicarse por el hecho de que el material de partida para la preparación de dicho extracto contiene flores que representan aproximadamente un 10% del peso de las partes aéreas de la planta (para más información ver tabla A1 de los anexos). Las flores pueden contener glicósidos de quercetina, como la rutina, estos compuestos pueden hidrolizarse durante la etapa de secado a 70 °C liberando quercetina, factor que no aplica en el caso de FL-20 pues la técnica de secado utilizada fue liofilización. Esta hipótesis es consistente con los altos niveles de rutina (glicósido de quercetina) determinados en FL-20.

En el caso del kaempferol, este compuesto se encontró en mayor cantidad en PAH-20, seguido de PEH-20. Nuevamente, la mayor cantidad de kaempferol en PAH-20 y PEH-20 podría explicarse por la presencia de glicósidos de kaempferol en las flores que formaron parte del material vegetal de partida las cuales representan aproximadamente un 10% y 8% del peso de dicho material, respectivamente. La hidrólisis de dichos glicósidos durante el secado por aplicación de energía térmica puede contribuir a la mayor cantidad de kaempferol encontrada en PAH-20 y PEH-20 en comparación con FL-20. La rutina se encontró en mayor cantidad en FL-20. Mientras que la isoquercetina únicamente fue cuantificable en HH-20. Los resultados de cuantificación sugieren que en el caso de PAH-20, HH-20, FL-20 y TH-20, la quercetina se encuentra predominantemente en forma de glicósido. La escopoletina se encontró en mayores concentraciones en RH-20. Por su parte, la lawsona no fue detectable en ninguno de los extractos preparados con material recolectado en el año 2020. Sin embargo, como se discute más adelante, fue cuantificable en extractos de hojas de *I. hawkeri* recolectadas en 2021.

Cuadro V. Contenido de compuestos fenólicos bioactivos en los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*.

Extracto	Contenido (mg/g)				
	Quercetina	Kaempferol	Rutina	Isoquercetina	Escopoletina
PEH-20	N.D	0,19±0,01 ^A	N.D	N.D	0,47±0,03 ^A
PAH-20	0,42 ±0,01 ^A	0,30±0,01 ^A	2,68±0,07 ^A	N.D	0,78±0,02 ^B
HH-20	0,17±0,01 ^B	N.D	4,58±0,09 ^B	1,65±0,11	1,35±0,04 ^C
FL-20	0,03±0,01 ^{C*}	0,17±0,01 ^B	23,80±0,78 ^C	N.D	0,05±0,00 ^D
TH-20	N.D	N.D	0,24±0,03 ^D	N.D	0,41±0,06 ^A
RH-20	N.D	N.D	N.D	N.D	2,24±0,04 ^E

N.D: No detectado, *Valor debajo del límite de cuantificación. Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La heterogeneidad observada en la distribución cualitativa y cuantitativa de los metabolitos fenólicos entre los extractos de diferentes partes anatómicas es consistente con los resultados reportados en estudios previos con plantas del género *Impatiens*. Por ejemplo, Lobstein *et al.* (202) reporta que las hojas, tallos y flores de *I. glandulifera* pueden tener diferencias significativas en su contenido de lawsona, inclusive, dependiendo de la época de recolección, este metabolito es únicamente detectable en las hojas de dicha planta, lo cual coincide con los resultados encontrados en el presente estudio. Szewczyk & Olech (203) reportan variaciones cualitativas y cuantitativas significativas entre la composición de ácidos fenólicos en los extractos metanólicos de hojas, raíces o flores de *I. glandulifera*. Chua (204) describe diferencias en el perfil cromatográfico de los extractos metanólicos de tallos y hojas de *I. balsamina*, siendo el extracto de hojas positivo para kaempferol, quercetina, isoquercetina y lawsona, mientras que el extracto de tallo solo presentó lawsona entre los cuatro componentes mencionados. Este tipo de contraste no es exclusivo de las plantas del género *Impatiens*, por ejemplo, se han reportado diferencias en el perfil de compuestos fenólicos para los extractos obtenidos de diferentes partes anatómicas de

otras plantas medicinales farmacológicamente relevantes como es el caso de la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) y de *G. biloba* (205,206).

Las técnicas de secado del material vegetal utilizado para la preparación de los extractos pueden tener influencia en su perfil de composición de metabolitos secundarios. La técnica de liofilización, la cual se realiza a temperaturas cercanas o a los $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, normalmente se asocia a la protección de los metabolitos termolábiles a procesos de hidrólisis o degradación térmica. El secado a la sombra se emplea con el propósito de tener un sistema de bajo coste energético que permita la protección del material ante la incidencia directa de la radiación solar, la cual podría degradar metabolitos de la planta. El secado mediante la aplicación de calor asistida con hornos de convección natural, como en la presente investigación, o convección mecánica constituye un método que favorece un secado rápido del material que es adecuado sobre todo cuando los metabolitos activos son poco sensibles a procesos de degradación mediados por la aplicación de calor. Además, tanto la aplicación de calor como el secado por liofilización pueden contribuir a la inactivación de enzimas con actividad oxidasa, glicosidasa y peroxidasa que se pueden encontrar de manera natural en el material vegetal de interés. Estas proteínas son capaces de degradar compuestos fenólicos reduciendo la actividad biológica de extractos derivados del material de partida (207-209).

Por lo anteriormente descrito, se suele asumir que el secado por liofilización favorece un mayor rendimiento de metabolitos secundarios debido a la inactivación de enzimas degradativas y al establecimiento de condiciones que reducen su descomposición térmica. Sin embargo, esta generalización no se cumple en todos los casos, por lo que es posible establecer que los rendimientos dependen del material vegetal específico que se esté estudiando y de los metabolitos particulares de interés (210-211). Esto puede ser explicado por el hecho de que la hidrólisis mediada por la aplicación de calor puede provocar que compuestos más simples con actividad biológica se produzcan a partir de otros más complejos como lo pueden ser moléculas glicosídicas y la lignina (207,212). Inclusive, se ha propuesto que la aplicación de calor

puede activar glicosidasas moduladas por el calor ambiental, una vez activadas, estas enzimas catalizan la degradación de glicósidos a su forma no glicosídica (aglicona) lo que puede explicar incrementos en las cantidades de estos últimos en el material vegetal seco en comparación con el material de partida (213). Además, en otros casos se ha reportado que la aplicación de calor puede ser más eficiente en la inactivación de enzimas degradativas de compuestos fenólicos del material vegetal con respecto al secado a bajas temperaturas mediante liofilización (209).

Como se explicó anteriormente y se amplía en las próximas secciones, las hojas junto con las flores corresponden a las partes anatómicas de *I. hawkeri* con mayor potencial como material de vegetal de partida para obtención de extractos con actividad antioxidante y antibacteriana. Sin embargo, las flores constituyen una parte relativamente escasa de la planta en contraposición con las hojas. Por lo anterior, se procedió a estudiar el efecto de la técnica de secado de las hojas sobre la composición y actividades de los extractos derivados de este material.

En el cuadro VI se reportan los valores de los metabolitos cuantificados en los extractos preparados con hojas sometidas a secado bajo diferentes técnicas. El kaempferol y la quercetina se encontraron en mayor concentración en HS-21 (secado a la sombra). En el caso de los contenidos de rutina y escopoletina, HH-21 tuvo mayores niveles de dichos metabolitos. La isoquercetina fue únicamente cuantificable en HL-21 (secado por liofilización a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Mientras la concentración más alta de lawsona fue determinada en HL-21 seguido por HS-21, en el extracto HH-21 no fue detectable dicho compuesto.

Cuadro VI. Contenido de compuestos fenólicos bioactivos en los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado bajo diferentes técnicas.

Extracto	Contenido (mg/g)					
	Quercetina	Kaempferol	Rutina	Isoquercetina	Lawsona	Escopoletina
HL-21	0,65±0,02 ^A	0,26±0,01 ^A	5,51±0,16 ^A	2,88±0,14	0,99±0,04 ^A	0,81±0,02 ^A
HH-21	2,03±0,06 ^B	0,76±0,01 ^B	9,74±0,32 ^B	N.D	N.D	1,42±0,05 ^B
HS-21	2,72±0,05 ^C	1,70±0,03 ^C	2,53±0,08 ^C	N.D	0,13±0,00 ^B	0,16±0,01 ^C

N.D: No detectado. Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los resultados reportados en el cuadro VI demuestran que cada tipo de compuesto bioactivo es afectado en diferente magnitud por el tipo de técnica de secado que se utiliza. Esta heterogeneidad es consistente con datos indicados en la literatura para otros estudios. Nunes *et al.* (214) reporta mayores niveles de quercetina y rutina en el polvo obtenido de guayabas (*Psidium guajava*) sometido a secado al horno a 55 °C con respecto al polvo obtenido de frutos secados por liofilización. Mohapatra *et al.* (215) ha determinado mayores niveles de quercetina y kaempferol en las hojas de *Centella asiatica* secadas a la sombra con respecto a hojas que han sido secadas con horno a 60 °C. Datos de estudios comparativos de condiciones de secado demuestran que la isoquercetina puede encontrarse en mayores cantidades en materiales vegetales sometidos a menores temperaturas de secado (216,217), esto puede explicar que dicha sustancia solamente se pudo cuantificar en HL-21 entre los extractos producidos a partir de hojas recolectadas en febrero de 2021.

Bennaceur *et al.* (218) ha determinado que el contenido de lawsona en las hojas de henna (*Lawsonia inermis*) decae conforme se incrementa la temperatura de secado. Esta observación es consistente con los resultados de cuantificación de lawsona en los extractos estudiados, pues este compuesto se encontró en mayores concentraciones en HL-21 seguido por HS-21 para los cuales el secado de las hojas de *I. hawkeri* se realizó a -50 °C y a temperatura ambiente, respectivamente, mientras que

en HH-21, para el cual el secado del material vegetal se realizó a 70 °C, no se detectó el compuesto.

En el caso de la escopoletina, la cual corresponde a una cumarina, se ha determinado que el secado del tubérculo de yuca (*Manihot esculenta*) al horno a 50 °C permite obtener mayores contenidos con respecto al secado a la sombra (219). Además, se ha observado mejores rendimientos en el contenido de cumarinas totales en las raíces de *Angelica dahurica* secadas con aire caliente a 50 °C en comparación con el mismo tipo de material sometido a secado a la sombra (220). Los resultados de otro estudio con el mismo material vegetal demuestran que el secado con aplicación de aire caliente a 100 °C permite mayores rendimientos de cumarinas, en comparación con el secado por liofilización y el secado a la sombra (221). Esta tendencia en el contenido de cumarinas es consistente con la observada para los datos de cuantificación de escopoletina en los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado por diferentes técnicas.

Con la finalidad de evaluar la relevancia de las concentraciones halladas de los metabolitos fenólicos analizados mediante ensayos HPTLC, vale la pena hacer comparaciones con datos reportados para extractos secos obtenidos de plantas reconocidas por su actividad antioxidante y/o antimicrobiana. El contenido de quercetina determinado en los extractos sujetos a análisis oscila en un rango de 0,03 mg/g a 2,72 mg/g para aquellos en los que fue detectable dicho metabolito (cuadros V y VI). Otros extractos de plantas medicinales presentan cantidades de quercetina en dicho rango o inclusive menores. El extracto obtenido por reflujo de las hojas de té verde con etanol tiene cantidades de 0,01 mg/g de quercetina (222). Los extractos de hojas de mirto común (*Myrtus communis*) obtenidos por maceración con alcohol al 80 % v/v contienen hasta 0,77 mg/g de quercetina (217). Para el extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido de las partes aéreas de la hierba de San Juan con metanol al 80 % v/v se reportan niveles de 0,42 mg/g (206). Mientras que para diferentes extractos comerciales de hojas de *G. biloba* se reportan valores de

quercetina de entre 1,1 mg/g y 63,6 mg/g en los productos en que fue detectable dicho flavonoide (223).

La concentración de kaempferol en los extractos de *I. hawkeri* positivos para este compuesto se encontró en el rango de 0,17 mg/g y 1,70 mg/g. Los niveles de kaempferol hallados, principalmente los de HS-21, son superiores o se encuentran dentro de los valores reportados para extractos de otras plantas relevantes desde el punto de vista farmacológico. Por ejemplo, los extractos de hojas de mirto común obtenidos por maceración con alcohol al 80 % v/v tienen contenidos de hasta 0,16 mg/g de kaempferol (217). Para diferentes extractos comerciales de hojas de *G. biloba* se han determinado valores de kaempferol de entre 1,5 mg/g y 37,8 mg/g en los productos en que fue detectable dicho metabolito (223). El extracto obtenido de hojas de guayaba por percolación continua con metanol al 70 % v/v contienen 0,30 mg/g de kaempferol (224). Mientras los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y de salvia (*Salvia officinalis*) obtenidos por digestión con etanol al 80 % v/v contienen 0,02 mg/g y 0,05 mg/g de kaempferol, respectivamente (225).

En relación con el contenido de la rutina, los extractos de *I. hawkeri* analizados presentaron valores de entre 0,24 mg/g y 23,80 mg/g. Exceptuando TH-20, los valores de este metabolito en los extractos de *I. hawkeri* se ubican en el rango de concentración reportado para extractos comerciales de *G. biloba*, el cual va de 0,9 mg/g a 45,6 mg/g. (223). Los extractos de *I. hawkeri* presentan concentraciones más bajas con respecto al extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido de las partes aéreas de la hierba de San Juan con metanol al 80 % v/v (65,08 mg/g) (206). Sin embargo, todos los extractos de *I. hawkeri*, con la excepción de TH-20, presentan mayores niveles con respecto al extracto de romero obtenido por digestión con etanol al 80 % v/v el cual contiene 0,35 mg/g de rutina. Además, los extractos estudiados presentan mayores cantidades de kaempferol con respecto al extracto de salvia obtenido por digestión con etanol al 80 % v/v. Dicho extracto presenta una concentración de rutina de 0,06 mg/g (225).

La isoquercetina se cuantificó en niveles de 1,65 mg/g y 2,88 mg/g en HH-20 y HL-21, respectivamente. Dichos valores son mayores a los reportados para los extractos de hojas de mirto común obtenidos por maceración con alcohol al 80 % v/v, los cuales tienen contenidos de hasta 0,24 mg/g de isoquercetina (217). Los niveles de isoquercetina de HH-20 y HL-21 también son superiores con respecto a los del extracto acuoso de moras (*Morus alba*) obtenido mediante la técnica de aplicación de alta presión hidrostática, el cual contiene 0,03 mg/g de isoquercetina (226). HL-21 demostró niveles de isoquercetina superiores a los reportados para el extracto de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) obtenido mediante maceración con etanol al 70 % v/v, para el cual se reporta una concentración de 2,18 mg/g (227).

Los extractos HL-21 y HS-21 presentaron contenidos de lawsona de 0,99 mg/g y 0,13 mg/g, respectivamente. En el caso de HL-21 la concentración supera a la reportada para el extracto de hojas de henna obtenido por reflujo con metanol (0,49 mg/g) (228). En relación con extractos de otras plantas del género *Impatiens*, HL-21 posee un contenido de lawsona en el rango de concentración reportado para los extractos preparados por reflujo de las hojas de *I. balsamina* con cloroformo al 50 % v/v en metanol, el cual oscila entre 0,47 mg/g y 2,9 mg/g (229,230). La cantidad de lawsona determinada en HL-21 es cercana a los niveles reportados para el extracto de hojas de *I. balsamina* obtenido mediante extracción por percolación continua con metanol, la cual corresponde a 0,98 mg/g (231).

La presencia de lawsona en los extractos establece la necesidad de valorar la toxicidad de los extractos de hojas de *I. hawkeri*, pues pese a que la lawsona es una molécula bioactiva, también se considera tóxica (232,233). Por ser una quinona se ha planteado que la lawsona y los extractos de hojas y raíces de henna, las fuentes naturales más conocidas de este metabolito pueden ser prooxidantes, citotóxicos y mutagénicos (232,234). A pesar de ello, los estudios experimentales demuestran resultados contradictorios al punto de que hoy en día se considera necesaria más investigación con la finalidad de esclarecer la capacidad mutagénica de los extractos de henna que presentan lawsona, esto pese a que la mayoría de los estudios en células

y en animales indican que los extractos de henna con este metabolito no son mutagénicos (232,235).

Por otra parte, diversos extractos de plantas que contienen lawsona, utilizadas como material comestible o como remedios tradicionales, han demostrada baja toxicidad en roedores, tal y como es el caso de la henna y de *I. balsamina* (153,235-239), por lo que la presencia de la lawsona en los extractos de hojas de *I. hawkeri* no implica necesariamente un nivel toxicidad alto. Sin embargo, la determinación de la toxicidad en modelos *in vivo* para los extractos de *I. hawkeri*, que debería hacerse en estudios futuros si se quiere la aplicación medicinal de los mismos, deben prestar especial atención a signos de toxicidad vinculados con reacciones adversas observados para la lawsona administrada en roedores de forma pura, como lo son esplenomegalia, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y hemólisis (233,240,241).

Los niveles de escopoletina determinados para los extractos de *I. hawkeri* se ubican en el rango de 0,05 mg/g a 2,24 mg/g. Estos valores son superiores a los reportados para un extracto metanólicos comercial de flores y hojas de malva (*Malva sylvestris*) el cual contiene 0,03 mg/g de escopoletina (242). Del mismo modo, los extractos de *I. hawkeri* tienen un contenido de escopoletina superior al reportado para un extracto comercial de noni (*Morinda citrifolia*) el cual corresponde a 0,03 mg/g. Los extractos, con las excepciones de FL-20 y HS-21, contienen más escopoletina que capsulas comerciales del mismo fruto para las que se reporta una concentración de 0,22 mg/g (243). Sin embargo, los extractos de *I. hawkeri* presenta valores inferiores de escopoletina a los reportados para el extracto obtenido de las partes áreas de cilantro (*Coriandrum sativum*) por reflujo con etanol al 40 % v/v. Para dicho extracto se ha determinado una concentración de escopoletina de 20,30 mg/g (244).

Debido a que en el resto de la literatura consultada sobre la cuantificación de los compuestos de interés en plantas del género *Impatiens* se indican valores de concentración en términos de peso del material vegetal o de volumen de los extractos no concentrados (extractos no sometidos a secado), no fue posible establecer comparaciones adicionales con los datos reportados, esto debido a que para el presente

estudio se reportan los datos en términos de peso de los extractos (192,202,204,245-248). Las diferencias en la proporción entre solvente y material vegetal, el mayor volumen de los extractos líquidos y las pérdidas que se presentan al preparar extractos secos a partir de extractos líquidos son factores que limitan el poder establecer dichos contrastes.

5.2. Cuantificación colorimétrica de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y antocianinas monoméricas totales (TMA):

En el cuadro VII se resumen los resultados obtenidos para los ensayos colorimétricos para la determinación de TPC, TFC y TMA en los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*. Los datos indican que los compuestos fenólicos y los flavonoides extraíbles se presentan en las hojas de la planta en mayor concentración seguido de las flores. En las raíces y tallos estos compuestos se concentran en menor medida. Con respecto a las partes aéreas y las plantas enteras, se observa como conforme se reduce la proporción de las hojas y flores en el material utilizado para preparar los extractos (para más información se puede consultar la tabla A1 de los anexos), se da una reducción de la cantidad de TPC y TFC en estos últimos. En el caso de las antocianinas, estas se concentran en las flores seguido de las hojas, en el resto de los extractos no fue posible detectar dichos compuestos, posiblemente por la reducción de la proporción de hojas y flores en el peso del material empleado para preparar los extractos.

Cuadro VII. Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y antocianinas monoméricas totales (TMA) en los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*.

Extracto	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	TMA (mg C3GE/g)
PEH-20	15,59±0,31 ^A	23,40±1,55 ^A	N.D
PAH-20	37,79±0,91 ^B	57,97±2,00 ^B	N.D
HH-20	156,49±1,79 ^C	333,66±6,62 ^C	0,14±0,00 ^A
FL-20	124,75±3,93 ^D	100,48±4,02 ^D	4,96±0,08 ^B
TH-20	7,50±0,12 ^A	11,33±0,16 ^A	N.D
RH-20	14,83±0,40 ^A	28,88±1,92 ^{A,E}	N.D

N.D: No detectado. Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Las variaciones en las cantidades de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de plantas del género *Impatiens* en función de la parte anatómica utilizada para su preparación es un aspecto previamente reportado para otras especies. Tal es el caso del extracto obtenido mediante la agitación de flores de *I. balsamina* con acetona, el cual presente niveles de TPC y TFC superiores a los de hojas y tallos preparados bajo la misma metodología (249). Los extractos producidos mediante el reflujo de hojas de *I. balsamina* con etanol al 50 % v/v presentan mayor cantidad de TPC y TFC que el mismo tipo de extracto preparado con tallos (204). La misma tendencia ha sido reportada para los extractos elaborados con las mismas partes de *I. balsamina* preparados por maceración con alcohol al 70 % v/v (153). El análisis de los extractos de semillas, hojas, flores, tallos y raíces de *I. chinensis* preparados por reflujo con metanol al 90 % v/v acidificado con 1 % v/v de ácido clorhídrico ha demostrado que los niveles de TPC son superiores en las hojas de la planta (250). De acuerdo con la búsqueda bibliográfica realizada, no se encontraron reportes previos sobre estudios comparativos relacionados con la determinación de TMA en extractos preparados de diferentes partes anatómicas de plantas del género *Impatiens*.

Otras plantas cuyos extractos son relevantes por sus propiedades medicinales o nutricionales también presentan diferencias en sus niveles de TPC, TFC o TMA en función de la parte anatómica analizada. En el caso de la quinoa (*Chenopodium quinoa*), se ha reportado que las flores corresponden a las partes en las cuales se han determinado mayores niveles de TPC y TFC (251). Para la caléndula (*Calendula officinalis*) se ha establecido que las flores y hojas son los órganos en los cuales se pueden determinar las cantidades más elevadas de TPC y TFC (252). Por otra parte, se ha observado que hay mayores niveles de TPC, TFC y TMA en las hojas juveniles de moras (*Morus alba*) con respecto a los frutos de la planta (253).

La tendencia a una mayor concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas en las hojas y flores de las plantas podría estar relacionada con el hecho de que, para las hojas, se ha planteado la posibilidad de que se activen mecanismos que fomentan la producción de estos metabolitos como una respuesta de retrocontrol negativo a los procesos prooxidantes que tienen lugar en los cloroplastos durante la fotosíntesis, especialmente ante la exposición excesiva a luz (254,255). En el caso de las flores, la selección natural ha favorecido el desarrollo de coloraciones que resultan atractivas para organismos polinizadores, siendo los flavonoides y las antocianinas pigmentos que pueden ser producidos y participar en la coloración de este órgano vegetal (256-258).

Con respecto a los resultados obtenidos para los extractos de hojas sometidas a diferentes técnicas de secado, en el cuadro VIII se presentan sus datos de TPC, TFC y TMA. Los niveles de TPC y TFC fueron superiores para HL-21, seguido por HH-21 y HS-21. Las antocianinas fueron cuantificables únicamente en HL-21. Estas tendencias permiten plantear la hipótesis de que las enzimas degradativas de los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal son más activas durante el secado a la sombra y que su actividad puede ser inhibida a través de la acción del calor o mediante la aplicación de bajas temperaturas, de manera similar a lo descrito para las hojas de achicoria (*Cichorium intybus*) (209). Además, los datos obtenidos revelan que,

en términos generales, los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas de las hojas de *I. hawkeri* son sensibles a la aplicación de calor.

Cuadro VIII. Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TFC) y antocianinas monoméricas totales (TMA) en los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas.

Extracto	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	TMA (mg C3GE/g)
HL-21	342,66±2,51 ^A	979,96±25,05 ^A	0,29±0,01
HH-21	232,10±2,93 ^B	534,03±4,93 ^B	N.D
HS-21	165,93±0,52 ^C	344,70±6,53 ^C	N.D

N.D: No detectado. Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En el caso de los datos de TPC y TFC, los mayores valores de esos parámetros para HH-20 en comparación con HS-20 coincide con la tendencia observada para otras plantas de interés medicinal y alimentario. Por ejemplo, los extractos obtenidos por maceración con alcohol al 80 % v/v de hojas de mirto común sometidas a secado a la sombra presentan valores de TPC y TFC más bajos con respecto a los extractos producidas con hojas que han sido secadas con la aplicación de calor con horno a 70 °C (217). Las hojas de mirto limón (*Backhousia citriodora*) secadas mediante liofilización presentan niveles de TPC y TFC superiores a los del mismo material secado al horno a 90 °C, los cuales a su vez son mayores a los de las hojas que han sido secadas a la sombra (259).

Los mayores valores para TPC y TFC cuando se aplica secado mediante liofilización en comparación con el secado mediante la aplicación de calor con horno es una tendencia ampliamente reportada para diferentes tipos de material vegetal, como lo son naranjas (*Citrus sinensis*), frutos de jujuba (*Ziziphus jujube*), hojas de ortiga (*Urtica dioica*) y hojas de té verde (260-263). Esta tendencia puede ser explicada por la protección que ofrece el secado a bajas temperaturas a la degradación enzimática y térmica de los compuestos fenólicos (207-209). Además, los resultados de TMA son

consistentes con la inestabilidad térmica de las antocianinas que ha sido descrita para otro tipo de material vegetal, tal y como es el caso de las bayas (moras, arándanos, frambuesas y moras) (264).

Con la finalidad de evaluar la relevancia de los niveles de TPC, TFC y TMA determinados para los extractos de *I. hawkeri*, vale la pena comparar los resultados con otros reportados para plantas reconocidas por su actividad antioxidante y/o antibacteriana. El extracto de *I. hawkeri* con mayores niveles de TPC y TFC es HL-21, el cual presenta valores de 342,66 mg GAE/g y 979,96 mg/g QE/g, respectivamente. Dicho extracto presenta una cantidad más elevada de TPC con respecto a los valores reportado para los extractos acuosos de hojas de té verde obtenidos por digestión con agua a 70 °C, los cuales oscilan entre 291,14 mg GAE/g y 326,92 mg GAE/g (265). HL-21 también presenta un nivel de TPC más elevado que el reportado para extractos comerciales de *G. biloba*, el cual varía entre 172,17 mg GAE/g y 237,96 mg GAE/g (266). Sin embargo, la concentración de TPC en HL-21 es inferior con respecto a las fracciones fenólicas de jugos de mora microfiltrados pasteurizados o no pasteurizados (*Rubus adenotrichos*), los cuales presentan un valor de TPC de entre 679 mg GAE/g y 714 mg GAE/g (162).

HL-21 presenta mayores valores de TPC y TFC en comparación con los datos reportados para el extracto de los cálices florales de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) producidos por agitación con una mezcla 80:20 etanol:ácido cítrico 1,0 M a 88,2 °C, el cual presenta valores de TPC y TFC de 20 mg GAE/g y 6,76 mg QE/g, respectivamente (267). Mientras los extractos de romero y de salvia obtenidos por digestión con etanol al 80 % v/v presentan una cantidad de TPC de 46,48 mg GAE/g y 41,61 mg GAE/g, respectivamente. Los mismos extractos presentan valores de TFC de 11,89 mg QE/g y 15,03 mg QE/g en el mismo orden indicado (225).

De los extractos analizados, el que presentó mayores niveles de TMA corresponde a FL-20 con 4,96 mg C3GE/mL, dicha cantidad es inferior a la reportada para la fracción fenólica de jugos de mora microfiltrados pasteurizados o no pasteurizado (*Rubus adenotrichos*), los cuales poseen un contenido de TMA

determinado por cromatografía líquida de alto desempeño acoplado a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) de entre 181 mg/g a 195 mg/g (162). Sin embargo, FL-20 presenta un valor de TMA más alto al reportado para el extracto de los cálices florales de Jamaica producido por agitación con una mezcla 80:20 etanol:ácido cítrico 1,0 M a 60 °C, para el cual se registra una concentración de 2,7 mg C3GE/g (267). De manera similar, FL-21 presenta un valor de TMA superior al reportado para el extracto de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) obtenido mediante extracción con agua supercrítica a 130 °C con ácido cítrico al 1 % p/v. Para dicho extracto se reporta un valor de TMA de 0,47 mg G3CE/g (268).

Existen múltiples reportes para la determinación de los valores de TPC y TFC de extractos elaborados con especies del género *Impatiens*. Por ejemplo, el extracto de plantas enteras de *I. hawkeri* preparado por maceración con etanol al 80 % v/v ha demostrado tener mayores niveles de TPC (44,04 mg GAE/g) y TFC (55,02 mg QE/g) con respecto al mismo tipo de extracto preparado con plantas enteras de *I. balsamina* e *I. walleriana* (151). Los extractos de tallos de *I. balsamina* preparados por extracción asistida por ultrasonido con éter de petróleo, éter dietílico, cloroformo, metanol y agua presentan valores de TPC en el intervalo de 2,88 mg GAE/g a 13,63 GAE mg/g, mientras sus niveles de TFC oscilan entre 0,98 mg QE/g y 7,87 mg QE/g (238). Los extractos obtenidos por la maceración de las hojas o tallos de *I. balsamina* con etanol al 70 % v/v contienen valores de TPC y TFC máximos de 103,94 mg GAE/g y 104,28 mg QE/g, respectivamente (153). Los extractos producidos mediante el reflujo de hojas o tallos de *I. balsamina* con etanol al 50 % v/v presentan niveles de TPC entre 2,85 mg GAE/g y 4,96 mg GAE/g (204). El extracto obtenido de las flores de *I. balsamina* por percolación continua con metanol presenta contenidos de TPC y TFC de 103,23 mg GAE/g y 64,69 mg QE/g, respectivamente (269). El extracto de hojas de *I. walleriana* preparado por agitación con metanol presenta una concentración de TPC de 67,57 mg GAE/g (270).

Con base a la revisión de datos indicados en el párrafo anterior, se puede observar que en la mayoría de los casos HL-21 presenta mayores niveles de TPC y TFC

con respecto a los reportados previamente para otros extractos de plantas del género *Impatiens*, sin embargo, hay algunas excepciones. El análisis de los extractos de semillas, hojas, flores, tallos y raíces de *I. chinensis* preparados por reflujo con metanol al 90 % v/v acidificado con 1 % v/v de ácido clorhídrico ha demostrado cantidades de TPC en un rango de entre 112,65 mg GAE/g y 858,43 mg GAE/g (250). En el caso del extracto de flores *I. balsamina* obtenido por agitación con acetona se reportan valores de TPC y TFC de 1692,46 mg GAE/g y 1139,97 mg QE/g, respectivamente (249). El extracto de plantas enteras de *I. bicolor* preparado con extracción por percolación continua presenta un nivel de TPC de 532 mg GAE/g (271).

En relación con los datos de TMA, FL-20 corresponde al extracto con el valor más alto para dicho parámetro. Este extracto presenta valores inferiores a los reportados para extractos obtenidos de otras plantas del género *Impatiens*. Entre ellos se encuentran los extractos de flores de *I. balsamina* e *I. walleriana* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v con 0,5 % de ácido trifluoroacético, los cuales presenta un nivel de antocianinas de entre 14,4 mg/g y 19 mg/g según la sumatoria de antocianinas individuales determinadas mediante análisis por cromatografía líquida de alto desempeño acoplada a detector de arreglo de diodos y espectrómetro de masas (HPLC-DAD-MS) (201,272).

5.3. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante mediante ensayos químicos:

Los ensayos químicos para determinar la capacidad antioxidante de sustancias permiten evaluar la capacidad de estabilizar radicales libres o la capacidad de actuar como agentes quelantes de iones metálico que participan en reacciones químicas que promueven su producción, tal y como es el caso del ion hierro II o ion ferroso, el cual puede participar en reacciones de Fenton y de Haber-Weiss que promueven la generación de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, las cuales son sustancias consideradas como ROS, dichas reacciones tienen relevancia en la generación de estrés oxidativo en sistemas biológicos (79,80,273).

Las reacciones de estabilización de radicales libres se clasifican en dos mecanismos, la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), o la transferencia de electrones (SET) (79). El ensayo ORAC permite evaluar el mecanismo HAT, la prueba FRAP define la capacidad antioxidante mediada por el mecanismo SET y el método de determinación de capacidad barredora sobre el radical DPPH es útil para estimar la actividad de estabilización por ambos mecanismos (79,274). Por su parte, el ensayo FIC permite determinar la capacidad quelante sobre el ion hierro II (80).

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri* bajo los métodos mencionados anteriormente se presentan en el cuadro IX. Según los resultados del ensayo ORAC, el extracto FL-20 tiene la mayor actividad antioxidante seguido por HH-20. Mientras que los datos obtenidos con la prueba de determinación de capacidad barredora del radical DPPH indica que FL-20 tiende a ser más activo sin ser estadísticamente distinto a HH-20. En cambio, en el ensayo FRAP, HH-20 es el extracto con mayor capacidad reductora seguido por FL-20. En los ensayos ORAC, DPPH y FRAP se observa una tendencia hacia resultados de menor potencia antioxidante conforme se reduce la proporción de hojas en material vegetal de partida para la preparación de los extractos y disminuyen los niveles de TPC y TFC de los extractos. Estas tendencias son respaldadas por los resultados de los análisis de correlación que se discuten en la sección 5.6.

Cuadro IX. Actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*.

Extracto	ORAC (mmol TE/g)	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP (mmol TE/g)	FIC (µmol EDTAE/g)
PEH-20	0,69±0,04 ^A	276,77±6,51 ^A	0,08±0,00 ^A	43,50±2,03 ^{A,B}
PAH-20	1,52±0,02 ^B	115,72±1,61 ^B	0,20±0,01 ^B	39,90±0,85 ^B
HH-20	3,65±0,01 ^C	21,36±0,94 ^C	0,74±0,01 ^C	50,76±3,06 ^{A,C}
FL-20	4,27±0,04 ^D	26,78±1,38 ^C	0,62±0,01 ^D	3,74±0,07 ^D
TH-20	0,36±0,01 ^E	378,86±8,32 ^D	0,06±0,00 ^A	36,00±2,57 ^B
RH-20	0,47±0,00 ^{A,E}	268,93±2,91 ^A	0,08±0,00 ^A	39,12±1,82 ^B
Control (Quercetina)	23,11±0,48 ^F	2,96±0,21 ^E	12,53±0,61 ^E	23,32±0,48 ^E

Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

De acuerdo con los resultados del método FIC, HH-20 tiene la mayor actividad como agente quelante del ion ferroso, seguido por PEH-20 sin que exista una diferencia estadísticamente significativa entre ambos extractos, por su parte FL-20 es el extracto con menor capacidad quelante. La escasa actividad quelante de FL-20 puede ser explicada por la presencia de compuestos fenólicos con una baja afinidad por los iones de hierro, por ejemplo, las antocianinas presentan una menor capacidad quelante en comparación con flavonoles como la quercetina (275). La ausencia de correlación significativa entre los resultados del ensayo FIC y los datos TPC y TFC permite sugerir que la capacidad quelante de los extractos de *I. hawkeri* está más influenciada por la presencia de compuestos particulares que por la cantidad total de flavonoides o fenoles, por lo que se requiere de un análisis fitoquímico minucioso para determinar cuáles son los compuestos que determinan dicha actividad. Los resultados de los análisis de correlación se discuten con mayor detalle en la sección 5.6.

Otras plantas reconocidas por sus propiedades antioxidantes también presentan diferencias en su actividad en función de la parte anatómica utilizada para la preparación de los extractos evaluados. En el caso de la quinoa, se ha reportado que

las hojas y raíces corresponden a los tejidos que permiten obtener extractos con mayor capacidad antioxidante según los métodos de determinación de actividad barredora sobre el radical DPPH y FRAP (251). Para la caléndula se ha establecido que los extractos de flores preparados por diferentes técnicas empleando metanol como solvente presentan mayor actividad antioxidante según los ensayos de determinación de actividad barredora sobre el radical DPPH y FRAP, esto en comparación con los extractos de hojas y raíces. Sin embargo, los extractos de hojas presentan mayor actividad quelante según el ensayo FIC (252). Por otra parte, se ha determinado que los extractos de hojas juveniles de moras (*Morus alba*) preparados por digestión empleando diferentes solventes (metanol al 70 % v/v, etanol al 60 % v/v y acetona al 65 % v/v) presentan mayor actividad antioxidante con respecto a los extractos de los frutos de la planta, esto según los resultados de las pruebas de determinación de actividad barredora sobre el radical DPPH y FRAP (253).

Con respecto a los datos obtenidos para los extractos de hojas sometidas a diferentes técnicas de secado, en el cuadro X se presentan los resultados para los ensayos de determinación de la capacidad barredora sobre el radical DPPH, ORAC, FRAP y FIC. El extracto HL-21 presenta una tendencia a demostrar mayor potencia antioxidante en todos los ensayos, a excepción de FIC. Las tendencias observadas en los datos obtenidos a través de los ensayos de determinación de la capacidad barredora sobre el radical DPPH, ORAC y FRAP coinciden con las establecidas para los valores de TPC y TFC del cuadro VIII, tal y como lo demuestran los resultados de los análisis de correlación que se presentan en la sección 5.6. Esto sugiere que la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides de los extractos de hojas de *I. hawkeri* explican la actividad antioxidante observada en dichos extractos, esto es consistente con la relevancia reconocida para estos compuestos como determinantes del potencial antioxidante de extractos derivados de material vegetal (26).

Cuadro X. Actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas.

Extracto	ORAC (mmol TE/g)	DPPH IC₅₀(µg/mL)	FRAP (mmol TE/g)	FIC (µmol EDTAE/g)
HL-21	7,15±0,01 ^A	7,43±0,24 ^A	1,88±0,03 ^A	16,83±0,14 ^A
HH-21	6,73±0,06 ^A	12,80±0,58 ^B	1,03±0,02 ^B	32,16±0,65 ^B
HS-21	4,21±0,21 ^B	14,77±0,49 ^B	0,79±0,02 ^C	34,41±0,25 ^C
Control (Quercetina)	23,11±0,48 ^C	2,96±0,21 ^C	12,53±0,61 ^D	23,32±0,48 ^D

Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Además, los resultados indican que la liofilización como técnica de secado, no solo favorece la preservación de la cantidad de flavonoides y fenoles extraíbles, adicional a ello, promueve la conservación de la capacidad antioxidante determinada a través de ensayos químicos. La tendencia hacia una mayor potencia antioxidante observada en resultados de ensayos químicos de determinación de actividad antioxidante, cuando se aplica secado mediante liofilización en comparación con el secado a través de la aplicación de calor con horno, es una característica descrita para otros extractos derivados de distintos tipos de material vegetal, como lo son naranjas (*Citrus sinensis*), frutos de jujuba, hojas de ortiga y hojas de té verde (260-263).

Por otra parte, según los datos de los ensayos de determinación de la capacidad barredora sobre el radical DPPH, ORAC y FRAP, se puede observar que el secado al horno a 70 °C favorece la obtención de extractos de hojas de *I. hawkeri* con una tendencia hacia una mayor actividad antioxidante en comparación con el extracto preparado con hojas sometidas a secado a la sombra. Esta observación coincide con los resultados reportados para extractos de otras plantas de interés medicinal. Por ejemplo, los extractos obtenidos por maceración con alcohol al 80 % v/v de hojas de mirto común sometidas a secado a la sombra presentan una actividad antioxidante más baja con respecto a los extractos producidos con hojas secadas al horno a 70 °C (217). Las hojas de mirto limón secadas mediante liofilización permiten obtener extractos con

mayor actividad antioxidante en comparación con los preparados con el mismo material secado al horno a 90 °C, los cuales a su vez son más activos con respecto a los extractos de hojas que han sido secadas a la sombra (259).

Los resultados del ensayo FIC obtenidos al evaluar los extractos de hojas sometidas a secado mediante diferentes técnicas muestran una tendencia inversa con respecto a los resultados de los otros ensayos de actividad antioxidante. Una hipótesis que podría explicar dichos resultados es el efecto de las modificaciones estructurales que puedan sufrir los compuestos fenólicos producto de la aplicación de energía térmica y de la acción enzimática de proteínas presentes en el material vegetal, las cuales pueden generar compuestos con un mejor perfil de actividad quelante en comparación con los de partida. Una observación que puede aportar evidencia para apoyar esta hipótesis es la mayor complejidad, en términos de la cantidad de bandas de compuestos distintos, que se observa en los cromatogramas de HS-21 con respecto a HL-21 y HH-21 (figura 3), lo cual demuestra que el secado a la sombra produce cambios químicos más diversos con respecto a las otras dos técnicas de secado. Las modificaciones en los compuestos fenólicos derivadas de la aplicación de energía térmica y de la acción de enzimas del material vegetal podrían cambiar el patrón de hidroxilación de los compuestos fenólicos y con ello modificar su actividad quelante. Esto se propone con base al hecho de que la cantidad y la posición de los grupos hidroxilos en los núcleos estructurales de compuestos fenólicos son aspectos que determinan su capacidad quelante (276).

El extracto de *I. hawkeri* que demostró mayor actividad antioxidante según el método ORAC corresponde a HL-21 (ORAC = 7,15 mmol TE/g). El valor ORAC de este extracto se encuentra en el rango de resultados reportado para otros extractos producidos a partir de material vegetal reconocido por su alto potencial antioxidante. Ninfali *et al.* (277) ha determinado la actividad antioxidante de diferentes extractos hidroalcohólicos obtenidos por percolación a 40 °C de diez plantas, correspondientes a hojas de alcachofa (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), frutos de cardo mariano (*Silybum marianum*), rizomas de cúrcuma (*Curcuma xanthorriza*), hojas de olivo (*Olea*

europaea), raíz de hierba nudosa japonesa (*Polygonum cuspidatum*), hojas de rooibos (*Aspalathus linearis*), hojas de *G. biloba*, hojas de salvia, hojas de té verde y hojas de romero. El intervalo de valores ORAC para dichos extractos se encuentra entre 1,04 mmol TE/g y 8,25 mmol TE/g. Únicamente el extracto de frutos de cardo mariano y el de hojas de té verde presenta valores ORAC por encima a los determinados a HL-21, correspondientes a 7,87 mmol TE/g y 8,25 mmol TE/g, respectivamente. HL-21 presenta un valor ORAC inferior al reportado para las fracciones fenólicas derivadas de jugos de moras (*Rubus adenotrichos*) microfiltrados pasteurizados o no pasteurizados, los cuales presentan valores de entre 7,18 mmol TE/g a 7,91 mmol TE/g (162).

Con respecto al método de determinación de la capacidad barredora del radical DPPH, HL-21 presenta el valor de IC_{50DPPH} más bajo ($IC_{50DPPH} = 7,43 \mu\text{g/mL}$) siendo por tanto el más potente de los extractos evaluados. HL-21 presenta mayor potencia en comparación con los extractos obtenidos por homogenización de diferentes bayas (frambuesas (*Rubus idaeus*), grosellas (*Ribes nigrum*, *Ribes rubrum*, *Ribes pallidum*, y *Ribes grossularia*), moras (*Rubus fruticosus*), arándanos (*Vaccinium corymbosum*) y bayas de goji (*Lycium barbarum*)) con una mezcla metanol:agua 80:20 (v/v) acidificada con ácido fórmico (1%), los cuales presentan valores de IC_{50DPPH} de entre 200 $\mu\text{g/mL}$ y 1180 $\mu\text{g/mL}$ (278). Sin embargo, HL-21 tiene menor potencia en comparación con las fracciones fenólicas de jugos microfiltrados de mora (*Rubus adenotrichos*) pasteurizados o no pasterizados, los cuales presentan valores de IC_{50DPPH} de entre 5,05 $\mu\text{g/mL}$ a 6,42 $\mu\text{g/mL}$ (162).

Los resultados del ensayo FRAP indican que HL-21 corresponde al que presenta mayor poder reductor (FRAP = 1,88 mmol TE/g). Este valor es superior a los reportados para los extractos acuosos preparados por decocción de hojas de tomillo (*Thymus vulgaris*) y hierbabuena (*Mentha spicata*), los cuales poseen valores de 0,33 mmol TE/g y 0,11 mmol TE/g, respectivamente (279). De manera similar, HL-21 presenta un valor FRAP superior al reportado para extractos comerciales de romero (0,14 mmol TE/g) y de té verde (1,76 mmol TE/g), así como para el extracto de flores

de caléndula obtenido por percolación continua con metanol (0,25 mmol TE/g) (252,280)

Los extractos analizados, excepto FL-20 y HL-21 poseen valores de actividad quelante superiores a los de la quercetina utilizada como control. De los extractos evaluados, el extracto HH-20 presenta la mayor capacidad quelante sobre el ion hierro II de acuerdo con el ensayo FIC (50,76 $\mu\text{mol EDTAE/g}$). HH-20 presenta una actividad quelante inferior a la reportada para el extracto de flores de caléndula obtenido por percolación continua con metanol (58 $\mu\text{mol EDTAE/g}$) (252). Sin embargo, HH-20 presenta una actividad quelante superior a la determinada para el extracto preparado por agitación del fruto de moringa con etanol al 50 % v/v (1,44 $\mu\text{mol EDTAE/g}$) y para el extracto de hojas de guayaba preparado por decocción con etanol al 70 % v/v (46,50 $\mu\text{mol EDTAE/g}$) (281,282).

Con respecto a otros extractos obtenidos de plantas del género *Impatiens*, HL-21 presenta un valor ORAC más alto al reportado para los extractos de planta entera de *I. balsamina*, *I. hawkeri* e *I. walleriana* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v, los cuales se encuentran en un rango de 0,78 mmol TE/g a 1,53 mmol TE/g (151). En el caso del método de determinación de la capacidad barredora del radical DPPH, HL-21 presenta un $\text{IC}_{50\text{DPPH}}$ inferior (mayor potencia) al reportado para diferentes extractos de plantas del género *Impatiens*, entre los cuales se puede mencionar al extracto acuoso obtenido por decocción de las flores de *I. balsamina* ($\text{IC}_{50\text{DPPH}} = 1140,36 \mu\text{g/mL}$) (283), al extracto de semillas de *I. balsamia* obtenido por maceración con etanol al 70 % v/v ($\text{IC}_{50\text{DPPH}} = 320 \mu\text{g/mL}$) (284), a los extractos de partes áreas de *I. baulfourii*, *I. glandulifera*, *I. balsamina*, *I. walleriana*, *I. parviflora* e *I. nolitangere* preparados por extracción asistida por ultrasonido con metanol/acetona/agua (3/1/1, v/v/v) ($\text{IC}_{50\text{DPPH}}$ con un rango aproximado de 50 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$) (285), a los extractos de hojas y tallos de *I. balsamina* obtenidos por reflujo con metanol al 50 % v/v ($\text{IC}_{50\text{DPPH}}$ de 282 $\mu\text{g/mL}$ y 380 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (204), al extracto de flores de *I. glandulifera* obtenido por percolación continua con metanol ($\text{IC}_{50\text{DPPH}}$ de aproximadamente 60 $\mu\text{g/mL}$) (203) y a los extractos de planta entera de *I. balsamina*,

I. hawkeri e *I. walleriana* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v (IC_{50DPPH} entre 100 $\mu\text{g/mL}$ y 440 $\mu\text{g/mL}$) (151). Sin embargo, HL-21 presenta un IC_{50DPPH} superior a los aceites esenciales producidos por hidrodestilación a partir de las raíces de *I. glandulifera* ($IC_{50DPPH} = 5,84 \mu\text{g/mL}$) y de las partes aéreas de *I. glandulifera* e *I. noli-tangere* (IC_{50DPPH} de 3,96 $\mu\text{g/mL}$ y 4,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (286).

En relación con los resultados obtenidos en el ensayo FRAP, HL-21 presenta un valor superior de potencial reductor en comparación con los extractos de planta entera de *I. balsamina*, *I. walleriana* e *I. hawkeri* obtenidos por maceración con etanol al 80 % v/v, para los cuales se reportan valores FRAP de entre 0,03 mmol TE/g y 0,09 mmol TE/g (151). Para otros extractos obtenidos de plantas del género *Impatiens* también se han reportado datos de actividad reductora sobre el ion hierro III y/o actividad quelante sobre el ion hierro II. A pesar de ello, dado que los resultados se reportan en términos distintos (porcentajes de inhibición, equivalentes de ion ferroso e IC_{50}) no es posible establecer comparaciones con dichos datos (204,238,246,284,285,287,288).

5.4. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante mediante ensayos biológicos:

En la figura 4A se resumen los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica (LPO) de los homogenizados de hígado de rata. Los datos de IC_{50LPO} indican que los extractos de hojas y flores de *I. hawkeri* son los que tienen mayor actividad con valores de 199,5 $\mu\text{g/mL}$ y 206,3 $\mu\text{g/mL}$ para HH-20 y FL-20, respectivamente. Por otra parte, la figura 4B presenta los resultados del mismo tipo de ensayo aplicado sobre los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas, dichos datos demuestran que el secado por liofilización permite obtener un extracto con mayor actividad. Inclusive, HL-21 es el extracto con mayor potencia de todos los extractos evaluados con un valor de IC_{50LPO} de 128,1 $\mu\text{g/mL}$. Todos los extractos tienen diferencias significativas con respecto a la quercetina utilizada como control positivo ($4,7 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$).

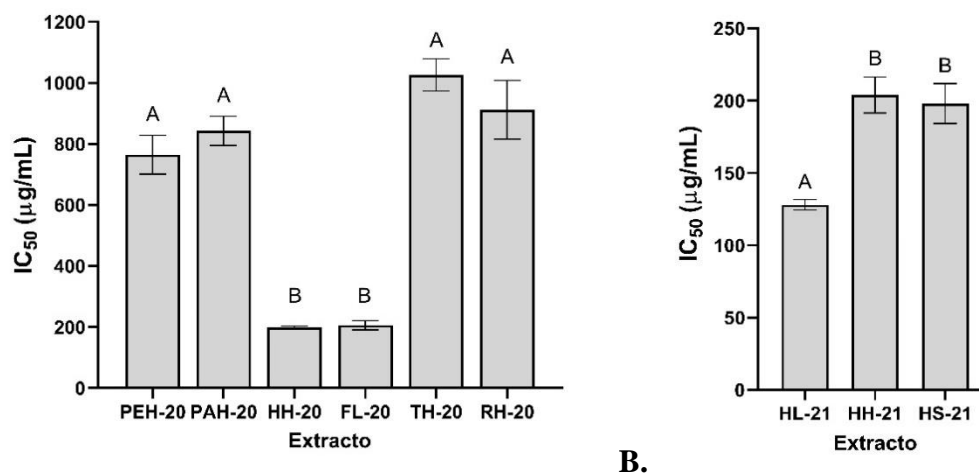


Figura 4. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica (LPO) de homogenizados de hígado de rata. A. Extractos de las diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*. B. Extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas. Las barras de error corresponden al error estándar. Letras distintas en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Las variaciones en la actividad antioxidante en función de la parte anatómica de la especie estudiada es un aspecto, que al igual que en los ensayos químicos *in vitro* para determinar actividad antioxidante, ha sido previamente reportada para los resultados de diferentes modelos de peroxidación lipídica. Tal es el caso de los extractos hidroalcohólicos (mezcla etanol: agua (70:30 v/v)) producidos por maceración de la corteza de *Monodora myristica*, los cuales tienen mayor potencial como inhibidor de la peroxidación lipídica de homogenizados de hígado de ratas Wistar inducida con cloruro férrico y peróxido de hidrógeno en comparación con el mismo tipo de extracto obtenido de hojas de la planta (289). También se han observado diferencias en la inhibición de la peroxidación lipídica de homogenizados yema de huevo inducida con sulfato ferroso por parte de los extractos producidos por percolación continua de las partes áreas y raíces de *Phyllanthus fraternus* con etanol, siendo más activo el extracto de partes áreas (290).

Existen estudios previos que indican que el secado del material vegetal puede inducir cambios en la capacidad de extractos para inhibir la peroxidación lipídica. Por ejemplo, el extracto acuoso preparado por maceración de hojas de moringa secadas por liofilización presenta valores de IC_{50LPO} más bajos en los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica de homogenizados de hígado y páncreas de ratas Wistar inducida con cloruro férrico o nitroprusiato sódico, esto en comparación con los extractos acuosos de hojas secadas a la sombra, secadas por exposición a la luz solar o secadas mediante la aplicación de calor al horno a 40 °C (291).

Al realizar comparaciones con otro tipo de plantas se puede observar que HL-21 presenta un valor de IC_{50LPO} superior (menor potencia) al de la fracción fenólica derivada del extracto de güisoyol (*Bactris guineensis*) obtenido por agitación con acetona/agua (70:30, v/v) ($IC_{50LPO} = 52,8 \mu\text{g/mL}$) (292), al de las fracciones fenólicas de jugos microfiltrados no pasteurizados y pasteurizados de mora (*Rubus adenotrichos*) (IC_{50LPO} de entre 49,4 y 57,7 $\mu\text{g/mL}$) (162) y al del extracto de pulpa de cas (*Psidium friedrichsthalianum*) obtenido por agitación con acetona/agua (70:30, v/v) (9,44 $\mu\text{g/mL}$) (293), cuya actividad como inhibidores de la peroxidación lipídica de homogenizados de hígado de rata se determinó siguiendo una metodología similar a la utilizada en la presente investigación. No fue posible establecer comparaciones con extractos de otras plantas del género *Impatiens* debido a que no se encontraron reportes de la aplicación de este tipo de ensayo para la evaluación de su actividad antioxidante.

En la figura 5A se presentan los resultados del ensayo ERYCA aplicado a los extractos de las diferentes partes de *I. hawkeri*. Los extractos de hojas (HL-20) y flores (FL-20) de *I. hawkeri* son los que tienen mayor actividad con valores de 1,48 mmol QE/g y 1,65 mmol QE/g para HH-20 y FL-20, respectivamente. Por otro lado, la figura 5B muestra los resultados del mismo ensayo utilizado para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas, dichos datos demuestran que el secado por liofilización permite obtener un extracto con mayor actividad. De hecho, HL-21 corresponde al extracto con mayor potencia de todos los extractos evaluados con un valor 2,59 mmol QE/g.

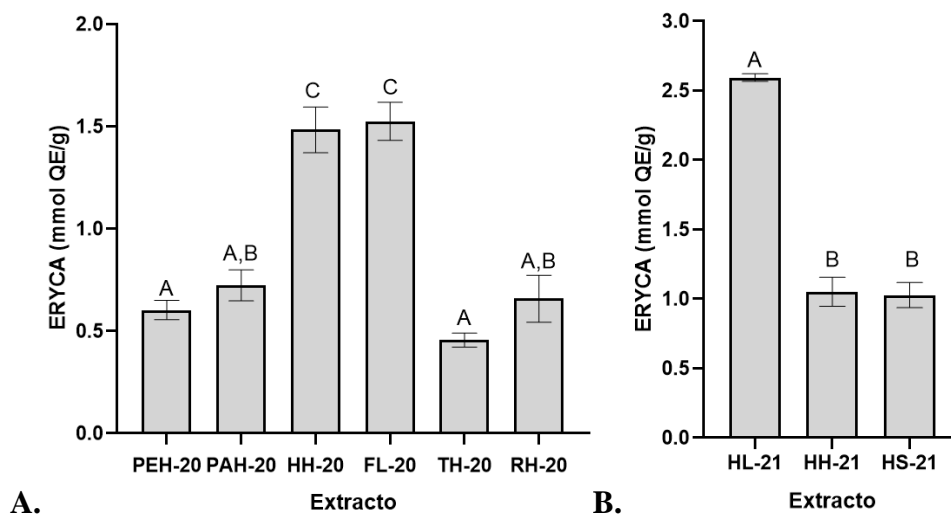


Figura 5. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo ERYCA. A. Extractos de las diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*. B. Extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas. Las barras de error corresponden al error estándar. Letras distintas en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El ensayo ERYCA tiene como propósito evaluar la capacidad de antioxidantes para reducir la hemólisis de eritrocitos humanos inducida por la peroxidación lipídica de su membrana promovida mediante la exposición a un agente prooxidante, como lo es AAPH, el cual funciona como una fuente de radicales libres (164). En la literatura es posible encontrar ensayos similares en los que se emplean condiciones experimentales o agentes prooxidantes distintos. Mediante dichos ensayos también se han determinado diferencias entre los extractos que se pueden obtener de diferentes partes anatómicas de una misma planta. Por ejemplo, se ha reportado diferencias en el porcentaje de reducción de la hemólisis de eritrocitos humanos inducida con AAPH entre los extractos preparados por agitación de las hojas y la corteza de *Rhamnus alaternus* con una mezcla etanol: agua (70/30: v/v) (294). También se ha determinado que la infusión de hojas de maracuyá (*Passiflora edulis*) tiene mayor potencia como factor que reduce la hemólisis de eritrocitos humanos expuestos a peróxido de hidrógeno, esto en comparación con el jugo obtenido del fruto de la misma planta (295).

En relación con el efecto del secado, de manera similar que con las hojas de *I. hawkeri*, se ha observado una tendencia hacia una disminución más pronunciada hemólisis de eritrocitos humanos expuestos a TBHP al tratar a dichas células con el extracto acuoso producido por digestión de las hojas liofilizadas de *Bryophyllum pinnatum*, esto en comparación con el mismo tipo de extracto obtenido de hojas secadas mediante horno a 40 °C, a la sombra o mediante la exposición a la luz solar (296).

Por otra parte, los extractos de flores de *I. balsamina* e *I. walleriana* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v con 0,5 % de ácido trifluoroacético tienen la capacidad de reducir la hemólisis inducida en eritrocitos de ovino por exposición a AAPH (201,272). Estos extractos son los únicos derivados de plantas del género *Impatiens* para los cuales se reporta previamente dicho tipo de actividad. Dadas las diferencias en las metodologías no es posible establecer comparaciones con los resultados del presente estudio.

La comparación de resultados obtenidos en el ensayo ERYCA con otros reportados para extractos evaluados por el mismo método, señala que HL-21 presenta menor capacidad antioxidante que un extracto fenólico de güiscol obtenido por agitación con acetona/agua (70:30, v/v) (3,65 mmol QE/g) y que las fracciones fenólicas de jugos microfiltrados no pasteurizados y pasteurizados de mora (*Rubus adenotrichos*) (valores de actividad antioxidante entre 3,65 mmol QE/g y 3,74 mmol QE/g) (162,292). Sin embargo, el extracto de pulpa de cas obtenido por agitación con acetona/agua (70:30, v/v) presentan un valor de actividad antioxidante menor (0,77 mmol QE/g) (293).

Otro de los ensayos llevados a cabo para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *I. hawkeri* es la determinación del potencial de inhibición de la generación de ROS (IROS) a nivel intracelular en células Vero. En la figura 6 se muestran los resultados del ensayo de viabilidad celular por reducción resazurina previo a determinar la capacidad antioxidante.

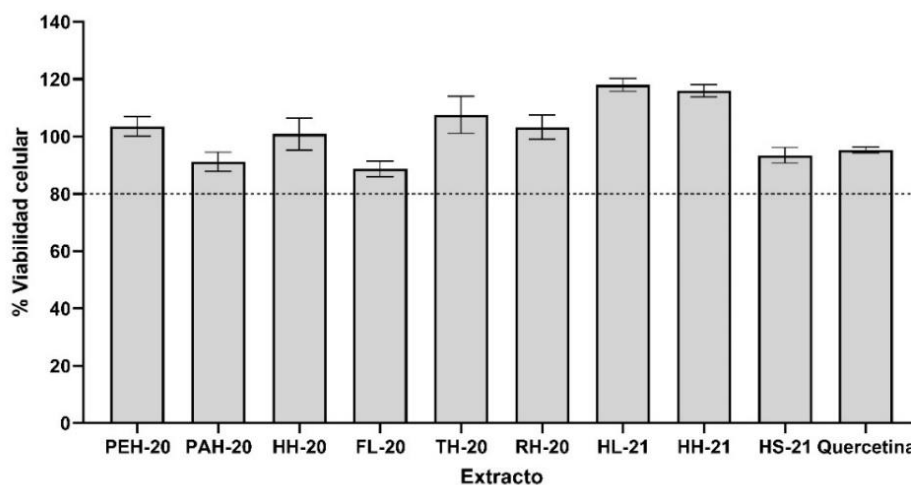


Figura 6. Prueba de citotoxicidad sobre células Vero preliminar al ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular. Las concentraciones de prueba corresponden a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la quercetina. Las barras de error corresponden al error estándar.

Los resultados de la figura 6 demuestran que ningún extracto ni la quercetina promueven viabilidades celulares inferiores al 80 % con respecto a células de los pozos control (células no tratadas con extracto o quercetina), esto a la concentración máxima de prueba, correspondiente a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la quercetina. Esta condición es considerada como un requisito para poder llevar a cabo el ensayo de reducción de los niveles de ROS intracelulares (297). Además, los resultados del ensayo de viabilidad celular indican que los extractos presentan una baja citotoxicidad contra la línea celular Vero, esto se establece con base al criterio de que un extracto es significativamente citotóxico sobre células normales si induce una reducción de su viabilidad de al menos el 50 % a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (298).

En la figura 7A se muestran los resultados del ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular en células Vero para los extractos de diferentes anatómicas de *I. hawkeri*, siendo el extracto de planta entera (PEH-20) el que mostró mayor actividad, con un porcentaje IROS del 61 %. La figura 7B resume los resultados para los extractos obtenidos a partir de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante

diferentes técnicas. De ellos HH-21 presentó el mayor porcentaje IROS correspondiente a 44 %, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres extractos.

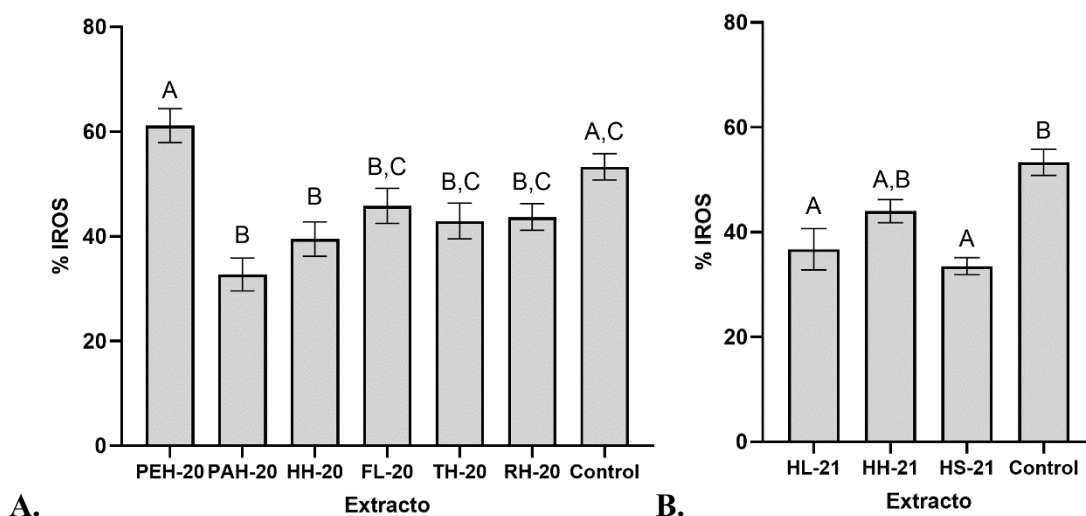


Figura 7. Ensayo de inhibición de la producción de ROS (IROS) a nivel intracelular en células Vero. A. Extractos de las diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*. B. Extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas. Las concentraciones de prueba corresponden a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la quercetina (control). Las barras de error corresponden al error estándar. Letras distintas en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los resultados del ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular muestran una tendencia distinta a los resultados de los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica y ERYCA lo cual puede deberse a diferencias en los mecanismos principales de actividad antioxidante que dichos ensayos biológicos evalúan. La actividad en los dos últimos ensayos mencionados está definida principalmente por el potencial reductor y la capacidad barredora de radicales libres que tengan los extractos presentes en el mismo medio en que se encuentran lípidos de membrana y/o células, así como las fuentes de radicales libres (TBHP o AAPH) los cuales inducen peroxidación lipídica (164). Sin embargo, en el caso del ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular utilizado en el presente estudio,

el mismo está diseñado para observar efectos antioxidantes remanentes o posteriores a la exposición de las células a los extractos antes de inducir estrés oxidativo. Los resultados en este tipo de ensayo pueden estar influenciados por la capacidad que tengan los compuestos antioxidantes de atravesar la membrana celular y permanecer en el medio intracelular, en cual pueden estabilizar directamente radicales libres, así como por la modulación de vías de señalización celular que rigen la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos (299).

El menor porcentaje IROS observado para HH-20 y FL-20 en comparación con PEH-20, pese a que este último presenta menores niveles de compuestos fenólicos (TPC, TFC y TMA), podría explicarse por el hecho de que la capacidad de los compuestos antioxidantes de atravesar la membrana celular es un aspecto crítico para observar actividad en el ensayo inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular y que en términos generales los compuestos fenólicos son reconocidos como sustancias polares con dificultades para atravesar membranas lipídicas por difusión pasiva. Además, la capacidad de permear una membrana biológica para cada compuesto fenólico puede estar definida por la presencia de proteínas de transporte específicas (300,301). Esto a su vez plantea la posibilidad de que el mayor efecto observado por el tratamiento de las células con PEH-20 este determinado por la presencia de otro tipo de metabolito antioxidante. Otro factor que podría estar influenciando los resultados es el antagonismo y sinergismo entre los diferentes componentes de los diferentes extractos (302). La consideración de los factores mencionados anteriormente también puede ayudar a establecer una posible explicación para la tendencia hacia un mayor porcentaje IROS observado para el tratamiento de las células con HH-21 en comparación con el HL-21, pese a que este último extracto presenta mayores niveles de TPC, TFC y TMA.

Debido a que no hay reportes del uso del mismo protocolo experimental para la determinación de la inhibición de ROS a nivel intracelular, resulta difícil establecer comparaciones con resultados reportados para otros extractos. Sin embargo, considerando similitudes como el uso de la misma línea celular y del mismo inductor

de estrés oxidativo (TBHP), vale la pena hacer referencia a resultados determinados con una metodología similar, pero empleando citometría de flujo para determinar el nivel de reducción de los niveles intracelulares de ROS, lo cual corresponde al procedimiento más habitual.

En el presente estudio, mediante una metodología basada en el desarrollo del ensayo en microplacas, se definió que el extracto más potente es PEH-20, para el cual se determinó un porcentaje de inhibición de los ROS intracelulares de 61 % a una concentración de prueba de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que bajo la metodología de citometría de flujo mencionada anteriormente se ha determinado que las fracciones fenólicas de los extractos microfiltrados de jugos pasteurizados y no pasteurizados de mora (*Rubus adenotrichos*) requieren de una concentración de entre 204 a 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para reducir la producción de ROS en un 50 % (162). Mediante el mismo ensayo se ha determinado que la fracción fenólica derivada del extracto de güiscoyol obtenido por agitación con acetona/agua (70:30, v/v) requiere de una concentración de 153 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para alcanzar el mismo porcentaje de reducción de ROS. Mientras el extracto de pulpa de cas obtenido por agitación con acetona/agua (70:30, v/v) requiere de una concentración de 733 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para alcanzar el 50 % de inhibición de la producción de ROS (293). En el caso de otras plantas de género *Impatiens*, al menos en la revisión bibliográfica realizada para la discusión de los resultados, no se encontraron datos de determinación de actividad antioxidante a través de ensayos similares para evaluar la inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular.

5.5. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*:

En el cuadro XI se presentan los resultados para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de diferentes secciones anatómicas de *I. hawkeri*. Solamente los extractos HH-20 y FL-20 demostraron actividad con valores de CMI de entre 8,33 mg/mL y 10,00 mg/mL. Las únicas bacterias susceptibles fueron las Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis*). Ninguno de los extractos ejerció actividad bactericida sobre las cepas ensayadas (CMB > 10 mg/mL).

La observación de diferencias en la actividad antibacteriana de extractos de una misma planta en función de la parte anatómica empleada para su preparación es un aspecto que ha sido previamente reportado. Tal es el caso de los extractos preparados por maceración con metanol de hojas, corteza de raíz y pericarpio del fruto de *Diploknema butyracea*, siendo el extracto de corteza de raíz el que más actividad antibacteriana ha demostrado (303). Para otros extractos del género *Impatiens* también se han observado diferencias en la actividad antibacteriana dependiendo de la parte anatómica utilizada para su preparación. Los extractos de hojas de *I. balsamina* obtenidos por maceración con alcohol al 70 % v/v han demostrado mayor potencia y mayor espectro de actividad antibacteriana en comparación con el mismo tipo de extracto obtenido de tallos (153). El extracto producido por agitación de frutos de *I. balsamina* con etanol presenta mayor potencia antibacteriana contra *Helicobacter pylori* que el mismo tipo de extracto preparado a partir de semillas y plantas enteras de la misma especie (247).

Cuadro XI. Valores de CMI determinados para los extractos de diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri* sobre las distintas bacterias de prueba.

Extracto	CMI (mg/mL)						
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>
PEH-20	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
PAH-20	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
HH-20	10,00±0,00 ^A	8,33±1,67 ^A	10,00±0,00 ^A	>10	>10	>10	>10
FL-20	8,33±1,67 ^A	10,00±0,00 ^A	>10	>10	>10	>10	>10
TH-20	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
RH-20	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Control	2,75±0,37 ^B	2,00±0,00 ^B	0,50±0,00 ^B	24,00±3,58	0,03±0,00	0,09±0,01	0,03±0,00

*En el caso del control (clorhidrato de ciprofloxacina para *E. coli* y *E. faecalis* o ceftriaxona disódica para el resto de cepas), los resultados se reportan en unidades de µg/mL. Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, en el cuadro XII se presentan los resultados obtenidos para los extractos de hojas sometidas a secado mediante diferentes técnicas. De ellos HH-21 es el que presenta una tendencia hacia mayor actividad (menor CMI) y un espectro más amplio de microorganismos sobre los cuales ejerce un efecto inhibitorio de su proliferación. Nuevamente, los extractos fueron activos solamente sobre las bacterias Gram-positivas de prueba y ninguno de los extractos demostró actividad bactericida (CMB > 10 mg/mL).

Para extractos de otras plantas también se han reportado variaciones en su actividad antibacteriana dependiendo de la técnica de secado utilizada para el material vegetal de partida. El extracto obtenido de la cáscara de la granadilla (*Punica granatum*) secada al horno a 50 °C mediante extracción asistida con ultrasonido con metanol al 80 % v/v es más activo que los extractos preparados a partir del mismo tipo de material secado por liofilización (304). El extracto preparado a partir de las hojas de moringa secadas a la sombra por maceración con etanol tiene mayor actividad antibacteriana con respecto a los extractos obtenidos de hojas secadas por exposición a la luz solar o mediante horno a 50 °C (305).

Al comparar los resultados de los cuadros XI y XII se puede observar que HH-21 es el extracto con valores de CMI más bajos de todos los sujetos a estudio. Además, con base al criterio de Bussmann *et al.* (306), quien define que los extractos de plantas crudos (no fraccionados) con una CMI < 5 mg/mL tienen una potencia antibacteriana alta, se puede concluir que la actividad antibacteriana de los extractos de *I. hawkeri* es débil.

Cuadro XII. Valores de CMI determinados para los extractos de hojas de *I. hawkeri* sometidas a secado mediante diferentes técnicas.

Extracto	CMI (mg/mL)						
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>
HL-21	>10	5,00±0,00 ^A	10,00±0,00 ^A	>10	>10	>10	>10
HH-21	5,00±0,00 ^A	6,67±1,67 ^A	10,00±0,00 ^A	>10	>10	>10	>10
HS-21	>10	5,00±0,00 ^A	>10	>10	>10	>10	>10
Control	2,75±0,37 ^B	2,00±0,00 ^B	0,50±0,00 ^B	24,00±3,58	0,03±0,00	0,09±0,01	0,03±0,00

*En el caso del control (clorhidrato de ciprofloxacina para *E. coli* y *E. faecalis* o ceftriaxona disódica para el resto de cepas), los resultados se reportan en unidades de µg/mL. Letras superíndices distintas en los datos de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Con respecto a los resultados reportados para extractos de otras plantas reconocidas por ser fuente de metabolitos fenólicos con actividad antibacteriana (307,308), se tiene que HH-21 presenta valores de CMI inferiores a los reportados para la infusión de té verde cuando su actividad ha sido evaluada contra *S. aureus* (CMI = 10 mg/mL) y *E. faecalis* (CMI = 20 mg/mL) (309). Por su parte, los extractos de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), hojas de tomillo y hojas de romero preparados por extracción asistida por ultrasonido con etanol presentan valores de CMI contra *S. aureus* de 25 mg/mL, 50 mg/mL y 12,5 mg/mL, respectivamente (310).

Sin embargo, otros extractos han demostrado mayor potencia en comparación con HH-21. El extracto obtenido por maceración con etanol de las partes aéreas de romero presenta valores de CMI de 120 µg/mL, 90 µg/mL y 350 µg/mL sobre *S. epidermidis*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, respectivamente (311). El extracto preparado por maceración de los rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*) con etanol al 70 % v/v presenta valores de CMI de 100 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL sobre *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente (312). El extracto acuoso de rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa*) preparado por decocción presenta actividad frente diferentes cepas de *S. aureus* con valores de CMI de entre 256 µg/mL y 512 µg/mL, mientras que contra *P. aeruginosa* ha demostrado un resultado de CMI de 1024 µg/mL (313).

Con respecto a resultados reportados previamente para plantas del género *Impatiens*, HH-21 presenta mayor actividad sobre *S. epidermidis* que los extractos de planta entera de *I. balsamina*, *I. hawkeri* e *I. walleriana* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v para los cuales se determinaron valores de CMI de 10 mg/mL. En el caso de *S. aureus*, HH-21 tiene menor potencia que el extracto de *I. balsamina* (CMI = 2,5 mg/mL) y el mismo nivel de efecto inhibitorio que el reportado para el extracto de *I. walleriana* (CMI = 5 mg/mL) y más actividad que el extracto de *I. hawkeri* (CMI > 10 mg/mL) (151).

Para los extractos de tallos de *I. balsamina* preparados por extracción asistida por ultrasonido con éter de petróleo y éter dietílico se ha determinado una CMI sobre

S. aureus de 500 µg/mL y 1000 µg/mL, respectivamente. De ambos extractos, solo el preparado con éter dietílico tiene actividad sobre *E. coli* (CMI = 500 µg/mL) (238). El extracto preparado por agitación de las raíces de *I. tinctoria* con acetato de etilo presenta mayor potencia que HH-21 sobre *S. aureus* (CMI = 800 µg/mL), *S. epidermidis* (CMI = 700 µg/mL) y *E. faecalis* (CMI = 8 mg/mL). Además, se ha determinado que este extracto es activo sobre *E. coli* y *S. typhimurium* con una CMI de 8 mg/mL sobre ambas bacterias (314).

El estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de *I. baulfourii*, *I. glandulifera*, *I. balsamina*, *I. walleriana*, *I. parviflora* e *I. noli-tangere* preparados por extracción asistida por ultrasonido con metanol/acetona/agua (3/1/1, v/v/v) establece que solo el extracto de *I. baulfourii* es activo sobre una de las bacterias Gram-negativas ensayadas, la cual corresponde a *K. pneumoniae* (CMI = 1000 µg/mL). Además, los extractos de *I. baulfourii*, *I. glandulifera*, *I. balsamina* e *I. noli-tangere* mostraron actividad sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* con un rango de CMI de 125 a 1000 µg/mL (285). En relación con los extractos de flores de *I. balsamina* e *I. walleriana* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v con 0,5 % de ácido trifluoroacético se ha determinado valores de CMI de entre 50 µg/mL y 200 µg/mL sobre *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhimurium* (201,272).

La menor capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas observada para los extractos de *I. hawkeri* es un fenómeno que ha sido descrito para extractos de diferentes plantas. Bussmann *et al.* (306) ha determinado que es más probable encontrar extractos con actividad frente a bacterias Gram-positivas que contra Gram-negativas. Observación que ha establecido al evaluar el efecto antibacteriano de los extractos obtenidos por maceración con etanol de 141 plantas usadas tradicionalmente en Perú para el tratamiento de infecciones. Se ha planteado que la menor actividad de extractos de plantas sobre bacterias Gram-negativas puede estar relacionada con la membrana externa de lipopolisacáridos en este tipo de microorganismo. Esta membrana constituye una barrera adicional con respecto a las

bacterias Gram-positivas que puede dificultar el ingreso de las moléculas activas de los extractos a las células bacterianas de modo que no pueden interactuar con sus correspondientes dianas o blancos moleculares (149,309,315).

5.6. Resultados de los análisis de correlación y PCA:

En la figura 8 se presenta la matriz de correlación de Spearman para los diferentes ensayos de caracterización química y de actividad biológica aplicados a los nueve extractos estudiados. El motivo por el cual no se empleó un análisis de correlación de Pearson obedece a la existencia de variables cuya distribución no es normal.

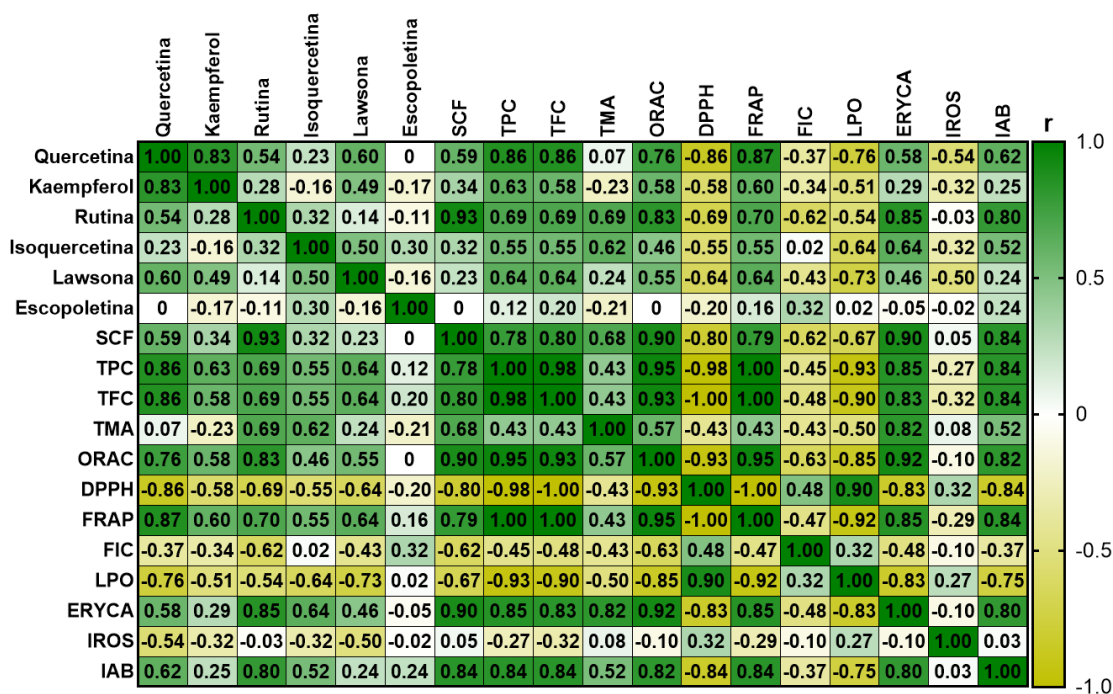


Figura 8. Matriz de correlación de Spearman entre los diferentes parámetros determinados para los nueve extractos estudiados. El color de la barra lateral derecha indica la escala para el valor del coeficiente de correlación r los cuales se indican en cada una de las celdas.

Con respecto a las correlaciones significativas ($p < 0,05$) más relevantes entre el contenido de metabolitos fenólicos determinado mediante cromatografía HPTLC y

la magnitud de la actividad antioxidante y antibacteriana determinada mediante ensayos *in vitro*, se tiene que la cantidad de quercetina es un parámetro que correlaciona con los resultados de las pruebas químicas *in vitro* de evaluación de la actividad antioxidante (valores absolutos de r de entre 0,76 y 0,87) exceptuando el ensayo FIC ($r = - 0,37$). Además, el contenido de quercetina también presenta una correlación significativa con respecto a los valores de IC_{50LPO} ($r = - 0,76$).

En el caso del contenido de rutina, también se observa correlación con los resultados de las pruebas químicas *in vitro* de actividad antioxidante (valores absolutos de r de entre 0,69 y 0,83) con excepción de los resultados de la prueba FIC ($r = - 0,34$). El contenido de rutina correlaciona positivamente con los resultados de ERYCA ($r = 0,85$) y con la variable IAB ($r = 0,80$), la cual es una medida de la potencia y espectro de actividad antibacteriana. Por su parte, la concentración de lawsona correlaciona significativamente con los resultados del ensayo LPO ($r = - 0,73$), pero no presenta correlaciones significativas con respecto a los ensayos químicos de evaluación de la actividad antioxidante ni con la variable IAB. Las concentraciones de escopoletina e isoquercetina no presentaron correlaciones significativas con ninguna de las variables determinadas mediante los ensayos *in vitro* de actividad antioxidante y antibacteriana.

La variable SCF, correspondiente a la sumatoria de las concentraciones de los metabolitos determinadas por cromatografía HPTLC, el cual funciona como indicador adicional del contenido de compuestos fenólicos de los extractos, tiene las mismas correlaciones significativas descritas para la rutina con los resultados de las pruebas químicas *in vitro* de actividad antioxidante, los resultados del ensayo ERYCA y los valores IAB (valores absolutos de r de entre 0,79 y 0,90). Este es un resultado esperable si se considera que el contenido de rutina es el parámetro que más aporta a los valores de SCF de los extractos con mayor capacidad antioxidante.

En relación con los resultados de los ensayos colorimétricos para la determinación de compuestos fenólicos, las variables TPC y TFC presentan correlaciones significativas (valores absolutos de r de entre 0,83 y 1,00) con todos los

parámetros definidos a través de los ensayos *in vitro* de actividad antioxidante y antibacteriana, excepto con los resultados del ensayo FIC (valores de r de entre -0,48 y -0,45) y el porcentaje IROS definido en cultivos de células Vero (valores de r de entre 0,05 y 0,10). Por su parte, los valores de TMA presentan una correlación positiva y significativa con los resultados del ensayo ERYCA ($r = 0,82$). Además, los resultados de los ensayos químicos de determinación de actividad antioxidante, excepto los obtenidos en el ensayo FIC, correlacionan de manera significativa con los resultados de los ensayos biológicos ERYCA y LPO (valores absolutos de r de entre 0,83 y 0,92). No se encontraron correlaciones significativas entre las variables derivadas de los análisis de químicos de composición y de determinación de la actividad antioxidante de los extractos con los resultados de porcentaje IROS.

Los resultados de los diferentes análisis de correlación pueden resumirse a través de los gráficos de la figura 9 generados a través del análisis PCA. Según los resultados de esta evaluación estadística, es posible realizar una reducción de las 18 variables (dimensiones) originales a solamente dos, las cuales corresponden al primer componente principal (PC1) y al segundo componente principal (PC2). Estas variables alternativas pueden representar en un sistema bidimensional que incluye un 70,61 % de la varianza o dispersión total de los datos, en la cual PC1 aporta el 51,76 % y PC2 aporta un 18,85 %.

En la literatura es posible encontrar recomendaciones para que los modelos de análisis PCA tenga una cantidad de componentes que alcance un porcentaje de la varianza total del sistema de al menos el 80 %. Sin embargo, también se ha indicado que la cantidad e identidad de componentes que se escoja es un aspecto que puede variar en función del contexto y objetivo del análisis (316). Para la presente investigación se seleccionó el modelo PCA bidimensional con las dos componentes que representan los valores más altos del porcentaje total de varianza del sistema bajo análisis ya que se considera más sencillo de interpretar que uno en tres dimensiones que represente un porcentaje mayor de varianza. Además, existen modelos PCA publicados para estudios similares en los que se ha utilizado un porcentaje de varianza

menor al 60 % (317). En la sección 8.8 de los anexos se presentan los gráficos para un modelo PCA de tres dimensiones que alcanza un 83,47 % de la varianza del sistema, el cual, por su complejidad, puede resultar más difícil de interpretar gráficamente que el de dos dimensiones seleccionado para la presente discusión de resultados.

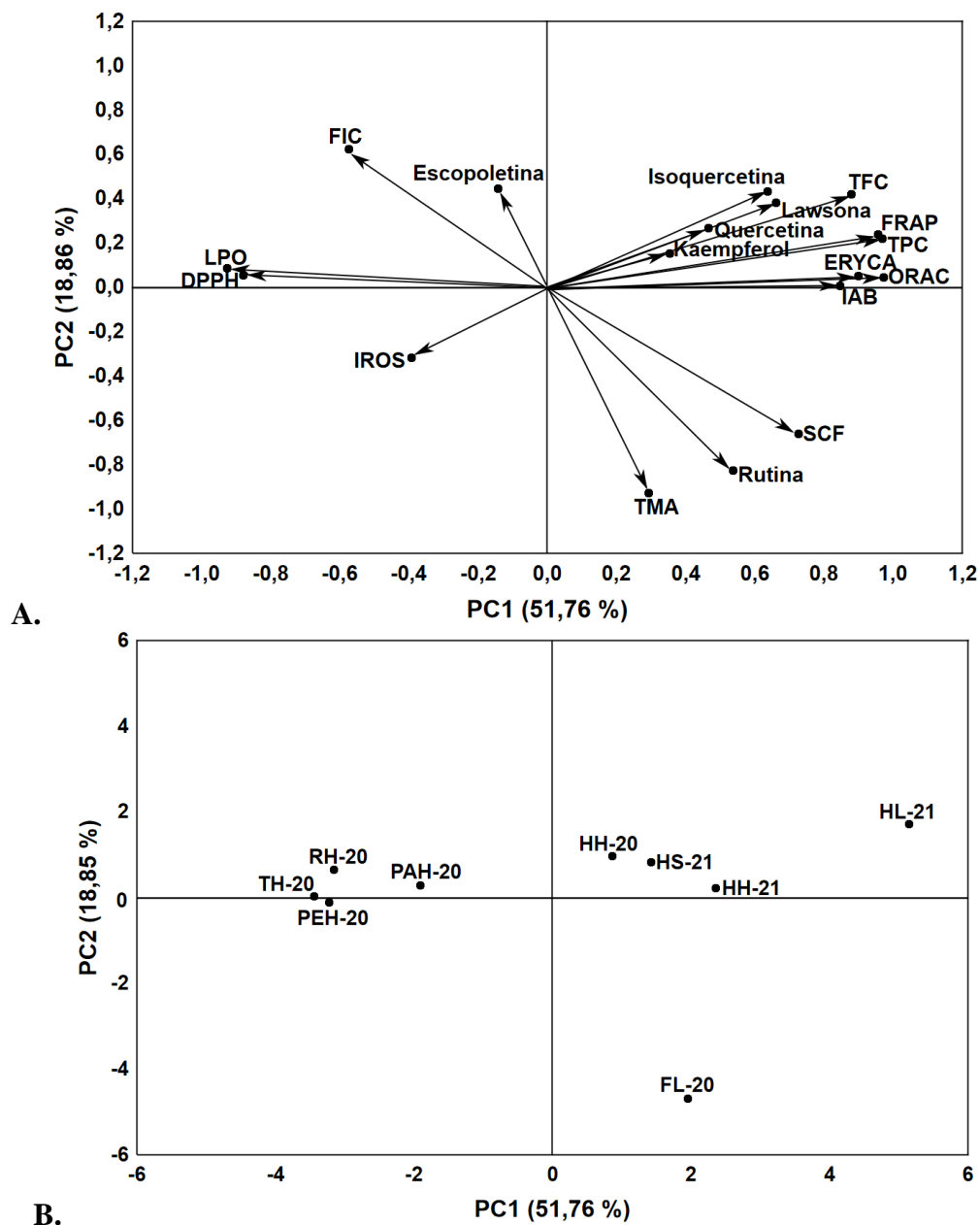


Figura 9. Análisis PCA bidimensional para los diferentes parámetros evaluados en los extractos sujetos a estudio. A. Gráfico bidimensional de cargas factoriales (*loadings*

plot) para las variables incluidas en el modelo. B. Gráfico bidimensional de puntuaciones factoriales (*score plot*) para los extractos. El porcentaje indicado en cada eje corresponde al aporte a la varianza del sistema de cada componente principal (PCA).

En el gráfico de cargas factoriales (*loadings plot*) (figura 9A) se representan las 18 variables incluidas en el análisis como vectores. Con base al ángulo y longitud (magnitud de dichos vectores) es posible determinar que PC1 (eje x) está determinado principalmente por las variables derivadas de los ensayos de actividad antioxidante y antibacteriana (exceptuando el porcentaje IROS y los resultados del ensayo FIC) y los de cuantificación de TPC y TFC. Para este componente, los resultados altos de IC_{50} en los ensayos de determinación de capacidad barredora del radical DPPH y LPO tienden hacia valores negativos, mientras los datos elevados de TPC, TFC, IAB y de actividad antioxidante determinada mediante los ensayos ORAC, FRAP y ERYCA tiende hacia valores positivos. En el caso de PC2 (eje y), este componente se encuentra determinado principalmente por las variables SCF, TMA, la cantidad de rutina y la actividad en el ensayo FIC. Por lo tanto, para este componente una actividad quelante alta tiende hacia datos positivos, mientras que cantidades elevadas de TMA, SCF y de concentración de rutina promueven un desplazamiento hacia valores negativos.

Además, al observar la cercanía entre los puntos de cada variable es posible establecer que el conjunto de las variables TPC, TFC, IAB, ORAC, FRAP y ERYCA presenta una elevada correlación positiva entre sí de manera similar al conjunto de dos variables compuesto por los resultados de los ensayos de determinación de capacidad barredora del radical DPPH y LPO. La dirección opuesta entre ambos conjuntos de variables plantea una fuerte correlación negativa entre cada uno de los parámetros que los componen, lo cual tiene sentido si se considera que los valores de IC_{50} en los ensayos de determinación de capacidad barredora del radical DPPH y LPO son inversamente proporcionales a la actividad antioxidante, a diferencia de los resultados de los ensayos ORAC, FRAP y ERYCA que más bien guardan una relación de proporcionalidad con la potencia antioxidante de los extractos evaluados.

Por otra parte, se pueden reconocer dos grupos adicionales de variables, el primer grupo está compuesto por el contenido de isoquercetina, lawsona y quercetina, las cuales presentan tendencias a una correlación positiva entre sí y con las variables TPC, TFC, IAB, ORAC, FRAP y ERYCA. El segundo conjunto está integrado por TMA, el contenido de rutina y SCF. En dicho conjunto, las variables tienden a correlacionar positivamente entre sí, pero negativamente con respecto a los resultados del ensayo FIC. Para las variables correspondientes al porcentaje IROS, concentración de kaempferol y concentración de escopoletina, los ángulos, la poca magnitud de sus vectores, así como la separación de ellos con respecto a otros parámetros incluidos en el análisis PCA son factores que indican bajas correlaciones con respecto a las variables relacionadas a la determinación de actividad antioxidante y antibacteriana.

La correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos es un fenómeno previamente reportado para otras plantas, tal y como lo son las bayas y hojas de frambuesa (318) y extractos de diferentes partes anatómicas de *Rhus verniciflua* y *Papaver rhoeas* (319,320). En el caso de extractos de plantas del género *Impatiens*, ha sido descrita previamente la existencia de correlación significativa entre sus contenidos de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, sin embargo, no se había hallado una correlación significativa con respecto a su actividad antibacteriana (153,285)

Las correlaciones significativas observadas entre el contenido de compuestos fenólicos con la actividad antioxidante y antibacteriana pueden ser explicada por las reconocidas propiedades de este tipo de metabolito como agentes antioxidantes y antimicrobianos (26,321-323). Tal y como es el caso de la quercetina y de la rutina, cuyo contenido podría ser incluso utilizado como un indicador orientativo de la potencia de la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de *I. hawkeri* en futuros estudios.

Las correlaciones significativas entre los resultados de los ensayos químicos FRAP, ORAC y de determinación de capacidad barredora del radical DPPH con los

ensayos biológicos LPO y ERYCA sugieren que los extractos ejercen su actividad antioxidante principalmente por su capacidad de estabilizar radicales libres capaces de inducir peroxidación lipídica. Por otra parte, la ausencia de correlación significativa entre los resultados del ensayo de determinación de inhibición de la generación de ROS a nivel intracelular y los datos de los ensayos químicos de actividad antioxidante y de cuantificación de compuestos fenólicos puede deberse a que los metabolitos fenólicos de los extractos de *I. hawkeri* tienen una baja capacidad de atravesar la membrana celular, a que presenten baja potencia para la modulación de las vías de señalización reguladoras de los sistemas antioxidantes celulares, a que fenómenos como la sinergia y antagonismo estén influenciado los resultados obtenidos o a que otro tipo de compuesto diferente a los compuestos fenólicos sea el principal responsable de los efectos antioxidantes determinado con el ensayo en biológico en cuestión.

El gráfico bidimensional de puntuaciones factoriales (*score plot*) para los extractos (figura 9B) muestra que los extractos pueden ser clasificados en dos categorías principales correspondientes a extractos con actividad antioxidante alta con efecto antibacteriano y extractos con actividad antioxidante baja sin efecto antibacteriano. Los extractos de la primera categoría se ubican en valores positivos de PC1 y los de la segunda categoría en valores negativos para la misma componente principal. Los extractos de la primera categoría se derivan de flores y hojas de *I. hawkeri* mientras que los de la segunda son extractos del resto de partes anatómicas de la planta.

Los extractos de la primera categoría presentan tres extractos agrupados, correspondientes a HH-20, HH-21 y HS-21, los cuales tienen un perfil de actividad antioxidante y antibacteriana similar. En el caso de FL-20, su posición en el gráfico de la figura 9B está determinada por sus valores más elevados de TMA, SCF y de concentración de rutina, lo cual se desprende del gráfico de figura 9A en el que se puede observar la dirección de los vectores de dichas variables.

Por otro lado, la posición de HL-21 en el gráfico de la figura 9B está condicionada por la actividad antioxidante superior, así como por los niveles más elevados para la concentración de lawsona, isoquercetina, TFC y TPC. Esto también se puede establecer a partir del gráfico de figura 9A en el que se puede observar la dirección de los vectores de esas variables. Por lo tanto, en términos generales, se puede concluir a partir del gráfico 9B que el extracto HL-21 corresponde al extracto con mejor perfil de actividad antioxidante, lo que puede asociarse con sus mayores niveles de compuestos fenólicos, siendo las dos variables más importantes relacionadas con esta característica los valores de TPC y TFC.

Finalmente, vale la pena aclarar que las comparaciones establecidas en la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio con respecto a datos de investigaciones realizadas previamente tienen únicamente carácter informativo y su objetivo es de orientar con respecto al potencial relativo de los extractos de *I. hawkeri* como agentes antioxidantes y antibacterianos. Debe considerarse la existencia de diferencias entre las metodologías utilizadas en esta investigación con respecto a las empleadas en los estudios publicados utilizados como referencia para el establecimiento de los contrastes, aspecto que limita el uso de dichas comparaciones como un indicador estricto de la relevancia de los efectos observados para los extractos de *I. hawkeri* estudiados.

6. Conclusiones y recomendaciones:

Ha sido posible determinar tentativamente la presencia de metabolitos fenólicos bioactivos en los extractos de *I. hawkeri* que previamente han sido reportados en otras plantas del género *Impatiens*, tal y como es el caso de la quercetina, kaempferol, rutina, isoquercetina, lawsona y escopoletina. Los resultados demuestran la heterogeneidad cualitativa y cuantitativa en la distribución de estos metabolitos entre diferentes partes anatómicas de *I. hawkeri*, lo cual puede sentar un precedente útil para orientar futuros estudios de aislamiento y elucidación estructural mediante técnicas espectroscópicas para la confirmación de la identidad de los compuestos detectados. Además, con ese aislamiento se podría valorar la relevancia de estas sustancias para los efectos biológicos ejercidos por los extractos de la planta al evaluar su actividad individualmente.

El análisis de resultados obtenidos demuestra que la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de *I. hawkeri* preparados por maceración con etanol al 80 % v/v presentan variaciones significativas en función de la sección o parte anatómica de la planta utilizada para su preparación. Dichos datos también han hecho posible definir que, en términos generales, las hojas y flores permiten obtener los extractos más activos, sin embargo, por su abundancia relativa, es más factible el uso de hojas para la preparación de extractos dada la mayor disponibilidad de este material vegetal.

Otra conclusión que se desprende de los resultados es que la técnica del secado de las hojas tiene un impacto significativo en las propiedades antioxidantes y antibacterianas de los extractos hidroalcohólicos que se preparen con ellas. El secado por liofilización permite la obtención de extractos con mejor perfil de actividad antioxidante, mientras el secado al horno permite obtener extractos con mejor actividad antibacteriana.

Los contenidos de TPC, TFC, SCF, quercetina y rutina son parámetros químicos que presentan las correlaciones más significativas con la actividad

antioxidante y antibacteriana. Por lo tanto, es posible determinar que los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, tienen una relación con los efectos biológicos observados. Por su parte, la correlación significativa entre los datos de las pruebas químicas de evaluación de la actividad antioxidante (FRAP, ORAC y ensayo de determinación de la actividad barredora sobre el radical DPPH) y los resultados de los ensayos LPO y ERYCA demuestran que la capacidad reductiva y de estabilización de radicales libres son fenómenos que permiten explicar la actividad antioxidante de los extractos en los modelos biológicos mencionados.

Los resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular en células Vero no presentan correlaciones significativas con los datos definidos mediante los ensayos químicos de determinación de actividad antioxidante ni de cuantificación de compuestos fenólicos. De hecho, el extracto con mayor capacidad para reducir la generación de radicales libres a nivel intracelular es el obtenido de la planta entera, uno de los que presenta menor cantidad de compuestos fenólicos. Esto sugiere la posibilidad de que los compuestos fenólicos de los extractos de *I. hawkeri* tengan baja capacidad de atravesar la membrana celular, que presenten baja potencia para la modulación de las vías de señalización reguladoras de los sistemas antioxidantes celulares, que fenómenos como la sinergia y antagonismo estén influenciado los resultados obtenidos o que otro tipo de compuesto diferente a los metabolitos fenólicos sea el principal responsable de los efectos antioxidantes observados bajo el ensayo en cuestión. Para poder definir cuál de estos factores es el más importante, se requiere de la combinación de estudios metabolómicos más amplios de los extractos y del uso de modelos biológicos complementarios, como lo pueden ser ensayos de permeabilidad a través de monocapas celulares y estudios de regulación de vías de señalización específicas.

En el caso de la actividad antibacteriana de los extractos, se concluye que la misma es débil y que presenta un espectro de actividad focalizado en bacterias Gram-positivas. Para estudios futuros se puede analizar el fraccionamiento de los extractos, sobre todo del obtenido de hojas secadas al horno, para valorar la posibilidad de que la

potencia antimicrobiana aumente mediante la concentración de los compuestos bioactivos. Inclusive, esta es una posibilidad que se puede considerar si se quiere optimizar la actividad antioxidante de este tipo de extracto. Otra posibilidad es realizar estudios con extractos preparados a partir del mismo material vegetal, pero empleando otras técnicas de extracción y sistemas de solventes. Estos estudios pueden ayudar a seleccionar condiciones de extracción para producir extractos con perfiles de actividad optimizados.

Finalmente, al integrar la información obtenida, se puede definir que el extracto obtenido de hojas sujetas a secado por liofilización es, en términos generales, el más promisorio para realizar futuros estudios metabolómicos y que permitan comprender de una manera más completa su composición, así como para realizar ensayos biológicos *in vitro* con el propósito de definir los mecanismos moleculares de acción antioxidante. Inclusive, dicho tipo de extracto posee el mayor potencial para la realización de estudios *in vivo* que evalúen su actividad antioxidante y su potencial utilidad terapéutica en modelos de enfermedades relacionadas con el desarrollo de estrés oxidativo, para lo cual será necesario definir previamente su toxicidad bajo modelos animales adecuados.

7. Referencias

1. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1245049. doi: 10.1155/2016/1245049.
2. Murotomi K, Umeno A, Shichiri M, Tanito M, Yoshida Y. Significance of Singlet Oxygen Molecule in Pathologies. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3):2739. doi: 10.3390/ijms24032739.
3. Shergalis AG, Hu S, Bankhead A 3rd, Neamati N. Role of the ERO1-PDI interaction in oxidative protein folding and disease. *Pharmacol Ther*. 2020 Jun;210:107525. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107525.
4. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2016 Nov;100:14-31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
5. Puente-Maestu L, Tejedor A, Lázaro A, de Miguel J, Alvarez-Sala L, González-Aragoneses F, Simón C, Agustí A. Site of mitochondrial reactive oxygen species production in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with exercise oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Sep;47(3):358-62. doi: 10.1165/rcmb.2011-0382OC.
6. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*. 2019 Jul;44(1):3-15. doi: 10.3892/ijmm.2019.4188.
7. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018 Mar 16;122(6):877-902. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311401.

8. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
9. Bonekamp NA, Völkl A, Fahimi HD, Schrader M. Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors*. 2009 Jul-Aug;35(4):346-55. doi: 10.1002/biof.48.
10. Yang K, Wu Y, Xie H, Li M, Ming S, Li L, Li M, Wu M, Gong S, Huang X. Macrophage-mediated inflammatory response decreases mycobacterial survival in mouse MSCs by augmenting NO production. *Scientific Reports*. 2016;6(1):27326. doi:10.1038/srep27326.
11. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(9):689–709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1
12. Möller MN, Rios N, Trujillo M, Radi R, Denicola A, Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem*. 2019 Oct 4;294(40):14776-14802. doi: 10.1074/jbc.REV119.006136.
13. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
14. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26464-72. doi: 10.1074/jbc.R113.472936.
15. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):5839-5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115.

16. Castino R, Fiorentino I, Cagnin M, Giovia A, Isidoro C. Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. *Toxicol Sci.* 2011 Oct;123(2):523-41. doi: 10.1093/toxsci/kfr179.
17. Heaton RA, Heales S, Rahman K, Sexton DW, Hargreaves I. The Effect of Cellular Coenzyme Q10 Deficiency on Lysosomal Acidification. *J Clin Med.* 2020 Jun 19;9(6):1923. doi: 10.3390/jcm9061923.
18. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008 Apr;129(4):389-406. doi: 10.1007/s00418-008-0394-y.
19. Richter K, Konzack A, Pihlajaniemi T, Heljasvaara R, Kietzmann T. Redox-fibrosis: Impact of TGF β 1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:344-352. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.015.
20. Zeeshan HM, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar 2;17(3):327. doi: 10.3390/ijms17030327.
21. Veith A, Moorthy B. Role of cytochrome p450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr Opin Toxicol.* 2018 Feb;7:44-51. doi: 10.1016/j.cotox.2017.10.003.
22. Kargapolova Y, Geißen S, Zheng R, Baldus S, Winkels H, Adam M. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants (Basel).* 2021 Apr 5;10(4):562. doi: 10.3390/antiox10040562.

23. Onyango AN. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2398573. doi: 10.1155/2016/2398573.
24. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*. 2001 Oct 12;89(8):650-60. doi: 10.1161/hh2001.098351.
25. Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Corrêa TC, Toma IN, Bertolucci A, Oliveira MC, Motta FD, Medeiros MH, Mascio PD. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life*. 2007 Apr-May;59(4-5):322-31. doi: 10.1080/15216540701242508.
26. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010 Oct 21;15(10):7313-52. doi: 10.3390/molecules15107313.
27. Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014 Jan 27;6(2):466-88. doi: 10.3390/nu6020466.
28. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis CD, Marinari UM, Pronzato MA, Traverso N, Domenicotti C. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6235641. doi: 10.1155/2016/6235641.
29. Rahman I, Biswas SK. Oxidants and antioxidants. En: Lauren GJ, Shapiro SD. Eds. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Academic Press; 2009. p. 258-266.

30. Aich A, Freundlich M, Vekilov PG. The free heme concentration in healthy human erythrocytes. *Blood Cells Mol Dis.* 2015 Dec;55(4):402-9. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.09.003.
31. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(11):1030–1043. doi:10.1002/mnfr.200500076.
32. Rashid MH, Babu D, Siraki AG. Interactions of the antioxidant enzymes NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and NRH: Quinone oxidoreductase 2 (NQO2) with pharmacological agents, endogenous biochemicals and environmental contaminants. *Chem Biol Interact.* 2021 Aug 25;345:109574. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109574.
33. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
34. Suraweera TL, Rupasinghe HPV, Dellaire G, Xu Z. Regulation of Nrf2/ARE Pathway by Dietary Flavonoids: A Friend or Foe for Cancer Management? *Antioxidants (Basel).* 2020 Oct 11;9(10):973. doi: 10.3390/antiox9100973.
35. Wang R, Liang L, Matsumoto M, Iwata K, Umemura A, He F. Reactive Oxygen Species and NRF2 Signaling, Friends or Foes in Cancer? *Biomolecules.* 2023 Feb 11;13(2):353. doi: 10.3390/biom13020353.
36. Wang SB, Venkatraman V, Crowgey EL, Liu T, Fu Z, Holewinski R, Ranek M, Kass DA, O'Rourke B, Van Eyk JE. Protein S-Nitrosylation Controls Glycogen Synthase Kinase 3 β Function Independent of Its Phosphorylation State. *Circ Res.* 2018 May 25;122(11):1517-1531. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312789.

37. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, Hayes JD. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2015 Nov;88(Pt B):108-146. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
38. Dietrich C. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7943495. doi: 10.1155/2016/7943495.
39. Grishanova AY, Perepechaeva ML. Aryl Hydrocarbon Receptor in Oxidative Stress as a Double Agent and Its Biological and Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 16;23(12):6719. doi: 10.3390/ijms23126719.
40. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96.
41. Sorbara MT, Girardin SE. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell Res.* 2011 Apr;21(4):558-60. doi: 10.1038/cr.2011.20.
42. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol.* 2014 Sep 29;5:352. doi: 10.3389/fphys.2014.00352.
43. Anderson ER, Shah YM. Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol.* 2013 Jan;3(1):315-30. doi: 10.1002/cphy.c120016.
44. Handa P, Morgan-Stevenson V, Maliken BD, Nelson JE, Washington S, Westerman M, Yeh MM, Kowdley KV. Iron overload results in hepatic oxidative stress, immune cell activation, and hepatocellular ballooning injury, leading to

- nonalcoholic steatohepatitis in genetically obese mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):G117-27. doi: 10.1152/ajpgi.00246.2015.
45. Gates KS. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol*. 2009 Nov;22(11):1747-60. doi: 10.1021/tx900242k.
46. Ríos-Arrabal S, Artacho-Cordón F, León J, Román-Marinetto E, Del Mar Salinas-Asensio M, Calvente I, Núñez MI. Involvement of free radicals in breast cancer. *Springerplus*. 2013 Aug 27;2:404. doi: 10.1186/2193-1801-2-404.
47. Chakraborty S, Karmakar K, Chakravorty D. Cells producing their own nemesis: understanding methylglyoxal metabolism. *IUBMB Life*. 2014 Oct;66(10):667-78. doi: 10.1002/iub.1324.
48. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Aug 10;38(2):167-197. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
49. Kawai Y, Furuhashi A, Toyokuni S, Aratani Y, Uchida K. Formation of acrolein-derived 2'-deoxyadenosine adduct in an iron-induced carcinogenesis model. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50346-54. doi: 10.1074/jbc.M309057200.
50. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*. 2003 Aug 15;278(33):31426-33. doi: 10.1074/jbc.M212549200.
51. Leone A, Nigro C, Nicolò A, Prevezano I, Formisano P, Beguinot F, Miele C. The Dual-Role of Methylglyoxal in Tumor Progression - Novel Therapeutic Approaches. *Front Oncol*. 2021 Mar 22;11:645686. doi: 10.3389/fonc.2021.645686.

52. Tang MS, Wang HT, Hu Y, Chen WS, Akao M, Feng Z, Hu W. Acrolein induced DNA damage, mutagenicity and effect on DNA repair. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Sep;55(9):1291-300. doi: 10.1002/mnfr.201100148.
53. Van Loenhout J, Peeters M, Bogaerts A, Smits E, Deben C. Oxidative Stress-Inducing Anticancer Therapies: Taking a Closer Look at Their Immunomodulating Effects. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Nov 27;9(12):1188. doi: 10.3390/antiox9121188.
54. Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*. 2015 Nov 12;527(7577):186-91. doi: 10.1038/nature15726.
55. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786.
56. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965. doi: 10.1155/2016/4350965.
57. Ma H, Das T, Pereira S, Yang Z, Zhao M, Mukerji P, Hoffman RM. Efficacy of dietary antioxidants combined with a chemotherapeutic agent on human colon cancer progression in a fluorescent orthotopic mouse model. *Anticancer Res*. 2009 Jul;29(7):2421-6.
58. Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem*. 2005 Dec;16(12):705-13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.06.007.

59. Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H. The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 3;22(4):1509. doi: 10.3390/ijms22041509.
60. Pan Y, Lu Y, Zhou JD, Wang CX, Wang JQ, Fukunaga A, Yodoi J, Tian H. Prospect of thioredoxin as a possibly effective tool to combat OSAHS. *Sleep Breath*. 2023 May;27(2):421-429. doi: 10.1007/s11325-022-02640-z.
61. Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. *Physiol Rev*. 2020 Jan 1;100(1):407-461. doi: 10.1152/physrev.00001.2019.
62. Zhang X, Sessa WC, Fernández-Hernando C. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2018 Sep 25;5:130. doi: 10.3389/fcvm.2018.00130.
63. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14;411(23-24):1875-82. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.038.
64. Bobryshev YV, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG, Orekhov AN. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9582430. doi: 10.1155/2016/9582430.
65. Malekmohammad K, Bezsonov EE, Rafieian-Kopaei M. Role of Lipid Accumulation and Inflammation in Atherosclerosis: Focus on Molecular and Cellular Mechanisms. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Sep 6;8:707529. doi: 10.3389/fcvm.2021.707529.

66. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Jun;13(6):368-380. doi: 10.1038/nrneph.2017.51.
67. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, Laviola L, Giorgino F. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 May 14;2020:5732956. doi: 10.1155/2020/5732956.
68. Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2004 Feb 3;109(4):544-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000109701.77059.E9.
69. Yang F, Chen H, Liu Y, Yin K, Wang Y, Li X, Wang G, Wang S, Tan X, Xu C, Lu Y, Cai B. Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(4):1072-82. doi: 10.1159/000354507.
70. Bhatia V, Sharma S. Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2021 Feb 15;421:117253. doi: 10.1016/j.jns.2020.117253.
71. Tamagno E, Guglielmotto M, Vaschiaveo V, Tabaton M. Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease. Which Comes First: The Chicken or the Egg? *Antioxidants (Basel).* 2021 Sep 16;10(9):1479. doi: 10.3390/antiox10091479.
72. Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, Masutani H, Yodoi J, Urano Y, Nagano T, Ichijo H. Amyloid beta induces

neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.* 2005 Jan;12(1):19-24. doi: 10.1038/sj.cdd.4401528.

73. Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci.* 2005 Feb 2;25(5):1149-58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4736-04.2005
74. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):461-91. doi: 10.3233/JPD-130230.
75. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2019 Dec;18(6):e13031. doi: 10.1111/acel.13031
76. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis.* 2011;1(1):19-33. doi: 10.3233/JPD-2011-11023.
77. Nonnekes J, Post B, Tetrud JW, Langston JW, Bloem BR. MPTP-induced parkinsonism: an historical case series. *Lancet Neurol.* 2018 Apr;17(4):300-301. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30072-3. Epub 2018 Mar 13. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2018 Mar 27;: PMID: 29553378.
78. Konopko A, Litwinienko G. Unexpected Role of pH and Microenvironment on the Antioxidant and Synergistic Activity of Resveratrol in Model Micellar and Liposomal Systems. *J Org Chem.* 2022 Feb 4;87(3):1698-1709. doi: 10.1021/acs.joc.1c01801.
79. Schaich KM, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J Funct Foods.* 2015;14:111-125. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.043.

80. Santos JS, Alvarenga Brizola VR, Granato D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chem.* 2017 Jan 1;214:515-522. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.091.
81. Cai SC, Yi CA, Hu XS, Tang GY, Yi LM, Li XP. Isoquercitrin Upregulates Aldolase C Through Nrf2 to Ameliorate OGD/R-Induced Damage in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res.* 2021 Dec;39(6):1959-1969. doi: 10.1007/s12640-021-00430-1.
82. Chen M, Vial ML, Gee L, Davis RA, St John JA, Ekberg JAK. The plant natural product 2-methoxy-1,4-naphthoquinone stimulates therapeutic neural repair properties of olfactory ensheathing cells. *Sci Rep.* 2020 Jan 22;10(1):951. doi: 10.1038/s41598-020-57793-2.
83. Khalaf MM, Hassan SM, Sayed AM, Abo-Youssef AM. Ameliorate impacts of scopoletin against vancomycin-induced intoxication in rat model through modulation of Keap1-Nrf2/HO-1 and I κ B α -P65 NF- κ B/P38 MAPK signaling pathways: Molecular study, molecular docking evidence and network pharmacology analysis. *Int Immunopharmacol.* 2022 Jan;102:108382. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108382.
84. Yao H, Sun J, Wei J, Zhang X, Chen B, Lin Y. Kaempferol Protects Blood Vessels From Damage Induced by Oxidative Stress and Inflammation in Association With the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Front Pharmacol.* 2020 Jul 22;11:1118. doi: 10.3389/fphar.2020.01118.
85. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J.* 1999 Jun 15;340 (Pt 3)(Pt 3):715-22.

86. Lozza L, Moura-Alves P, Domaszewska T, Lage Crespo C, Streata I, Kreuchwig A, Puyskens A, Bechtle M, Klemm M, Zedler U, Silviu Ungureanu B, Guhlich-Bornhof U, Koehler AB, Stäber M, Mollenkopf HJ, Hurwitz R, Furkert J, Krause G, Weiner J 3rd, Jacinto A, Mihai I, Leite-de-Moraes M, Siebenhaar F, Maurer M, Kaufmann SHE. The Henna pigment Lawsone activates the Aryl Hydrocarbon Receptor and impacts skin homeostasis. *Sci Rep*. 2019 Jul 26;9(1):10878. doi: 10.1038/s41598-019-47350-x. Erratum in: *Sci Rep*. 2020 May 20;10(1):8640.

87. Michalski J, Deinzer A, Stich L, Zinser E, Steinkasserer A, Knippertz I. Quercetin induces an immunoregulatory phenotype in maturing human dendritic cells. *Immunobiology*. 2020 Jul;225(4):151929. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151929.

88. DiGiandomenico A, Sellman BR. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation? *Curr Opin Microbiol*. 2015 Oct;27:78-85. doi: 10.1016/j.mib.2015.07.014.

89. Piddock LJ. The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? *Lancet Infect Dis*. 2012 Mar;12(3):249-53. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70316-4.

90. Hasan CM, Dutta D, Nguyen ANT. Revisiting Antibiotic Resistance: Mechanistic Foundations to Evolutionary Outlook. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Dec 30;11(1):40. doi: 10.3390/antibiotics11010040.

91. Salmond GPC, Welch M. Antibiotic resistance: adaptive evolution. *Lancet*. 2008;372:S97-S103. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61888-7.

92. Skalet AH, Cevallos V, Ayele B, Gebre T, Zhou Z, Jorgensen JH, Zerihun M, Habte D, Assefa Y, Emerson PM, Gaynor BD, Porco TC, Lietman TM, Keenan

- JD. Antibiotic selection pressure and macrolide resistance in nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae*: a cluster-randomized clinical trial. *PLoS Med*. 2010 Dec 14;7(12):e1000377. doi: 10.1371/journal.pmed.1000377.
93. Nelson RE, Hatfield KM, Wolford H, Samore MH, Scott RD, Reddy SC, Olubajo B, Paul P, Jernigan JA, Baggs J. National Estimates of Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Hospitalized Patients in the United States. *Clin Infect Dis*. 2021;72(Suppl 1), S17–S26. doi: 10.1093/cid/ciaa1581.
94. da Silva Ramos FJ, de Freitas FGR, Machado FR. Sepsis in patients hospitalized with coronavirus disease 2019: how often and how severe? *Curr Opin Crit Care*. 2021 Oct 1;27(5):474-479. doi: 10.1097/MCC.0000000000000861.
95. Zhang H, Zhang Y, Wu J, Li Y, Zhou X, Li X, Chen H, Guo M, Chen S, Sun F, Mao R, Qiu C, Zhu Z, Ai J, Zhang W. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):1958-1964. doi: 10.1080/22221751.2020.1812437.
96. Bassetti M, Righi E. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms. *Langenbecks Arch Surg*. 2015 Feb;400(2):153-65. doi: 10.1007/s00423-015-1280-4.
97. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 Feb 12;399(10325):629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. Epub 2022 Jan 19. Erratum in: *Lancet*. 2022 Oct 1;400(10358):1102.
98. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel

- J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
99. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. 2021 Dec;81(18):2117-2131. doi: 10.1007/s40265-021-01635-6.
100. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
101. Begier E, Rosenthal NA, Gurtman A, Kartashov A, Donald RGK, Lockhart SP. Epidemiology of Invasive *Escherichia coli* Infection and Antibiotic Resistance Status Among Patients Treated in US Hospitals: 2009-2016. *Clin Infect Dis*. 2021 Aug 16;73(4):565-574. doi: 10.1093/cid/ciab005.
102. Bonten M, Johnson JR, van den Biggelaar AHJ, Georgalis L, Geurtsen J, de Palacios PI, Gravenstein S, Verstraeten T, Hermans P, Poolman JT. Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clin Infect Dis*. 2021 Apr 8;72(7):1211-1219. doi: 10.1093/cid/ciaa210.
103. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018 Jul;6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

104. Peirano G, Chen L, Nobrega D, Finn TJ, Kreiswirth BN, DeVinney R, Pitout JDD. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015-2017. *Emerg Infect Dis.* 2022 May;28(5):924–31. doi: 10.3201/eid2805.212535.
105. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017 Mar 29;16(1):18. doi: 10.1186/s12941-017-0191-3.
106. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jan 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.
107. Eng SK, Pusparaja, P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci.* 2015;8(3):284-293. doi: 10.1080/21553769.2015.105124.
108. Dekker D, Krumkamp R, Eibach D, Sarpong N, Boahen KG, Frimpong M, Fechtner E, Poppert S, Hagen RM, Schwarz NG, Adu-Sarkodie Y, Owusu-Dabo E, Im J, Marks F, Frickmann H, May J. Characterization of *Salmonella enterica* from invasive bloodstream infections and water sources in rural Ghana. *BMC Infect Dis.* 2018 Jan 19;18(1):47. doi: 10.1186/s12879-018-2957-4.
109. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):603-61. doi: 10.1128/CMR.00134-14.

110. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Apr;25(2):362-86. doi: 10.1128/CMR.05022-11.
111. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Johnson PD, Howden BP. Vancomycin minimum inhibitory concentration, host comorbidities and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Dec;19(12):1163-8. doi: 10.1111/1469-0691.12168.
112. Sakamoto Y, Yamauchi Y, Jo T, Michihata N, Hasegawa W, Takeshima H, Matsui H, Fushimi K, Yasunaga H, Nagase T. In-hospital mortality associated with community-acquired pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a matched-pair cohort study. *BMC Pulm Med.* 2021 Nov 3;21(1):345. doi: 10.1186/s12890-021-01713-1.
113. Jean-Pierre V, Boudet A, Sorlin P, Menetrey Q, Chiron R, Lavigne JP, Marchandin H. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* in the Specific Context of Cystic Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 29;24(1):597. doi: 10.3390/ijms24010597.
114. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. *Front Microbiol.* 2018 Nov 27;9:2749. doi: 10.3389/fmicb.2018.02749.
115. Dengler Haunreiter V, Boumasmoud M, Häffner N, Wipfli D, Leimer N, Rachmühl C, Kühnert D, Achermann Y, Zbinden R, Benussi S, Vulin C, Zinkernagel AS. In-host evolution of *Staphylococcus epidermidis* in a

- pacemaker-associated endocarditis resulting in increased antibiotic tolerance. *Nat Commun.* 2019 Mar 8;10(1):1149. doi: 10.1038/s41467-019-09053-9.
116. Ehlers MM, Strasheim W, Lowe M, Ueckermann V, Kock MM. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Implicated in Catheter-Related Bloodstream Infections at an Academic Hospital in Pretoria, South Africa. *Front Microbiol.* 2018 Mar 7;9:417. doi: 10.3389/fmicb.2018.00417.
117. Petri O, Vrenjo K, Angjeli A, Abazaj E, Kika B, Koraqi A, Daka A. Prevalence of Catheter-related Bloodstream Infection and Distribution of Multidrug Resistance Microorganisms among the Hospitalized Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 10(A), 181-186. doi: 10.3889/oamjms.2022.7464
118. Dadashi M, Sharifian P, Bostanshirin N, Hajikhani B, Bostanghadiri N, Khosravi-Dehaghi N, van Belkum A, Darban-Sarokhalil D. The Global Prevalence of Daptomycin, Tigecycline, and Linezolid-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains From Human Clinical Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne).* 2021 Sep 10;8:720647. doi: 10.3389/fmed.2021.720647.
119. Dahl A, Iversen K, Tonder N, Hoest N, Arpi M, Dalsgaard M, Chehri M, Soerensen LL, Fanoë S, Junge S, Hoest U, Valeur N, Lauridsen TK, Fosbol E, Hoi-Hansen T, Bruun NE. Prevalence of Infective Endocarditis in *Enterococcus faecalis* Bacteremia. *J Am Coll Cardiol.* 2019 Jul 16;74(2):193-201. doi: 10.1016/j.jacc.2019.04.059.
120. Hayakawa K, Marchaim D, Palla M, Gudur UM, Pulluru H, Bathina P, Alshabani K, Govindavarjulla A, Mallad A, Abbadi DR, Chowdary D, Kakarlapudi H, Guddati H, Das M, Kannekanti N, Vemuri P, Doddamani R, Mundra VR, Guddeti RR, Policherla R, Bai S, Lohithaswa S, Shashidharan SP, Chidurala S, Diviti S,

- Sukayogula K, Joseph M, Pogue JM, Lephart PR, Martin ET, Rybak MJ, Kaye KS. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case-case-control study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):49-55. doi: 10.1128/AAC.01271-12.
121. Grundmann H, Klugman KP, Walsh T, Ramon-Pardo P, Sigauque B, Khan W, Laxminarayan R, Heddini A, Stelling J. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug Resist Updat*. 2011 Apr;14(2):79-87. doi: 10.1016/j.drug.2011.02.007.
122. Oldfield E, Feng X. Resistance-resistant antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Dec;35(12):664-74. doi: 10.1016/j.tips.2014.10.007.
123. Kesselheim AS, Outtersen K. Fighting antibiotic resistance: marrying new financial incentives to meeting public health goals. *Health Aff (Millwood)*. 2010 Sep;29(9):1689-96. doi: 10.1377/hlthaff.2009.0439.
124. Hughes D, Karlén A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci*. 2014 May;119(2):162-9. doi: 10.3109/03009734.2014.896437.
125. O'Connell KM, Hodgkinson JT, Sore HF, Welch M, Salmond GP, Spring DR. Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 Oct 4;52(41):10706-33. doi: 10.1002/anie.201209979.
126. Esmail MAM, Abdulghany HM, Khairy RM. Prevalence of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecalis* in Hospital-Acquired Surgical Wound Infections and Bacteremia: Concomitant Analysis of Antimicrobial Resistance Genes. *Infect Dis (Auckl)*. 2019 Oct 15;12:1178633719882929. doi: 10.1177/1178633719882929.

127. Braz VS, Melchior K, Moreira CG. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Dec 21;10:548492. doi: 10.3389/fcimb.2020.548492.
128. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*. 2019 Mar 1;43(2):123-144. doi: 10.1093/femsre/fuy043.
129. Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS, Zhang D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Front Microbiol*. 2021 Dec 22;12:750662. doi: 10.3389/fmicb.2021.750662.
130. Lee B, Yeroushalmi K, Me HM, Sojitra P, Jilani U, Iqbal S, Ahmed S, Verley J, Akella J. Community acquired *Klebsiella pneumoniae* meningitis: a case report. *Germs*. 2018 Jun 4;8(2):92-95. doi: 10.18683/germs.2018.1136.
131. Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):308-41. doi: 10.1128/CMR.00066-12.
132. Cavalcanti VP, Camargo LA, Moura FS, Fernandes EJM, Lamaro-Cardoso J, Braga CADSB, André MCP. *Staphylococcus aureus* in tonsils of patients with recurrent tonsillitis: prevalence, susceptibility profile, and genotypic characterization. *Braz J Infect Dis*. 2019 Jan-Feb;23(1):8-14. doi: 10.1016/j.bjid.2018.12.003.
133. Kwiecinski JM, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol*. 2020 Feb;53:51-60. doi: 10.1016/j.mib.2020.02.005.

134. Pintado V, Pazos R, Jiménez-Mejías ME, Rodríguez-Guardado A, Díaz-Pollán B, Cabellos C, García-Lechuz JM, Lora-Tamayo J, Domingo P, Muñoz E, Domingo D, González-Romo F, Lepe-Jiménez JA, Rodríguez-Lucas C, Gil A, Pelegrín I, Chaves F, Pomar V, Ramos A, Alarcón T, Pérez-Cecilia E. Staphylococcus aureus meningitis in adults: A comparative cohort study of infections caused by meticillin-resistant and meticillin-susceptible strains. *J Hosp Infect.* 2019 May;102(1):108-115. doi: 10.1016/j.jhin.2018.11.008.
135. Pivard M, Moreau K, Vandenesch F. Staphylococcus aureus Arsenal To Conquer the Lower Respiratory Tract. *mSphere.* 2021 May 19;6(3):e00059-21. doi: 10.1128/mSphere.00059-21.
136. Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Aug;7(8):555-67. doi: 10.1038/nrmicro2182.
137. Donadio S, Maffioli S, Monciardini P, Sosio M, Jabes D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *J Antibiot (Tokyo).* 2010 Aug;63(8):423-30. doi: 10.1038/ja.2010.62.
138. Wright GD. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol.* 2014 Mar;60(3):147-54. doi: 10.1139/cjm-2014-0063.
139. Morrison KC, Hergenrother PJ. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. *Nat Prod Rep.* 2014 Jan;31(1):6-14. doi: 10.1039/c3np70063a.
140. Davies J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr Opin Chem Biol.* 2011 Feb;15(1):5-10. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.11.001.

141. Demain AL. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014 Feb;41(2):185-201. doi: 10.1007/s10295-013-1325-z.
142. Golestani MR, Rad M, Bassami M, Afkhami-Goli A. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7. *Life Sci*. 2015 Aug 15;135:22-6. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.007.
143. AlSheikh HMA, Sultan I, Kumar V, Rather IA, Al-Sheikh H, Tasleem Jan A, Haq QMR. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Aug 4;9(8):480. doi: 10.3390/antibiotics9080480.
144. Yuan G, Guan Y, Yi H, Lai S, Sun Y, Cao S. Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. *Sci Rep*. 2021 May 18;11(1):10471. doi: 10.1038/s41598-021-90035-7.
145. Alam M, Bano N, Ahmad T, Sharangi AB, Upadhyay TK, Alraey Y, Alabdallah NM, Rauf MA, Saeed M. Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jun 26;11(7):855. doi: 10.3390/antibiotics11070855.
146. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol*. 2010 Jul 6;130(1):107-15. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.025.

147. Kumar H, Bhardwaj K, Cruz-Martins N, Nepovimova E, Oleksak P, Dhanjal DS, Bhardwaj S, Singh R, Chopra C, Verma R, Chauhan PP, Kumar D, Kuča K. Applications of Fruit Polyphenols and Their Functionalized Nanoparticles Against Foodborne Bacteria: A Mini Review. *Molecules*. 2021 Jun 6;26(11):3447. doi: 10.3390/molecules26113447.
148. Lobiuc A, Pavăl NE, Mangalagiu II, Gheorghită R, Teliban GC, Amăriucăi-Mantu D, Stoleru V. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*. 2023 Jan 22;28(3):1114. doi: 10.3390/molecules28031114.
149. Kho W, Kim MK, Jung M, Chong YP, Kim YS, Park KH, Chong Y. Strain-specific anti-biofilm and antibiotic-potentiating activity of 3',4'-difluoroquercetin. *Sci Rep*. 2020 Aug 25;10(1):14162. doi: 10.1038/s41598-020-71025-7.
150. Pinheiro PF, Menini LAP, Bernardes PC, Saraiva SH, Carneiro JWM, Costa AV, Arruda TR, Lage MR, Gonçalves PM, Bernardes CO, Alvarenga ES, Menini L. Semisynthetic Phenol Derivatives Obtained from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties. *J Agric Food Chem*. 2018 Jan 10;66(1):323-330. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04418.
151. Delgado-Rodríguez FV, Hidalgo O, Loría-Gutiérrez A, Weng-Huang NT. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts from whole plants of three *Impatiens* species (balsaminaceae). *Ancient Sci Life*. 2017;37:16-23. doi:10.4103/asl.ASL_162_17.
152. Yi W, Wetzstein HY. Effects of Drying and Extraction Conditions on the Biochemical Activity of Selected Herbs. *HortScience*. 2011;46(1), 70–73. doi:10.21273/hortsci.46.1.70.

153. Kang SN, Goo YM, Yang MR, Ibrahim RI, Cho JH, Kim IS, Lee OH. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from the stem and leaf of *Impatiens balsamina* L. (Balsaminaceae) at different harvest times. *Molecules*. 2013 May 29;18(6):6356-65. doi: 10.3390/molecules18066356.
154. Safdar MN, Kausar T, Nadeem M. Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the Mango Peel. *J Food Process Preserv*. 2016;41(4), e13028. doi:10.1111/jfpp.13028.
155. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015 Jan;95(1):204-9. doi: 10.1002/jsfa.6706.
156. Magalhães LM, Almeida MIGS, Barreiros L, Reis S, Segundo MA. Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. *Food Anal Methods*. 2012 Jun; 5(3):530–539. doi: 10.1007/s12161-011-9278-1.
157. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*. 2005 Sep-Oct;88(5):1269-78.
158. Kenny O, Brunton NP, Smyth TJ. *In vitro* protocols for measuring the antioxidant capacity of algal extracts. In: Stengel DB, Connan S, editors. *Natural Products from Marine Algae: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*.

Vol. 1308. New York: Springer Science Business Media; 2015. p. 375-402.

159. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*. 2001 Oct;49(10):4619-26. doi: 10.1021/jf010586o.
160. Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH· assay using several statistical programs. *Food Chem*. 2013 May 1;138(1):414-20. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001.
161. Işıl Berker K, Güçlü K, Tor İ, Demirata B, Apak R. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Anal Methods*. 2010;3(3):154–168. doi:10.1007/s12161-009-9117-9.
162. Azofeifa G, Quesada S, Pérez AM, Vaillant F, Michel A. Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *J Food Compost Anal*. 2015;42:56-62. doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.015.
163. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978 May;86(1):271-8. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
164. González E, Vaillant F, Rojas G, Pérez A. Novel semiautomated method for assessing in vitro cellular antioxidant activity using the light-scattering properties of human erythrocytes. *J Agric Food Chem*. 2010 Feb 10;58(3):1455-61. doi: 10.1021/jf903467x.

165. Toyoda A, Itagaki H. Development of an *in vitro* photosafety evaluation method utilizing intracellular ROS production in THP-1 cells. *J Toxicol Sci.* 2018;43(4):247-256. doi: 10.2131/jts.43.247.
166. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000 Sep;267(17):5421-6. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
167. Gómez-García M, Puente H, Argüello H, Mencía-Ares Ó, Rubio P, Carvajal A. *In vitro* Assessment of Antiviral Effect of Natural Compounds on Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus. *Front Vet Sci.* 2021 Mar 29;8:652000. doi: 10.3389/fvets.2021.652000.
168. Furger C. Live Cell Assays for the Assessment of Antioxidant Activities of Plant Extracts. *Antioxidants (Basel).* 2021 Jun 11;10(6):944. doi: 10.3390/antiox10060944.
169. American Type Culture Collection (ATCC). Virginia, Estados Unidos: American Type Culture Collection; 2020. Disponible en: <https://www.atcc.org/>
170. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016 Apr;6(2):71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
171. Jyotshna, Srivastava P, Killadi B, Shanker K. Uni-dimensional double development HPTLC-densitometry method for simultaneous analysis of mangiferin and lupeol content in mango (*Mangifera indica*) pulp and peel during storage. *Food Chem.* 2015 Jun 1;176:91-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.034.

172. Zhou B, Chang J, Wang P, Li J, Cheng D, Zheng PW. Qualitative and quantitative analysis of seven oligosaccharides in *Morinda officinalis* using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Biomed Mater Eng*. 2014;24(1):953-60. doi: 10.3233/BME-130890.
173. Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*. 2011 Apr;11(4):298-344. doi: 10.2174/138955711795305335.
174. Islam MS, Hossain R, Ahmed T, Rahaman MM, Al-Khafaji K, Khan RA, Sarkar C, Bappi MH, de Andrade EM, Araújo IM, Coutinho HDM, Kowalska G, Kowalski R, Hanif MA, Islam MT. Anxiolytic-like Effect of Quercetin Possibly through GABA Receptor Interaction Pathway: In Vivo and In Silico Studies. *Molecules*. 2022 Oct 22;27(21):7149. doi: 10.3390/molecules27217149.
175. Lim YH, Kim IH, Seo JJ. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J Microbiol*. 2007 Oct;45(5):473-7.
176. Vissiennon C, Nieber K, Kelber O, Butterweck V. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin--are they prodrugs? *J Nutr Biochem*. 2012 Jul;23(7):733-40. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.03.017.
177. Wang S, Yao J, Zhou B, Yang J, Chaudry MT, Wang M, Xiao F, Li Y, Yin W. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *J Food Prot*. 2018 Jan;81(1):68-78. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-214.

178. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, Gao Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2016;56:21–38. doi:10.1016/j.tifs.2016.07.004.
179. Szewczyk K. Phytochemistry of the genus *impatiens* (Balsaminaceae): A review. *Biochem Syst Ecol.* 2018;80:94–121. doi:10.1016/j.bse.2018.07.001
180. Ban C, Park JB, Cho S, Kim HR, Kim YJ, Bae H, Kim C, Kang H, Jang D, Shin YS, Kim DO, Kim H, Kweon DH. Characterization of *Ginkgo biloba* Leaf Flavonoids as Neuroexocytosis Regulators. *Molecules.* 2020 Apr 17;25(8):1829. doi: 10.3390/molecules25081829.
181. Dabeek WM, Marra MV. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients.* 2019 Sep 25;11(10):2288. doi: 10.3390/nu11102288.
182. Maiti S, Nazmeen A, Medda N, Patra R, Ghosh TK. Flavonoids Green tea against oxidant stress and inflammation with related human diseases. *Clin Nutr Exp.* 2019;24:1-14. doi:10.1016/j.yclnex.2018.12.004.
183. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J.* 2017 Feb;25(2):149-164. doi: 10.1016/j.jsps.2016.04.025.
184. Valentová K, Vrba J, Bancířová M, Ulrichová J, Křen V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol.* 2014 Jun;68:267-82. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.018.
185. Yun J, Woo ER, Lee DG. Effect of isoquercitrin on membrane dynamics and apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018 Feb;1860(2):357-363. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.11.008.

186. Mikhaeil BR, Badria FA, Maatooq GT, Amer MM. Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2004 Jul-Aug;59(7-8):468-76. doi: 10.1515/znc-2004-7-803.
187. Rahmoun NM, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Benabdallah M, Villemin D, Choukchou-Braham N. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. *Med Mal Infect*. 2012 Jun;42(6):270-5. doi: 10.1016/j.medmal.2012.05.002.
188. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Comparison of antimicrobial activities of naphthoquinones from *Impatiens balsamina*. *Nat Prod Res*. 2012;26(12):1119-24. doi: 10.1080/14786419.2010.551297.
189. Yang X, Summerhurst DK, Koval SF, Ficker C, Smith ML, Bernards MA. Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. *Phytother Res*. 2001 Dec;15(8):676-80. doi: 10.1002/ptr.906.
190. Conneely LJ, Berkowitz O, Lewsey MG. Emerging trends in genomic and epigenomic regulation of plant specialised metabolism. *Phytochemistry*. 2022 Nov;203:113427. doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113427.
191. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem*. 2020 Mar;148:80-89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
192. Ruckli R, Hesse K, Glauser G, Rusterholz HP, Baur B. Inhibitory potential of naphthoquinones leached from leaves and exuded from roots of the invasive plant *Impatiens glandulifera*. *J Chem Ecol*. 2014 Apr;40(4):371-8. doi: 10.1007/s10886-014-0421-5.

193. Zhan X, Chen Z, Chen R, Shen C. Environmental and Genetic Factors Involved in Plant Protection-Associated Secondary Metabolite Biosynthesis Pathways. *Front Plant Sci.* 2022 Apr 8;13:877304. doi: 10.3389/fpls.2022.877304.
194. Tsushiro K, Kurizaki A, Watanabe T, Devkota HP. Chemical constituents from the aerial parts of *Impatiens hypophylla* Makino var. *hypophylla*. *Biochem Syst Ecol.* 2019;83:10–12. doi:10.1016/j.bse.2018.12.011
195. Buathong R, Chamchumroon V, Schinnerl J, Bacher M, Santimaleeworagun W, Kraichak E, Vajrodaya S. Chemovariation and antibacterial activity of extracts and isolated compounds from species of *Ixora* and *Greenea* (Ixoroideae, Rubiaceae). *PeerJ.* 2019 May 7;7:e6893. doi: 10.7717/peerj.6893.
196. Parama D, Girisa S, Khatoun E, Kumar A, Alqahtani MS, Abbas M, Sethi G, Kunnumakkara AB. An overview of the pharmacological activities of scopoletin against different chronic diseases. *Pharmacol Res.* 2022 May;179:106202. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106202.
197. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI, Hassan Z, Kabbashi NA. Dataset on LC-Q-TOF/MS tentative identification of phytochemicals in the extract of *Vernonia amygdalina* leaf through positive ionization. *Data Brief.* 2018 Nov 3;21:1686-1689. doi: 10.1016/j.dib.2018.10.159.
198. Chetnik K, Petrick L, Pandey G. MetaClean: a machine learning-based classifier for reduced false positive peak detection in untargeted LC-MS metabolomics data. *Metabolomics.* 2020 Oct 21;16(11):117. doi: 10.1007/s11306-020-01738-3.

199. Ma A, Qi X. Mining plant metabolomes: Methods, applications, and perspectives. *Plant Commun.* 2021 Sep 4;2(5):100238. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100238.
200. Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal Chem.* 2017 Sep 5;89(17):8696-8703. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00947.
201. Pires EO Jr, Pereira E, Carocho M, Pereira C, Dias MI, Calhelha RC, Ćirić A, Soković M, Garcia CC, Ferreira ICFR, Caleja C, Barros L. Study on the Potential Application of *Impatiens balsamina* L. Flowers Extract as a Natural Colouring Ingredient in a Pastry Product. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Aug 27;18(17):9062. doi: 10.3390/ijerph18179062.
202. Lobstein A, Brenne X, Feist E, Metz N, Weniger B, Anton R. Quantitative determination of naphthoquinones of *Impatiens* species. *Phytochem Anal.* 2001 May-Jun;12(3):202-5. doi: 10.1002/pca.574.
203. Szewczyk K, Olech M. Optimization of extraction method for LC–MS based determination of phenolic acid profiles in different *Impatiens* species. *Phytochem Lett.* 2017;20:322–330. doi:10.1016/j.phytol.2017.02.005.
204. Chua LS. Untargeted MS-based small metabolite identification from the plant leaves and stems of *Impatiens balsamina*. *Plant Physiol Biochem.* 2016 Sep;106:16-22. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.04.040.

205. Kovač Tomas M, Jurčević I, Šamec D. Tissue-Specific Profiling of Biflavonoids in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Plants* (Basel). 2022 Dec 28;12(1):147. doi: 10.3390/plants12010147.
206. Tusevski O, Krstikj M, Stanoeva JP, Stefov, M, Gadzovska Simic S. Phenolic profile and biological activity of *Hypericum perforatum* L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds? *S Afr J Bot*. 2018;117:301–310. doi:10.1016/j.sajb.2018.05.030
207. Antony A, Farid M. Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Appl Sci*. 2022;12:2107. doi: 10.3390/app12042107.
208. Cao X, Cai C, Wang Y, Zheng X. The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2018;45:169–178. doi:10.1016/j.ifset.2017.09.018.
209. Li R, Shang H, Wu H, Wang M, Duan M, Yang J. Thermal inactivation kinetics and effects of drying methods on the phenolic profile and antioxidant activities of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Sci Rep*. 2018 Jun 22;8(1):9529. doi: 10.1038/s41598-018-27874-4.
210. Abascal K, Ganora L, Yarnell E. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytother Res*. 2005 Aug;19(8):655-60. doi: 10.1002/ptr.1651.
211. Belwal T, Cravotto C, Prieto MA, Venskutonis PR, Daglia M, Devkota HP, Baldi A, Ezzat SM, Gómez-Gómez L, Salama MM, Campone L, Rastrelli L, Echave J, Jafari SM, Cravotto G. Effects of different drying techniques on the quality and bioactive compounds of plant-based products: a critical review on current trends, *Dry Technol*. 2022;40(8);539-1561. doi: 10.1080/07373937.2022.2068028.

212. Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *J Agric Food Chem*. 2007 Feb 21;55(4):1568-73. doi: 10.1021/jf063221i.
213. Zhang W, Zuo Y, Xu F, Wang T, Liu J, Wu D. Study of the mechanism of change in flavonoid composition in the processing of *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Tzvel. 'Boju'. *BMC Chem*. 2019 Nov 9;13(1):128. doi: 10.1186/s13065-019-0645-0. Erratum in: *BMC Chem*. 2020 Mar 5;14(1):16.
214. Nunes JC, Lago MG, Castelo-Branco VN, Oliveira FR, Torres AG, Perrone D, Monteiro M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. *Food Chem*. 2016 Apr 15;197(Pt A):881-90. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.050.
215. Mohapatra P, Ray A, Jena S, Nayak S, Mohanty S. Influence of various drying methods on physicochemical characteristics, antioxidant activity, and bioactive compounds in *Centella asiatica* L. leaves: a comparative study. *BioTechnologia (Pozn)*. 2022 Sep 29;103(3):235-247. doi: 10.5114/bta.2022.118666.
216. Madrau MA, Piscopo A, Sanguinetti AM, Del Caro A, Poiana M, Romeo FV, Piga A. Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *Eur Food Res Technol*. 2009;228(3): 441–448. doi:10.1007/s00217-008-0951-6.
217. Snoussi A, Essaidi I, Ben Haj Koubaier H, Zrelli H, Alsafari I, Živoslav T, Mihailovic J, Khan M, El Omri A, Ćirković Veličković T, Bouzouita N. Drying methodology effect on the phenolic content, antioxidant activity of *Myrtus communis* L. leaves ethanol extracts and soybean oil oxidative stability. *BMC Chem*. 2021 May 5;15(1):31. doi: 10.1186/s13065-021-00753-2.

218. Bennaceur S, Berreghioua A, Bennamoun L, Mulet A, Draoui B, Abid M, Carcel JA. Effect of Ultrasound on Henna Leaves Drying and Extraction of Lawsone: Experimental and Modeling Study. *Energies*. 2021;14(5):1329. doi:10.3390/en14051329.
219. Ba, R, Gbaguidi F, Alban Hounghem G, Kohoude J, Benoit Gnonlonfin GJ, Toukourou F, Baba-Moussa L. Influence of the drying on the scopoletin induction of cassava chips produced in Benin. *Int J Appl Biol Pharm*. 2016;7(2):235-242.
220. Zhou B, Liu P, Lu XJ, Qian DW, Duan JA. [Optimization of Suitable Drying Processing Methods of *Angelica dahurica*]. *Zhong Yao Cai*. 2016 Jul;39(7):1509-15.
221. Liu P, Chen J, Zhou B, Xu Y, Qian DW, Duan JA. [Analysis of variation of coumarin and volatile compounds in *Angelica Dahuricae radix* in different drying methods and conditions]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2014 Jul;39(14):2653-9.
222. Savic IM, Nikolic VD, Savic-Gajic IM, Nikolic LB, Moder K, Hopkins M. Optimization of Quercetin Extraction from Green Tea (*Camellia sinensis*) Using Central Composite Design, and the Pharmacological Activity of the Extract. *Chem Biochem Eng Q*. 2016;30(1): 103–115. doi:10.15255/cabeq.2015.2166.
223. Collins BJ, Kerns SP, Aillon K, Mueller G, Rider CV, DeRose EF, London RE, Harnly JM, Waidyanatha S. Comparison of phytochemical composition of *Ginkgo biloba* extracts using a combination of non-targeted and targeted analytical approaches. *Anal Bioanal Chem*. 2020 Oct;412(25):6789-6809. doi: 10.1007/s00216-020-02839-7. Epub 2020 Aug 31. Erratum in: *Anal Bioanal Chem*. 2021 Oct;413(25):6449-6450.

224. Batubara I, Suparto IH, Wulandari NS. The Best Extraction Technique for Kaempferol and Quercetin Isolation from Guava Leaves (*Psidium guajava*). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2017;58:012060. doi:10.1088/1755-1315/58/1/012060.
225. Bianchin M, Pereira D, Almeida JF, Moura C, Pinheiro RS, Heldt LFS, Haminiuk CWI, Carpes ST. Antioxidant Properties of Lyophilized Rosemary and Sage Extracts and its Effect to Prevent Lipid Oxidation in Poultry Pâtê. *Molecules*. 2020 Nov 6;25(21):5160. doi: 10.3390/molecules25215160.
226. Jung S, Lee MS, Chang E, Kim CT, Kim Y. Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit Extract Ameliorates Inflammation via Regulating MicroRNA-21/132/143 Expression and Increases the Skeletal Muscle Mitochondrial Content and AMPK/SIRT Activities. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Sep 13;10(9):1453. doi: 10.3390/antiox10091453.
227. Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Gritsanapan W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind Crops Prod*. 2013;44:566–571. doi:10.1016/j.indcrop.2012.09.021.
228. Oda Y, Nakashima S, Kondo E, Nakamura S, Yano M, Kubota C, Masumoto Y, Hirao M, Ogawa Y, Matsuda H. Comparison of lawsone contents among *Lawsonia inermis* plant parts and neurite outgrowth accelerators from branches. *J Nat Med*. 2018 Sep;72(4):890-896. doi: 10.1007/s11418-018-1221-y.
229. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Quantitative HPLC determination of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* leaves. *Planta Med*. 2008;74: PC24. doi: 10.1055/s-0028-1084542

230. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Simultaneous determination of three naphthoquinones in the leaves of *Impatiens balsamina* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 2010 Sep-Oct;21(5):444-50. doi: 10.1002/pca.1216.
231. Sonandkar, AA, Agrawal PN, Madrewar, DM, Labana SM, Jain AP. Densitometric Simultaneous Quantification of Three Naphthoquinones from *Impatiens balsamina* L. Leaves by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J Planar Chromatogr. - Mod TLC.* 2014;27:357–361. doi: 10.1556/JPC.27.2014.5.5.
232. Kirkland D, Marzin D. An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of Henna. *Mutat Res.* 2003 Jun 6;537(2):183-99. doi: 10.1016/s1383-5718(03)00077-9.
233. Munday R, Smith BL, Fowke EA. Haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in rats. *J Appl Toxicol.* 1991 Apr;11(2):85-90. doi: 10.1002/jat.2550110203.
234. Kumbhar A, Padhye S, Ross D. Cytotoxic properties of iron-hydroxynaphthoquinone complexes in rat hepatocytes. *Biometals.* 1996 Jul;9(3):235-40. doi: 10.1007/BF00817921.
235. Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on *Lawsonia inermis* (Henna) COLIPA n° C169. European Commission; 2013 Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_140.pdf
236. Gull I, Sohail M, Aslam MS, Amin Athar M. Phytochemical, toxicological and antimicrobial evaluation of *Lawsonia inermis* extracts against clinical isolates of

- pathogenic bacteria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013 Dec 1;12:36. doi: 10.1186/1476-0711-12-36.
237. Mir NT, Saleem U, Anwar F, Ahmad B, Ullah I, Hira S, Ismail T, Ali T, Ayaz M. *Lawsonia Inermis* Markedly Improves Cognitive Functions in Animal Models and Modulate Oxidative Stress Markers in the Brain. *Medicina (Kaunas)*. 2019 May 22;55(5):192. doi: 10.3390/medicina55050192.
238. Su BL, Zeng R, Chen JY, Chen CY, Guo JH, Huang CG. Antioxidant and antimicrobial properties of various solvent extracts from *Impatiens balsamina* L. stems. *J Food Sci.* 2012 Jun;77(6):C614-9. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02709.x.
239. Toyoda T, Takami S, Imai T, Cho YM, Hasumura M, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Hirose M, Nishikawa A, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of garden balsam extract in F344 rats. *Jpn J Food Chem Saf.* 2013;20(1),52-60. doi: 10.18891/jjfc.20.1_52.
240. Munday R, Smith BL, Munday CM. Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones in rats. *Chem Biol Interact.* 1995 Nov 17;98(2):185-92. doi: 10.1016/0009-2797(95)03645-8.
241. McMillan DC, Sarvate SD, Oatis JE Jr, Jollow DJ. Role of oxidant stress in lawsone-induced hemolytic anemia. *Toxicol Sci.* 2004 Dec;82(2):647-55. doi: 10.1093/toxsci/kfh288.
242. Tosi B, Tirillini B, Donini A, Bruni A. Presence of Scopoletin in *Malva sylvestris*. *Int J Pharmacogn.* 1995;33(4):353–355. doi:10.3109/13880209509065394

243. Tasfiyati AN, Antika LD, Dewi RT, Septama AW, Sabarudin A, Ernawati T. An experimental design approach for the optimization of scopoletin extraction from *Morinda citrifolia* L. using accelerated solvent extraction. *Talanta*. 2022 Feb 1;238(Pt 1):123010. doi: 10.1016/j.talanta.2021.123010.
244. Oganesyan, ET, Nersesyan ZM, Parkhomenko AY. Chemical composition of the above-ground part of *Coriandrum sativum*. *Pharm Chem J*. 2007;41(3),149–153. doi:10.1007/s11094-007-0033-2.
245. Hua L, Peng Z, Chia LS, Goh NK, Tan SN. Separation of kaempferols in *Impatiens balsamina* flowers by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Chromatogr A*. 2001 Feb 16;909(2):297-303. doi: 10.1016/s0021-9673(00)01102-x.
246. Paun G, Neagu E, Albu C, Moroceanu V, Radu G-L. Antioxidant activity and inhibitory effect of polyphenolic-rich extract from *Betonica officinalis* and *Impatiens noli-tangere* herbs on key enzyme linked to type 2 diabetes. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2016;60:1–7. doi:10.1016/j.jtice.2015.10.005.
247. Wang YC, Li WY, Wu DC, Wang JJ, Wu CH, Liao JJ, Lin CK. In Vitro Activity of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and Stigmasta-7,22-diene-3 β -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:704721. doi: 10.1093/ecam/nep147.
248. Zeng T, Zhou SS, Xu JD, Lin XY, Zhu H, Li SL, Kong M. Quality consistency evaluation of commercial *Impatiens Caulis* by integrating UPLC-QTOF-MS/MS chemical profiling and UPLC-DAD multi-components quantification approaches. *J Pharm Biomed Anal*. 2022 Feb 5;209:114522. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114522.

249. Koodkaew I, Sukonkhajorn P. Anti-tyrosinase and antioxidant activities of *Impatiens balsamina* L. *Songklanakarin J Sci Tech.* 2019; 41(3), 686-692.
250. Oldenburg K, Henning S, Soendergaard M. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Chinese Balsam (*Impatiens chinensis*). *FASEB J.* 2020;34(S1):1-1. doi: 10.1096/fasebj.2020.34.s1.06468.
251. Buitrago D, Buitrago-Villanueva I, Barbosa-Cornelio R, Coy-Barrera E. Comparative Examination of Antioxidant Capacity and Fingerprinting of Unfractionated Extracts from Different Plant Parts of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Grown under Greenhouse Conditions. *Antioxidants (Basel).* 2019 Jul 24;8(8):238. doi: 10.3390/antiox8080238.
252. Ak G, Zengin G, Sinan KI, Mahomoodally MF, Picot-Allain MCN, Cakır O, Bensari S, Yilmaz MA, Gallo M, Montesano DA. Comparative Bio-Evaluation and Chemical Profiles of *Calendula officinalis* L. Extracts Prepared via Different Extraction Techniques. *Appl Sci.* 2020;10(17):5920. doi: 10.3390/app10175920.
253. Chen C, Mokhtar RAM, Sani MSA, Noor NQIM. The Effect of Maturity and Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mulberry (*Morus alba*) Fruits and Leaves. *Molecules.* 2022 Apr 8;27(8):2406. doi: 10.3390/molecules27082406.
254. Juvany M, Müller M, Munné-Bosch S. Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *J Exp Bot.* 2013 Aug;64(11):3087-98. doi: 10.1093/jxb/ert174.
255. Zhang TJ, Zheng J, Yu ZC, Huang XD, Zhang QL, Tian XS, Peng CL. Functional characteristics of phenolic compounds accumulated in young leaves of two

subtropical forest tree species of different successional stages. *Tree Physiol.* 2018 Oct 1;38(10):1486-1501. doi: 10.1093/treephys/tpy030.

256. Iwashina T. Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Nat Prod Commun.* 2015 Mar;10(3):529-44.
257. Tenhumberg B, Dellinger AS, Smith SD. Modelling pollinator and nonpollinator selection on flower colour variation. *J Ecol.* 2022;111(4):743-966. doi: 10.1111/1365-2745.14057.
258. Wessinger CA, Rausher MD. Lessons from flower colour evolution on targets of selection. *J Exp Bot.* 2012 Oct;63(16):5741-9. doi: 10.1093/jxb/ers267.
259. Saifullah M, McCullum R, McCluskey A, Vuong Q. Effects of different drying methods on extractable phenolic compounds and antioxidant properties from lemon myrtle dried leaves. *Heliyon.* 2019 Dec 18;5(12):e03044. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e03044.
260. García LM, Ceccanti C, Negro C, De Bellis L, Incrocci L, Pardossi A, Guidi L. Effect of Drying Methods on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. Leaves. *Horticulturae.* 2021;7(1),10. doi: 10.3390/horticulturae7010010.
261. Kumar D, Ladaniya MS, Gurjar M, Kumar S. Impact of drying methods on natural antioxidants, phenols and flavanones of immature dropped *Citrus sinensis* L. Osbeck fruits. *Sci Rep.* 2022 Apr 23;12(1):6684. doi: 10.1038/s41598-022-10661-7.

262. Roslan AS, Ismail A, Ando Y, Azlan A. Effect of drying methods and parameters on the antioxidant properties of tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Prod Process Nutri.* 2020;2(1). doi:10.1186/s43014-020-00022-0.
263. Wojdyło A, Lech K, Nowicka P, Hernandez F, Figiel A, Carbonell-Barrachina AA. Influence of Different Drying Techniques on Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Colour of *Ziziphus jujube* Mill. Fruits. *Molecules.* 2019 Jun 26;24(13):2361. doi: 10.3390/molecules24132361.
264. Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Technol.* 2010;21(1), 3–11. doi:10.1016/j.tifs.2009.07.00.
265. Paiva L, Lima E, Motta M, Marcone M, Baptista J. Influence of Seasonal and Yearly Variation on Phenolic Profiles, Caffeine, and Antioxidant Activities of Green Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) from Azores. *Appl Sci.* 2021;11(16):7439. doi: 10.3390/app11167439.
266. Ronowicz J, Kupcewicz B, Budzisz E. Chemometric analysis of antioxidant properties of herbal products containing *Ginkgo biloba* extract. *Cent Eur J Biol.* 2013;8:374–385. doi:10.2478/s11535-013-0139-8.
267. Maciel LG, do Carmo MAV, Azevedo L, Daguer H, Molognoni L, de Almeida MM, Granato D, Rosso ND. Hibiscus *sabdariffa* anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem Toxicol.* 2018 Mar;113:187-197. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.053.
268. Kang HJ, Ko MJ, Chung MS. Anthocyanin Structure and pH Dependent Extraction Characteristics from Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and

- Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in Subcritical Water State. *Foods*. 2021 Mar 3;10(3):527. doi: 10.3390/foods10030527.
269. Imam MZ, Nahar N, Akter S, Rana MS. Antinociceptive activity of methanol extract of flowers of *Impatiens balsamina*. *J Ethnopharmacol*. 2012 Aug 1;142(3):804-10. doi: 10.1016/j.jep.2012.06.004.
270. Haider F, Ullah N. Antioxidant and Antimicrobial activity of *Impatiens walleriana* local to Malaysia. *Moroccan J Chem*. 2019;7(3):548-553.
271. Anwer N, Waqar MA, Iqbal M, Mushtaq M, Sobia A. Phytochemical analysis, free radical scavenging capacity and antimicrobial properties of *Impatiens bicolor* plant. *Int Food Res J*. 2013;20(1),99-103.
272. Pires EO Jr, Pereira E, Pereira C, Dias MI, Calhelha RC, Ćirić A, Soković M, Hassemer G, Garcia CC, Caleja C, Barros L, Ferreira ICFR. Chemical Composition and Bioactive Characterisation of *Impatiens walleriana*. *Molecules*. 2021 Mar 3;26(5):1347. doi: 10.3390/molecules26051347.
273. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000 Aug 14;149(1):43-50. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
274. Wojtunik-Kulesza KA. Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. *Molecules*. 2020 Nov 12;25(22):5267. doi: 10.3390/molecules25225267.
275. Horniblow RD, Henesy D, Iqbal TH, Tselepis C. Modulation of iron transport, metabolism and reactive oxygen status by quercetin-iron complexes in vitro. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Mar;61(3). doi: 10.1002/mnfr.201600692.

276. Lakey-Beitia J, Burillo AM, La Penna G, Hegde ML, Rao KS. Polyphenols as Potential Metal Chelation Compounds Against Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S335-S357. doi: 10.3233/JAD-200185.
277. Ninfali P, Gennari L, Biagiotti E, Cangi F, Mattoli L, Maidecchi A. Improvement in botanical standardization of commercial freeze-dried herbal extracts by using the combination of antioxidant capacity and constituent marker concentrations. *J AOAC Int.* 2009 May-Jun;92(3):797-805.
278. Zorzi M, Gai F, Medana C, Aigotti R, Morello S, Peiretti PG. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Small Berries. *Foods.* 2020 May 13;9(5):623. doi: 10.3390/foods9050623.
279. Dauqan E, Abdullah A, Muin NM. Antioxidants and Antibacterial Activities of Extract from Thyme and Mint Leaves. *J Chem Pharm Res.* 2017;9(12):104-110.
280. Pires MA, Munekata PES, Villanueva NDM, Tonin FG, Baldin JC, Rocha YJP, Carvalho LT, Rodrigues I, Trindade MA. The Antioxidant Capacity of Rosemary and Green Tea Extracts to Replace the Carcinogenic Antioxidant (BHA) in Chicken Burgers. *J Food Qual.* 2017;2017:1–6. doi:10.1155/2017/2409527.
281. Lapsongphon N, Pinthong M, Sukdee P. Antioxidant Activity of Crude Extract from Raw and Heat-treated *Moringa oleifera*. *Int J Env Rural Dev.* 2018;9-2:59-63.
282. Ruksiriwanich W, Khantham C, Muangsanguan A, Phimolsiripol Y, Barba FJ, Sringarm K, Rachtanapun P, Jantasakulwong K, Jantrawut P, Chittasupho C, Chutoprapat R, Boonpisuttinant K, Sommano SR. Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extract as Bioactive Substances for Anti-Androgen and Antioxidant

Activities. *Plants* (Basel). 2022 Dec 14;11(24):3514. doi: 10.3390/plants11243514.

283. Banerjee A, De B. Antioxidant Activity of Ethnomedicinally Used Flowers of West Bengal, India. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 2014;6(3),622-635.
284. Bole S, Wahengbam SS, Kund, S, Dubey S, Ab V. Phytochemical screening and biological activities of *Impatiens balsamina* L. seeds. *World J Pharm Sci.* 2013;2(6):5363-5376.
285. Szewczyk K, Zidorn C, Biernasiuk A, Komsta Ł, Granica S. Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Ind Crops Prod.* 2016;86:262-27. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.03.053.
286. Szewczyk K, Kalemba D, Komsta Ł, Nowak R. Comparison of the Essential Oil Composition of Selected *Impatiens* Species and Its Antioxidant Activities. *Molecules.* 2016 Sep 1;21(9):1162. doi: 10.3390/molecules21091162.
287. Szewczyk K, Bonikowskib R, Maciąg-Krajewskab A, Abramekc J, Bogucka-Kocka A. Lipophilic components and evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of *Impatiens glandulifera* Royle and *Impatiens noli – tangere* L. (Balsaminaceae). *Grasas Aceites.* 2018;69(3),e270.
288. Yang J, Kim JS, Kim MJ. Antioxidant, antiproliferative, and α -glucosidase inhibitory activities of extracts from *Impatiens textori* Miq. *J Med Plant Res.* 2012;6(3):391-397.
289. Moukette BM, Pieme CA, Njimou JR, Biapa CP, Marco B, Ngogang JY. In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: *Monodora myristica*. *Biol Res.* 2015 Mar 14;48(1):15. doi: 10.1186/s40659-015-0003-1.

290. Upadhyay R, Chaurasia JK, Tiwari KN, Singh K. Antioxidant property of aerial parts and root of *Phyllanthus fraternus* Webster, an important medicinal plant. *ScientificWorldJournal*. 2014 Jan 23;2014:692392. doi: 10.1155/2014/692392.
291. Ademiluyi AO, Aladeselu OH, Oboh G, Boligon AA. Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory properties of *Moringa (Moringa oleifera)* leaf. *Food Sci Nutr*. 2018 Oct 10;6(8):2123-2133. doi: 10.1002/fsn3.770.
292. Quesada MS, Azofeifa G, Campone L, Pagano I, Pérez AM, Cortés C, Rastrelli L, Quesada S. *Bactris Guineensis* (Arecaceae) Extract: Polyphenol Characterization, Antioxidant Capacity and Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. *J Berry Res*. 2020;10(3),329-344. doi: 10.3233/JBR190449.
293. Navarro Bolaños L. IMPACTO DEL PROCESAMIENTO DEL JUGO DE CAS (*Psidium friedrichsthalianum*) SOBRE SUS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES Y CITOTÓXICAS EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES [Tesis de maestría]. Costa Rica. Universidad de Costa Rica; 2021.
294. Kherbachi S, Kheniche M, Tacherfiout M. Antihemolytic activity of hydroalcoholic leaves and bark extracts from *Rhamnus alaternus* against AAPH induced hemolysis on human erythrocytes. *Int J Plant Based Pharm*. 2022;2(2),210–219.doi:10.29228/ijpbp.3
295. Aguillón Osma J, Maldonado ME, Loango N, Arango Varela SS, Landázuri P. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. *Perspect Nutr Humana*. 2013;15(1):13-25.

296. Omojokun OS, Oboh G, Ademiluyi AO, Oladele JO, Boligon AA. Impact of drying processes on *Bryophyllum pinnatum* phenolic constituents and its anti-inflammatory and antioxidative activities in human erythrocytes. *J Food Biochem*. 2021 Mar;45(3):e13298. doi: 10.1111/jfbc.13298.
297. Toyoda A, Itagaki H. Development of an in vitro photosafety evaluation method utilizing intracellular ROS production in THP-1 cells. *J Toxicol Sci*. 2018;43(4):247-256. doi: 10.2131/jts.43.247.
298. Memariani T, Hosseini T, Kamali H, Mohammadi A, Ghorbani M, Shakeri A, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Shahsavand S. Evaluation of the cytotoxic effects of *Cyperus longus* extract, fractions and its essential oil on the PC3 and MCF7 cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2016 Feb;11(2):1353-1360. doi: 10.3892/ol.2015.4050.
299. Furger C. Live Cell Assays for the Assessment of Antioxidant Activities of Plant Extracts. *Antioxidants* (Basel). 2021 Jun 11;10(6):944. doi: 10.3390/antiox10060944.
300. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 May;79(5):727-47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
301. Scott MB, Styring AK, McCullagh JSO. Polyphenols: Bioavailability, Microbiome Interactions and Cellular Effects on Health in Humans and Animals. *Pathogens*. 2022 Jul 5;11(7):770. doi: 10.3390/pathogens11070770.
302. Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep*. 2019 Jun 19;36(6):869-888. doi: 10.1039/c9np00011a.

303. Chhetry AK, Dhakal S, Chaudhary L, Karki K, Khadka RB, Chaudhary GP, Bastola T, Poudel A, Aryal P, Pandey J. Study of Antibacterial Activity of Root Bark, Leaves, and Pericarp Extracts of *Diploknema butyracea* and Evaluation of Prospective Antioxidant Activity. *J Trop Med*. 2022 Mar 23;2022:6814901. doi: 10.1155/2022/6814901.
304. Mphahlele RR, Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complement Altern Med*. 2016 May 26;16:143. doi: 10.1186/s12906-016-1132-y.
305. Hussein II, Mamman M, Abdulrasheed M. Effect of Varying Drying Temperature on the Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Leaf (Lam). *IOSR J Pharm Biol Sci*. 2015;10(4):39-43.
306. Bussmann RW, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, Pourmand K, Jonat B, Somogy S, Guardado G, Aguirre C, Chan R, Meyer K, Kuhlman A, Townesmith A, Effio-Carbajal J, Frías-Fernandez F, Benito M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol*. 2010 Oct 28;132(1):101-8. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.048.
307. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Oct;12(4):564-82. doi: 10.1128/CMR.12.4.564.
308. Chassagne F, Samarakoon T, Porras G, Lyles JT, Dettweiler M, Marquez L, Salam AM, Shabih S, Farrokhi DR, Quave CL. A Systematic Review of Plants With Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. *Front Pharmacol*. 2021 Jan 8;11:586548. doi: 10.3389/fphar.2020.586548.

309. Liu S, Zhang Q, Li H, Qiu Z, Yu Y. Comparative Assessment of the Antibacterial Efficacies and Mechanisms of Different Tea Extracts. *Foods*. 2022 Feb 21;11(4):620. doi: 10.3390/foods11040620.
310. Gonelimali FD, Lin J, Miao W, Xuan J, Charles F, Chen M, Hatab SR. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Front Microbiol*. 2018 Jul 24;9:1639. doi: 10.3389/fmicb.2018.01639.
311. Petrolini FV, Lucarini R, de Souza MG, Pires RH, Cunha WR, Martins CH. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec 17;44(3):829-34. doi: 10.1590/S1517-83822013005000061.
312. Gao D, Zhang Y. Comparative antibacterial activities of extracts of dried ginger and processed ginger. *Pharmacogn J*. 2010;2(15):41–44. doi:10.1016/s0975-3575(10)80077.
313. Etemadi S, Barhaghi MHS, Leylabadlo HE, Memar MY, Mohammadi AB, Ghotaslou R. The synergistic effect of turmeric aqueous extract and chitosan against multidrug-resistant bacteria. *New Microbes New Infect*. 2021 Mar 16;41:100861. doi: 10.1016/j.nmni.2021.100861.
314. Degu S, Abebe A, Gemedo N, Bitew A. Evaluation of antibacterial and acute oral toxicity of *Impatiens tinctoria* A. Rich root extracts. *PLoS One*. 2021 Aug 11;16(8):e0255932. doi: 10.1371/journal.pone.0255932.
315. Valle DL, Andrade JI, Puzon JJ, Cabrera EC, Rivera WL. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine

medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(7):532-540. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.04.005.

316. Jolliffe I. Principal Component Analysis. En: Lovric M, ed. *International Encyclopedia of Statistical Science*. Alemania: Springer-Verlag; 2011. p. 1094–1096.
317. Mekinić IG, Skroza D, Ljubenković I, Katalinić V, Šimat V. Antioxidant and Antimicrobial Potential of Phenolic Metabolites from Traditionally Used Mediterranean Herbs and Spices. *Foods.* 2019 Nov 15;8(11):579. doi: 10.3390/foods8110579.
318. Lebedev VG, Lebedeva TN, Vidyagina EO, Sorokopudov VN, Popova AA, Shestibratov KA. Relationship between Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Berries and Leaves of Raspberry Genotypes and Their Genotyping by SSR Markers. *Antioxidants (Basel).* 2022 Sep 30;11(10):1961. doi: 10.3390/antiox11101961.
319. Jang JY, Shin H, Lim JW, Ahn JH, Jo YH, Lee KY, Hwang BY, Jung SJ, Kang SY, Lee MK. Comparison of antibacterial activity and phenolic constituents of bark, lignum, leaves and fruit of *Rhus verniciflua*. *PLoS One.* 2018 Jul 25;13(7):e0200257. doi: 10.1371/journal.pone.0200257.
320. Hmamou A, Eloutassi N, Alshawwa SZ, Al Kamaly O, Kara M, Bendaoud A, El-Assri EM, Tlemcani S, El Khomsi M, Lahkimi A. Total Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Papaver rhoeas* L. Organ Extracts Growing in Taounate Region, Morocco. *Molecules.* 2022 Jan 27;27(3):854. doi: 10.3390/molecules27030854.

321. Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):277S-283S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.277S.
322. Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front Microbiol.* 2019 May 15;10:911. doi: 10.3389/fmicb.2019.00911.
323. Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V, Stefan G. Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017;16(6):1243–1268. doi:10.1111/1541-4337.12298

8. Anexos:

8.1. Estimación del porcentaje del peso total de las plantas de *I. hawkeri* correspondiente a cada sección anatómica:

En el cuadro A1 se resume el porcentaje del peso promedio de la planta de *I. hawkeri* correspondiente a cada parte o sección anatómica. Para definir esta estimación, se utilizaron 10 plantas frescas las cuales fueron pesadas en conjunto. Luego, cada una de las partes o secciones anatómicas fue aislada de las plantas y pesada en conjunto. Con los datos de peso total de las plantas y peso de las secciones de las plantas se estimó el porcentaje promedio que representa cada sección anatómica del peso promedio total de una planta de *I. hawkeri*.

Cuadro A1. Porcentaje del peso promedio de la planta de *I. hawkeri* que corresponde a cada parte o sección anatómica

Sección anatómica	Peso promedio por planta (g)	Porcentaje del peso promedio de una planta (Porcentaje del peso de partes áreas)
Hojas	106	33 % (42 %)
Flores	25	8 % (10 %)
Tallo	121	37 % (48 %)
Raíz	73	22 % (0 %)
*Partes áreas	252	78 % (100 %)
Planta entera	325	100 % (No aplica)

*Es la combinación de flores, hojas y tallos.

8.2. Pérdida de humedad del material vegetal durante la fase de secado:

Cuadro A2. Pérdida de humedad del material vegetal durante la fase de secado.

Material vegetal (Técnica de secado)	Peso inicial (g)	Peso al finalizar el secado (g)	Porcentaje de pérdida de humedad
Plantas enteras 2020 (Horno)	3036	183	94 %
Partes áreas 2020 (Horno)	1605	114	93 %
Hojas 2020 (Horno)	1060	99	91 %
Flores 2020 (Liofilización)	246	15	94 %
Tallos 2020 (Horno)	1206	62	95 %
Raíces 2020 (Horno)	733	65	91 %
Hojas 2021 (Liofilización)	814	90	89 %
Hojas 2021 (Horno)	760	90	88 %
Hojas 2021 (Sombra)	974	110	89 %

8.3. Rendimiento de extracción:

Cuadro A3. Porcentaje de rendimiento para los procesos de extracción con los diferentes tipos de material vegetal de *I. hawkeri*.

Material vegetal (Técnica de secado)	Peso de material seco sometido a extracción (g)	Peso de extracto liofilizado obtenido (g)	Porcentaje de rendimiento
Plantas enteras 2020 (Horno)	50,14	3,51	7,00
Partes áreas 2020 (Horno)	50,01	3,55	7,10
Hojas 2020 (Horno)	50,00	2,42	4,84
Flores 2020 (Liofilización)	14,93	3,36	22,52
Tallos 2020 (Horno)	50,05	5,38	10,75
Raíces 2020 (Horno)	50,00	2,74	5,49
Hojas 2021 (Liofilización)	50,30	3,68	7,32
Hojas 2021 (Horno)	50,10	3,70	7,39
Hojas 2021 (Sombra)	50,00	4,32	8,63

8.4. Parámetros analíticos de los ensayos por cromatografía HPTLC:

Los valores de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) de cada método se calculó con base a los datos desviación estándar de los residuos obtenida para las diferentes rectas de calibración generadas con cada sustancia de referencia o patrón estándar según el método descrito por Ismael *et al.* (A1). El porcentaje de recuperación de cada método se estableció mediante la evaluación de la concentración de sustancia patrón en soluciones estándar de prueba preparadas independientemente a las soluciones utilizadas para la construcción de la recta de calibración. Se aplicaron diferentes volúmenes de las soluciones estándar de prueba en placas cromatográficas de manera que la cantidad de sustancia de referencia por banda cubriera el rango de linealidad del método correspondiente. El valor reportado de porcentaje de recuperación es el promedio determinado en todo el rango de linealidad en al menos cuatro experimentos distintos con su respectivo porcentaje de desviación estándar relativa (DER). Los parámetros analíticos de cada método se encuentran resumidos en el cuadro A4.

Cuadro A4. Parámetros analíticos de los métodos empleados para la determinación de compuestos fenólicos bioactivos.

Metabolito analizado	Recta de calibración	LD (ng/banda)	LQ (ng/banda)	Porcentaje de recuperación ± DER
Quercetina^a	$Y = 0,75X + 39,95$ ($r^2 = 0,9946$)	37	113	99±4 (n* = 4)
Quercetina^b	$Y = 0,59X - 20,40$ ($r^2 = 0,9992$)	18	54	99±4 (n = 4)
Kaempferol^a	$Y = 0,73X + 18,40$ ($r^2 = 0,9988$)	17	52	99±2 (n = 4)
Kaempferol^b	$Y = 0,60X - 27,95$ ($r^2 = 0,9984$)	20	62	100±5 (n = 4)
Rutina	$Y = 0,36X - 24,60$ ($r^2 = 0,9980$)	46	140	99±4 (n = 6)
Isoquercetina	$Y = 0,27X - 27,26$ ($r^2 = 0,9984$)	41	127	99±4 (n = 6)
Lawsona	$Y = 0,56X - 15,08$ ($r^2 = 0,9997$)	7	22	98±3 (n = 4)
2-MNQ	$Y = 0,51X + 79,40$ ($r^2 = 0,9994$)	17	50	98±3 (n = 4)
Escopoletina	$Y = 1,78X + 6,56$ ($r^2 = 0,9996$)	10	30	101±3 (n = 4)

^aMétodo empleado para el análisis del extracto FL-20. ^bMétodo utilizado para el análisis de todos los extractos excepto FL-20. *Número de experimentos.

Referencia:

A1. Ismail R, Lee HY, Mahyudin NA, Abu Bakar F. Linearity study on detection and quantification limits for the determination of avermectins using linear regression. J Food Drug Anal. 2014 Dec;22(4):407-412. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.026.

8.5. Ejemplos de densitogramas procesados en los análisis por cromatografía HPTLC:

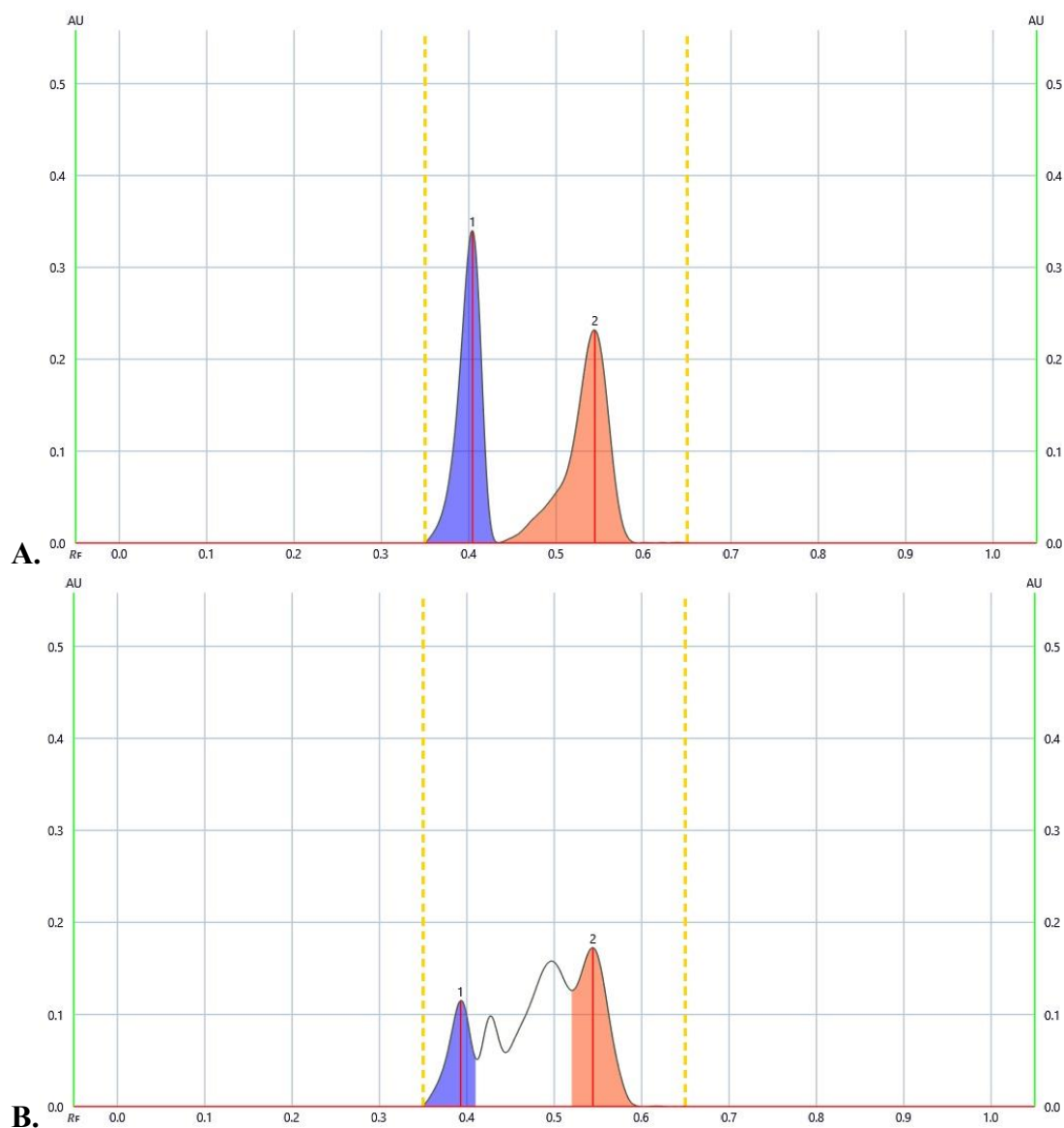


Figura A1. Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 1. A. Densitograma obtenido con la aplicación de 1.5 μL de la SE de quercetina y kaempferol. B. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μL de la solución de prueba de FL-20.

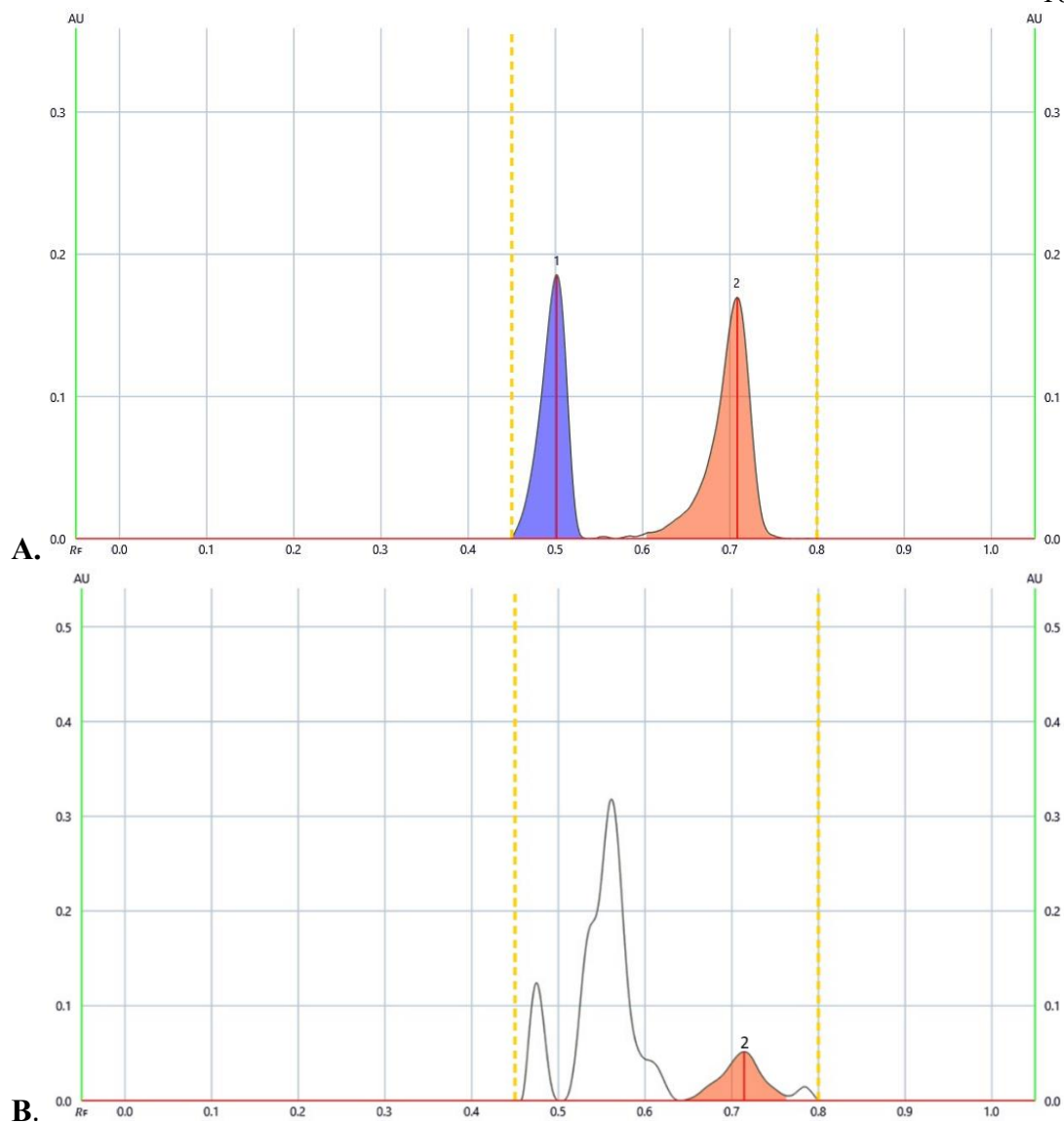


Figura A2. Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 1 y 2. A. Densitograma obtenida con la aplicación de 1.5 μL de la SE de quercetina y kaempferol. B. Densitograma obtenido con la aplicación de 50 μL de la solución de prueba de PEH-20.

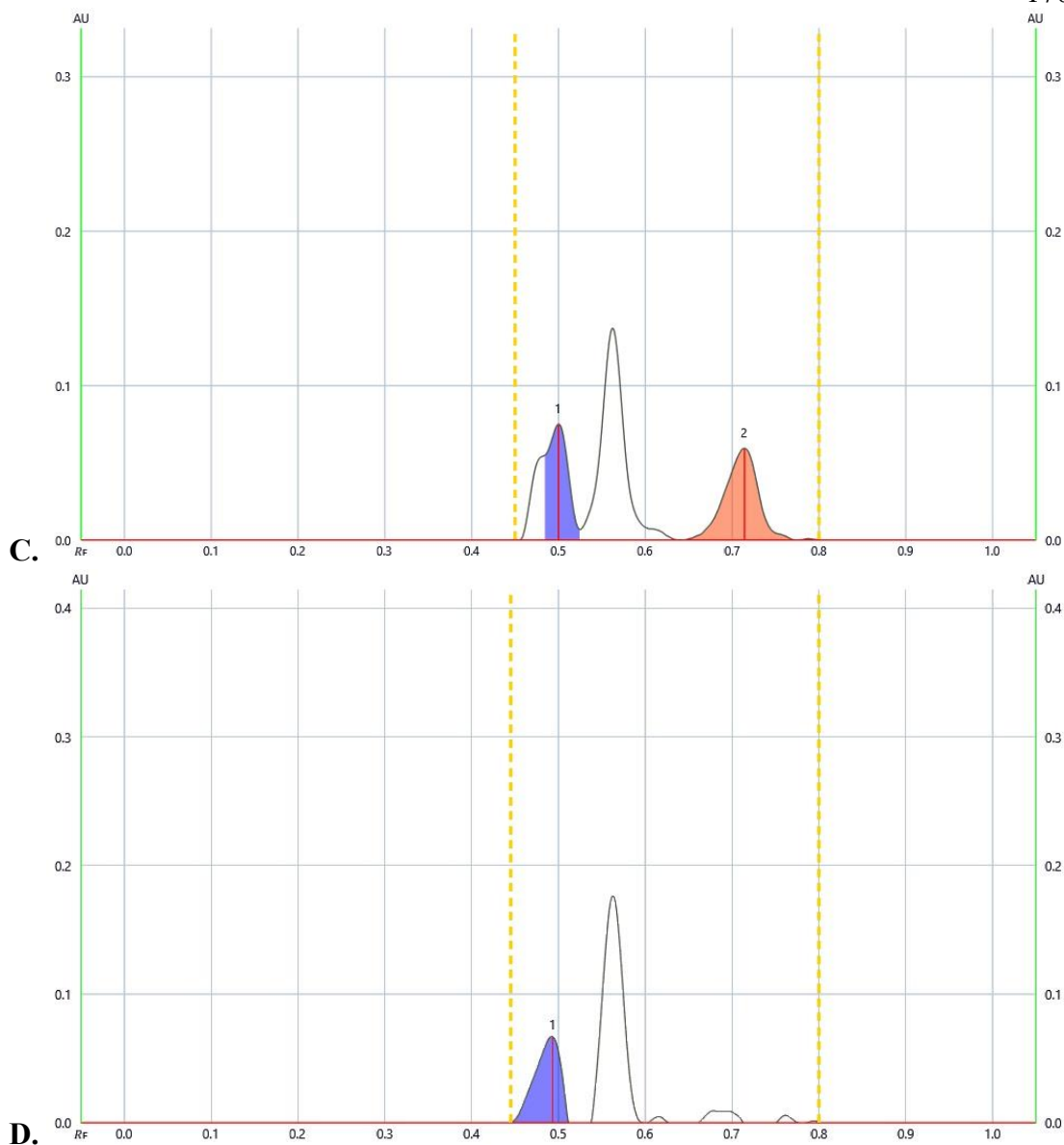


Figura A2 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 1 y 2. C. Densitograma obtenido con la aplicación de 50 μ L de la solución de prueba de PAH-20. D. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de HH-20.

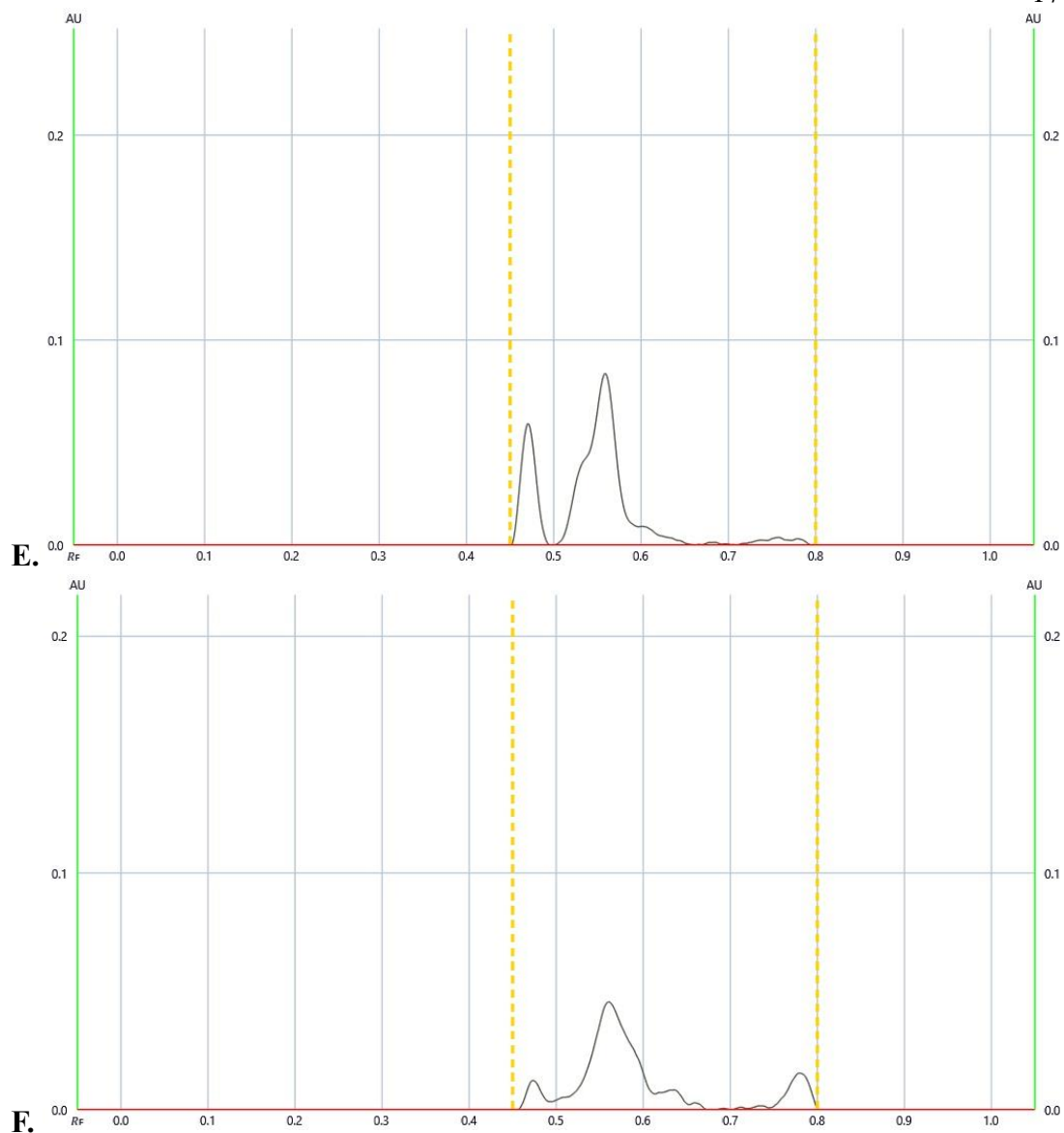


Figura A2 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 1 y 2. E. Densitograma obtenido con la aplicación de 40 μL de la solución de prueba de TH-20. F. Densitograma obtenido con la aplicación de 60 μL de la solución de prueba de RH-20.

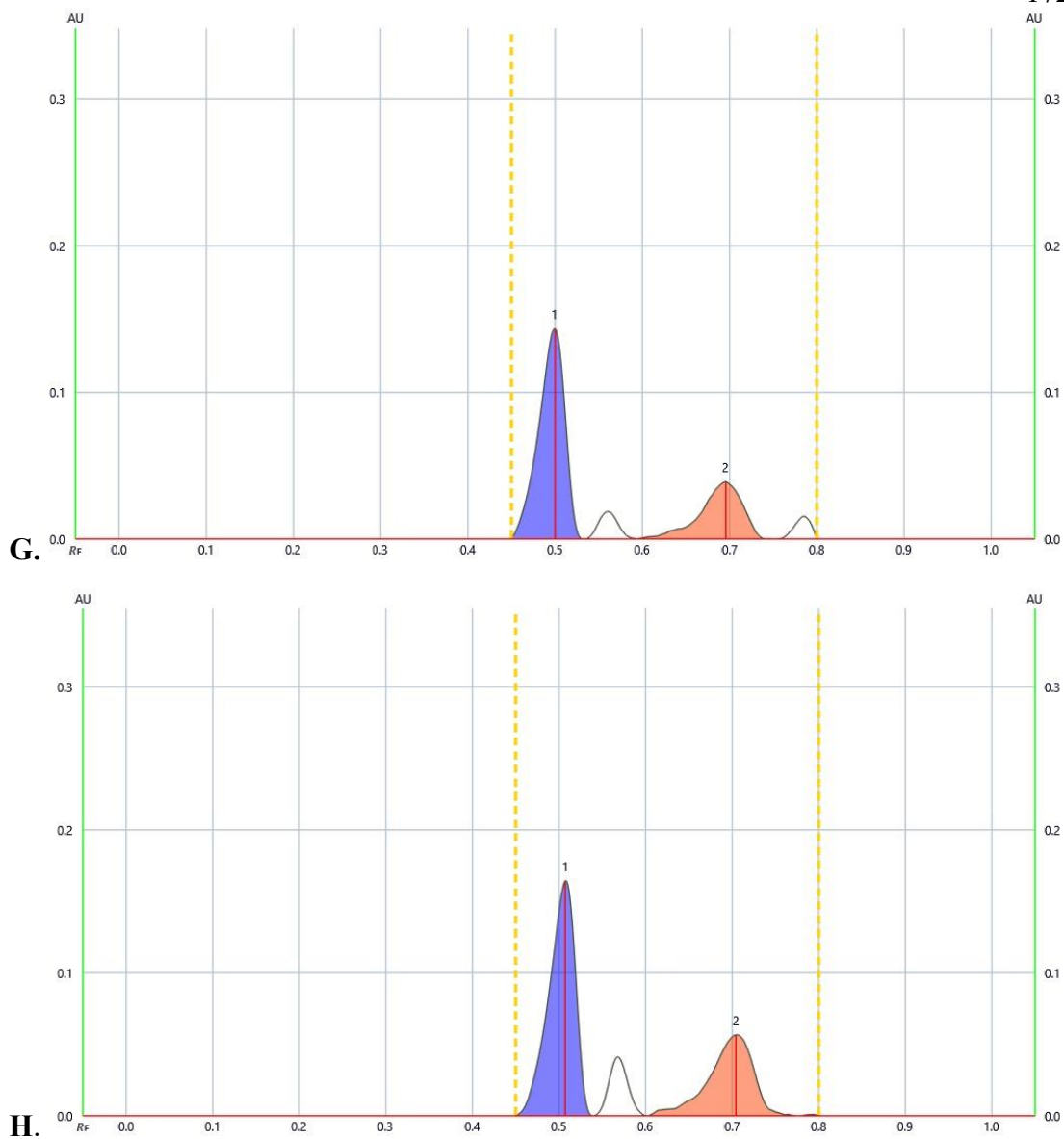
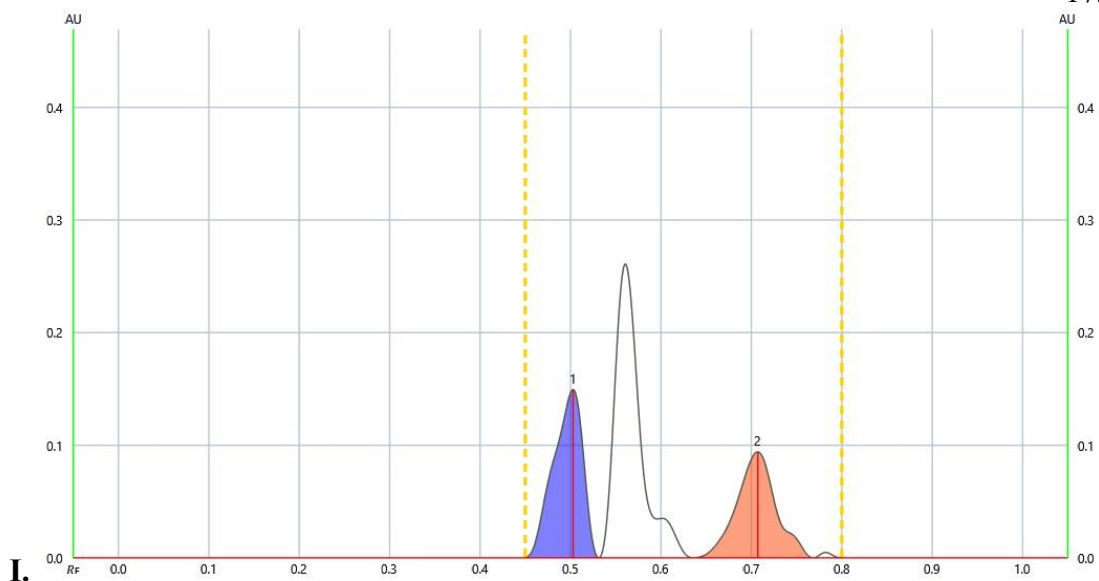


Figura A2 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 1 y 2. G. Densitograma obtenido con la aplicación de 15 μL de la solución de prueba de HL-21. H. Densitograma obtenido con la aplicación de 50 μL de la solución de prueba de HH-21.



I. **Figura A2 (continuación).** Densitogramas de absorbancia para la determinación de quercetina (1) y kaempferol (2) obtenidos a 380 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 1 y 2. I. Densitograma obtenido con la aplicación de 10 μ L de la solución de prueba de HS-21.

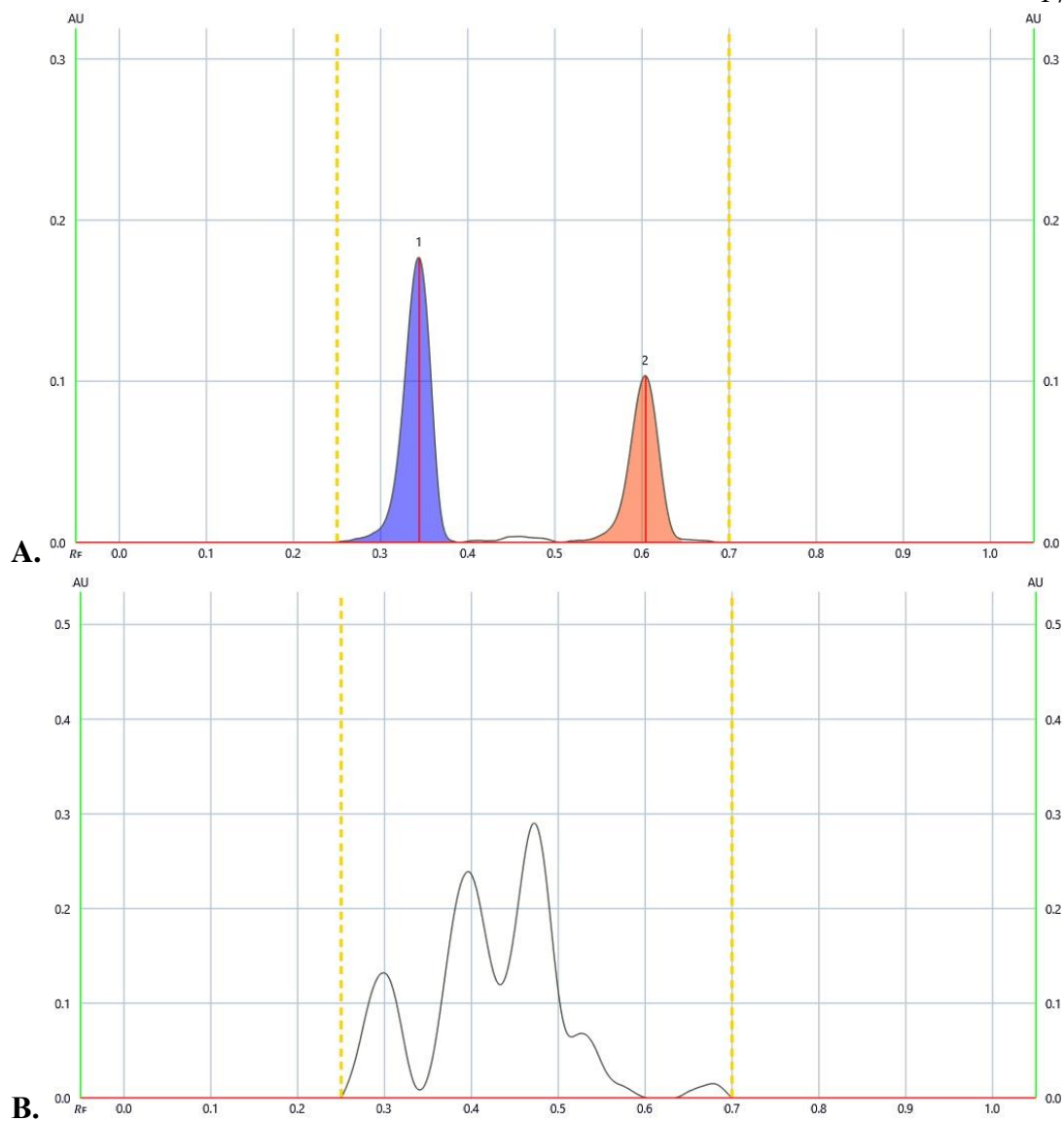


Figura A3. Densitogramas de absorbancia para la determinación de rutina (1) e isoquercetina (2) obtenidos a 365 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 3. A. Densitograma obtenido con la aplicación de 2.0 μL de la SE de rutina e isoquercitrina. B. Densitograma obtenido con la aplicación de 25 μL de la solución de prueba de PEH-20.

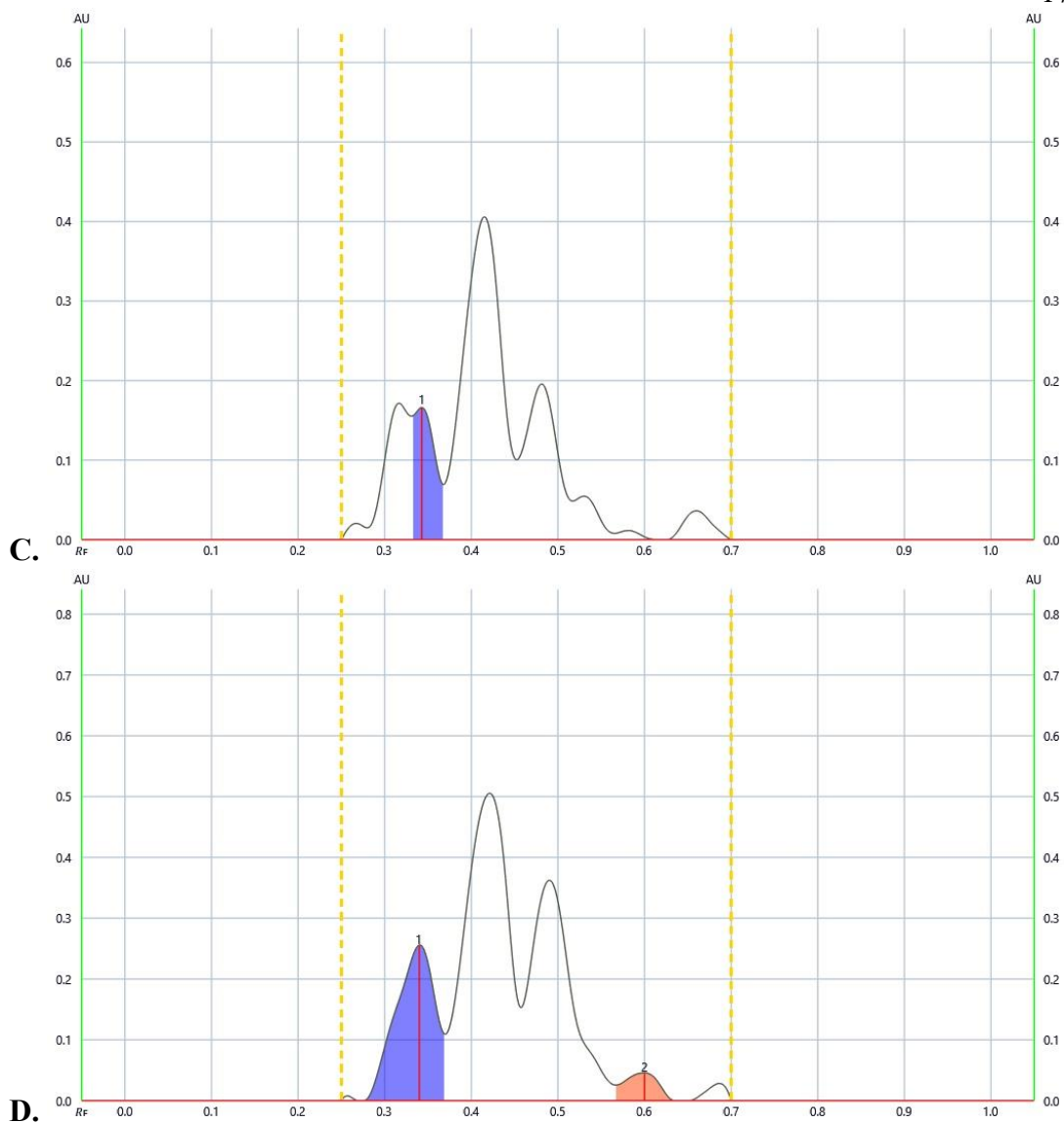


Figura A3 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de rutina (1) e isoquercetina (2) obtenidos a 365 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 3. C. Densitograma obtenido con la aplicación de 15 μ L de la de la solución de prueba de PAH-20. D. Densitograma obtenido con la aplicación de 15 μ L de la de la solución de prueba de HH-20.

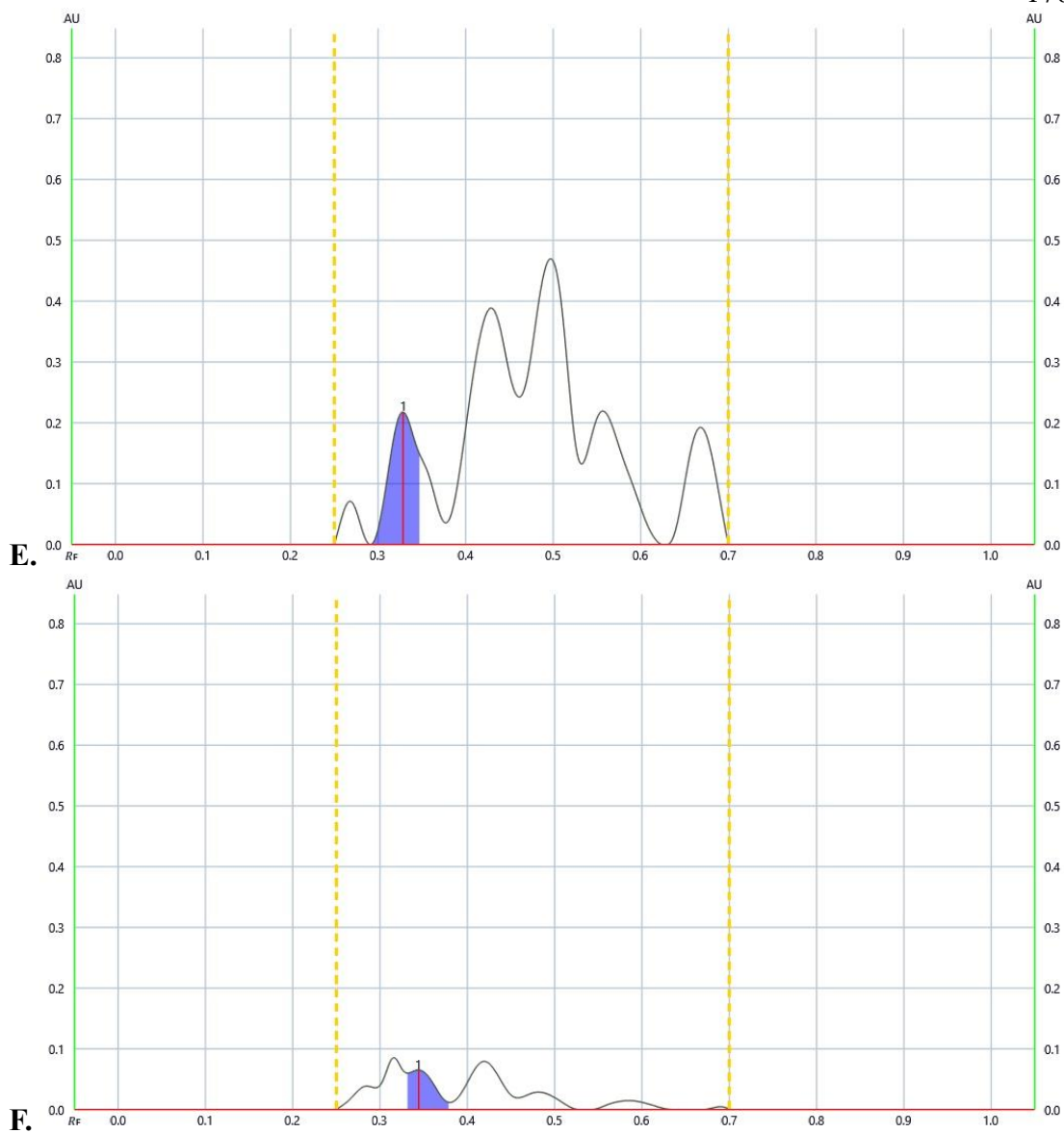


Figura A3 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de rutina (1) e isoquercetina (2) obtenidos a 365 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 3. E. Densitograma obtenido con la aplicación de 3 μ L de la de la solución de prueba de FL-20. F. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la de la solución de prueba de TH-20.

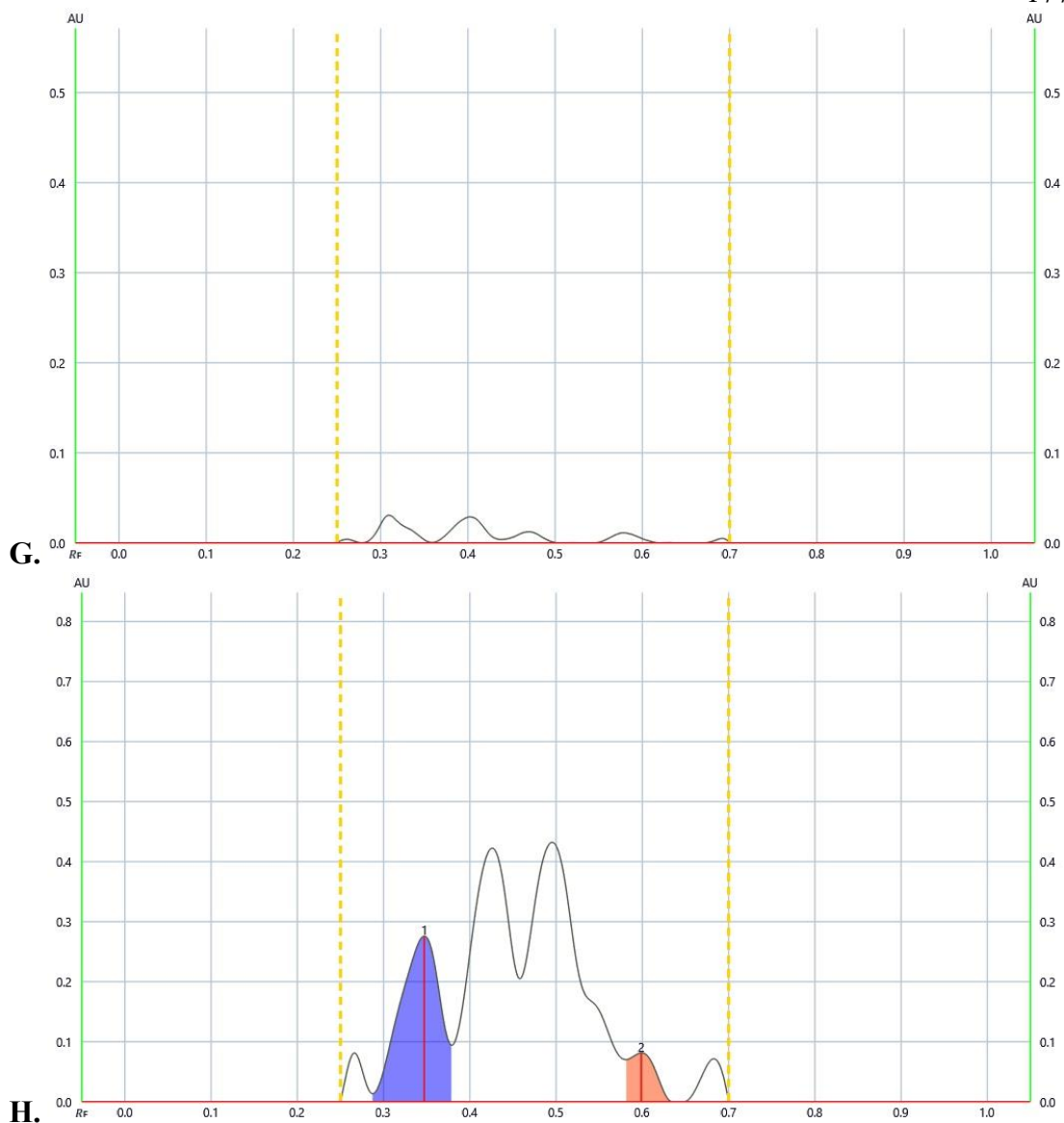


Figura A3 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de rutina (1) e isoquercetina (2) obtenidos a 365 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 3. G. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μL de la de la solución de prueba de RH-20. H. Densitograma obtenido con la aplicación de 15 μL de la de la solución de prueba de HL-21.

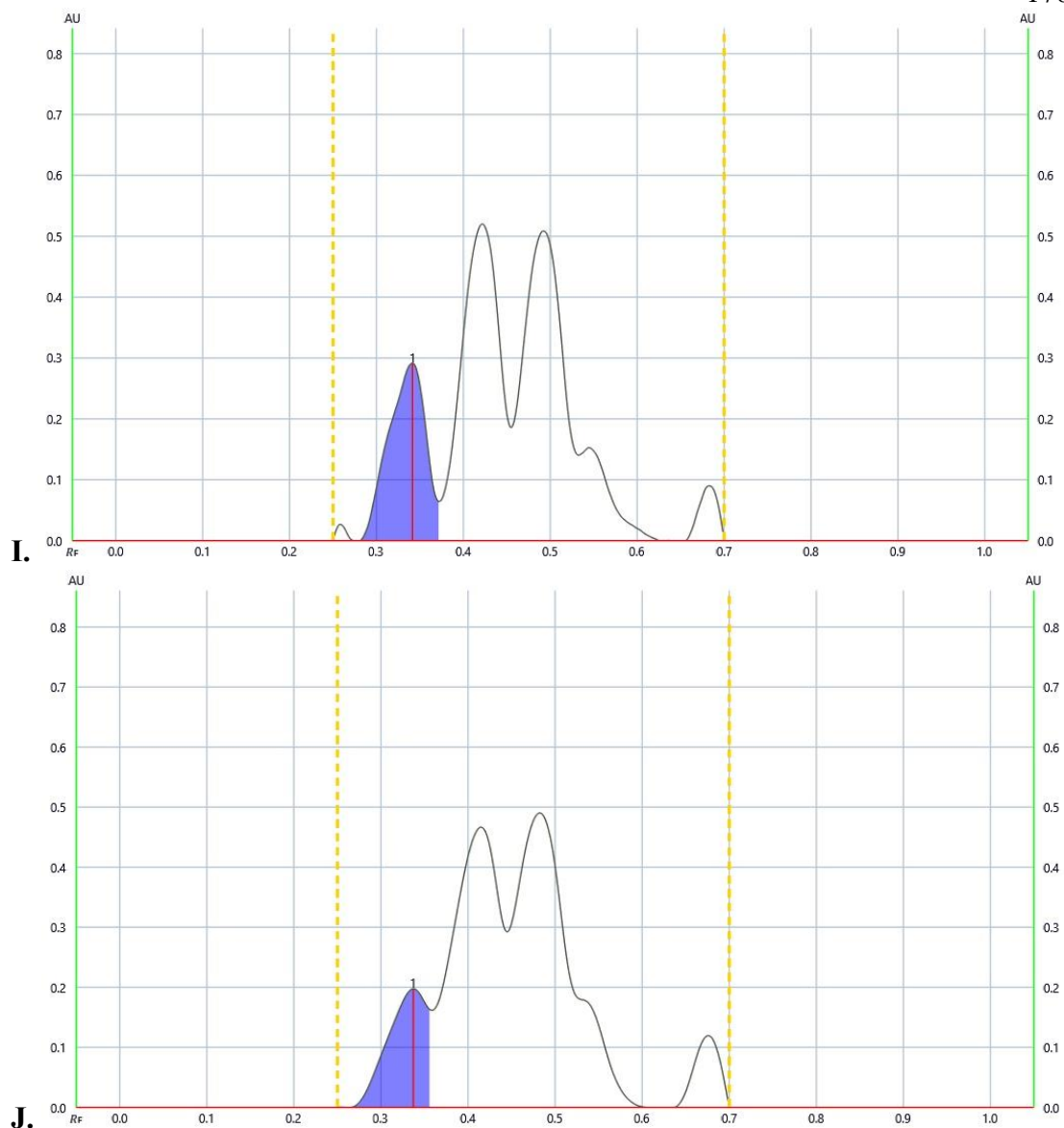


Figura A3 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de rutina (1) e isoquercetina (2) obtenidos a 365 nm después del desarrollo de la placa de cromatografía con la fase móvil 3. I. Densitograma obtenido con la aplicación de 8 μL de la de la solución de prueba de HH-21. J. Densitograma obtenido con la aplicación de 20 μL de la de la solución de prueba de HS-21.

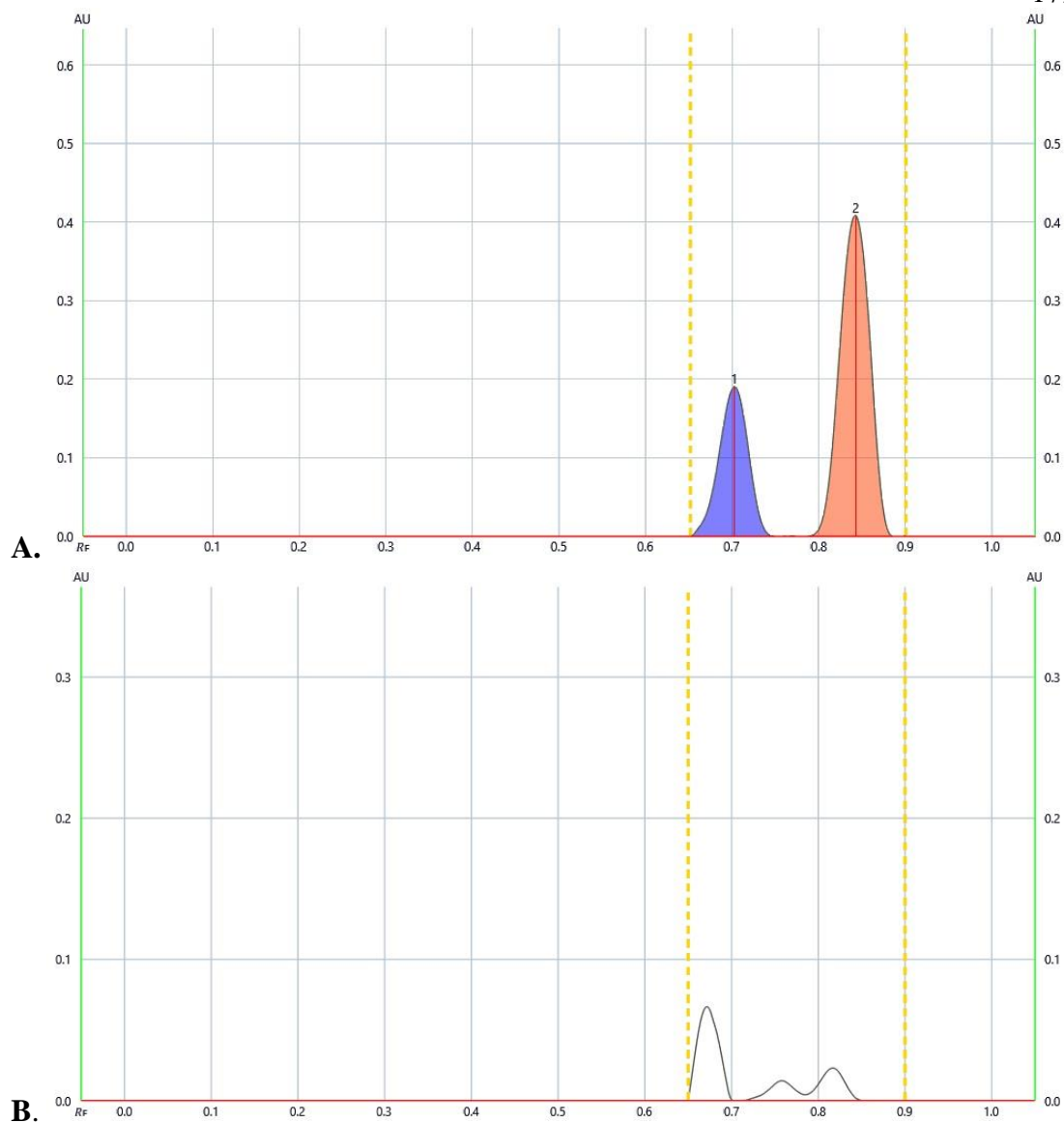


Figura A4. Densitogramas de absorbancia para la determinación de lawsona (1) y 2-MNQ (2) obtenidos a 275 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 4 y 5. A. Densitograma obtenida con la aplicación de 1.5 μL de la SE de lawsona y 2-MNQ. B. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μL de la solución de prueba de PEH-20.

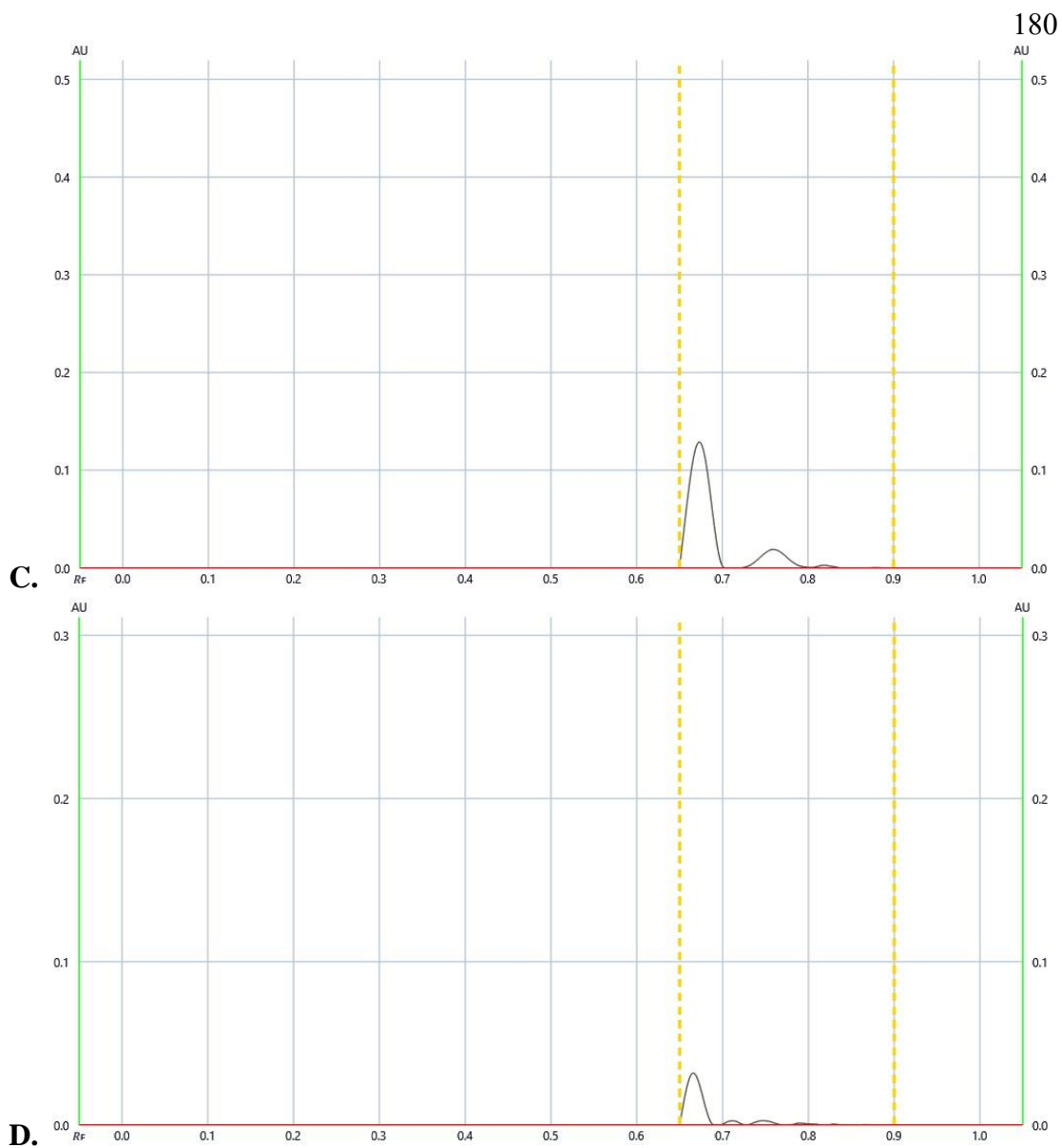


Figura A4 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de lawsona (1) y 2-MNQ (2) obtenidos a 275 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 4 y 5. C. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de PAH-20. D. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de HH-20.

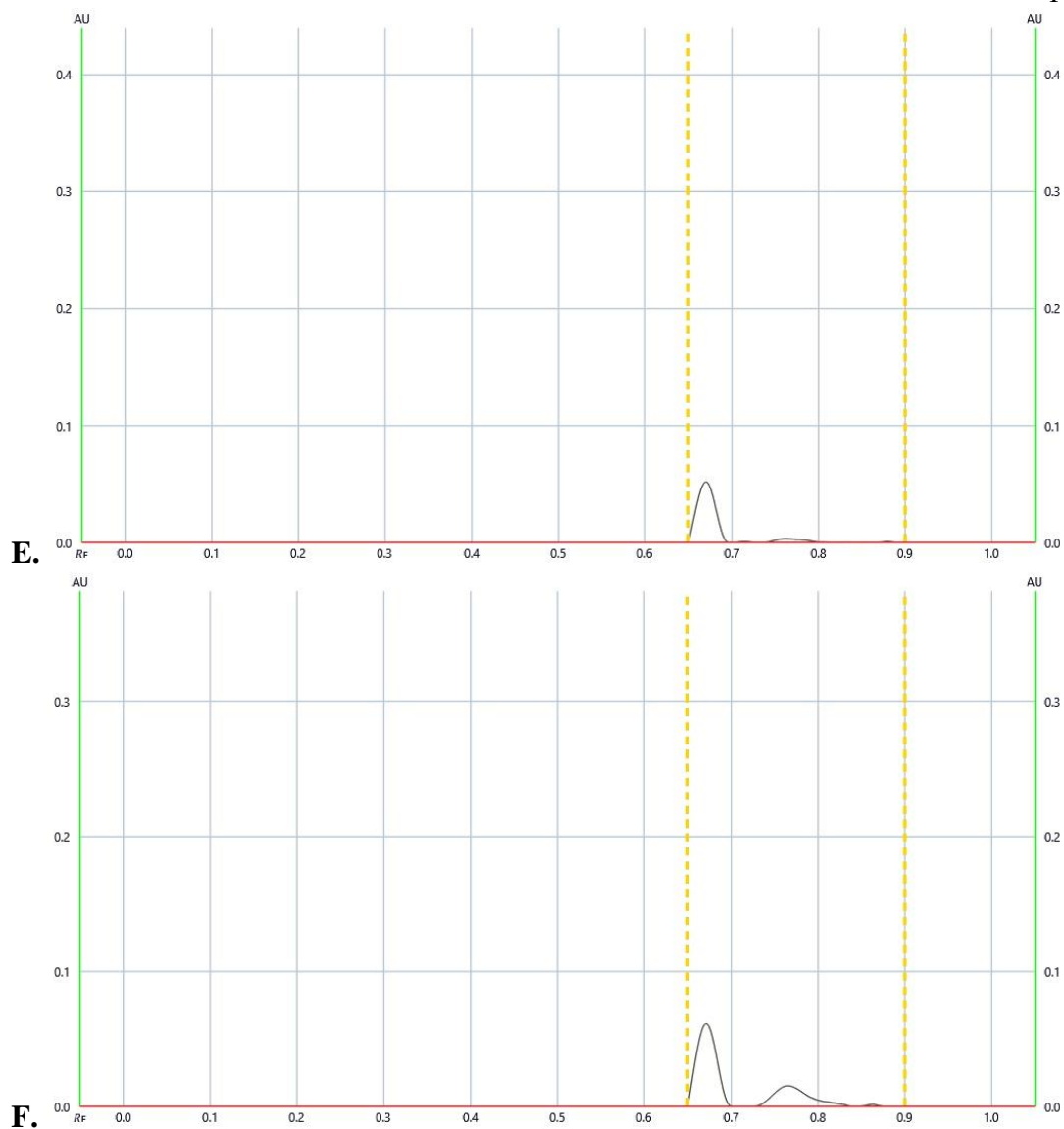


Figura A4 (continuación). Densitogramas de absorción para la determinación de lawsona (1) y 2-MNQ (2) obtenidos a 275 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 4 y 5. E. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de FL-20. F. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de TH-20.

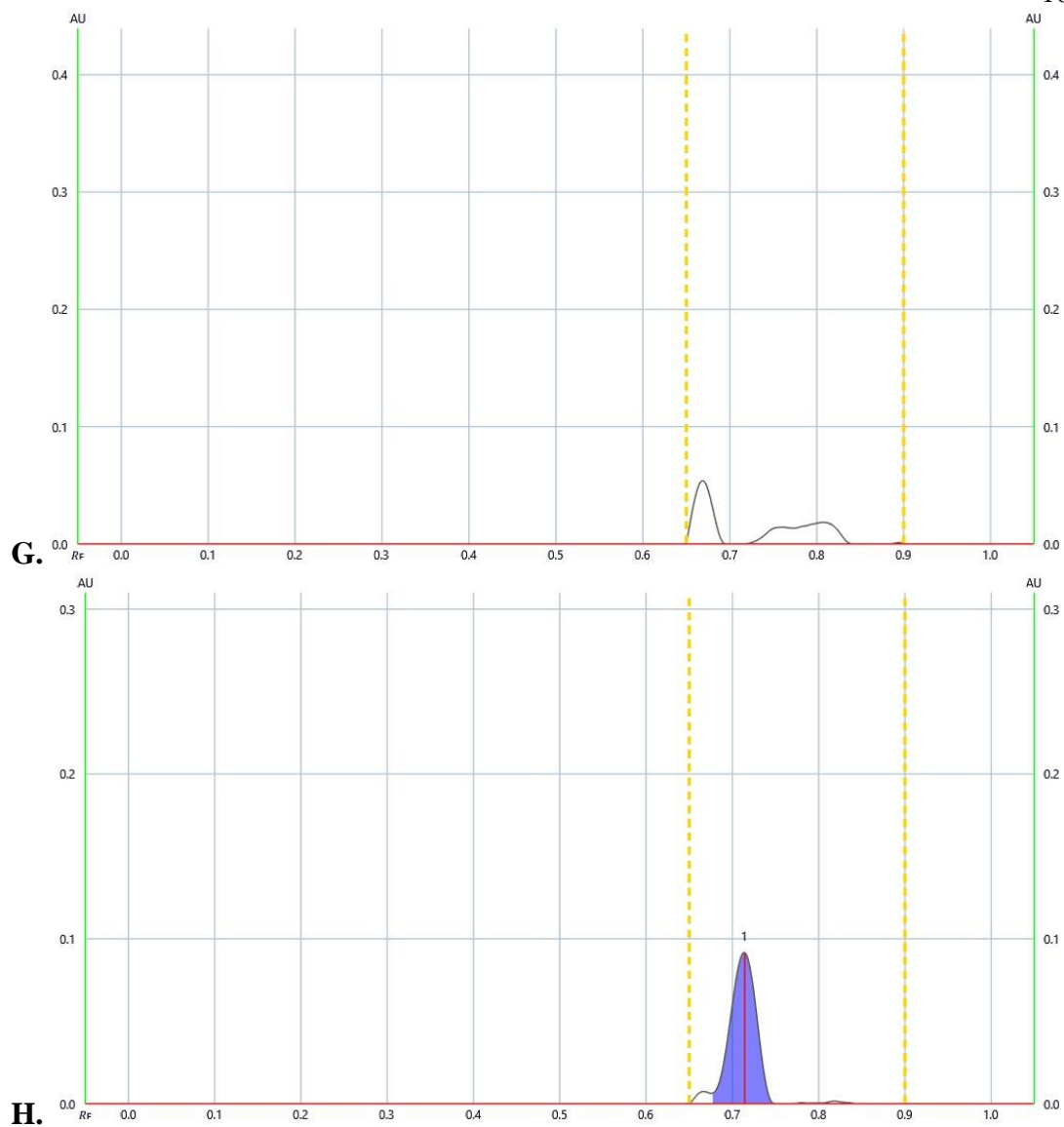


Figura A4 (continuación). Densitogramas de absorbancia para la determinación de lawsonia (1) y 2-MNQ (2) obtenidos a 275 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 4 y 5. G. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de RH-20. H. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de HL-21.

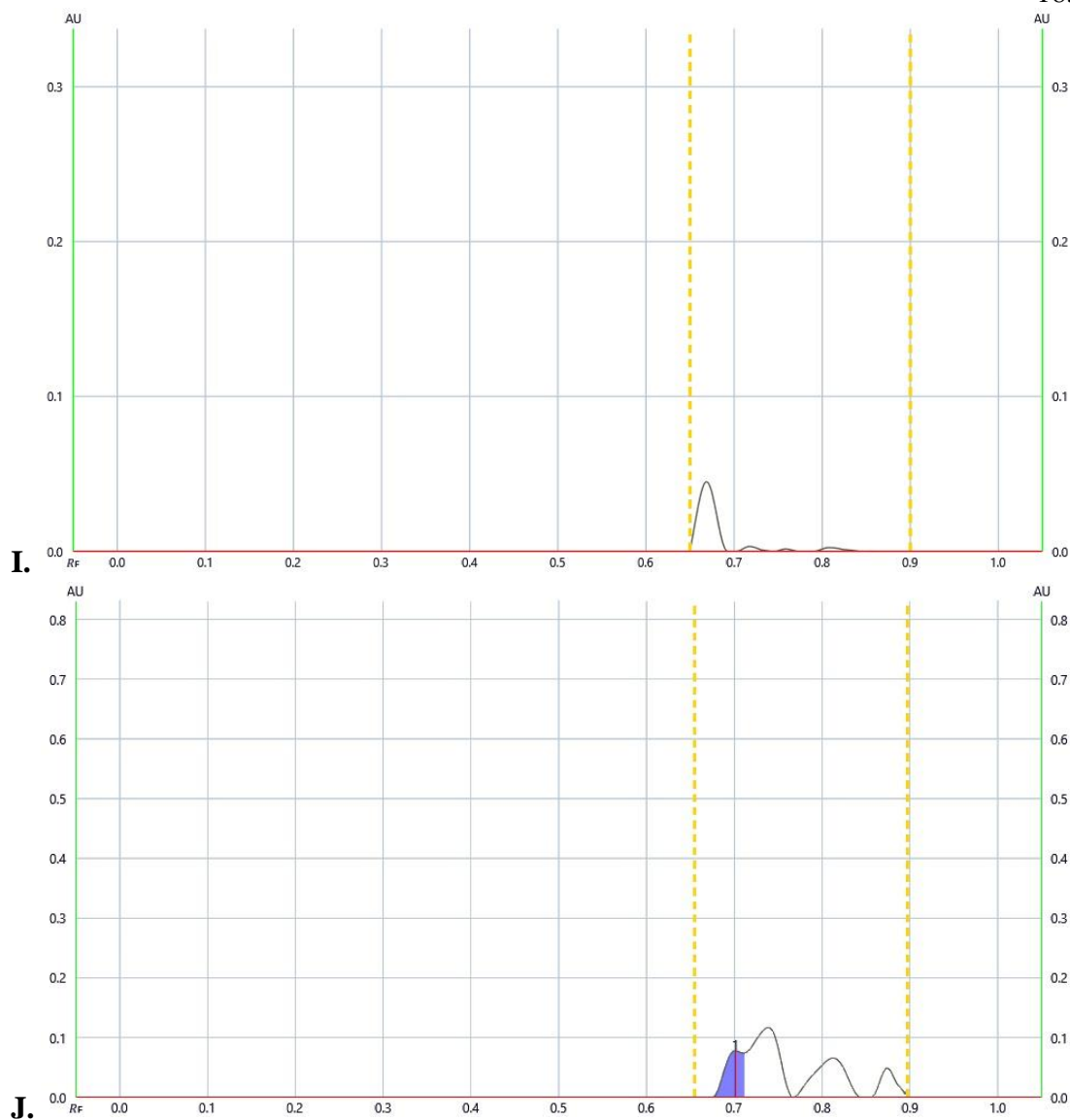


Figura A4 (continuación). Densitogramas de absorción para la determinación de lawsona (1) y 2-MNQ (2) obtenidos a 275 nm después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 4 y 5. I. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de HH-21. J. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de HS-21.

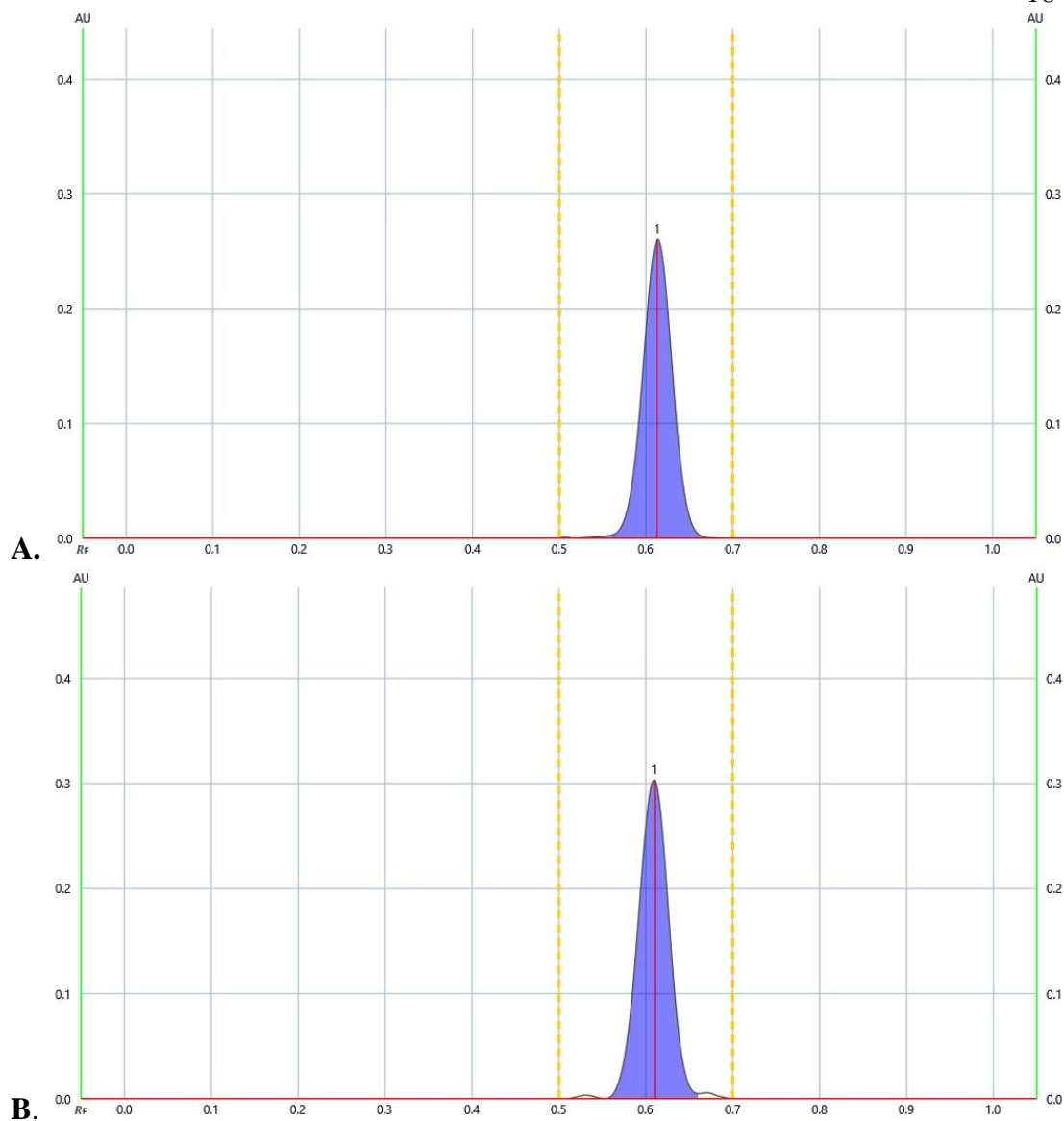


Figura A5. Densitogramas de fluorescencia para la determinación de escopoletina (1) obtenidos a una longitud de onda excitación de 302 nm y con la lectura de la intensidad de fluorescencia emitida con filtro de detección K400 después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 6 y 7. A. Densitograma obtenido con la aplicación de 0.5 μL de la solución estándar de escopoletina. B. Densitograma obtenido con la aplicación de 25 μL de la solución de prueba de PEH-20.

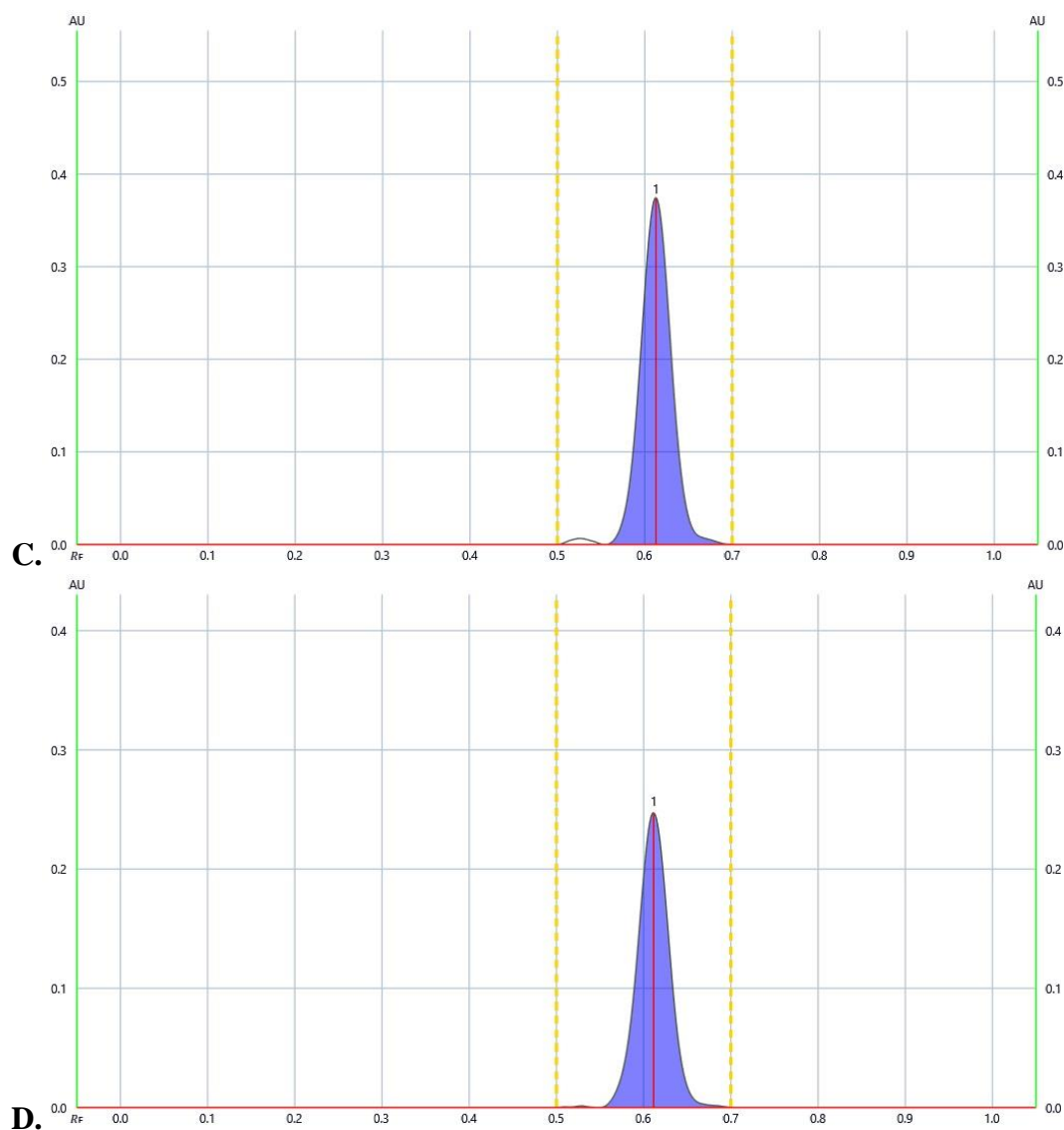


Figura A5 (continuación). Densitogramas de fluorescencia para la determinación de escopoletina (1) obtenidos a una longitud de onda excitación de 302 nm y con la lectura de la intensidad de fluorescencia emitida con filtro de detección K400 después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 6 y 7. C. Densitograma obtenido con la aplicación de 25 μ L de la solución estándar de PAH-20. D. Densitograma obtenido con la aplicación de 10 μ L de la solución de prueba de HH-20.

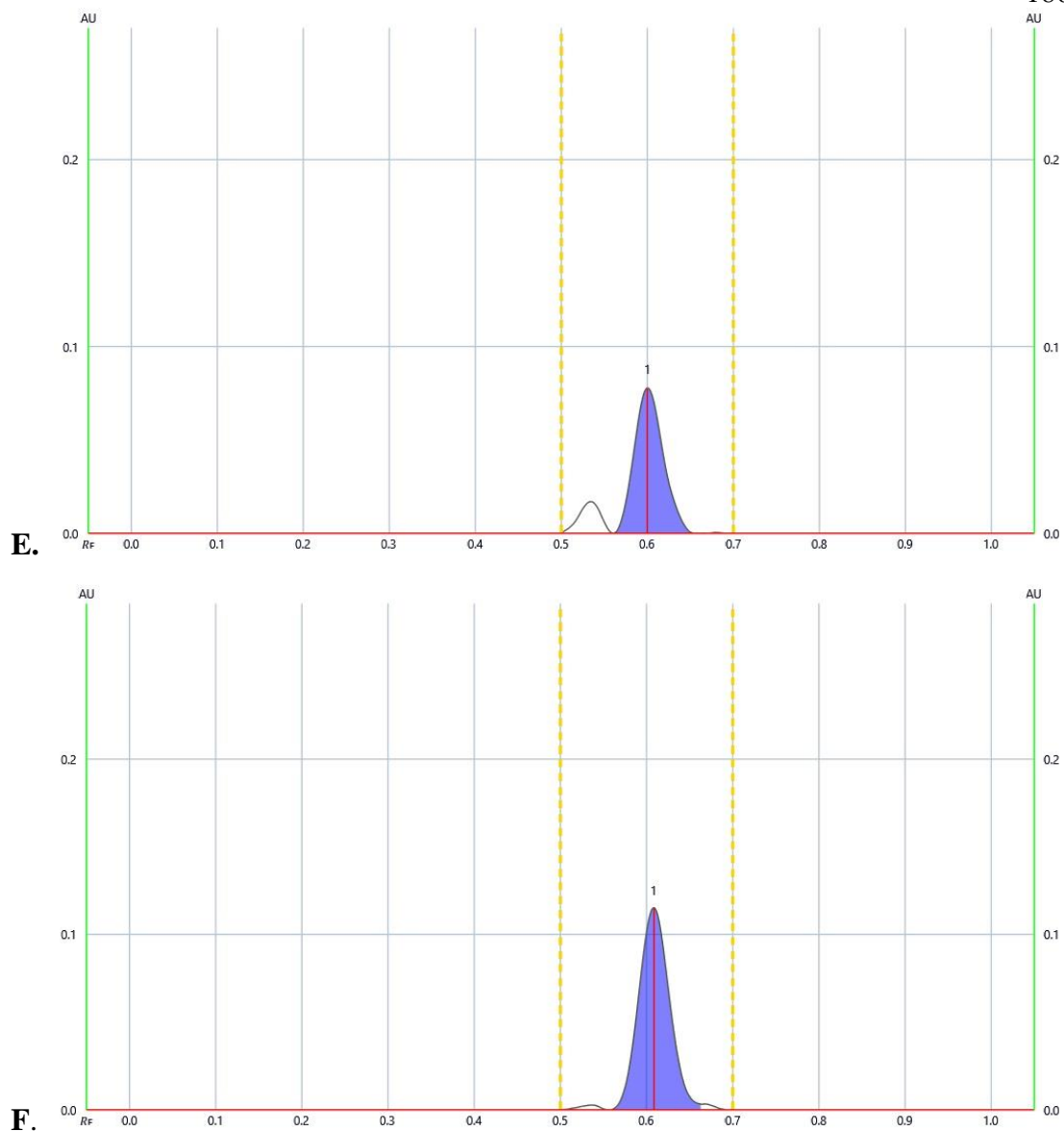


Figura A5 (continuación). Densitogramas de fluorescencia para la determinación de escopoletina (1) obtenidos a una longitud de onda excitación de 302 nm y con la lectura de la intensidad de fluorescencia emitida con filtro de detección K400 después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 6 y 7. E. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de FL-20. F. Densitograma obtenido con la aplicación de 15 μ L de la solución de prueba de TH-20.

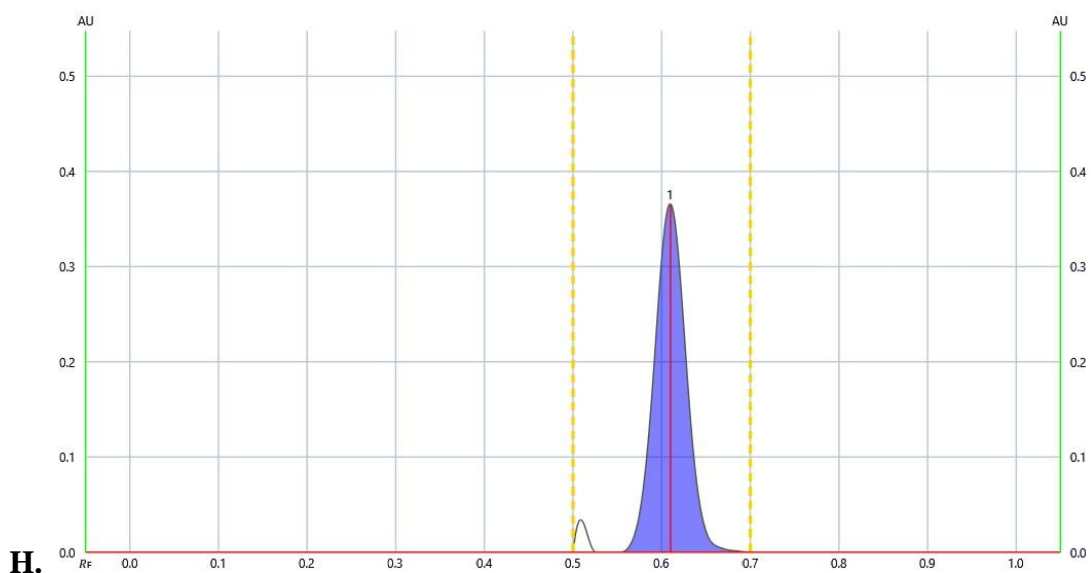
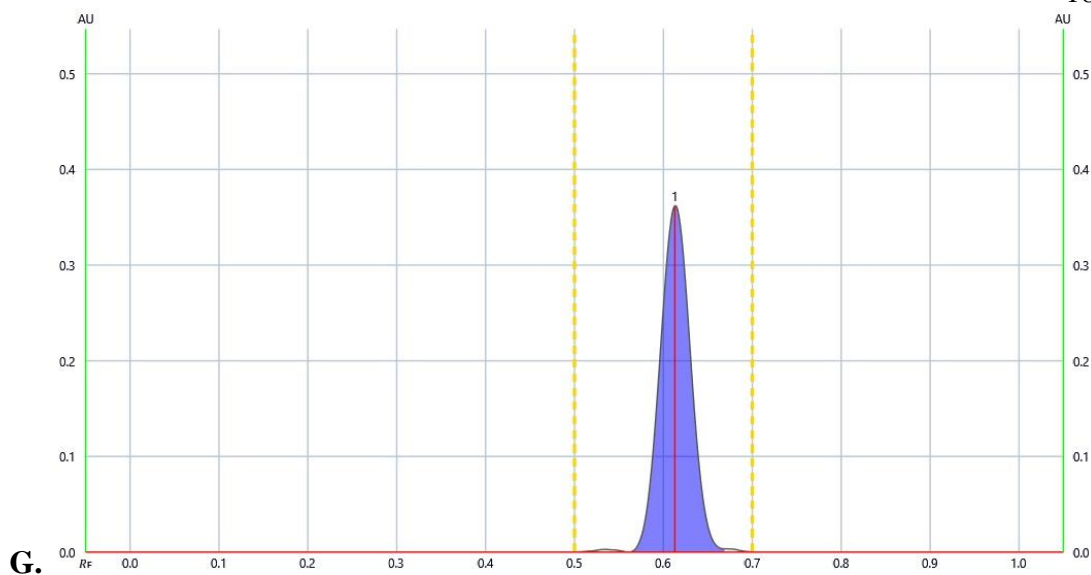


Figura A5 (continuación). Densitogramas de fluorescencia para la determinación de escopoletina (1) obtenidos a una longitud de onda excitación de 302 nm y con la lectura de la intensidad de fluorescencia emitida con filtro de detección K400 después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 6 y 7. G. Densitograma obtenido con la aplicación de 8 μL de la solución de prueba de RH-20. H. Densitograma obtenido con la aplicación de 25 μL de la solución de prueba de HL-21.

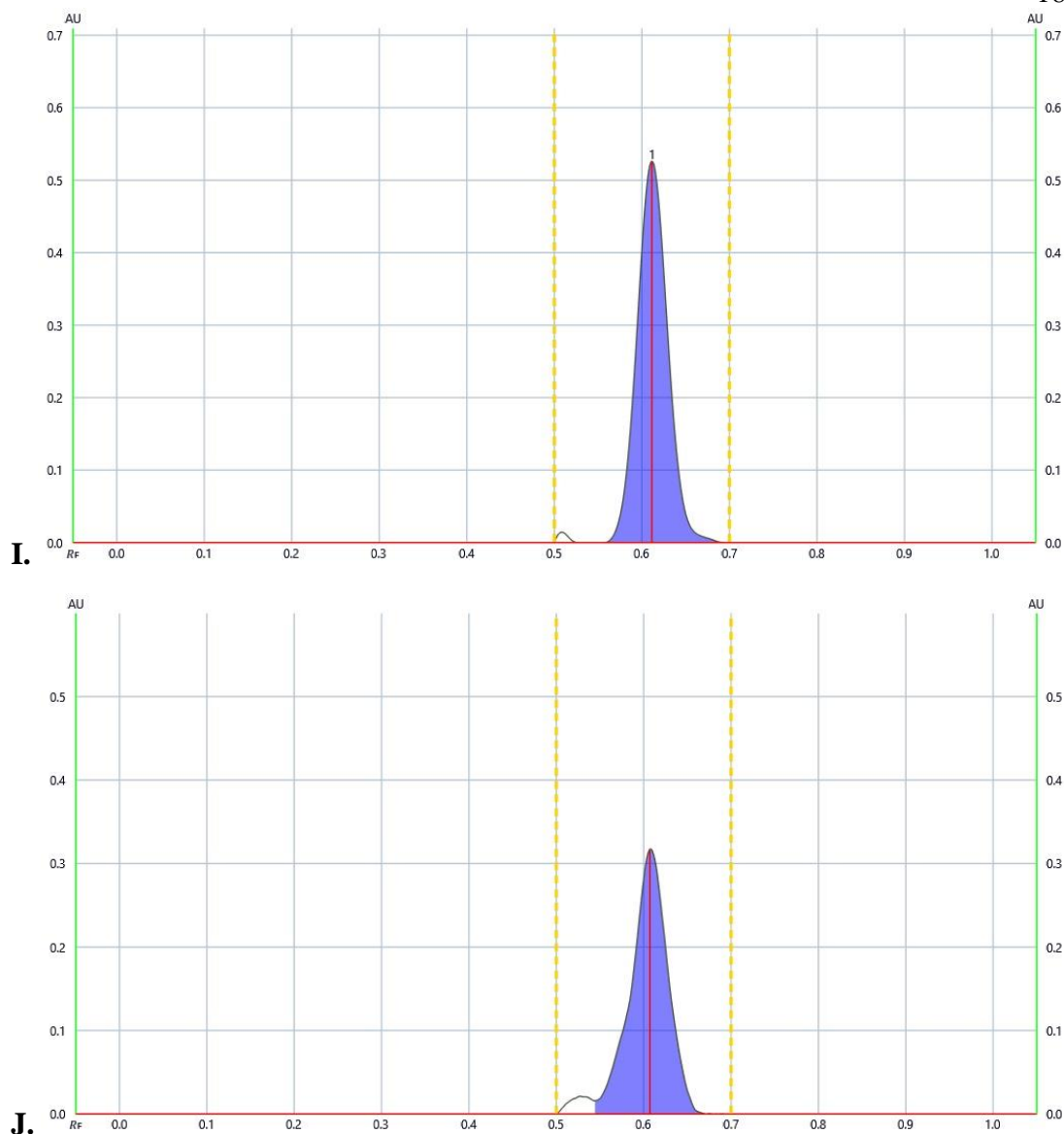


Figura A5 (continuación). Densitogramas de fluorescencia para la determinación de escopoletina (1) obtenidos a una longitud de onda excitación de 302 nm y con la lectura de la intensidad de fluorescencia emitida con filtro de detección K400 después del desarrollo consecutivo de la placa de cromatografía con las fases móviles 6 y 7. I. Densitograma obtenido con la aplicación de 20 μ L de la solución de prueba de HH-21. J. Densitograma obtenido con la aplicación de 100 μ L de la solución de prueba de HS-21.

8.6. Gráfico de tendencias dosis respuesta observada en el ensayo de determinación de la inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular:

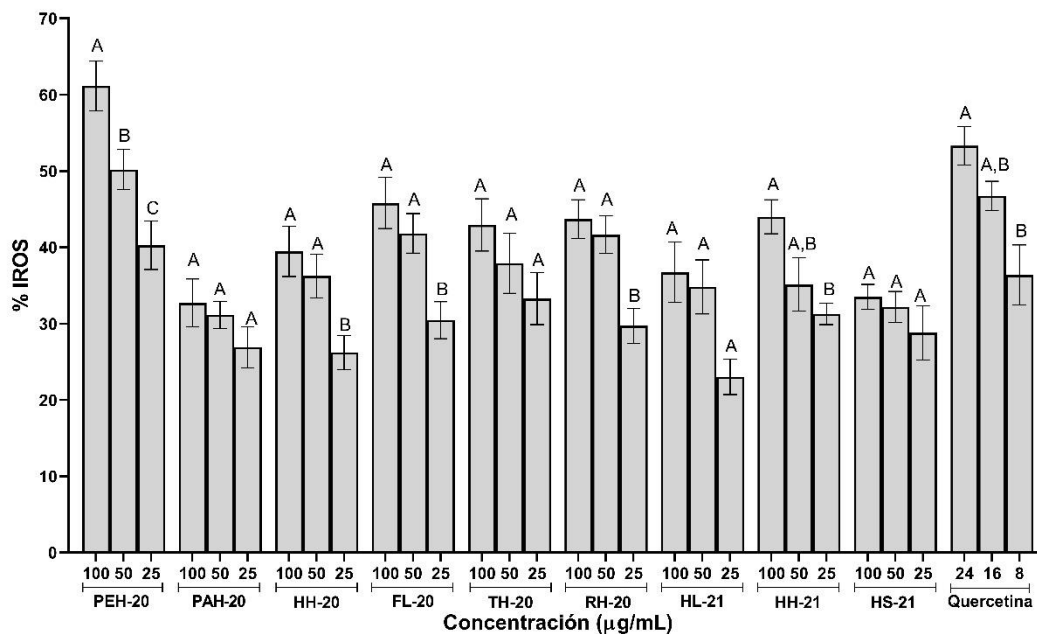


Figura A6. Tendencia dosis respuesta observada con los extractos y quercetina en el ensayo de inhibición de la producción de ROS a nivel intracelular. Las barras de error corresponden al error estándar. Letras distintas en las barras de los diferentes niveles de concentración de cada extracto indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

8.7. Valores para las variables SCF e IAB empleadas para los análisis de correlación y PCA:

Cuadro A5. Valores de las variables SCF e IAB para cada extracto

Extracto	SCF	IAB
PEH-20	0,66	0,00
PAH-20	4,18	0,00
HH-20	7,75	0,32
FL-20	24,06	0,22
TH-20	0,65	0,00
RH-20	2,24	0,00
HL-21	11,10	0,27
HH-21	13,95	0,42
HS-21	7,24	0,20

8.8. Resultados de análisis PCA establecido mediante la selección de los tres componentes principales con mayor varianza:

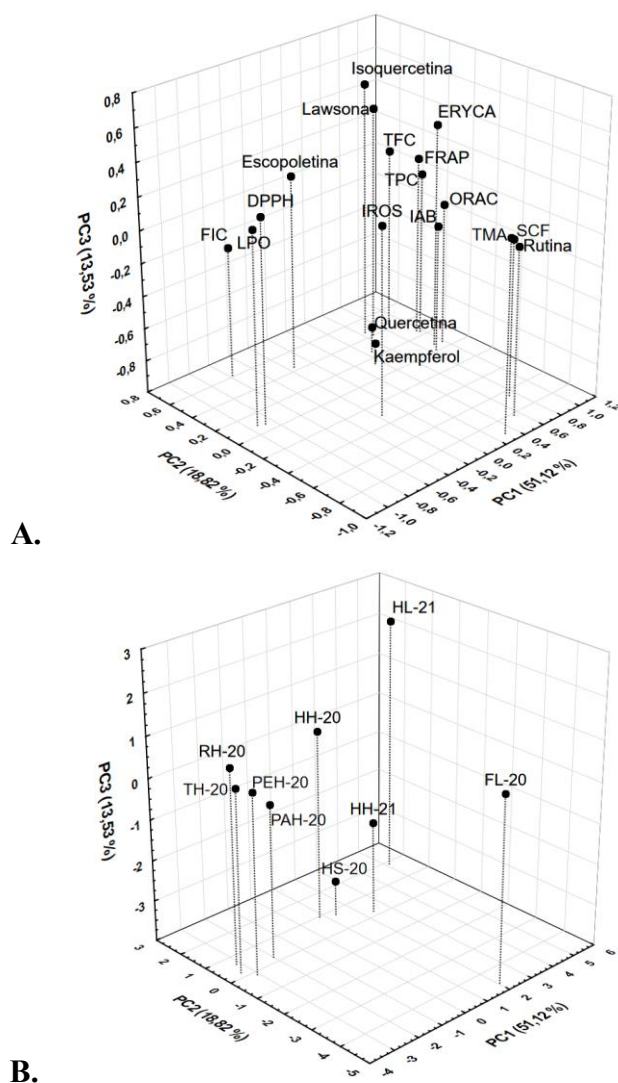


Figura A7. Análisis PCA tridimensional para los diferentes parámetros evaluados en los extractos sujetos a estudio. A. Gráfico tridimensional de cargas factoriales (*loadings plot*) para las variables incluidas en el modelo. B. Gráfico tridimensional de puntuaciones factoriales (*score plot*) para los extractos. El porcentaje indicado en cada eje corresponde al aporte a la varianza del sistema de cada componente principal (PCA).