

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	25 ABR. 2006
Hora	11:30
Nº Ingreso	1963

## INFORME DE AVANCE TECNICO

**ESTUDIO :**

**“Estudios químicos, farmacológicos y toxicológicos de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda*, conducentes al desarrollo de una Monografía del bailahuén”.**

**Codigo** FIA-ES-C-2005-1-A-007

**Período** 01.12.2005-31.03.2006

**Fecha de presentación** 25.04.2006

**Institución Ejecutante**

**Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile**

**Coordinadora**

  
**Francesca Faini di Castri**

## **I. RESUMEN EJECUTIVO DEL PROYECTO**

*Haplopappus multifolius* y *H. taeda*, especies nativas, conocidas comúnmente como bailahuén, fueron recolectadas en su habitat de origen, en verano e identificadas por el botánico, integrante del equipo técnico del Proyecto, Dr. José San Martín.

Parte del material vegetal se entregó para el análisis morfológico y organoléptico de la droga vegetal y el resto, se extrajo con etanol para obtener los extractos secos **Ham-6-E** y **Hat-6-E**. Paralelamente, otra porción de material vegetal se extrajo con agua para preparar las infusiones que fueron posteriormente liofilizadas (**Ham-6-I** y **Hat-6-I**).

Tanto de **Ham-6-E** como de **Hat-6-E**, se obtuvieron 2 sub-extractos para cada uno enriquecidos en componentes químicos estructuralmente diferentes : **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E-F** para *Haplopappus multifolius* y **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**, para *H. taeda*.

Todos los extractos y sub-extractos fueron distribuidos a los distintos grupos de investigación para la realización de los análisis y bioensayos propuestos, actualmente en desarrollo.

Mediante el uso de diversas técnicas cromatográficas, se aislaron e identificaron los posibles metabolitos marcadores de cada especie y se está trabajando en su forma de cuantificación.

Hasta el momento, ya se tienen resultados concretos y positivos de actividad antioxidante de los extractos como inhibición de la lipoperoxidación inducida por Cu/Ascorbato, cuantificación de polifenoles y resultados preliminares de actividad hepatoprotectora en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono.

Es importante señalar que en 4 de los laboratorios participantes en el proyecto, parte del trabajo experimental es realizado en unidades de investigación por estudiantes de pregrado o postgrado, contribuyendo así a su formación académica.

## **II. INFORME TECNICO DE AVANCE**

### **1. Resumen del período.**

Durante el lapso comprendido entre el 1° de diciembre del 2005 y el 31 de marzo del 2006, se llevaron a cabo exitosamente todas las actividades propuestas para el período. Se cumplió con el objetivo específico **1** y en los objetivos específicos **2, 4 y 5** se iniciaron las actividades actualmente en desarrollo. Solo hubo algunas variaciones que se detallarán en el punto **2** : se adelantaron algunas actividades y se desarrolló un bioensayo no propuesto inicialmente de actividad hepatoprotectora in vivo (Actividad **9**), muy importante para los objetivos del proyecto. Este bioensayo permite avalar científicamente el uso del bailahuén en medicina popular por lo que es de rigor incluir estos resultados en una Monografía, máxime si no hay antecedentes previos para esta especie en la literatura científica. Esta prueba no había sido contemplada en la proposición original por su alto costo y por la inseguridad de factibilidad en el momento. Los resultados obtenidos hasta ahora, son positivos, muy promisorios y sería casi una obligación realizarlo con la otra especie en estudio, *H. taeda*.

### **2. Actividades Ejecutadas y Análisis de Brecha.**

#### **Carta Gantt comparativa**

<b>Actividad N°</b>	<b>Descripción</b>	<b>Período Actividades programadas</b>	<b>Período Actividades ejecutadas</b>
1.1	Recolección de especies vegetales, Identificación, secado.	01/12/05-30/04/06	01/12/05-31/03/06
1.2	Extracción de material vegetal, preparación de extractos acuosos y alcohólicos, liofilización de infusiones.	01/12/05-31/01/06	01/12/05-31/01/06
1.3	Fraccionamiento de los extractos	01/12/05-	01/01/06-

	Aislamiento e identificación de compuestos puros.	30/06/06	en proceso
2	Ajuste de Metodologías analíticas cuali y cuantitativas.	01/12/05-30/06/06	01/12/05-en proceso
3	Estudio micro y macroscópico de las drogas secas y pulverizadas.	01/04/06 31/07/06	
4.1	Determinación de activ. antioxidante mediante secuestro de radicales DPPH	01/04/06 31/07/06	
4.2	Cuantificación de polifenoles totales	01/05/06 31/07/06	01/03/06-en proceso
4.3	Determinación de la capacidad antilipoperoxidante.	01/06/06 31/08/06	01/03/06-en proceso
4.4	Capacidad de protección de tioles proteicos	01/09/06 31/10/06	01/03/06-en proceso
4.5	Cultivo de células RLC, UCHT1. Control ensayos de protección.	01/01/06 30/06/06	01/01/06-en proceso
5.1	Cultivo de células RAW, inducción y detección de COX-2 .	01/12/05 31/07/06	01/12/05-en proceso
5.2	Actividad antiinflamatoria oral.	01/05/06 31/09/06	
5.3	Actividad antiinflamatoria tópica	01/05/06 31/09/06	
6.1	Cultivo de células RLC, UCHT1. Ensayos de toxicidad celular.	01/05/06 30/06/06	
6.2	Determinación de toxicidad aguda en ratas (DL50).	01/08/06 01/10/06	
7	Bioensayos de actividad antibacteriana de extractos y compuestos puros.	01/05/06 31/10/06	
8.1	3 Charlas (Santiago, La Serena y Talca).	01/12/06 31/12/06	
8.2	Edición de Folletos de divulgación.	01/11/06 31/12/06	
8.3	Presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales.	Noviembre- Diciembre	
9	Actividad hepatoprotectora in vivo	No propuesta	01/01/06-en proceso

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°1**

### **Actividad 1.1: Recolección de especies vegetales.**

Como estaba previsto, en el mes de diciembre del 2005 (día 22), se recolectaron 12 kg de planta fresca (brotes nuevos sin flores) de *Haplopappus multifolius* en la precordillera de Farellones, Km 22 camino a Los Bronces. La especie, identificada por el botánico Dr. José San Martín, integrante del equipo técnico del Proyecto, fue seccionada y secada a temperatura ambiente, a la sombra y con circulación de aire, obteniéndose 2 kg de hojas secas.

Se seleccionó y apartó un ramillete de la especie para el estudio farmacognóstico (Objetivo específico 3) A fines del mismo mes (día 29), con la participación del Dr. José San Martín, se recolectaron 13 Kg de *Haplopappus taeda* (planta fresca con botones florales no abiertos), a 20 Km pasado Los Queñes (Curicó, VI R). Seleccionado el material vegetal y secado, rindió 3,9 Kg de planta seca. Al igual que en el caso anterior, se separó material seco para el estudio farmacognóstico.

Con el fin de realizar un análisis comparativo de la composición química, en el mes de enero del 2006 (día 21), se recolectaron aproximadamente otros 5Kg de *H. taeda* en zonas aledañas a Las Termas del Flaco. La planta se seleccionó y secó como en los casos anteriores.

Las muestras de *H. taeda* obtenidas en ambas recolecciones, fueron debidamente identificadas por el botánico Dr. José San Martín.

### **Actividades 1.2 y 1.3 : Preparación y fraccionamiento de los extractos, identificación de los compuestos puros.**

Preparación de extractos. Se obtuvieron 2 tipos de extractos para cada especie.

a) Se prepararon 500 mL de Infusiones al 5% las que por posterior liofilización, rindieron 60 mg/g de hoja seca para *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-I**) y 40 mg/g de hoja seca para *H. taeda* (**Hat-6-I**).

b) Extractos etanólicos secos. 1,5 Kg de hojas secas de *H. multifolius* y

2 Kg de hojas secas de *H. taeda*, se maceraron con etanol al 95%. Por concentración de los macerados, se obtuvieron los respectivos extractos secos : 173 g para *H. multifolius* (**Ham-6-E**) y 320 g para *H. taeda* (**Hat-6-E**).

Dado el alto rendimiento de los extractos etanólicos, no se considero necesario preparar extractos adicionales (metanólicos) para el aislamiento de compuestos.

Preparación de sub-extractos. 20 g de cada uno de los extractos etanólicos secos fueron sometidos a cromatografía en columna de Sephadex a fin de lograr 2 fracciones diferentes en composición para cada especie. Para *H. multifolius*, se obtuvo una fracción enriquecida en cumarinas (**Ham-6-E-C**) y otra en flavonoles (**Ham-6-E-F**). En el caso de *H. taeda*, se obtuvo una fracción rica en compuestos terpénicos y aromáticos no flavónicos (**Hat-6-E-T**) y otra compuesta casi exclusivamente por flavonoides (**Hat-6-E-F**).

Tanto los liofilizados como los extractos secos y sub-extractos de ambas especies, se distribuyeron a los distintos grupos participantes en el proyecto en cantidad suficiente para sus respectivos ensayos.

#### Fraccionamiento de los extractos e identificación de compuestos puros.

Cada uno de los extractos etanólicos secos (10 g), fueron sometidos a sucesivos fraccionamientos por métodos cromatográficos habituales en fitoquímica a fin de aislar los compuestos mayoritarios presentes en los extractos para ser usados como posibles marcadores de la droga vegetal. De estos fraccionamientos, se aisló otra serie de componentes del extracto (monoterpenos, compuestos aromáticos, diterpenos y flavonoides) que están en etapa de caracterización.

Todos los compuestos aislados fueron identificados por análisis espectroscópico realizado en la Facultad de Química de la PUC y por cocromatografía con compuestos patrones.

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°2**

### **Actividad 2: Ajuste de metodologías analíticas cuali y cuantitativas.**

Se está trabajando en la búsqueda del mejor sistema cromatográfico (disolventes, sistema de detección, condiciones , etc.) en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) que permita separar, identificar y cuantificar los diferentes compuestos marcadores presentes en cada extracto.

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°4**

### **Actividades 4.2, 4.3 y 4.4: Cuantificación de polifenoles totales, determinación de la capacidad antilipoperoxidante y capacidad de protección de tioles proteicos en extractos de hojas de *Haplopappus multifolius* y *H.taeda*.**

Condiciones de trabajo favorables en el laboratorio de la Dra. Maria Eugenia Letelier, permitieron adelantar el comienzo de estas actividades que estaban programadas para los meses de mayo y junio. Los resultados preliminares obtenidos, se detallarán en el punto 4.

### **Actividad 4.5.**

Se dió comienzo al cultivo de los tejidos necesarios para los bioensayos y actualmente se están afinando las condiciones experimentales definitivas, por lo que aun no se tienen resultados concretos.

Se retrasó en un mes la contratación del personal técnico solicitado por problemas personales de la persona adecuada para el cargo, lo cual retrasó también la contratación del auxiliar para dicha actividad. Este hecho, sin repercusiones, no tendrá ninguna consecuencia en el cumplimiento y desarrollo de las tareas propuestas en la actividad, salvo en la postergación de un mes de los respectivos contratos.

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°5**

### **Actividad 5.1.**

Esta actividad, se inició con el cultivo de la línea celular macrofágica RAW 264.7. Siguió con la determinación de la viabilidad celular en presencia de los extractos de bailahuén y está en desarrollo el análisis de la expresión de COX-2 mediante inmunowesternblot. Con las curvas de viabilidad, se escogieron distintas concentraciones de los extractos, para realizar los ensayos. Estos se encuentran en proceso. Se espera tener resultados a lo menos en triplicado para ambos extractos y para fracciones enriquecidas en polifenoles de *H. multifolius* y de *H. taeda* y fracciones enriquecidas en cumarinas para el primero y enriquecidas en terpenos para la segunda especie.

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°9**

### **Actividad 9.**

En el mes de enero del presente año, en el Laboratorio de la Dra. M. Eugenia Letelier, integrante del equipo técnico del Proyecto, se tuvieron las condiciones técnicas necesarias para realizar el bioensayo de hepatoprotección in vivo. A pesar de que este ensayo no había sido propuesto inicialmente por su elevado costo, luego de solicitar la autorización correspondiente al Supervisor Sr. Mauricio Cañoles, se decidió realizarlo con el extracto seco de *Haplopappus multifolius*, la especie mas consumida en la zona Metropolitana y de mayor venta comercial en forma de bolsitas para infusiones.

Dado el interés que presentaron los resultados preliminares (punto 4), se decidió su repetición para refrendar los resultados obtenidos.

### 3. Metodología.

En todas las actividades ejecutadas, se siguió la metodología propuesta en el proyecto original, sin modificaciones.

La actividad 9, "Determinación de hepatoprotección en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono", no programada inicialmente, se realizó acorde a la metodología detallada a continuación.

**Efecto hepatoprotector asignado a *Haplopapus multifolius* determinado en ratas Sprague Dawley sometidas a la administración intraperitoneal de tetracloruro de carbono, solvente que provoca inflamación hepática.**

➤ **Animales de experimentación.** Se utilizaron ratas machos de 3 meses de edad de la cepa Sprague Dawley. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal (pellet Kimber), agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21°C. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Durante la experimentación los animales fueron controlados bajo las normas del Comité de bioética sobre la investigación en animales de la Universidad de Chile conforme a su "PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO 2004".

➤ **Diseño experimental y tratamiento de los animales.** Se utilizaron 48 ratas adultas machos de 3 meses de edad de un peso promedio 310 g ± 20 g los cuales fueron distribuidos en ocho grupos experimentales de 6 animales cada uno; cada grupo fue mantenido en jaulas independientes de 5 animales cada una.

El grupo 1 fue el control normal y recibió 200µl de la solución hidroalcohólica (0,0005% V/V) 3 veces al día. El grupo 2 recibió por 7 días oralmente el extracto de *H. multifolius* (10µg 3 veces al día, entregado en volúmenes de 200 µL) y fue sacrificado al octavo día de tratamiento. Para inducir daño hepático se administró una dosis única de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>: 1,2 g/Kg de peso, preparado 1:1 en aceite de oliva) por vía intraperitoneal a los grupos 3 y 4. Los ratones del grupo 3 fueron sacrificados

a las 24h y los del grupo 4 a las 48h después de la administración de CCl<sub>4</sub>. Los grupos 5 y 6 recibieron el extracto de *H. multifolius* durante 7 días. Luego de 1,5 h de la última dosis de extracto de *H. multifolius*, ambos grupos recibieron una dosis de CCl<sub>4</sub>, y continuaron con la dosis oral de *H. multifolius* hasta el sacrificio de los animales a las 24h el grupo 5 y a las 48 h el grupo 6. Los grupos 7 y 8 recibieron la misma dosis intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> y luego después de 1,5 h se comenzó la administración del extracto de *H. multifolius*; el grupo 7 fue sacrificado a las 24 h y el grupo 8, a las 48h después de administrada la dosis de CCl<sub>4</sub>.

Previo al sacrificio, las ratas fueron anestesiadas para obtener las muestras de sangre por punción cardíaca. A continuación, los animales fueron sacrificados realizando la eutanasia de ellos de acuerdo a uno de los métodos aceptados por la “Asociación Médico Veterinaria de América” ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) y la “Asociación Chilena de Ciencias de Animales de Laboratorio (ASOCHICAL)”, el que contempla la utilización de una guillotina especial para realizar la decapitación de los animales, procurando una muerte rápida, con mínimo sufrimiento.

De cada grupo, los hígados de 3 ratas fueron perfundidos *in situ* para eliminar la sangre remanente, los que posteriormente fueron pesados y luego homogeneizados para preparar las fracciones subcelulares microsomal y citosólica hepática (ver preparación de microsomas y citosol hepáticos descrita en la metodología), las cuales están siendo utilizadas para determinar la actividad GSH-transferasa. Los hígados de los otros 3 animales de cada grupo, fueron utilizados para obtener una biopsia la cual fue fijada en formalina tamponada al 10%. Estas biopsias fueron teñidas con hematoxilina-eosina y analizadas por el anatómo patólogo.

➤ **Pruebas clínicas sanguíneas.** A las muestras de sangre obtenidas de cada uno de los animales se les realizaron distintos análisis clínicos. A todos los animales se les realizó un estudio de pruebas hepáticas estándar, el que incluye: GOT, GPT,  $\gamma$ GT, FA, bilirrubina total y bilirrubina directa. Además, a los grupos control tratados solamente con la solución hidroalcohólica y a los tratados con la solución del extracto seco de *H. multifolius*, se les realizaron hemogramas y perfil bioquímico, de modo de analizar el efecto del tratamiento

con el extracto natural sobre el estado general de los animales. Todos estos estudios se realizaron en un Laboratorio Clínico especializado.

➤ **Técnicas Histoquímicas.**

**a) Preparación de los colgajos de piel para el desarrollo de las técnicas histoquímicas.** Las biopsias de hígados fijadas en la formalina tamponada (pH 7,2), se pasaron por una batería de alcoholes de grado ascendente para deshidratar el tejido, que incluye el paso por alcohol de 70° (30 a 45 minutos), alcohol 95° (30 a 45 minutos por 3 veces), alcohol de 100° (30 a 45 minutos por 3 veces), xilol (30 a 45 minutos por 3 veces). Finalmente los hígados fueron incluidos en parafina de punto de fusión entre 56 y 58°C, pasando por 3 baños de 30 minutos cada uno y así la inclusión del tejido en la parafina permitió obtener los moldes para su utilización en la preparación de cortes seccionados de 4 micrómetros de espesor.

**b) Tinción histoquímica. Hematoxilina/eosina.** Para llevar a cabo esta tinción, los cortes fueron previamente desparafinados e hidratados en una batería que incluye xilol (2 pasos), alcohol 100% (2 pasos), alcohol 95%, alcohol 70% y finalmente agua destilada. La tinción con Hematoxilina - eosina permite determinar la histología tisular mediante microscopía óptica. Se diferencian leucocitos, eritrocitos, fibroblastos, células epiteliales, fibras colágenas, vasos sanguíneos. (**Mc Manus and Mowry**, 1968). Las muestras desparafinadas e hidratadas se sometieron primero a la tinción nuclear con Hematoxilina de Harris (hematoxilina (5g), alcohol absoluto (50 ml), alumbre de potasio (100g), agua destilada (1000mL) y óxido rojo de mercurio (2,5g) y se lavaron con abundante agua corriente durante 10 minutos. Luego se realizó la tinción citoplasmática con eosina 1% durante 1 a 2 minutos y nuevamente las muestras se lavaron rápidamente en agua destilada. Posteriormente los cortes se deshidrataron en alcohol 50%, alcohol 70%, alcohol 95% y alcohol 100% (2 veces) y finalmente se aclararon con dos lavados con xilol. La observación microscópica muestra los núcleos de color azul, mientras que el citoplasma y otros elementos celulares se aprecian de color rosado a rojo.

**McManus, J.F.A., Mowry, R.W.** (1968). Staining Methods. Histologic and Histochemical. Special Methods for the Constituents of Cell and Tissues. Hoerber International Reprints. pp: 124-128.

#### 4. Resultados e Hitos.

##### OBJETIVO ESPECIFICO N°1

**Actividades 1.1, 1.2 y 1.3. Recolección de especies vegetales, preparación y fraccionamiento de los extractos, identificación de los compuestos puros.**

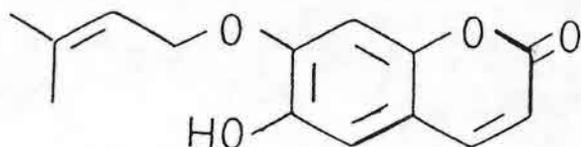
***Haplopappus multifolius*** : 173,1 g de extracto etanólico seco y 5 g de liofilizado.

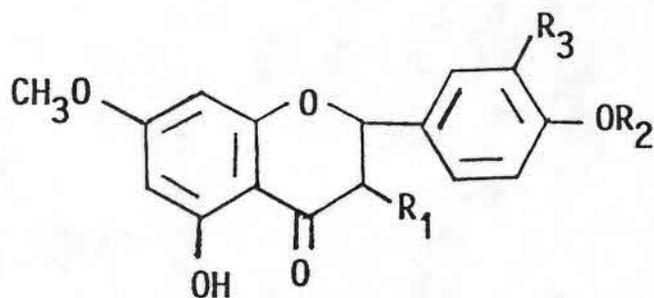
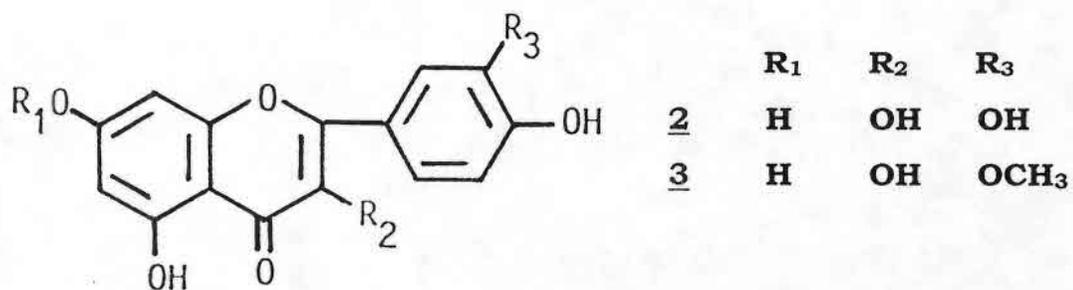
**Metabolitos aislados.** Del extracto seco de *Haplopappus multifolius*, se aislaron los cuatro compuestos mayoritarios, 2 cumarinas : **preniletina (1)** y ger-cuma, en vías de identificación), 2 flavonoles conocidos : **quercetina (2)** e **isoramnetina (3)** y las cumarinas ya descritas en la especie.

***H. taeda*** : 320 g de extracto etanólico seco y 5 g de liofilizado.

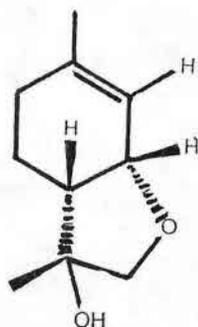
Metabolitos aislados. Del extracto seco de *H. taeda*, se aislaron los dihidroflavonoides Tae-5 = **sakuranetina (4)**, Tae-7 = **7-metilaromadendrina (5)**, Tae-30 = **7-metileriodyctiol (6)** y el monoterpeno llamado **taedol (7)**, como compuestos mayoritarios y posibles marcadores. Adicionalmente, se aislaron otros flavonoides previamente informados en la especie y diversos otros metabolitos no descritos en esta planta y que son objeto de un trabajo a publicar actualmente en curso.

Cabe señalar que en ambos casos los metabolitos elegidos como marcadores también aparecen en los liofilizados de las infusiones.





	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<u>4</u>	H	OH	H
<u>5</u>	OH	H	H
<u>6</u>	H	OH	OH



7

Para finalizar el **OBJETIVO ESPECIFICO N°1**, sólo faltaría la identificación definitiva de ciertos compuestos ya aislados y purificados.

## OBJETIVO ESPECIFICO N°4

**Actividades 4.2 y 4.3 : Caracterización de extractos y sub-extractos de hojas de *Haplopappus multifolius* y *H.taeda* a través de la cuantificación de polifenoles, y la capacidad antilipoperoxidante de microsomas hepáticos.**

Los extractos analizados fueron los siguientes:

<b>Extractos</b>	<b>Descripción</b>
<b><i>Ham-6-E</i></b>	Extracto etanólico seco total de <i>Haplopappus multifolius</i> .
<b><i>Ham-6-E-C</i></b>	Extracto etanólico seco de <i>Haplopappus multifolius</i> . Fracción enriquecida en cumarinas.
<b><i>Ham-6-E-F</i></b>	Extracto etanólico seco de <i>Haplopappus multifolius</i> . Fracción que contiene flavonoides
<b><i>Hat-6-E</i></b>	Extracto etanólico seco total de <i>Haplopappus taeda</i>
<b><i>Hat-6-E-T</i></b>	Extracto etanólico seco de <i>Haplopappus taeda</i> . Fracción enriquecida en terpenos.
<b><i>Hat-6-E-F</i></b>	Extracto etanólico seco de <i>Haplopappus taeda</i> . Fracción que contiene flavonoides.

### Resultados :

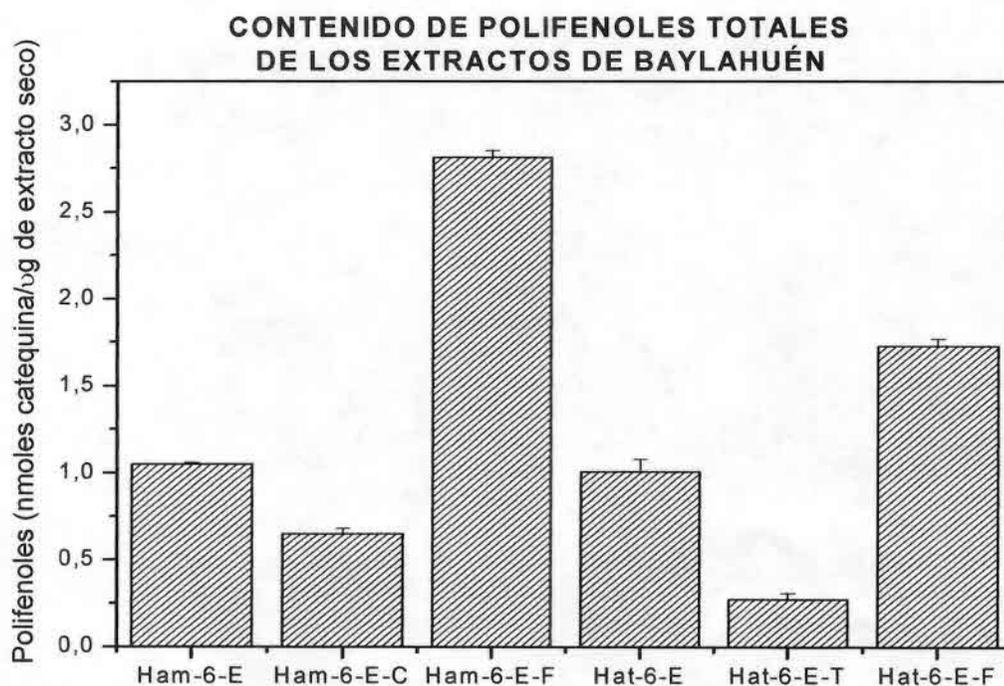
➤ **Cuantificación de Polifenoles.** Los resultados se muestran en la **Tabla 1**. Los extractos totales de *H. multifolius* (***Ham-6-E***) y *H. taeda* (***Hat-6-E***) no presentaron diferencias significativas en la concentración de polifenoles totales ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, el extracto de *H. multifolius* enriquecido en

flavonoides (**Ham-6-E-F**) presentó mayor concentración de polifenoles totales que el de *H. taeda* también enriquecido en flavonoides (**Hat-6-E-F**). Los extractos **Ham-6-E-C** y **Hat-6-E-T** enriquecidos en cumarinas y terpenos respectivamente, presentaron significativamente menor concentración de polifenoles que los demás extractos lo cual concuerda plenamente con su composición química.

**Tabla 1 : Cuantificación de polifenoles.**

<b>Extractos</b>	<b>Contenido de polifenoles nmoles de catequina/<math>\mu</math>g de extracto seco</b>
<b>Ham-6-E</b>	1,049 $\pm$ 0,009
<b>Ham-6-E-C</b>	0,650 $\pm$ 0,030
<b>Ham-6-E-F</b>	2,812 $\pm$ 0,040
<b>Hat-6-E</b>	1,006 $\pm$ 0,071
<b>Hat-6-E-T</b>	0,271 $\pm$ 0,039
<b>Hat-6-E-F</b>	1,727 $\pm$ 0,040

➤ **Efecto comparativo de Inhibición de la lipoperoxidación de diferentes extractos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda*.** Los resultados se expresan en la **Figura 1**. Todos los extractos fueron utilizados en concentración 9  $\mu$ g/mg proteína microsómica/mL, a excepción de los extractos enriquecidos en flavonoides (**Ham-6-E-F** y **Hat-6-E-F**), los cuales se utilizaron en la concentración 4,5  $\mu$ g/mg de proteína microsómica/mL. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu<sup>2+</sup>/ascorbato, en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. \* Valores significativamente diferentes: p<0,05.



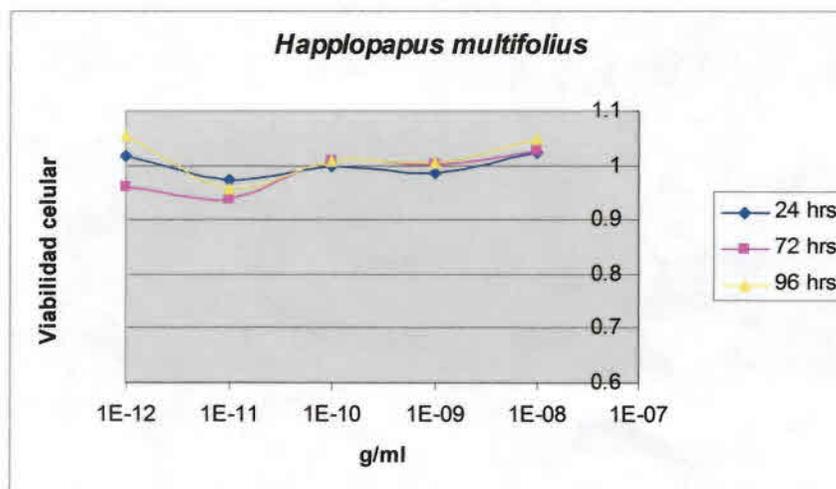
**Figura 1. Lipoperoxidación microsómica inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.**

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°5**

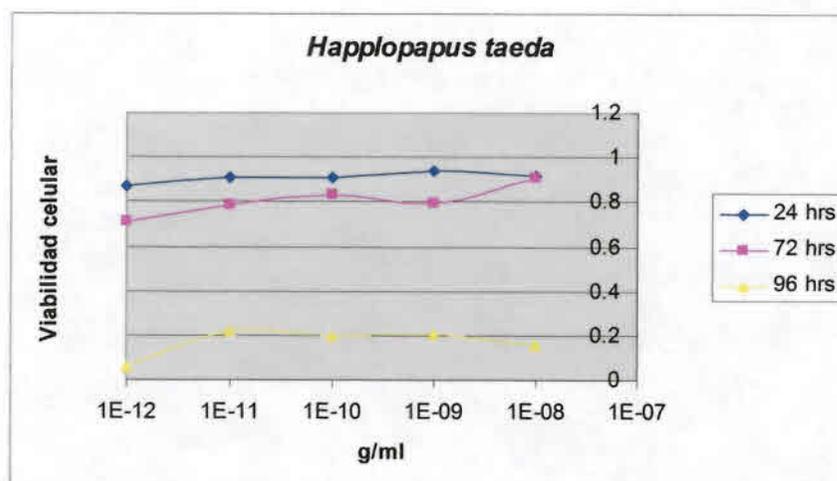
**Actividad 5.1: Caracterización del efecto de extractos de hojas de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda* en la línea celular macrofágica RAW sobre la expresión de ciclooxygenasa-2 (COX-2)**

**Estudios del efecto de extractos alcohólicos de *H. multifolius* y *H. taeda* sobre viabilidad celular de células RAW 264.7.** Los resultados obtenidos en este punto, han mostrado que *H. multifolius*, no presentaría cambios significativos en la viabilidad de células RAW a ninguno de los tiempos y concentraciones utilizadas. En el caso del tratamiento de las células con *H. taeda*, se produjo una inhibición de la viabilidad de las células del 10% a las 24h de exposición, aumentando a un 20% a las 72h y cayendo drásticamente en alrededor de 80% a las 96h la exposición. (**Figuras 2 y 3**) Este efecto se observó a todas las concentraciones utilizadas. Sin embargo, este estudio aún está en proceso y se están ampliando los rangos de concentraciones

analizados y aumentando el número de experimentos independientes para validarlos estadísticamente.



**Figura 2. Efecto de extractos de *Happlopapus multifolius* sobre la viabilidad de células RAW 264.7.** Células RAW 264.7 fueron tratadas por 24, 48 y 72h con las concentraciones de extractos indicadas en la figura. La viabilidad celular se cuantificó por el ensayo de MTS (ver Métodos) y los resultados se muestran relativos a la viabilidad de las células control sin tratamiento. Resultados de un experimento hecho en duplicado.



**Figura 3. Efecto de extractos de *Happlopappus taeda* sobre la viabilidad de células RAW 264.7.** Células RAW 264.7 fueron tratadas por 24, 48 y 72h con las concentraciones de extractos indicadas en la figura. La viabilidad celular se cuantificó por el ensayo de MTS (ver Métodos) y los resultados se muestran relativos a la viabilidad de las células control sin tratamiento. Resultado de un experimento hecho en duplicado

## OBJETIVO ESPECIFICO N°9

**Estudios de hepatoprotección *in vivo* realizados con Extracto seco de hojas de *Haplopappus multifolius*.**

a) **Evaluación de la dosis de *H. multifolius* oral administrada mediante pruebas sanguíneas.** Muestras de sangre fueron extraídas de cada animal por punción cardiaca, antes de eutanasiar los animales. Las muestras fueron colocadas en un tubo sin anticoagulante para realizar el perfil bioquímico, análisis que incluye: Calcio, Fósforo, Glicemia, Nitrógeno Ureico Sanguíneo (NUS) (BUN), Colesterol total, Proteínas, Albúmina, Bilirrubina Total, Fosfatasa alcalina (FA), Lactato deshidrogenada (LDH), Aspartato amino-transferasa (GOT o AST), Creatinina.

La **Tabla 2** muestra los resultados obtenidos para los grupos controles **1** y **2**. **GRUPO 1:** animales tratados vía oral con 200µL de solución hidroalcohólica (0,0005%), 3 veces al día; **GRUPO 2:** animales tratados vía oral 3 veces al día con 200µL de una solución de *H. multifolius* de 0,05 µg/□L. Estos animales no mostraron cambios significativos en ninguno de los parámetros analizados, los valores permanecieron dentro de los rangos normales.

**Tabla 2. Perfil bioquímico de ratas tratadas con extracto de *H. multifolius***

<b>Día 3 de tratamiento</b>	<b>Und. de Medida</b>	<b>Rango normal</b>	<b>GRUPO 1 Promedios</b>	<b>GRUPO 2 Promedios</b>
Calcio	mg/dL	11,3 - 14,7	14,7 ± 0,3	14,6 ± 0,36
Fósforo	mg/dL	12,9 - 26	19,6 ± 0,8	21,8 ± 0,2
Glicemia	mg/dL	152 - 343	124,6 ± 3,8	127,2 ± 7,4
BUN	mg/dL	15 - 22	15,2 ± 0,8	17,6 ± 0,3
Colesterol total	mg/dL	115 - 150	79,6 ± 4,8	102 ± 4,7
Proteínas	gr/dL	6- 8,9	5,7 ± 0,1	5,8 ± 0,1

Albúmina	gr/dL	3,6 - 3,9	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Bilirrubina Total	mg/dL	0,2 - 0,3	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,16
FA	U/L	206 - 251	116 ± 6,49	195 ± 17
LDH	U/L	921 - 3206	2202 ± 290	1,509 ± 180
* GOT	U/L	275 - 465	293 ± 40	185 ± 55
Creatinina	mg/dL	1,1 - 1,3	1,1 ± 0,03	1,1 ± 0,04

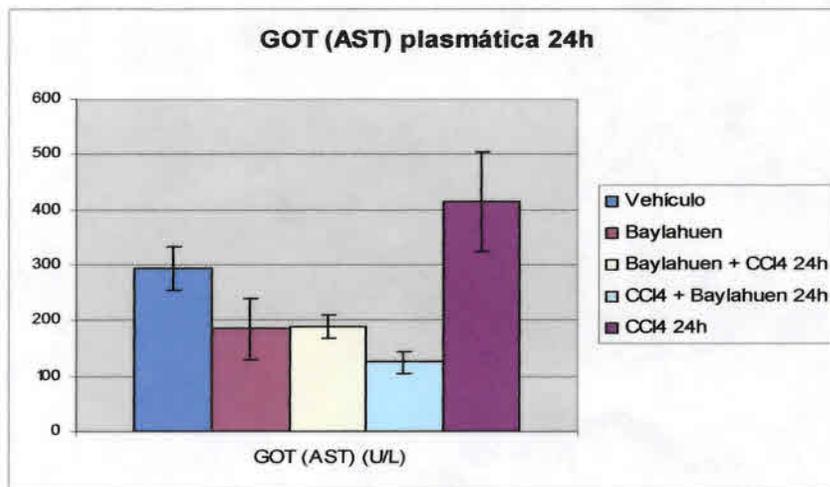
Promedio y desviación estándar de 5 animales por cada grupo.

**b) Efecto del extracto seco de hojas de *Haplopappus multifolius* sobre ratas *Sprague Dawley* a las cuales se les provocó daño hepático agudo mediante una inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).**

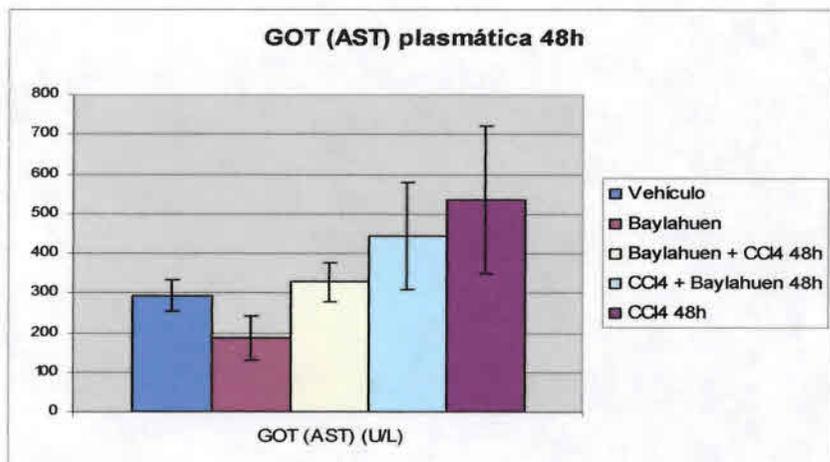
En este primer experimento, se midió la enzima hepática GOT (AST) que es liberada a la circulación cuando existe daño en hepatocitos. En la **Figura 4**, se muestran los niveles séricos de esta enzima detectados 24h de aplicado el CCl<sub>4</sub> i.p. en los diferentes grupos. Como se puede observar, el CCl<sub>4</sub> produjo un aumento de la actividad de la GOT sérica, el cual disminuyó en ambos grupos tratados con el extracto de *H. multifolius*, ya sea en los animales del grupo que se les administró el extracto por 7 días previos a la administración del hepatotóxico como en aquellos que lo recibieron sólo después de la administración del mismo. En la **Figura 5**, se muestran los resultados de GOT para las ratas con daño hepático agudo, después de 48h de la administración de CCl<sub>4</sub>. Se puede observar que la GOT sérica se mantiene muy elevada en las ratas tratadas sólo con el solvente tóxico por 48h, comparadas con los grupos control y que este aumento fue significativamente menor en las ratas que recibieron el extracto de *H. multifolius* 7 días antes o inmediatamente después de recibido el CCl<sub>4</sub>. Las muestras histológicas de estos experimentos están en proceso.

Cabe señalar que en estos primeros ensayos, la dosis utilizada de CCl<sub>4</sub> provocó un proceso inflamatorio generalizado en los animales ya que la toxicidad de este compuesto se debe al estrés oxidativo que éste induce al metabolizarse en el hígado a través del sistema oxidativo del citocromo P<sub>450</sub>. Es por ello que como una forma de provocar una lesión inflamatoria local, este experimento fue repetido utilizando una dosis menor de CCl<sub>4</sub> (0,4 g/Kg de

peso, preparado 1:1 en aceite de oliva). Actualmente, ya se están procesando las muestras sanguíneas e histológicas de este 2º experimento.



**Figura 4. Determinación de GOT sérica en ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> por 24h.**



**Figura 5. Determinación de GOT sérica en ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> por 48h.**

## 5. Impactos logrados a la fecha.

### Impactos científicos

Logro	Número a la fecha	Detalle (citas, título, descripción)
Publicaciones	2	Manuscritos en preparación
Eventos de divulgación científica	1	<p><b>POSTER :</b>  <b>CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE HAPLOPAPPUS BAYLAHUEN, III REGION, CHILE</b>  <u>Faini F.</u> , Labbé C., Torres R., Vogel H., González B. y San Martín J.</p> <p>XVII Reunión Anual de la Sociedad de Botánica de Chile            Talca, Enero, 2006</p>
Integración a redes de Investigación	1	<p><b>Laboratorios:</b></p> <p><b>Dr. José San Martín.</b> Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología., Universidad de Talca.</p> <p><b>Dr. Fernando Gable.</b> Anatómo Patólogo. Campus Centro-Sur. Facultad de Medicina. Hospital Clínico San Borja-Arriarán.</p>

### Impactos en formación

Logro	Número a la fecha	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Pregrado	2 Unidades de Investigación	<p><b>Pablo Díaz y José Awad.</b> Estudiantes de Química y Farmacia, Universidad de Chile.  <b>“Evaluación de la actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria de <i>Haplopappus multifolius</i> y <i>H. taeda</i>”</b></p> <p><b>Fabián Jaña.</b> Estudiante de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile  <b>“Efecto de extractos de baylahuen en cultivos de líneas celulares”.--</b></p>

Postgrado	1 Unidad de investigación	<b>Víctor Manuel González Lira:</b> Estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. <b>“Efectos antioxidantes de extractos secos de hojas de <i>Haplopappus multifolius</i> y <i>H. taeda</i> medidos por la protección de lípidos y los tioles microsómicos de la oxidación inducida por Cu<sup>2+</sup>/ascorbato”.</b>
Pasantías	2	<b>Alfredo Molina.</b> Estudiante de Química y Farmacia. Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. <b>“Efectos antioxidantes de extractos naturales medidos por la protección de lípidos y los tioles microsómicos”</b>
Cursos de capacitación	-----	-----

## 6. Problemas enfrentados.

Hasta el momento, las diferentes actividades relativas a los objetivos planteados, se han desarrollado con normalidad. Por problemas de alta frecuencia de uso y antigüedad, existe el riesgo de una posible falla en el detector U.V. del equipo de CLAE lo que significaría una seria dificultad puesto que en nuestro Departamento actualmente no disponemos de otro equipo alternativo en sus funciones. Esto retrasaría el diseño de un método de análisis cuantitativo de los extractos.

## 7. Programa próximo período.

En el próximo período, se finalizarán las actividades en desarrollo y se llevarán a cabo aquellas pendientes acorde al programa propuesto inicialmente. Según los resultados que se obtengan finalmente en el objetivo **9**, agregado recientemente, sería de interés repetir el mismo bioensayo de actividad hepatoprotectora con la 2<sup>a</sup> especie en estudio, *H. taeda*, previa solicitud y aprobación del Sr Supervisor del Proyecto.

## Carta Gantt actualizada

2005

2006

Actividad N°	Descripción	Dic	Ene	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
1.1	Recolección, Identificación	X	X	X	X								
1.2	Extracc. de especies vegetales	X	X										
1.3	Fraccion.extractos Identific producto	X	X	X	X	X	X						
2	Ajuste metodolog analítica	X	X	X	X	X	X						
3	Estudio morfológ droga vegetal				X	X	X	X					
4.1	Activ. antioxidant con DPPH				X	X	X	X					
4.2	Cuantificación de polifenoles			X	X	X	X	X					
4.3	Capacidad antilipoperoxidan			X	X	X	X	X					
4.4	Capacidad de protecc de tioles			X	X	X							
4.5	Cultivo células, hepatoprotección		X	X	X	X	X	X					
5.1	Cultivo de células Raw Exp Cox-2	X	X	X	X	X	X	X					
5.2	Activ antiinflamat oral					X	X	X	X	X			
5.3	Activ antiinflamat tópica					X	X	X	X	X			
6.1	Cultivo células citotoxicidad					X	X	X					
6.2	Determinación toxicidad aguda								X	X	X		
7	Actividad antimicrobiana					X	X	X	X	X	X		
8.1	Charlas												X
8.2	Preparación de folletos											X	X
8.3	Presentaciones a Congresos											X	X
9	Determinación de capacidad hepatoprotectora in vivo.		X	X	X	X							

## **8. Otros aspectos de interés.**

En este punto quisiera dejar establecido que hubo una variación en el proyecto en lo que se refiere a la persona del Representante Legal del Agente Asociado, el Rector de la Universidad de Talca. El Rector que firmó por el Agente Asociado, actualmente Ministro de Agricultura, acaba de ser reemplazado por el Sr. Juan Antonio Rock Tarud, el cual aún no asume el cargo. Esta es la razón por la cual no se anexa la Ficha correspondiente.

## **9. Conclusiones y recomendaciones.**

Estimo muy positivo el otorgamiento de apoyo financiero a la realización de este proyecto sin el cual no se podrían lograr los resultados prometidos que seguramente serán un valioso aporte al conocimiento en el área y con importantes repercusiones a nivel científico, técnico y comercial (en salud, agricultura y comercio). Quiero reconocer también la cordial, informada y valiosa ayuda de los profesionales encargados de FIA. A todos ellos, mis sinceros agradecimientos.

Creo sin embargo, que si bien FIA requiere solicitar un informe de avance económico, no me parece conveniente elaborar un detallado informe de avance técnico a los 3 meses de iniciado el proyecto, en un estudio de un año de duración ya que significa desviar gran cantidad de tiempo de dedicación al proyecto por parte de los investigadores implicados. Bastaría con un breve resumen de las actividades realizadas, problemas presentados, variaciones en lo propuesto u otro de importancia o trascendencia.