

INFORME FINAL TECNICO

ESTUDIO:

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



Institución Ejecutante

**Facultad de Ciencias
Universidad de Chile**

Coordinadora


Francesca Faini di Castri

I. ANTECEDENTES GENERALES

• **Código** FIA-ES-C-2005-1-A-007

• **Nombre del Proyecto**

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

• **Región de Ejecución** Región Metropolitana

• **Agente Ejecutor** Facultad de Ciencias,
Universidad de Chile

• **Agente Asociado** Universidad de Talca

• **Coordinador del Proyecto** Francesca Faini di Castri

• **Costo total** (Programado) \$ 27.039.389
(Real)

• **Aporte del FIA** (Programado) \$ 19 990.278; 73.93%
(Real)

• **Período de Ejecución** (Programado) 01.12.2005-31.12.2006
(Real) 01.12.2005–30.03.2007

• **Fecha de presentación** 27.04.2007

II. RESUMEN EJECUTIVO

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, cada uno enriquecido 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.

Mediante el uso de diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas, se determinó la composición química total de ambas extractos, se identificaron los posibles metabolitos marcadores de cada especie y se estableció un método analítico por CLAE (HPLC) para su cuantificación.

Con el estudio macroscópico y microscópico de las hojas tanto frescas como secas, se logró una descripción anatómica de hojas secas fracturadas y de cortes de hojas frescas, útiles para la identificación de la droga vegetal.

El estudio de la actividad antioxidante “in vitro” a través de diversos ensayos: con DPPH por secuestro de radicales libres, inhibición de la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{+3} /ascorbato o Cu^{+2} /ascorbato, concentración de polifenoles, protección de grupos tioles, inhibición de la lipoperoxidación en cultivos de líneas celulares de tiroides (UCHT1) y hepatocitos (RLC), realizado con los extractos totales y algunos compuestos puros componentes de ellos, confirmó los promisorios antecedentes que se tenía al respecto de estas especies.

Se desarrolló un bioensayo “in vivo”, para estudiar la actividad hepatoprotectora de los extractos alcohólicos. Este ensayo, no programado en el proyecto original por su alto costo y dificultad, se realizó sólo con el extracto de

Haplopappus multifolius utilizando ratas Sprague Dawley a las cuales se les provocó daño hepático agudo. Se lograron interesantes resultados, los cuales hubo que repetir un par de veces. Se observó un efecto de igual magnitud que el presentado por silimarina, fármaco de origen vegetal, en uso clínico de más de una década.

Se refrendó la actividad antibacteriana descrita para estas plantas de “bailahuén”, usadas por sus propiedades antisépticas. Este efecto, sin ser espectacular es suficientemente efectivo contra bacterias Gram+ como son *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus cereus*, identificándose los metabolitos responsables de cada especie.

Respecto a la actividad antiinflamatoria, los resultados obtenidos fueron muy positivos para ambos extractos tanto en ensayos “*in vitro*” basados en la inhibición de la expresión de la COX, como “*in vivo*” por vía tópica en ratones.

Los índices de toxicidad oral, aguda (DL₅₀) determinados para para ambos extractos, indicaron inocuidad de ellos administrados a concentraciones bastante elevadas. Sin embargo, los ensayos realizados en líneas celulares de tiroides y hepatocitos, mostraron un cierto nivel de citotoxicidad manejable y comparable a silimarina usada como fármaco de referencia.

Como conclusión, con los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos realizados, se puede afirmar con propiedad, que los usos terapéuticos descritos en medicina folclórica para estas especies, tienen respaldo científico. Por otra parte, el conocimiento alcanzado para el “bailahuén”, lo convierte en una droga con mucho potencial terapéutico lo cual haría conveniente el patentamiento de sus usos.

Cabe destacar que parte del trabajo experimental realizado en distintos laboratorios de los investigadores participantes del proyecto, fue tema de Unidades de Investigación de estudiantes de pre y post-grado así como de Tesis de título, lo cual conlleva un aporte en formación de estudiantes.

III. INFORME TECNICO

1. Objetivos del Proyecto.

A la luz de los resultados e impactos obtenidos con el desarrollo del proyecto, se puede afirmar con propiedad que los objetivos originales tanto generales como específicos de la propuesta, se cumplieron a cabalidad y con creces. Esto es, la información científica existente acerca del “bailahuén” (plantas medicinales nativas del género *Haplopappus*) se aclaró, completó y acrecentó, identificando dos especies promisorias para uso terapéutico a fin de promover su explotación ambientalmente sustentable. Los resultados obtenidos fueron parcialmente difundidos en Congresos y Reuniones científicas tanto nacionales como internacionales, evitando una mayor divulgación por escrito (folletos) con miras al posible patentamiento de los extractos estudiados. Los objetivos específicos, se cumplieron en un 100% en todos los casos. Solamente algunos de ellos, fueron sujeto de modificaciones no previstas originalmente y que se detallarán a continuación.

Parte del trabajo experimental para el **Objetivo 2** que se realizaba en el laboratorio de la Prof. Sylvia Copaja, se perdió totalmente junto con los resultados que se tenían al momento, a raíz del incendio declarado en dependencias de la Facultad en agosto del año 2006. Con la postergación del Informe Final autorizada, estos experimentos se repitieron entre enero y marzo del 2007 lográndose alcanzar el objetivo planteado inicialmente. Por otra parte, dado el interés del FIA y de la Universidad por patentar los resultados obtenidos en el proyecto, previa anuencia de los supervisores, se acordó dar por cumplido parte del **Objetivo 8** (3 charlas y folletos de divulgación) luego de las presentaciones de resultados parciales en 3 Reuniones Internacionales realizadas en Chile (Los Angeles y Pucón) y en ciudad de México.

El **Objetivo 7** (Evaluación de la actividad antibacteriana) que inicialmente se iba a realizar solicitando los servicios del ISP, se cumplió mediante la realización de una Tesis de grado en el Laboratorio del Dr. Carlos Padilla de la Facultad de Ciencias de Salud de la Universidad de Talca.

En el mes de enero del año 2006, en el Laboratorio de la Dra. M. Eugenia Letelier, integrante del equipo técnico del Proyecto, se tuvieron las condiciones técnicas necesarias para realizar un bioensayo de hepatoprotección *in vivo*. A pesar de que este ensayo no había sido propuesto inicialmente por su costo y falta de infraestructura, luego de solicitar la autorización correspondiente al Supervisor Sr.

Mauricio Cañoles, se decidió realizarlo con el extracto seco de *Haplopappus multifolius*, la especie más consumida en la zona Metropolitana y de mayor venta en el comercio establecido en forma de bolsitas para infusiones. Este bioensayo, descrito como **Objetivo 9**, se repitió a lo largo del año lográndose interesantes resultados.

Las modificaciones arriba descritas, están presentadas en la carta Gantt comparativa.

2. Metodología del Proyecto.

Dada la naturaleza del Estudio realizado, mediante el cual se pretendía recabar información en áreas muy diversas, el problema a resolver en cada una de ellas se trató en forma independiente (metodología, investigadores participantes, financiamiento, etc.) como unidades aparte correspondientes a cada uno de los objetivos específicos planteados. Así, para mayor claridad del informe, éste se presentará siguiendo los objetivos específicos. Para cada uno de ellos, se entregarán las actividades realizadas, con sus metodologías y resultados.

3. Actividades Programadas y Ejecutadas.

Carta Gantt comparativa

Actividad N°	Descripción	Período Actividades programadas	Período Actividades ejecutadas
1.1	Recolección de especies vegetales, Identificación, secado.	01/12/05-30/04/06	01/12/05-30/04/06
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, aislamiento e identificación de compuestos puros.	01/12/05-30/06/06	01/01/06-30/06/06
2	Ajuste de Metodologías analíticas cuali y	01/12/05-	01/12/05-

	cuantitativas.	30/06/06	30/03/07
3	Estudio micro y macroscópico de las drogas secas y pulverizadas.	01/04/06 31/07/06	01/04/06 31/07/06
4.1	Determinación de activ. antioxidante mediante secuestro de radicales DPPH	01/04/06 31/07/06	01/04/06 31/07/06
4.2	Cuantificación de polifenoles totales	01/05/06 31/07/06	01/03/06- 31/07/06
4.3	Determinación de la capacidad antilipoperoxidante.	01/06/06 31/08/06	01/03/06- 31/08/06
4.4	Capacidad de protección de tioles proteicos	01/09/06 31/10/06	01/03/06- 31/10/06
4.5	Cultivo de células RLC, UCHT1. Control ensayos de protección.	01/01/06 30/06/06	01/01/06- 30/06/06
5.1	Cultivo de células RAW, inducción y detección de COX-2 .	01/12/05 31/07/06	01/12/05- 31/07/06
5.2	Actividad antiinflamatoria oral.	01/05/06 31/09/06	01/05/06 31/10/06
5.3	Actividad antiinflamatoria tópica	01/05/06 31/09/06	01/05/06 31/09/06
6.1	Cultivo de células RLC, UCHT1. Ensayos de toxicidad celular.	01/04/06 31/07/06	01/04/06 31/07/06
6.2	Determinación de toxicidad aguda en ratas (DL50).	01/08/06 01/10/06	01/08/06 01/10/06
7	Bioensayos de actividad antibacteriana de extractos y compuestos puros.	01/05/06 31/10/06	01/05/06 31/12/06
8.1	3 Charlas (Santiago, La Serena y Talca).	01/12/06 31/12/06	No realizadas
8.2	Edición de Folletos de divulgación.	01/11/06 31/12/06	No realizados
8.3	Presentaciones a Reuniones Internacionales.	Noviembre- Diciembre	Nov 2006 -Chile :Pucón, Los Angeles, -México
9	Actividad hepatoprotectora in vivo	No propuesta originalmente	01/01/06- 30/11/06

4. Actividades, Metodologías y Resultados analizados por cada Objetivo específico.

Objetivo específico N°1: Alcanzar el máximo conocimiento posible de la composición química de 2 especies de *Haplopappus* de alto consumo en la población como son: *Haplopappus multifolius* y *H. taeda*

Actividad 1.1: Recolección de especies vegetales, identificación, secado.

Metodología.

En diciembre del 2005 (día 22), se recolectaron 12 kg de planta fresca (parte aérea, brotes nuevos sin flores) de *Haplopappus multifolius* en la precordillera de la RM, en el 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**).

El día 29 del mismo mes, con la participación del Dr. José San Martín, se recolectaron 13 Kg de *Haplopappus taeda* (planta fresca con botones florales en formación), en el camino a la mina de cemento Bío-Bío a 20 Km pasados Los Queñes (Curicó, VI R).

El material vegetal seleccionado y sometido a 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, el 21 de enero del 2006, se recolectaron aproximadamente 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.

Actividad 1.2: Extracción de material vegetal, preparación de extractos acuosos y alcohólicos, liofilización de infusiones.

Metodología.

Se obtuvieron 2 tipos de **extractos** para cada especie: acuoso **(a)** y alcohólico **(b)**.

(a) Por cada especie, se prepararon 500 mL de Infusión al 5% (Agua a ebullición, 15 minutos, filtración) 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% (18 hrs., temperatura ambiente, agitación ocasional). Por filtración, concentración de los macerados y secado al vacío, 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 consideró 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 ésteres aromáticos de éstos (**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.

Actividad 1.3: Fraccionamiento de los extractos, aislamiento e Identificación de compuestos puros.

Metodología.

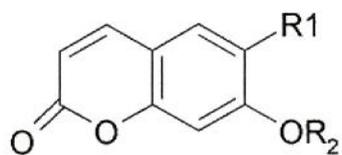
Cada uno de los extractos etanólicos secos (10 g), fueron sometidos a sucesivos fraccionamientos por métodos cromatográficos habituales en fitoquímica, a fin de aislar los compuestos mayoritarios característicos de la especie o biológicamente activos presentes en los extractos para ser usados como posibles marcadores de la droga vegetal o bien identificarlos si éstos no hubiesen sido descritos previamente.

Todos los compuestos aislados fueron identificados por análisis espectroscópico realizado en la Facultad de Química de la PUC, en la Universidade da Beira Interior, Portugal y por cocromatografía con compuestos patrones.

Resultados Actividades 1.1, 1.2 y 1.3.

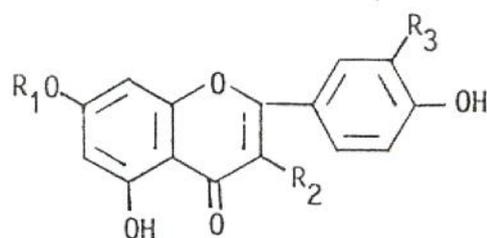
Haplopappus multifolius

- 173,1 g de extracto etanólico seco (**Ham-6-E**)
- 5 g de liofilizado (**Ham-6-E**)
- 20 g de subextracto concentrado en cumarinas (**Ham-6-E-C**)
- 9,7 g de subextracto que contiene flavonoides (**Ham-6-E-F**)
- **Metabolitos aislados:** del extracto etanólico seco de *Haplopappus multifolius*, se aislaron los 5 compuestos mayoritarios, 3 cumarinas: **esculetina (1)**, **preniletina (2)** y **geranil-cumarina (3)**, 2 flavonoles conocidos: **quercetina (4)** e **isoramnetina (5)** y las cumarinas minoritarias ya descritas en la especie¹.



R₁

R₂



(1) OH H

(2) OH

OH

(3) OH

R₁ R₂ R₃

(4) H OH OH

(5) H OH OCH₃

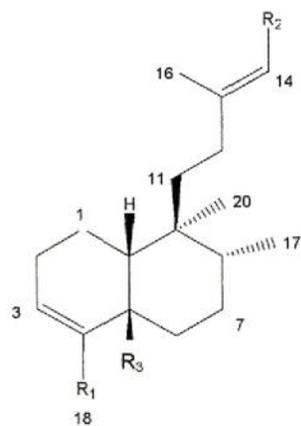
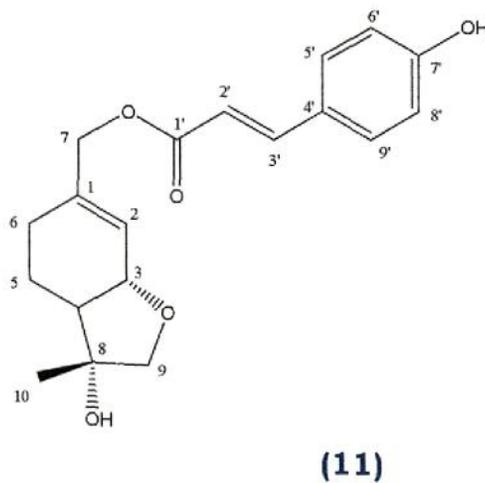
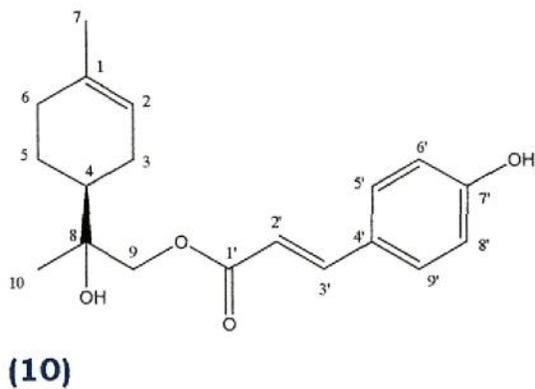
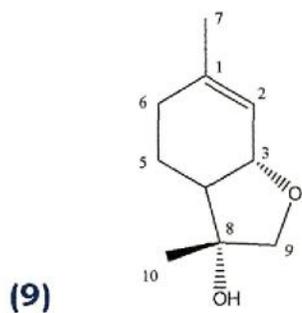
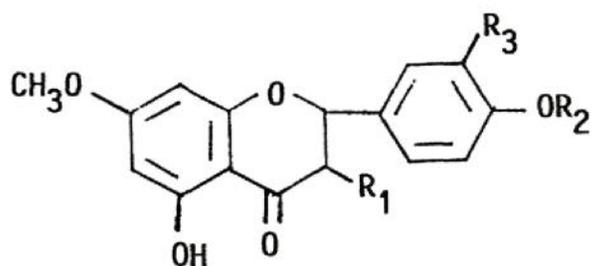
Haplopappus taeda

- 320,0 g de extracto etanólico seco (**Hat-6-E**)
- 5 g de liofilizado (**Ham-6-E**)
- 9,1 g de subextracto concentrado en terpenoides (**Hat-6-E-T**)
- 9,0 g de subextracto que contiene flavonoides (**Hat-6-E-F**)
- **Metabolitos aislados.** Del extracto etanólico seco de *H. taeda*, se aislaron flavonoides y terpenoides.

Flavonoides: los dihidroflavonoides : Tae-5 = **sakuranetina (6)**, Tae-7 = **7-metilaromadendrina (7)**, Tae-30 = **7-metileriodictiol (8)** y otros 10 flavonoides ya descritos en la especie².

Terpenoides: el monoterpeno **taedol (9)**, los ésteres: **p-cumaroiloxi- α -terpineol (10)**, **p-cumaroiloxitaedol (11)**, y 4 diterpenos de tipo **clerodano (12)**, **(13)**, **(14)** y **(15)**. La estructura de los ésteres es nueva por lo cual fueron objeto de una publicación enviada a la revista *Fitoterapia*³, actualmente en revisión.

	R ₁	R ₂	R ₃
(6)	H	OH	H
(7)	OH	H	H
(8)	H	OH	OH



(12)

(13)

(14)

(15)

R ₁	R ₂	R ₃
CH ₃	COOH	CH ₂ OH
CH ₂ OCOCH ₃	COOH	CH ₃
CH ₂ OH	COOH	CH ₃
CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃

Objetivo específico N°2: Establecer metodologías analíticas cuali y cuantitativas para identificar y cuantificar los principios activos y/o marcadores en la droga seca, en infusos acuosos y en extractos etanólicos.

Actividad: Ajuste de Metodologías analíticas cuali y cuantitativas, para identificar y cuantificar los compuestos bioactivos o marcadores presentes en infusiones y extractos etanólicos secos.

Metodología.

Metodologías analíticas cualitativas: Cromatografía en capa fina (CCF) y RMN-¹H.

CCF: Se probaron diferentes sistemas cromatográficos variando ya sea el soporte o el sistema de disolventes tanto con los extractos alcohólicos y acuoso como con los compuestos puros (patrones o marcadores) a modo de encontrar un sistema que resolviera bien los distintos componentes en los extractos y a la vez, fuera un método simple, rápido, reproducible y económico en su aplicación. Se ensayó principalmente con cromatoplasmas de gel de sílice y sistemas de disolventes de polaridad intermedia (diclorometano:acetato de etilo; diclorometano:metanol; etc., en diferentes relaciones de concentración)

RMN-¹H: Los extractos alcohólicos se sometieron a análisis de RMN-¹H ya sea disueltos en CDCl₃ como en DMSO-D₆. Los espectros fueron realizados en un equipo Bruker Avance de 400 MHz, usando TMS como Standard interno. Estos espectros se realizaron con el fin de tener un perfil espectroscópico del extracto total que permitan identificarlo y visualizar en él, algunas señales características de los compuestos activos o marcadores presentes.

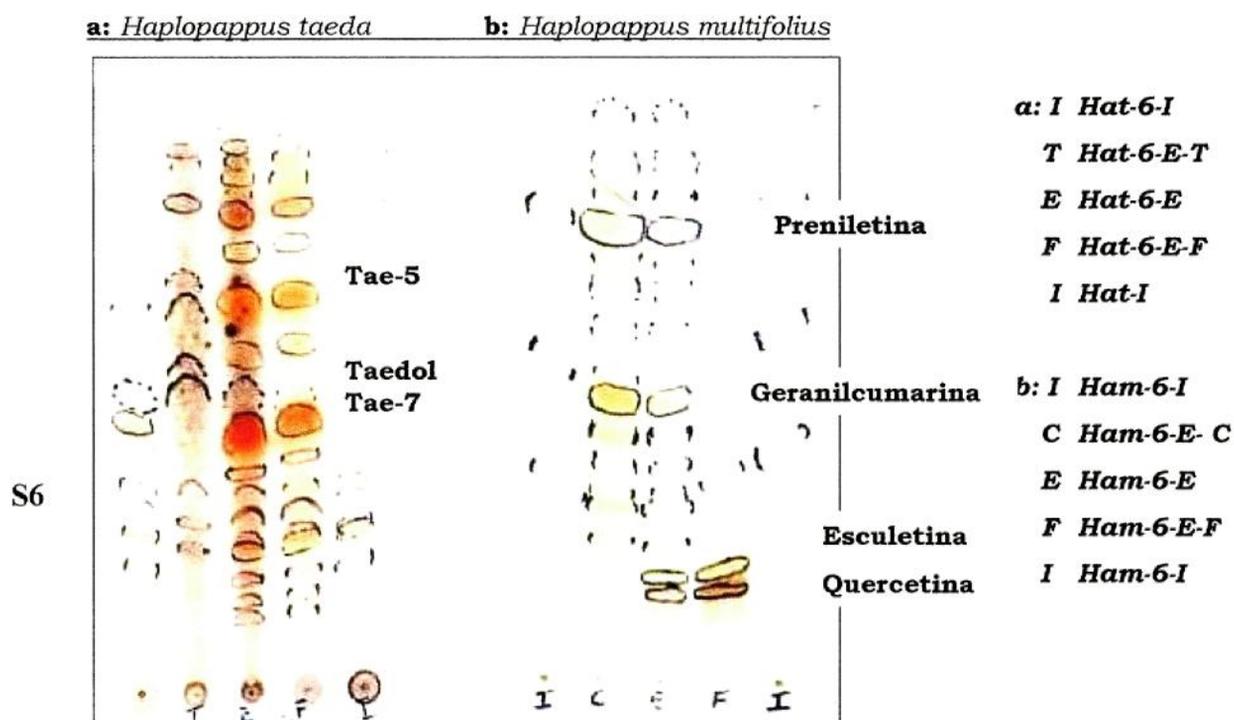
Metodología analítica cuantitativa: CLAE (Cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC).

Los extractos alcohólicos secos y patrones de ambas especies, disueltos en acetonitrilo, fueron cromatografiados en equipos de cromatografía líquida de diferentes modelos variando las condiciones experimentales (tipo de columna, fase móvil, modalidad de elusión, detector utilizado, etc.) a fin de ajustar éstas a aquella necesaria para la identificación y cuantificación de los marcadores y/o compuestos activos en los extractos. Se determinaron límites de detección, rango lineal y se realizaron curvas de calibración absolutas. Los compuestos de interés presentes en los extractos, se identificaron por comparación de sus tiempos de retención con el de los patrones y espectros de absorción en el U.V.

Resultados.

CCF. Las diversas pruebas realizadas permitieron definir un sistema cromatográfico que puede diferenciar los extractos de las dos especies así como caracterizar cada uno de ellos visualizando la presencia de metabolitos considerados marcadores. Este sistema está constituido por una placa cromatográfica de sílicagel PF 254, Merck (en soporte vidrio o aluminio), eluida con el sistema de disolventes Diclorometano/ Metanol (95:5 o 98:2) (**Fig. 1**). En ésta, se pueden aplicar tanto los extractos alcohólicos como los liofilizados.

Fig.1: Cromatograma de extractos y subextractos de *Haplopappus taeda* y *H. multifolius*. Silicagel, DCM:MeOH: **a** (98:2) y **b** (95:5).



En los cromatogramas que se muestran, se advierte claramente la diferente composición química de las dos especies botánicas. En la placa **a**, se observa que *Haplopappus taeda* acumula flavonoides (manchas de coloración amarillo-naranja-rojizas) presentes en el extracto total y en la fracción de flavonoides (Carriles **E** y **F**) y terpenos, visibles como manchas alargadas de color pardo oscuro (Carriles **E** y **T**).

También es posible visualizar algunas manchas por su color o concentración, que corresponden a compuestos algunos mayoritarios en el extracto, otros

característicos de la especie y que sin ser muy activos, podrían actuar como marcadores por su facilidad de identificación y cuantificación. Así, Tae-7 (**7-metilaromadendrina**) y S6 (**p-cumarato de aterpineol**), son compuestos de actividad antioxidante intermedia pero importantes en concentración y fáciles de identificar. **Taedol**, es un monoterpeneo característico de *H.taeda*, de fácil visualización en CCF, bastante concentrado en los extractos alcohólicos y que también pasa a las soluciones acuosas de los infusos. Tae-5 (**sakuranetina**), es un compuesto fácil de identificar por CCF y CLAE y que se debe cuantificar por su inconveniente actividad **prooxidante**.

Haplopappus multifolius por su parte (placa **b**), se caracteriza por acumular cumarinas (Carriles **E** y **C**) y en menor grado flavonoides del tipo flavonoles (**quercetina** e **isoramnetina**, manchas amarillo-anaranjadas). Las cumarinas que doblan en concentración a los flavonoides, en CCF, dan manchas fácilmente visibles bajo una lámpara U.V. de 360 nm por su destacada fluorescencia sin embargo no dan coloraciones intensas con reactivos cromogénicos. Están marcadas con lápiz de grafito y reveladas con R. De Liebermann, se ven de color amarillo pálido. Como marcadores para esta especie, hemos elegido las cumarinas **preniletina** y **esculetina** y el flavonol **quercetina**, todos por su abundancia en el extracto, facilidad de detección e importante actividad biológica.

RMN-¹H. Analizando los dos espectros de RMN-¹H (usando CDCl₃ y DMSO-D₆ como disolventes) realizados para los extractos totales de las dos especies, resultaron mas informativos aquellos realizados en CDCl₃, en los cuales es posible visualizar señales propias de los compuestos a utilizar como marcadores en cada extracto. Los espectros realizados en DMSO-D₆ tienen muchas señales no utiles por el mayor poder de disolución del disolvente lo cual complica el espectro con señales de compuestos no interesantes.

En la **Fig. 2**, en el espectro del extracto etanólico seco de *Haplopappus multifolius*, se observan claramente las señales de la **preniletina** (δ ppm 1,77; 1,80; 4,63; 4,65; 6,26; 6,28; 6,81; 6,95; 7,58; 7,60, marcadas de otro color) cumarina característica y la mas abundante del extracto, elegida como un marcador de la especie. En el caso del extracto etanólico de *H. taeda* (**Fig. 3**), dada la gran variedad de compuestos y la inexistencia de alguno que sobresalga en concentración, se debe recurrir a señales características de metabolitos propios de la especie. En este caso podrían ser las señales de los grupos metilo del **taedol** (δ 1,43 ppm) y del **p-cumarato de aterpineol** (δ 1,19 y 1,63 ppm).

Fig. 2. Espectro de RMN-¹H de **Ham-6-E** (400 MHz, CDCl₃, TMS)

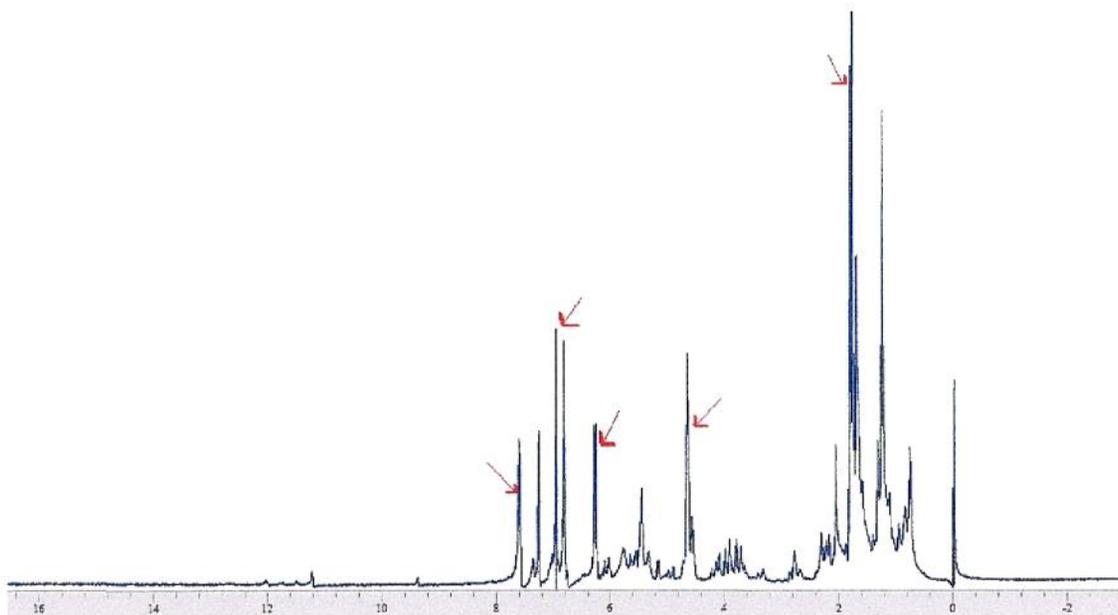
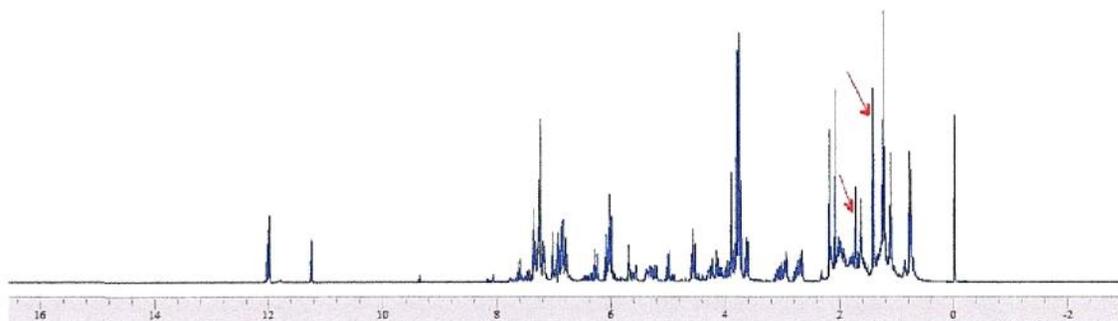


Fig. 3. Espectro de RMN-¹H de **Hat-6-E** (400 MHz, CDCl₃, TMS)



CLAE. En un equipo de cromatografía líquida marca Waters (bomba binaria modelo 1525 con detector de arreglo de diodos modelo 2996), utilizando una columna Ync Park Pro C₁₈, con fase móvil acetonitrilo/agua (H₃PO₄ 16mM) 50% p/p y con detector U.V.(longitud de onda 280 nm), se logró separar adecuadamente los componentes de los extractos que interesaba identificar y cuantificar. Con las curvas de calibración obtenidas con los patrones aislados de las dos especies y considerados posibles marcadores, se logró identificar los picos correspondientes a ellos por coincidencia del tiempo de retención (T_R) en esas condiciones experimentales. Con la información obtenida, se pudo cuantificar cada uno de los metabolitos marcadores en cada uno de los extractos. Ejemplo: Ver la concentración de **preniletina** en los extractos **Ham-6-E** (T_R 7,285 min \pm 0,005; 3,475 %), **Ham-6-E-C** (T_R 7,222 min \pm 0,005; 4,078 %) y **Ham-6-E-F** (T_R 7,317 min \pm 0,005; 0,113 %) (**Fig.4**), valores que concuerdan con lo observado cualitativamente en CCF.

Fig.4. Cromatogramas de *Ham-6-E*, en CLAE.

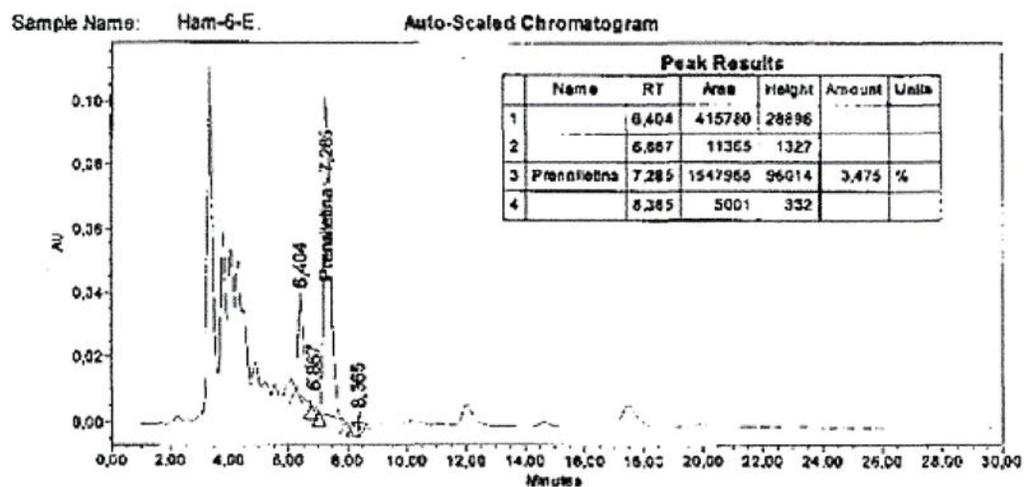


Fig.5. Cromatogramas de *Ham-6-E-C* en CLAE.

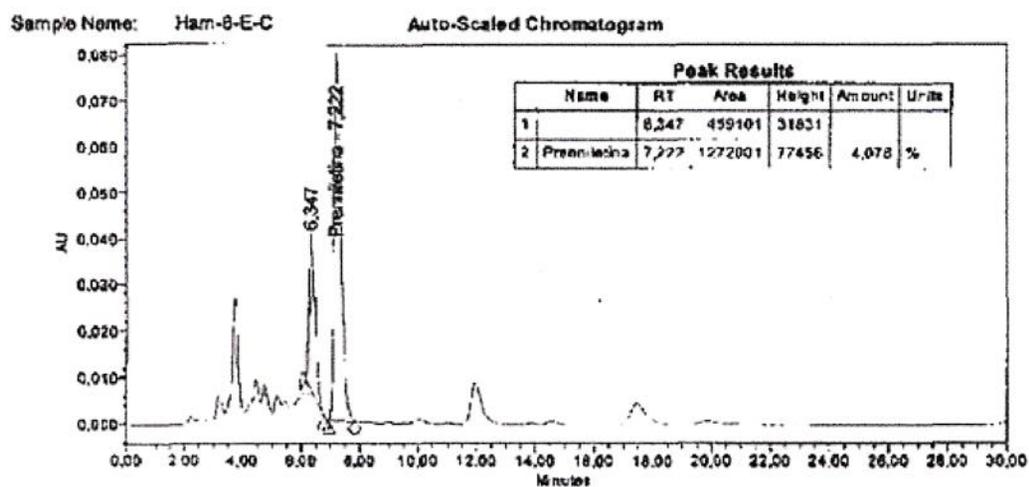
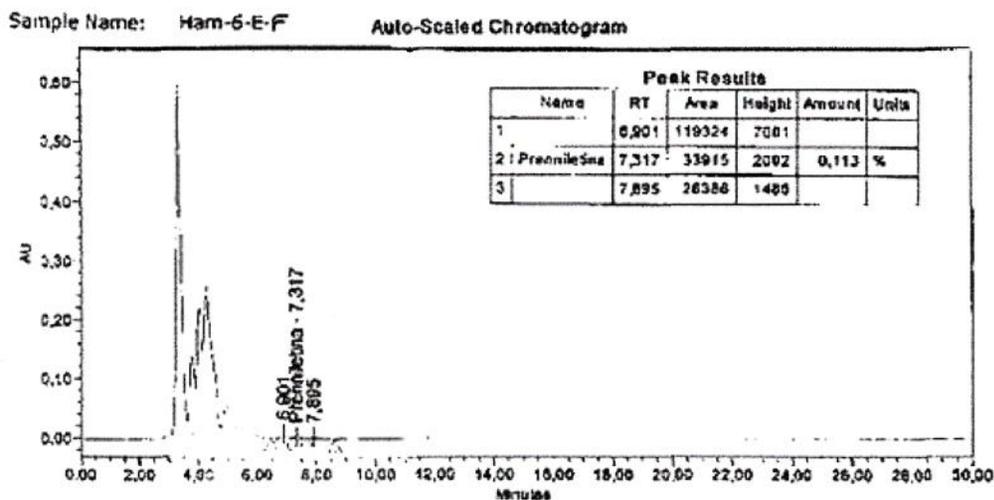


Fig.6. Cromatogramas de *Ham-6-E-F* en CLAE.



Objetivo específico N°3: Definir la droga vegetal para cada especie a estudiar. Lograr una descripción macro y microscópica de las drogas vegetales secas, pulverizadas y de sus propiedades organolépticas.

Actividad: Estudio micro y macroscópico de las drogas secas y pulverizadas.

Metodología.

Estudio macroscópico. En el libro *Plantas Medicinales Chilenas*⁴, el botánico Dr. San Martín, integrante del equipo técnico, describe morfológicamente las hojas de las dos especies en estudio. Personalmente, se pudo constatar que cuando éstas están frescas y aun secas, se presentan recubiertas por una abundante resina de color amarillo, de alto poder adhesivo, insoluble en agua fría y con un aroma muy característico, intenso y penetrante.

Estudio microscópico. Se realizaron cortes a mano alzada y en un micrótopo (espesor de los cortes 5 micrones) de las hojas frescas de ambas especies de *Haplopappus* los que fueron teñidos con rojo neutro. Para obtener la epidermis, se llevó a cabo un diafanizado de las hojas. Los cortes se observaron bajo un microscopio Leitz y fotografiaron con cámara CYBERSHOT.

Resultados:

- **Descripción anatómica de cortes transversales de hojas frescas de *Haplopappus multifolius* (Fig.1-4)**

En los cortes transversales de las hojas se pueden observar las células epidérmicas constituidas por una capa de células (epidermis monoestratificada) con una membrana cuticular gruesa y con los estomas situados a nivel de la superficie epidérmica. En la epidermis se observan además unos apéndices más complejos llamados colectores, éstos producen una secreción pegajosa. Los colectores son pelos glandulares pluricelulares con un pie corto. No presenta pelos tectores .

A continuación, debajo de la epidermis, se observan costillas de células parenquimáticas de paredes gruesas aparentemente isodiamétricas que se extienden desde el haz y hasta el envés. Además en el mesófilo se ve un abundante parénquima esponjoso constituido por células pequeñas y con amplios espacios intercelulares. Se ven escasos canales secretores en el mesófilo. Los haces conductores son algo pequeños y presentan a ambos lados un bajo porcentaje de fibras lignificadas

- **Descripción anatómica de cortes transversales de hojas frescas de *Haplopappus taeda* (Fig 5-8).**

En los cortes transversales de las hojas se pueden observar las células epidérmicas constituidas por una capa de células (epidermis monoestratificada) con una muy gruesa membrana cuticular y con los estomas ubicados a nivel de la superficie epidérmica. La epidermis presenta pliegues conspicuos y colectores que producen una secreción pegajosa. Se observan escasos pelos tectores simples pluricelulares.

A continuación, debajo de la epidermis, se presentan costillas de células parenquimáticas de paredes gruesas. En el mesófilo, se observa parénquima esponjoso de células pequeñas y debajo de la epidermis, numerosos canales secretores. En la misma zona, en los sectores de la hoja en que se presentan los haces conductores se aprecia abundante colénquima laminar. Respecto a los haces conductores, éstos son de mayor tamaño y tienen un mayor porcentaje de fibras lignificadas a ambos lados en comparación con los de *H. multifolius*. Se puede ver también, vasos escaleriformes

- **Estudio anatómico de las hojas secas fracturadas de *Haplopappus multifolius***

Se observan: fragmentos de tejido epidérmico, con estomas, colectores fragmentados, abundantes trozos de parénquima esponjoso con cloroplastos. Elementos conductores del xilema y fibras. Escaso colénquima laminar y canales secretores.

- **Estudio anatómico de las hojas secas fracturadas de *Haplopappus taeda***

Se observan: trozos de epidermis con bordes ondulados (con pliegues) y estomas, colectores fragmentados, abundantes trozos de parénquima esponjoso con cloroplastos. Elementos conductores del xilema además de elementos del tejido mecánico como fibras y abundante colénquima laminar. Escasos fragmentos de pelos tectores simples pluricelulares. Abundantes canales secretores.

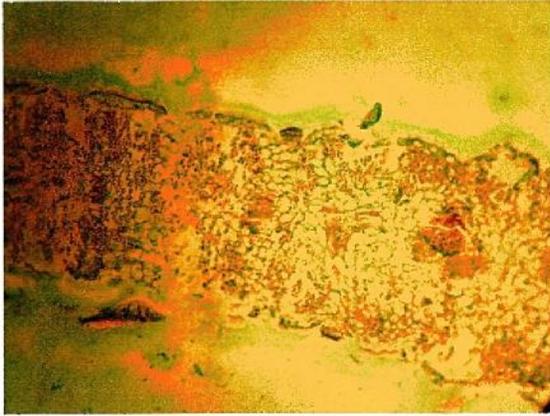


Fig. 1: *H. multifolius*

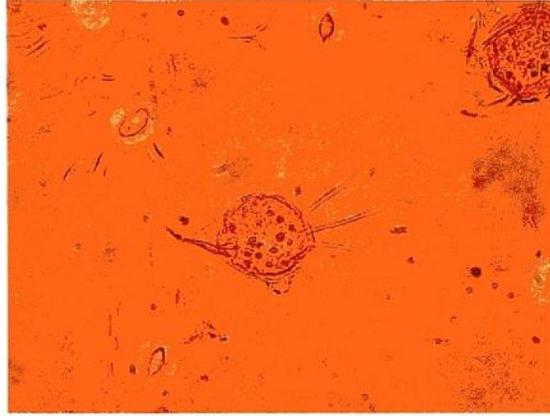


Fig. 2: *H. multifolius*

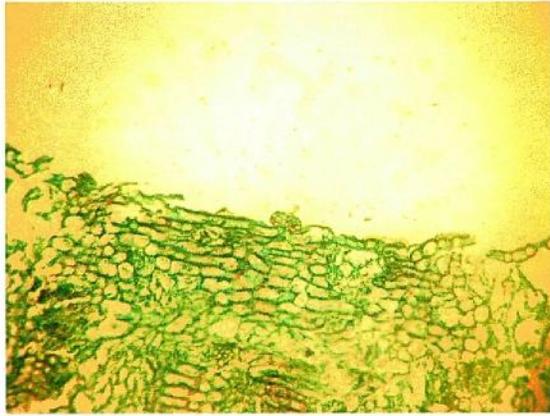


Fig. 3: *H. multifolius*

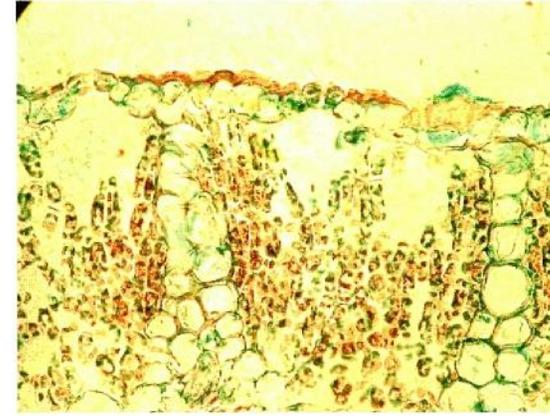


Fig. 4: *H. multifolius*

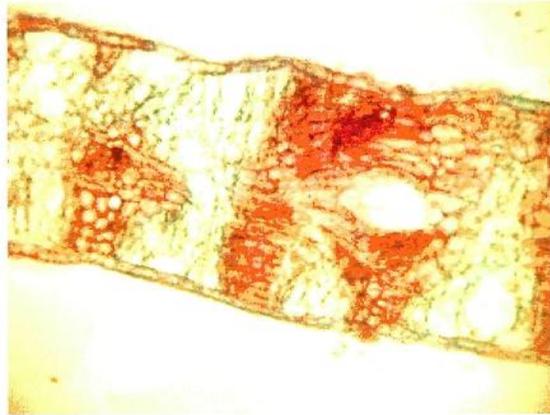


Fig. 5: *H. taeda*

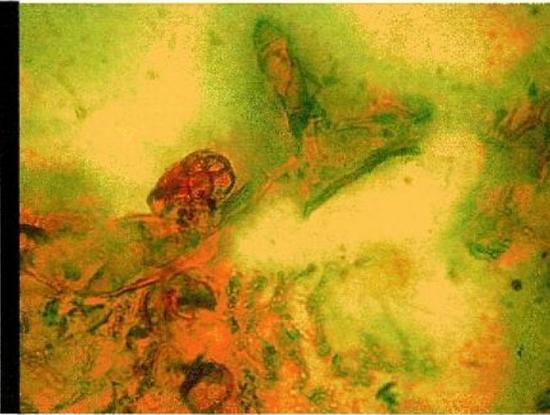


Fig. 6: *H. taeda*

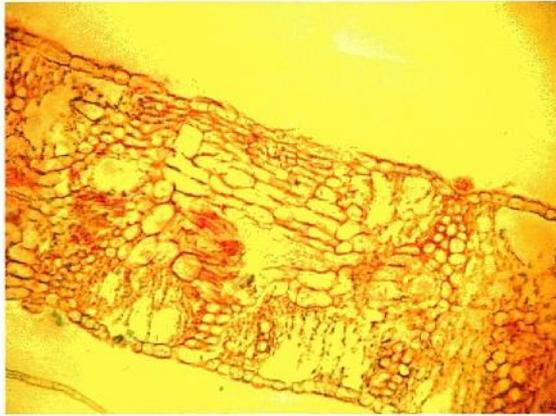


Fig. 7: *H. taeda*



Fig. 8: *H. taeda*

Objetivo específico N°4: Acrecentar el conocimiento de la actividad hepatoprotectora ejercida por las dos especies de *Haplopappus* en estudio, por medición de la actividad antioxidante *in vitro* y en cultivo celular, utilizando la línea celular RLC, derivada de hepatocitos

Actividad 4.1: Determinación de actividad antioxidante *in vitro* mediante secuestro de radicales DPPH.

Metodología.

Para la búsqueda de agentes atrapadores de radicales libres se empleó el bioensayo “*in vitro*” del DPPH⁵, el cual se fundamenta en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) es de color violeta intenso. Al ser capturado su radical libre el compuesto pierde su color característico. Es posible cuantificar la capacidad atrapadora de radicales libres que poseen distintas sustancias, mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH.

Para ello se prepara una solución metanólica fresca del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) de 20 mg/L. Se preparan además soluciones metanólicas de los compuestos a ensayar a concentraciones tales como 100 µg/mL, 50µg/mL, 10µg/mL, 1 µg/mL. Se mezclan y se esperan cinco minutos, transcurrido ese tiempo se lee la Absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm

El cálculo del % de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\%decoloración = 1 - \frac{(A_{compuesto})}{A_{blanco}} \times 100$$

Un valor igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libres y un valor cercano a 0 indica una reducida capacidad. El grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como capturadoras de radicales libres. Como captador de radicales libres de referencia se utilizó catequina. Tanto los extractos como los compuestos aislados se ensayaron a 100, 50, 10 y 1 µg/mL. Los valores son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones.

I.- Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos totales y los respectivos subextractos de dos especies de *Haplopappus*: *H. taeda* y *H. multifolius*, mediante el método de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), de acuerdo al siguiente protocolo:

PROTOCOLO:

	Control	Blanco	Muestra
Extracto	0 uL	375 uL	375 uL
DPPH (20 mg/L)	750 uL	0 uL	750 uL
Metanol	375 uL	750 uL	0 uL
Volumen total	1125 uL	1125 uL	1125 uL

Las soluciones se mezclaron y luego de transcurridos 5 minutos, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis Spectromer Unicam UV3 a 517 nm.

Las muestras se leyeron contra sus blancos respectivos y los controles, contra metanol (como blanco). Previo a las lecturas, se hizo cero en el equipo con las cubetas conteniendo metanol.

REACTIVOS

-Metanol

-Solución DPPH :

* Solución metanólica fresca del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) de 20 mg/L , preparada a partir de una solución madre de 200 mg/L .

Soluciones metanólicas de los extractos y subextractos a ensayar:

Ham-6-E	extracto etanólico seco de <i>H. multifolius</i> .
Ham-6-E-C	subextracto C: fracción rica en cumarinas obtenida del extracto etanólico seco de <i>H. multifolius</i> .
Ham-6-E-F	subextracto F: fracción rica en flavonoides obtenida del extracto etanólico seco de <i>H. multifolius</i> .
Ham-6-I	infuso al 5 % y posteriormente liofilizado.
Hat-6-E	extracto etanólico seco de <i>H. taeda</i> .
Hat-6-E-T	subextracto T: fracción rica en terpenos obtenida del extracto etanólico seco de <i>H. taeda</i> .
Hat-6-E-F	subextracto F: fracción rica en flavonoides obtenida del extracto etanólico seco de <i>H. taeda</i> .
Hat-6-I	infuso al 5% y posteriormente liofilizado.

-Concentración de las soluciones a ensayar: Estas dependieron de las actividades presentadas por las distintas muestras en estudio. En todas ellas se comenzó con una concentración máxima (en el ensayo final) de 200 ug/mL, a partir de la cual se fueron diluyendo hasta alcanzar cero actividad.

II.- Se evaluó la capacidad antioxidante de compuestos aislados desde *Haplopappus taeda* y *H. multifolius*, mediante el método de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), de acuerdo al protocolo ya indicado en la evaluación de extractos y fracciones:

Compuestos a ensayar	Extractos de origen	Especie
Quercetina	Ham-6-E-F	<i>H. multifolius</i>
Catequina		
Geranil-Cumarina	Ham-6-E-C	<i>H. multifolius</i>
Preniletina	Ham-6-E-C	<i>H. multifolius</i>
Tae-5: Sakuranetina	Hat-6-E-F	<i>H. taeda</i>
Tae-7: 7- metilaromadendrina	Hat-6-E-F	<i>H. taeda</i>
Taedol	Hat-6-E-T	<i>H. taeda</i>
Silimarina		
Silibinina		

Los compuestos se ensayaron en soluciones metanólicas a concentraciones que dependieron de la información bibliográfica para silimarina y silibinina (13% de

decoloración a 0.33mM)⁶. Para la evaluación de las cumarinas y del terpeno taedol no se encontraron antecedentes bibliográficos por lo que se ensayaron a concentraciones equivalentes a la CE₅₀ (35,2 µg/mL del extracto rico en cumarinas **Ham-6-E-C** y a la concentración máxima (213 µg/mL) del extracto rico en terpenos **Hat-6-E-T** . Los flavonoides se evaluaron a concentraciones equimolares cercanas a la CE₅₀ de las sustancias de referencia utilizadas (1µg/mL a 20 µg/mL) quercetina y catequina, equivalente a 3,3* 10⁻³ y a 6,6* 10⁻³ mM respectivamente.

Los compuestos que alcanzaron la CE₅₀ se tabularon para compararlos con las sustancias de referencia. Para aquellos cuya actividad atrapadora de radicales libres fue inferior al 50%, los resultados se expresaron como el efecto máximo encontrado en sus respectivas concentraciones mM.

Resultados:

Tabla 1: Concentraciones efectivas 50 de las muestras (extractos y subextractos) con más actividad.

MUESTRAS	<i>Ham-6-E</i>	<i>Hat-6-E-F</i>	<i>Ham-E-F</i>
CE ₅₀	13,2ug/mL	12,5ug/mL	9,5ug/mL

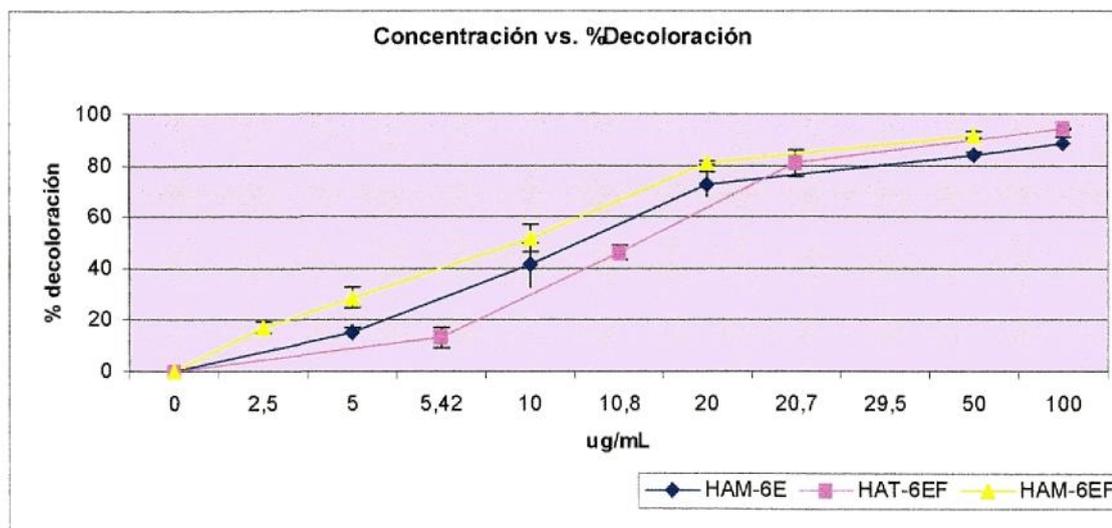


Tabla 2: Concentraciones efectivas 50 de las muestras (extractos y subextractos) con menor actividad.

Muestras	<i>Ham-6-E-C</i>	<i>Hat-6-E</i>	<i>Hat-6-I</i>	<i>Ham-6-I</i>
CE ₅₀	35,2ug/mL	38,6ug/mL	39,7ug/mL	44,1ug/mL

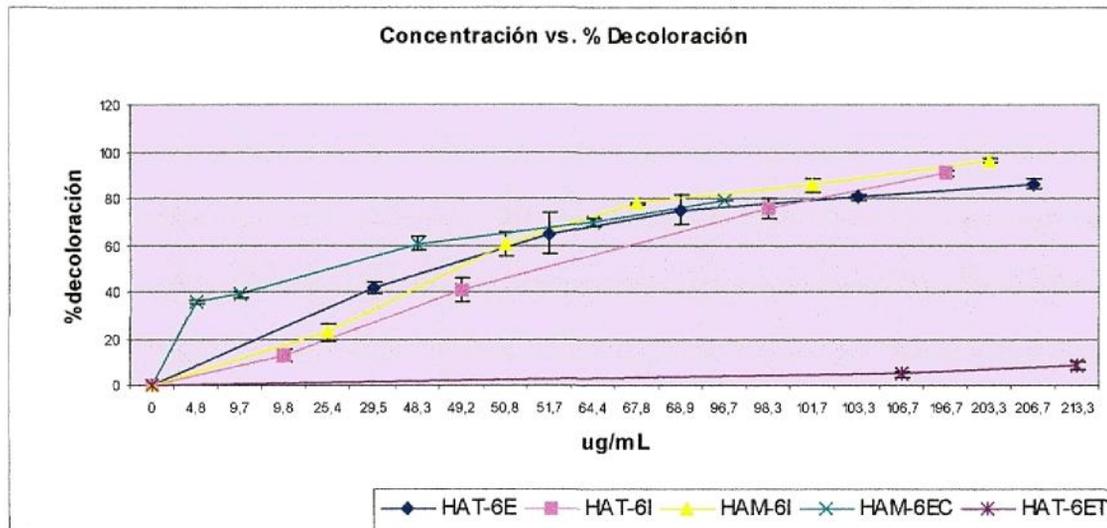
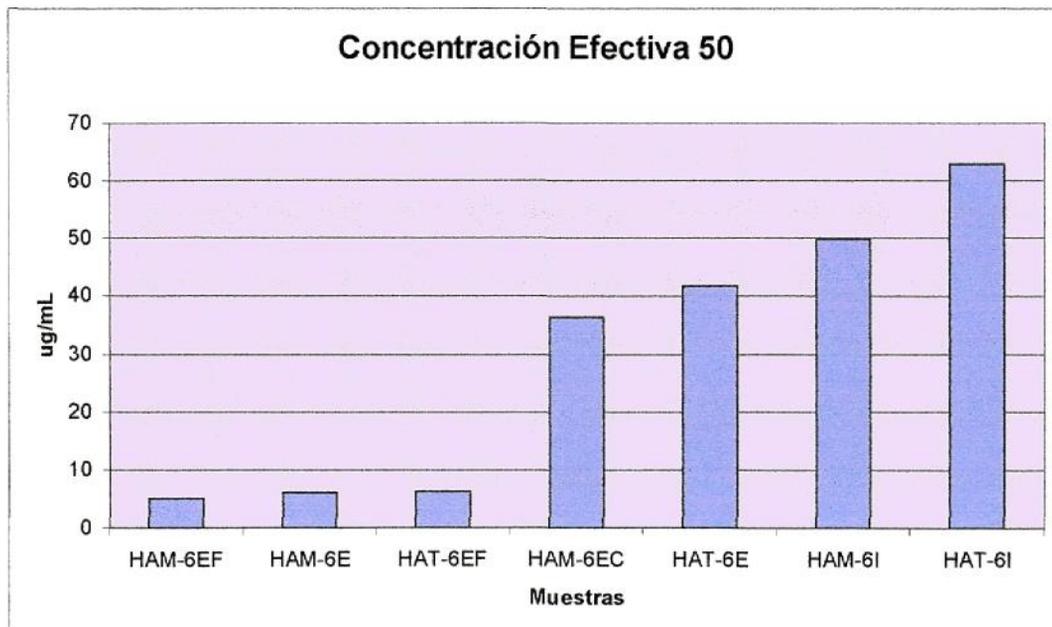


Gráfico comparativo de las diferentes muestras (extractos y subextractos) y sus respectivas CD₅₀



- Comparando los extractos etanólicos totales de ambas especies, *H. multifolius* presenta una actividad mucho mayor.
- Para ambas especies, las fracciones que contienen flavonoides resultaron ser las mas activas del total de muestras. Dado que el contenido de polifenoles respecto al extracto total en *H. multifolius* es menor que en *H. taeda*, la mayor actividad atrapadora de radicales libres, se deberia al diferente tipo estructural de flavonoides presentes en *H. multifolius*.
- La fracción rica en cumarinas obtenida del extracto etanólico de *H. multifolius* es mas activa que el extracto etanólico total de *H. taeda*.
- Los infusos de ambas especies fueron menos reactivos que el resto de las muestras, siendo mas activo el de *H. multifolius* por su mayor concentración de metabolitos activos polares, solubles en agua.

No se incluye en este análisis la fracción rica en terpenos obtenida del extracto etanólico de *H. taeda* por presentar muy baja actividad con respecto a las muestras analizadas.

Tabla 3: CE₅₀ de compuestos puros con mayor actividad

Compuesto	CE ₅₀
Quercetina	3,3 * 10 ⁻³ mM
Catequina	6,5 * 10 ⁻³ mM
Isoramnetina	7,7 * 10 ⁻³ mM
Geranil-Cumarina	4,9 * 10 ⁻² mM
Silimarina	0,7 mM

Fig. 1: Comparación de los CE₅₀ de los compuestos con mayor actividad.



El compuesto más activo es aquel que alcanza una CE_{50} a menor concentración, en este caso, quercetina. Geranil-cumarina, alcanza su CE_{50} a una concentración diez veces mayor a quercetina, catequina e isoramnetina, siendo el menos activo.

No se incluyó en el gráfico el efecto 50 % de la silimarina por ser éste alcanzado a concentraciones muy superiores (cien veces) a la de los flavonoides analizados y además por tratarse de una mezcla de compuestos (flavanolignanos).

Tabla 4: Actividad de cumarinas aisladas y extracto

Compuesto	38% decoloración	CE_{50}
Geranil-Cumarina	1,2 $\mu\text{g/mL}$ ($4 \cdot 10^{-2}$ mM)	16 $\mu\text{g/mL}$ ($4,9 \cdot 10^{-2}$ mM)
Preniletina	40 $\mu\text{g/mL}$ (0.16 mM)	‡
Extracto Ham-6-E-C	36,4 $\mu\text{g/mL}$	35,2 $\mu\text{g/mL}$

‡ = sin actividad

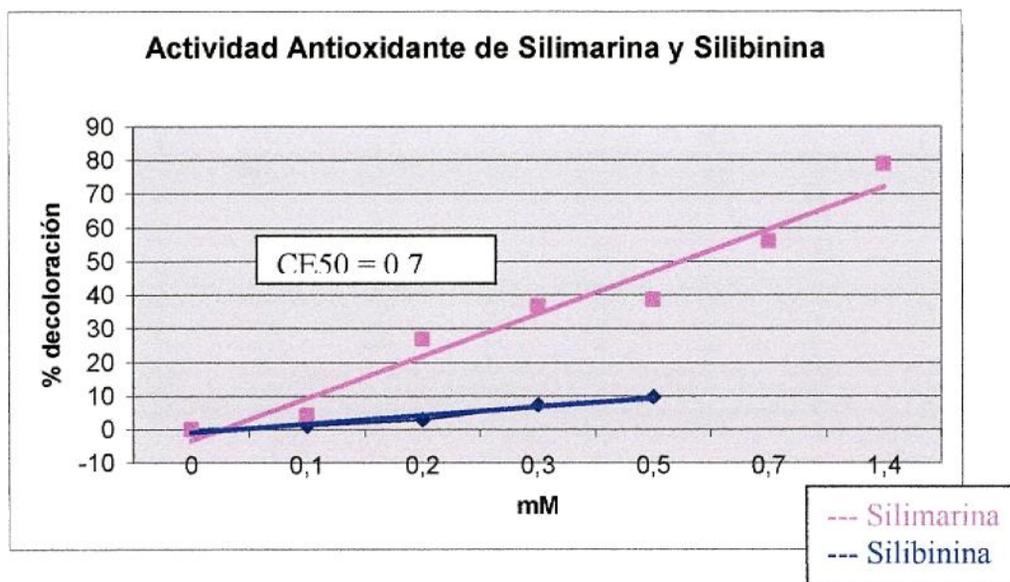
Al comparar los resultados observados solo para las cumarinas, las que se ensayaron a la concentración equimolar de la CE_{50} del extracto de origen **Ham-6-E-C** (35.2 $\mu\text{g/ml}$), preniletina sólo alcanzó un 38% de decoloración a la máxima concentración ensayada por lo que se comparan las CE_{38} como se observa en la Tabla n°4.

En la **Tabla 5**, se observa la comparación de la actividad atrapadora de radicales libres alcanzada a concentraciones equimolares por silimarina, silibinina y el valor encontrado en la literatura⁶. Además se realizó la curva concentración efecto para ambos compuestos.

Tabla 5: Porcentajes de decoloración alcanzado a 0.3 mM

Compuesto	% Decoloración
Silimarina	37
Silibinina	3
Silibinina ⁶	13

Fig. 2: Curva de concentración–actividad atrapadora de radicales libres de Silimarina y Silibinina



La silimarina que corresponde a la mezcla de tres isómeros de los cuales la silibinina es el mayoritario, presentó efecto atrapador de radicales libres, sin embargo al ensayar el isómero silibinina éste presentó un mínimo efecto (9.7%) lo que sugiere que podría existir un efecto sinérgico en la mezcla de silimarina. Cabe destacar sin embargo, que las CE son mucho mayores que las encontradas para los otros flavonoides ensayados en este estudio. Estos resultados no descartan que silimarina ejerza sus propiedades antioxidantes por otros mecanismos⁷

Tabla 6: Compuestos con menor actividad (Terpenos).

Compuesto	Concentración	% Decoloración
Taedol	447 µg/ml (2,7mM)	0,5
Hat-6-E-T	213 µg/ml	8,4

El subextracto **Hat-6-E-T**, que contiene mayoritariamente terpenos de diversa índole, resultó ser casi inactivo como atrapador de radicales libres (8,4%). Taedol, monoterpeno concentrado en esta fracción, al estado puro no mejoró la capacidad atrapadora de radicales libres incluso ensayándose al doble de la concentración del extracto.

Compuesto	Anillo B		Anillo C		Anillo A
	C3'	C4'	C3	C 2-3	C7
Quercetina	OH	OH	OH	insaturado	OH
Isoramnetina	OCH ₃	OH	OH	insaturado	OH
Tae-7	H	OH	OH	saturado	OCH ₃
Tae-5	H	OH	H	saturado	OCH ₃

Tabla 7 Estructura y sustitución de flavonoides presentes en *Haplopappus sp*

Tabla 8: Actividad antioxidante de flavonoides mayoritarios en *Haplopappus multifolius* (**Ham**) y *H. taeda* (**Hat**). Comparación con quercetina a 0.07 mM

Compuesto	% Decoloración
Quercetina (Ham)	100
Isoramnetina (Ham)	95
Tae - 7 (Hat)	20
Tae - 5 (Hat)	4

En la **Tabla 8**, se presenta la comparación de las actividades encontradas para distintos flavonoides aislados de las dos especies de *Haplopappus*, ensayados a concentraciones equimolares. Se observa claramente una relación estructura actividad concordante con la bibliografía⁸ y que se discute a continuación.

Los resultados que se muestran en la **Tabla** son coherentes con el análisis estructural de los compuestos ensayados. Quercetina posee la mayor actividad debido a la presencia de grupos hidroxilos sobre los anillos B, C y A, principalmente por los dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B sumado a la insaturación presente en la posición 2-3 del anillo C.

Isoramnetina presenta un porcentaje de decoloración algo menor al de la quercetina debido a la presencia de un grupo metoxilo en el C-3' del anillo B.

Tae-7 (7-metilaromadendrina) y Tae -5 (sakuranetina), dos dihidroflavonoides, presentan un % de decoloración mucho más bajo que los anteriores, debido a la saturación del anillo C, sustitución de grupos hidroxilo por metoxilos en ambas moléculas, además de la ausencia del grupo hidroxilo en el C-3 del anillo C en Tae-5, lo que lo hace menos activo que Tae-7.

Actividad 4.2: Cuantificación de polifenoles

Metodología.

Cuantificación de polifenoles totales: La cuantificación de los polifenoles presentes en los extractos de *Haplopappus multifolius* se realizó de acuerdo al método espectrofotométrico de Price y colaboradores⁹, el cual utiliza reactivo de Folin y Na₂CO₃. El producto de la reacción posee una Absorbancia máxima a 760 nm. Para cuantificar los polifenoles presentes en los extractos se utilizó como referencia, catequina [(+)-cianidol-3-(2R,3S)-2-(4,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3,5,7-triol-trans-3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona]].

Los extractos analizados fueron los siguientes:

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

Resultados.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1 y Fig. 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 subextracto de *H. multifolius* enriquecido en flavonoides (**Ham-6-E-F**) presentó mayor

Actividades 4.3 y 4.4: Capacidad antilipoperoxidante y de protección de tioles proteicos.

Metodología.

Capacidad de proteger biomoléculas de la acción oxidativa inducida por ROS.

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos se utilizó una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata, organelo subcelular constituido por fosfolípidos y proteínas. Entre las proteínas se encuentran las principales enzimas de biotransformación de xenobióticos que metabolizan los metabolitos naturales. Estas proteínas contienen en su estructura aminoacídica, cisteína, aminoácido fundamental en su actividad biológica. La metodología va dirigida a evaluar la capacidad de los extractos de proteger los lípidos y las proteínas de este organelo de la oxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato, sistema generador de radicales libres del oxígeno.

a. 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".

b. Preparación de microsomas hepáticos de rata. Los microsomas corresponden a una preparación experimental enriquecida en retículo endoplásmico y el citosol corresponde a la fracción sobrenadante del pellet microsómico. El retículo endoplásmico está constituido fundamentalmente de fosfolípidos y proteínas. Entre estas proteínas se encuentra: a) los sistemas enzimáticos que representan las vías mayoritarias de biotransformación de xenobióticos (Sistema oxidativo del citocromo P₄₅₀, UDP-glucuroniltransferasa, GSH-transferasa); b) Las enzimas encargadas de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga saturados y no saturados (>14 átomos de carbono). Asimismo, el citosol corresponde a la preparación subcelular citoplasmática que está enriquecida en los componentes antioxidantes celulares.

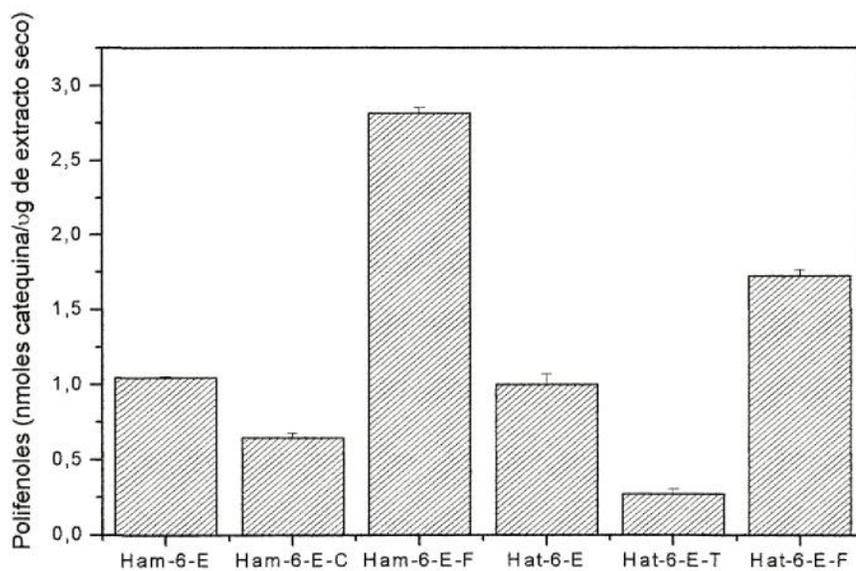
Ambas fracciones subcelulares hepáticas se prepararon de acuerdo a la técnica descrita en Letelier y colaboradores¹⁰. La proteína de las fracciones microsómica y citosólica se determinó por el método espectrofotométrico de Lowry y colaboradores¹¹, utilizando albúmina de bovino, fracción IV como estándar.

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.

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

Fig. 1: Contenido de polifenoles en extractos y subextractos de "bailahuén"



c. Lipoperoxidación microsómica. La lipoperoxidación se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por el método descrito en Letelier y cols¹¹. Para ello se utilizó Cu^{2+} /ascorbato como fuente generadora de ROS. El malondialdehído generado como producto de descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un compuesto conjugado el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm y su coeficiente de extinción es $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se realizaron curvas concentración-respuesta para determinar los IC_{50} , concentración que inhibe el 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. De esta forma se puede comparar la capacidad anti-lipoperoxidante de todas las muestras ensayadas.

La capacidad antilipoperoxidante, se determinó para todos los extractos y subextractos utilizados en 4.2 así como también en compuestos puros mayoritarios de cada especie y algunos compuestos de referencia.

Todos los extractos fueron utilizados en concentración de $9 \mu\text{g}/\text{mg}$ de 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 $4,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína microsómica/mL. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato, en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar. * Valores significativamente diferentes: $p < 0,05$.

d. Determinación de tioles totales. La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y colaboradores¹¹. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El contenido de tioles se expresó en nmoles de tioles/mg de proteína microsómica.

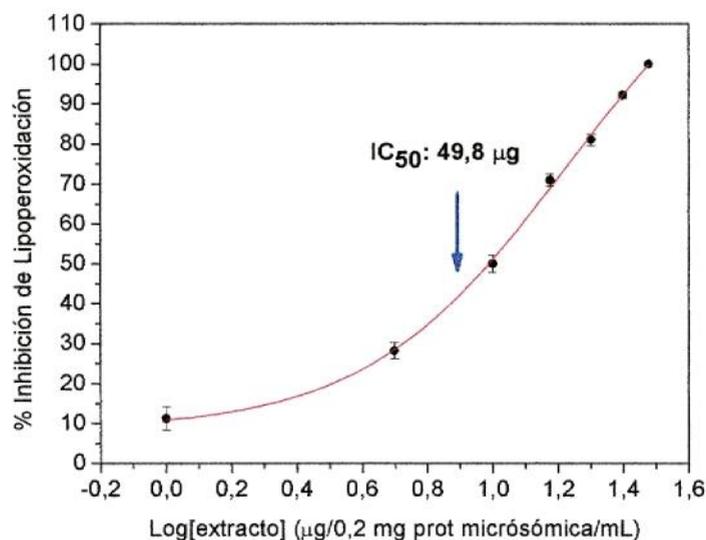
e. Análisis Estadístico. Los resultados están expresados como el promedio de los valores obtenidos en al menos 4 experimentos independientes \pm las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación con sus promedios. Para realizar el análisis de las muestras y el de las diferencias entre los grupos controles y las muestras, se exigió en cada caso un 95% de certeza ($p < 0,05$).

Resultados.

A. Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato

Fig. 2: Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato.

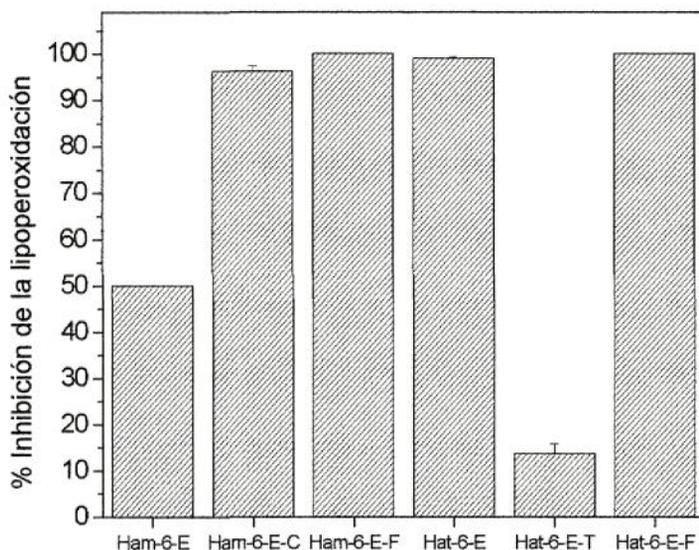
Efecto del extracto etanólico total de *Haplopappus multifolius*.



Los microsomas fueron previamente incubados con el extracto durante 10 min a 37°C, antes de inducir la lipoperoxidación con Fe^{3+} /ascorbato. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato, en ausencia del extracto. El valor IC_{50} (indicado por la flecha) representa la concentración de extracto que inhibe el 50% de la lipoperoxidación microsómica y fue calculado considerando como 100% el valor obtenido en ausencia de extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

La **Fig. 2**, muestra el gráfico semilogarítmico del efecto concentración-respuesta del extracto **Ham-6-E** sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato. La inhibición de la lipoperoxidación microsómica presentó un comportamiento concentración respuesta. A partir de este gráfico se calculó el valor de IC_{50} que correspondió a 49,8 µg de extracto etanólico seco/mg proteína microsómica. Este valor se tomó como referencia para comparar el efecto antilipoperoxidante de los extractos **Ham-6-E-C**, **Ham-6-E-F**, **Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**, los resultados se muestran en la **Fig. 3**.

Fig. 3: Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato. Efecto comparativo de los extractos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda*.



Los microsomas fueron previamente incubados con cada uno de los extracto durante 10 min a 37°C , antes de inducir la lipoperoxidación con Fe^{3+} /ascorbato. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato, en ausencia del extracto. El valor IC_{50} representa la concentración de extracto que inhibe el 50% de la lipoperoxidación microsómica y fue calculado considerando como 100% el valor obtenido en ausencia de extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

Como era de esperar, los extractos enriquecidos en polifenoles inhibieron 100% la lipoperoxidación. Sin embargo, el extracto total de *Haplopappus taeda* (Hat-6-E) que tenía semejante concentración de polifenoles que el extracto total de *Haplopappus multifolius* (Ham-6-E) inhibió 100% la lipoperoxidación. Asimismo, el extracto de *Haplopappus multifolius* enriquecido en cumarinas (Ham-6-E-C) también inhibió 100% la lipoperoxidación. Por otra parte, el extracto de *Haplopappus taeda* enriquecido en terpenoides (Hat-6-E-T), inhibió aproximadamente un 15% la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato.

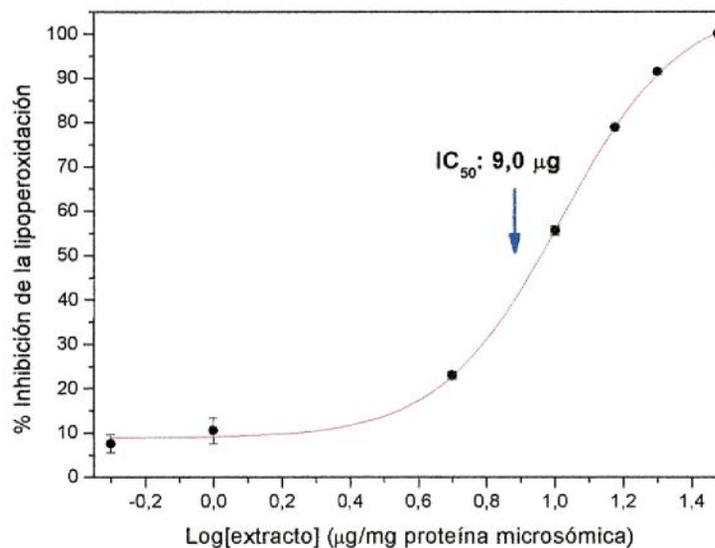
Estos resultados parecen indicar que la concentración de polifenoles no se relaciona directamente con la capacidad antilipoperoxidante de los preparados herbales. Sin embargo, cabe señalar que los principios activos de las plantas son polifuncionales y muchos metabolitos secundarios diferentes a los flavonoides, poseen grupos fenólicos en sus núcleos químicos característicos. La cuantificación de polifenoles incluye polifenoles totales y ésta puede ser la causa de las diferencias obtenidas. Cabe señalar además, que no podemos descartar que los extractos que provocaron 100% de inhibición de la lipoperoxidación, pudieran a concentraciones

inferiores a la ensayada (49,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína microsómica), provocar el mismo porcentaje de inhibición.

B. Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato.

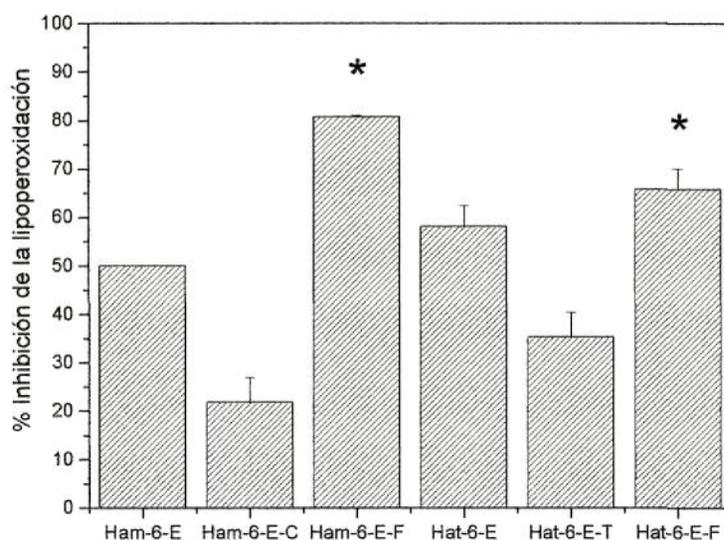
Dado que una de las características químicas de los polifenoles es su capacidad de quelar hierro, si éste es quelado, la cantidad de radicales libres generados por el sistema Fe^{3+} /ascorbato serían menores que aquellos generados por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Ambos sistemas, Fe^{3+} /ascorbato y Cu^{2+} /ascorbato generan radicales libres del oxígeno vía las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton. La concentración de ambos metales de transición es importante en estas reacciones, así, como una manera de evaluar estas diferencias se determinó el efecto de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato.

Fig. 4: Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Efecto del extracto etanólico total de *Happlopapus multifolius*.



Los microsomas (1 mg de proteína) fueron previamente incubados con las diferentes concentraciones del extracto durante 10 min a 37°C , antes de inducir la lipoperoxidación con Cu^{2+} /ascorbato de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición que aparecen en la **Fig. 4** fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato, en ausencia del extracto. El valor IC_{50} : 9,04 μg del extracto /mg de proteína microsómica representa la concentración de extracto que inhibió el 50% la lipoperoxidación microsómica y fue calculado considerando como 100% el valor obtenido en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

Fig. 5. Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Comparación de los efectos anti-lipoperoxidantes de los diferentes extractos y subextractos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda*.



Todos los extractos fueron utilizados en concentración 9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína microsómica, 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 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína microsómica/mL. Los microsomas fueron previamente incubados con cada uno de los extractos durante 10 min a 37°C, antes de inducir la lipoperoxidación con Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato, en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar. * Valores significativamente diferentes: $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos, se observan en la **Fig. 4** y confirman lo anteriormente expuesto, vale decir, la capacidad de los polifenoles de quelar hierro. De esta manera, al utilizar Cu^{2+} /ascorbato como agente prooxidante el IC_{50} del extracto etanólico total de *Haplopappus multifolius* fue aproximadamente 5 veces menor a aquel obtenido al utilizar Fe^{3+} /ascorbato como prooxidante. Por otra parte, la **Fig. 5** muestra una comparación de los efectos de los extractos en estudio sobre la lipoperoxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Estos valores también fueron menores a aquellos obtenidos al utilizar el sistema Fe^{3+} /ascorbato.

Efecto de los extractos herbales sobre la oxidación de los grupos tiólicos microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.

Como se observó en los experimentos de lipoperoxidación, el hierro puede ser quelado por los grupos fenólicos de los principios activos herbales y es por ello que estos experimentos se realizaron sólo con Cu^{2+} /ascorbato como sistema generador de radicales libres del oxígeno. En consecuencia, se utilizó el IC_{50} de la lipoperoxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato del extracto total de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**) para comparar el efecto antilipoperoxidante y protector de tioles de los distintos

extractos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda*. A esta concentración (9,0 µg/mg proteína microsómica) no se obtuvo efecto protector sobre la disminución de tioles microsómicos por lo tanto, se probaron 2 concentraciones equivalentes al doble y el triple de este IC₅₀ (18 y 27 µg/mg proteína microsómica). Los resultados obtenidos, se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Determinación de la protección de los grupos tiólicos. Efecto de los extractos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda* sobre la oxidación de tioles microsómicos inducida por Cu²⁺/ascorbato.

Extractos	18 µg/mg proteína		27 µg/mg proteína	
	Protección	±SD	Protección	±SD
Ham-6-E	54,9 %	1,25 %	63,6 %	1,98 %
Ham-6-E-C	47,5 %	3,18 %	53,2 %	1,99 %
Ham-6-E-F	55,3 %	2,21 %	58,7 %	1,74 %
Hat-6-E	11,2 %	1,98 %	34,4 %	0,00 %
Hat-6-E-T	0,00 %	0,00 %	28,9 %	3,92 %
Hat-6-E-F	28,6 %	3,67 %	56,6 %	4,35 %

Los microsomas fueron previamente incubados con cada uno de los extractos durante 10 min a 37°C, antes de inducir la oxidación de los tioles con Cu²⁺/ascorbato. El porcentaje de inhibición fue calculado considerando como 100% el valor de la oxidación de tioles microsómicos inducida por Cu²⁺/ascorbato, en ausencia del extracto. El valor sobre la barra representa el porcentaje de protección provocado por la concentración IC₅₀ obtenido del experimento de lipoperoxidación y fue calculado considerando como 100% el valor obtenido en ausencia de extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar.

El extracto total de *Haplopappus taeda* (**Hat-6-E**) que tenía semejante concentración de polifenoles que el extracto total de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**), presentó significativamente menor capacidad protectora de tioles que el extracto total de éste último (**Ham-6-E**). Cabe señalar que su efecto antilipoperoxidante fue semejante. Así, a la concentración 18 µg/mg proteína microsómica, los porcentajes de inhibición fueron 54,9% (**Ham-6-E**) y 11,2% (**Hat-6-E**), y para la concentración 27 µg/mg proteína microsómica, la diferencia fue 63,6 % (**Ham-6-E**) y 34,4% (**Hat-6-E**). Asimismo, a la concentración 18 µg/mg proteína microsómica, el porcentaje de protección de la disminución de los tioles microsómicos del extracto enriquecido en flavonoides de *Haplopappus taeda* (**Hat-6-E-F**), fue significativamente inferior al del extracto de *Haplopappus multifolius* enriquecido en flavonoides (**Ham-6-E-F**): 28,6% y 55,3%; sin embargo, a la concentración 27 µg/mg proteína microsómica esta diferencia desapareció y los porcentajes de protección fueron similares (56,6% y 58,7%). Por otra parte, el extracto de *Haplopappus multifolius* enriquecido en cumarinas (**Ham-6-E-C**) presentó un efecto protector significativamente mayor al extracto de *Haplopappus taeda* enriquecido en terpenoides (**Hat-6-E-T**); así, sólo el

extracto Ham-6-E-C presentó actividad protectora a la concentración 18 µg/mg proteína microsómica (47,5%) y a la concentración 27 µg/mg proteína microsómica, los porcentajes fueron 53,2% (**Ham-6-E-C**) y 28,9% (**Hat-6-E-T**).

Estos resultados muestran que el efecto protector de tioles de los extractos ensayados son menores que los efectos antilipoperoxidantes. Además, se puede concluir que los extractos de *Haplopappus multifolius*, son mejores protectores de tioles que los extractos de *Haplopappus taeda*, probablemente debido a las cumarinas presentes en la especie *Haplopappus multifolius*, principios activos ausentes en la especie *Haplopappus taeda*.

Efecto antioxidante de compuestos aislados. Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato.

Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Efecto antilipoperoxidante de compuestos aislados de los extractos totales de *Haplopappus spp.*

Compuesto	% de inhibición
TAE-7 (7-metilaramadendrina)	4 ± 2,1
TAE-5 (sakuranetina)	prooxidante
Isoramnetina	95,5 ± 3,7
Preniletina	74,9 ± 3,1
Silimarina*	42,0 ± 2,7
Quercetina	93,0 ± 3,6
Silibinina*	10,0 ± 2,8
Geranil-cumarina	35,5 ± 2,4
Taedol	9,0 ± 2,3

* Silimarina : extracto estandarizado de semillas de *Silybum marianum*, mezcla de flavanolignanos cuyo principal componente es la silibinina. Usado en medicina como hepatoprotector y en inflamaciones hepáticas.

Concentración de los compuestos puros: 9 µg/mg de proteína microsómica. Este valor corresponde a la concentración IC₅₀ del extracto de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**) que inhibió 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato.

Actividad 4.5: Cultivo de células RLC (hepatocitos) y UCHT 1(tiroides); Citotoxicidad; Control ensayos de protección.

Esta actividad se desarrolló en conjunto con la actividad 6.1 puesto que parte de la metodología es común a ambas. Consecuentemente, los resultados de citotoxicidad también se informarán en esta sección.

Metodología.

1. Líneas celulares utilizadas:

- Línea celular de origen epitelial que corresponde a un cultivo inmortal derivado de un tumor tiroideo de rata, autónomo y completamente diferenciado (UCHT1).
- Línea celular de hepatocitos de rata (RLC), la cual fue inmortalizada previamente a partir de cultivos primarios de hepatocitos de rata, mediante un sistema de transformación mediado por factores solubles presentes en el medio condicionado de la línea celular UCHT1 preservando las características diferenciadas de los tejidos de origen (Caviedes P., Caviedes R., Freeman T., Sanberg P. y Cameron D. Proliferated Cell Lines and Uses Thereof. International Publication number WO 03/065999 A2. Filed Feb. 8th, (2002), publication date: August 14th, 2003. World Intellectual Property Organization, International Bureau).
- Estas líneas fueron proporcionadas por el laboratorio de cultivo de tejidos del Dr. Pablo Caviedes en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2. Cultivo celular:

Las células fueron descongeladas a 37°C y cultivadas en placas de 10 centímetros, mantenidas en condiciones de proliferación en medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero bovino adulto (10%), suero fetal de bovino (2.5%), gentamicina 40mg/L. Estas fueron regularmente mantenidas en estas condiciones realizando periódicamente cambios de medio de cultivo y procedimientos de subcultivo, utilizando solución D (8g/L. NaCl, 0.4g/L. KCl, 0.02g/L. Na₂HPO₄, 0.03g/L. KH₂PO₄, 1.09g/L glucosa, 2.02g/L sacarosa aforando a 1000mL) para lavar las células, luego una mezcla de tripsina/EDTA (0,25 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA en HBSS (HANK'S Balanced SALT Solution : KCl 0.4 g/L, KH₂PO₄ 0.048 g/L, Na₂ HPO₄ 8 g/L, NaCl 1 g/L, D-glucosa 3,5 g/L y Na HCO₃ 3.5 g/L; ph 7,4) para desprender las células de la superficie de la placa de cultivo.

3. Conteo y sembrado de células:

En confluencia, las células fueron lavadas en solución D, luego se desprendieron de la placa al tratarlas con una mezcla de tripsina/EDTA (0,25 g/L de

tripsina y 0,2 g/L de EDTA), e incubándolas durante aproximadamente 1 minuto. La tripsinación se detuvo con medio de cultivo con suero. Las células se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente. Luego, las células fueron resuspendidas hasta homogeneidad. Para contar, se tomó una alícuota de 20 μ L de esta solución y se le agregaron 5 μ L de azul de tripán (0.4%). De esta mezcla se tomaron 10 μ L y se cuantificó el número de células, en cuatro zonas, en un Hemocitómetro (cámara de Neubauer). Luego se calculó el promedio de células de las áreas contadas y se multiplicó por 1000 y por el factor de dilución.

N° de Células / mL	=	1000 * promedio de células * 25/20
---------------------------	----------	---

Así, se puede calcular el volumen necesario de suspensión a medir para sembrar un número determinado de células en las placas. En los ensayos se sembraron 1000 células en placas de 3,5 cm. y 500 células en placas de 1,6 cm.

4. Determinación del Tiempo de Duplicación:

El estudio se realizó utilizando extractos etanólicos secos y acuosos liofilizados de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**, **Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-I**)*¹ y *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T**, **Hat-6-E-F** y **Hat-6-I**)*² a tres concentraciones diferentes (0,3; 0,6 y 1,0 mg/mL) y por triplicado.

Después de 24 horas de sembradas las células, estas fueron cuantificadas en 5 campos definidos por placa, lavadas y sometidas al medio que contenía el extracto a evaluar, previamente disuelto en DMSO en concentración inferior a 0,1% en solución.

El conteo se repitió en los 5 campos anteriormente establecidos (tiempo 0), a las 24, 48 y 72 horas de estimulación.

- *¹ **Ham-6-I** : Infusión liofilizada de *Haplopappus multifolius*
- Ham-6-E** : Extracto etanólico seco total de *H. multifolius*
- Ham-6-E-F** : Subextracto etanólico de *H. multifolius* que contiene flavonoides.
- Ham-6-E-C** : Subextracto etanólico de *H. multifolius* que contiene cumarinas
- *² **Hat-6-I** : Infusión liofilizada de *Haplopappus taeda*
- Hat-6-E** : Extracto etanólico seco total de *H. taeda*
- Hat-6-E-F** : Subextracto etanólico de *H. taeda*, contiene flavonoides
- Hat-6-E-T** : Subextracto etanólico de *H. taeda* que contiene terpenoides.

$$TD = \frac{(T_{FINAL} - T_{INICIAL}) * \log 2}{(\log N_{t_{final}} - \log N_{t_{inicial}})}$$

TD = Tiempo de duplicación celular (horas).

T_{FINAL} = Tiempo de recuento final (horas).

T_{INICIAL} = Tiempo de recuento inicial (horas).

log N_{t_{final}} = Numero total de células, al tiempo final.

log N_{t_{inicial}} = Numero total de células, al tiempo inicial.

5. Determinación de Citotoxicidad:

El estudio se realizó utilizando extractos etanólicos secos y acuosos (Infusiones) liofilizados de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**, **Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-I**)*¹ y *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T**, **Hat-6-E-F** y **Hat-6-I**)*² a tres concentraciones diferentes (0,3; 0,6 y 1 mg/mL), por triplicado. Se utilizaron placas de 24 pocillos (1,6 cm) con un cubreobjeto por pocillo, cada pocillo tuvo una concentración determinada de sustancia y cada cubreobjeto se utilizó para cada día de análisis (24, 48 y 72 horas de estimulación).

Después de 24 horas de sembradas las células, estas fueron lavadas y sometidas al medio que contenía el soluto a evaluar previamente disuelto en DMSO en concentración inferior a 0,1% en solución.

La toxicidad de las células fue evaluada mediante la técnica de LIVE/DEAD, mediante microscopía de fluorescencia. Para comenzar, se retiró el cubreobjeto de cada pocillo y se lavó con PBS 1X (8g/L NaCl, 0.4g/L KCl, 0.02g/L Na₂HPO₄, 0.03g/L KH₂PO₄ ajustado a pH 7,4). Las células se incubaron con 40μL de calceína 2 μM y yoduro de propidio 1mg/mL 1:1000 en PBS 1X, durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se volvió a lavar con PBS 1X y se montaron sobre portaobjetos para observar fluorescencia en el microscopio (ZEISS). Luego se tomaron fotografías de campo claro y fluorescencia con uso de programa RS Image.

Las células vivas presentan coloración verde intenso debido a la tinción por calceína, sustancia permeable a las membranas celulares. Una vez dentro del citoplasma, ésta es hidrolizada por esterases endógenas que la cargan negativamente, por lo que es retenida en el citoplasma. Este proceso solo puede ocurrir cuando las células están íntegras y funcionales.

Las células muertas presentan coloración rojo intenso nuclear debido a la tinción por yoduro de propidio, sustancia que se intercala en los puentes de hidrógeno del ADN. Las membranas celulares no son permeables a dicha sustancia, por lo que ésta solo puede llegar hasta el núcleo cuando las membranas están suficientemente

deterioradas para permitir el paso de una cantidad de moléculas importante, como sucede en el caso de las células muertas.

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{Número células muertas}}{\text{Número total de células}} * 100$$

6. Determinación de Lipoperoxidación:

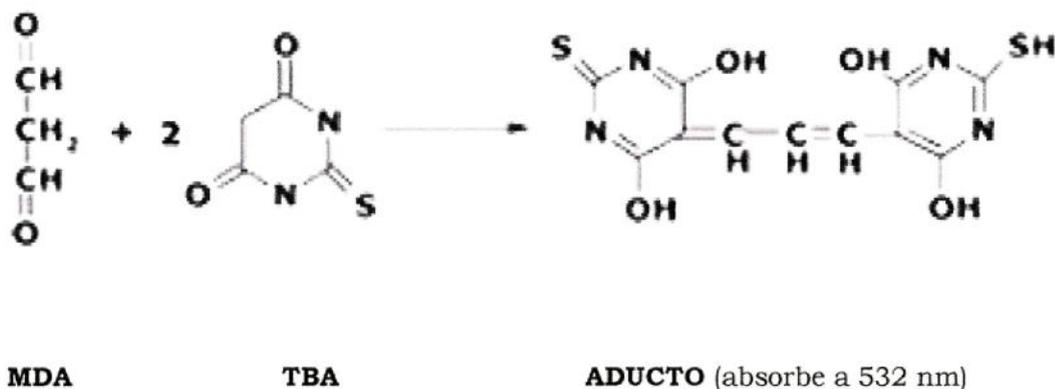
El estudio se realizó utilizando extractos etanólicos secos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**, **Ham-6-E-F** y **Ham-6-E**) y *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T**, **Hat-6-E-F**) a una concentración de 0,3 mg/mL.

- Las células fueron sembradas por triplicado en placas de 6 cm a una densidad de 5000 células/cm². Se utilizó medio de diferenciación (DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero fetal de bovino (3%), gentamicina 40mg/L).
- Después de 5 días de sembradas, las células fueron lavadas y sometidas al medio que contenía el soluto a evaluar, previamente disuelto en DMSO en concentración inferior a 0,1% en solución.
- Luego de 48 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X, posteriormente se desprendieron de la placa con una mezcla de tripsina/EDTA (0,25 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA) y un minuto de incubación. La tripsinación se neutralizó con medio de cultivo con suero.
- Las células se centrifugaron a 6000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Luego, se lavaron con 500 µL de PBS 1X refrigerado y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Al pellet, se agregaron 200 µL de buffer de lisis RIPA 2X (0.88 g NaCl; 1 mL de SDS 10%; 1 mL de nonidet 100%; 1 g de deoxicolato de sodio; 1 mL de EDTA 500 mM; 25 mL de TRIS Base 200 mM, aforados a 50 mL) con inhibidores de proteasas (PMSF, leupeptina).
- Las muestras se incubaron en hielo por 45 minutos, luego se sonicaron por 30 segundos y finalmente se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C, guardando el sobrenadante a -20°C.
- Del sobrenadante se extrajo una alícuota de 100 µL para la cuantificación de proteínas totales mediante el método del Acido Bicinconinico.
- A los 100 µL restantes del sobrenadante, se agregaron 200 µL de ácido tricloroacético al 10% para precipitar proteínas y se incubó durante 15 minutos a 4°C.

- Se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos y al sobrenadante (300 μ L) se agregaron 300 μ L de ácido Tiobarbitúrico al 0,67%.
- Se incubó por 10 minutos a baño maría y luego se llevó a temperatura ambiente.
- Finalmente se cuantificó leyendo en un espectrofotómetro la absorción a 532 nm.

La lipoperoxidación es un indicador de estrés oxidativo celular. Se determina utilizando el ensayo TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) mediante el cual se mide el malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, acoplado a ácido tiobarbitúrico (TBA). Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de TBA para producir un aducto cromogénico rosa conocido como sustancia reactiva al TBA que tiene un máximo de absorción a 532 nm.

El rendimiento del complejo generado es proporcional al MDA y por tanto a la peroxidación lipídica inducida.



7. Cuantificación de Proteínas. Método Acido Bicinonínico:

- Preparación Reactivo A: Ácido Bicinonínico 1 %; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 %; $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.16 %; NaOH 0.4 %; NaHCO_3 0.95 %. Ajustar pH 11,25.
- Preparación Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 %.
- Preparación Reactivo de trabajo: Mezclar 1 volumen de Reactivo B con 50 volúmenes de Reactivo A.
- Añadir 1 mL del Reactivo de trabajo a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla.
- Incubar 10 min a 60 °C y leer Absorbancia a 562 nm frente al blanco.

tubos	Estándar seroalbúmina bovino (1mg/mL) (μL)	H ₂ O (μL)	Reactivo de trabajo (mL)
Blanco	0	100	1
1	10	90	1
2	20	80	1
3	40	60	1
4	60	40	1
5	80	20	1
	Muestras problemas (1:200)		
M1	1	-	0.2
M2	1	-	0.2

- Representar la curva estándar.
- Calcular el coeficiente de extinción molar.
- Calcular las concentraciones de proteínas de las muestras M1 y M2.

El ácido bicinonínico (sal sódica), es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu⁺¹ en medio alcalino. Este reactivo constituye la base de un método analítico capaz de monitorear el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu⁺² en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran **tolerancia** a compuestos que afectan a otros métodos.



8. Determinación de Apoptosis:

El estudio se realizó con los extractos etanólicos secos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**, **Ham-6-E-F** y **Ham-6-E-C**) y *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) a una concentración de 0,3 mg/mL, por triplicado, utilizando Vybrant Apoptosis Assay Kit (V13240), Molecular Probes.

- Las células fueron sembradas por triplicado en placas de 24 pocillos (1,6 cm) a una densidad de 1000 células/cm². con un cubreobjeto por pocillo, cada pocillo tuvo una concentración determinada de sustancia y cada cubreobjeto se utilizó para cada día de análisis (24, 48 y 72 horas de estimulación). Utilizando medio de diferenciación (DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero fetal de bovino (3%),

gentamicina 40mg/L) y medio completo (DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero bovino adulto (10%), suero fetal de bovino (5%), gentamicina 40mg/L.

- Después de 24 horas de sembradas las células, estas fueron lavadas y sometidas al medio que contenía el soluto a evaluar, previamente disuelto en DMSO, el cual no podía superar el 0,1% en solución.
- Las células se incubaron durante 48 horas.
- Preparación de Reactivo A (Anexina buffer 1X): A partir de Anexina buffer 5X, diluir con agua destilada.
- Preparación Reactivo B (SYTOX 5 μ M): A partir de Sitos 50 μ M, diluir con anexina buffer 1X.
- Preparación de Reactivo C (Alexa Fluor 488 anexina V): Mezclar 5 μ L de Alexa Fluor 488 anexina V con 1 μ L de SYTOX 5 μ M.
- Luego de las 48 horas de incubación las células se lavaron 2 veces con PBS 1X., posteriormente las células se incubaron por 20 minutos con el Reactivo C.
- Pasado este tiempo, se volvió a lavar con Anexina Buffer 1X y se montaron sobre portaobjetos para observar fluorescencia en un microscopio (ZEISS) utilizando filtro de fluoresceína. Luego se tomaron fotografías de campo claro y fluorescencia, con uso de programa RS Image.

Apoptosis, es un proceso normal de la regulación de muerte celular que ocurre como parte del desarrollo, sin embargo, difiere de necrosis y muerte celular por cambios morfológicos y bioquímicos.

En células vivas, la fosfatidilserina (PS) esta localizada sobre la superficie citoplasmática de la membrana celular, sin embargo en células apoptóticas, la PS está translocalizada desde el interior hacia el exterior de la membrana.

Anexina V es un fosfolípido que tiene alta afinidad por la PS y junto con un fluoróforo como Alexa Fluor 488 puede identificar células apoptóticas que están unidas a la PS, generando gran sensibilidad a la fluorescencia.

SYTOX es un ácido nucleico verde, el cual es impermeable a células vivas y apoptóticas, pero tiñe las células muertas con una fluorescencia verde.

Resultados:

1. Determinación de concentración y tiempo de incubación óptimo

En este ensayo se evaluó el % de citotoxicidad en la línea celular UCHT1, el cual está normalizado por el tiempo de duplicación celular.

El efecto de cada sustancia se registró a 3 concentraciones distintas (0,3; 0,6 y 1,0 mg/mL) y a los tiempos de 24, 48 y 72 hrs. (**Fig1, 2 y 3**).

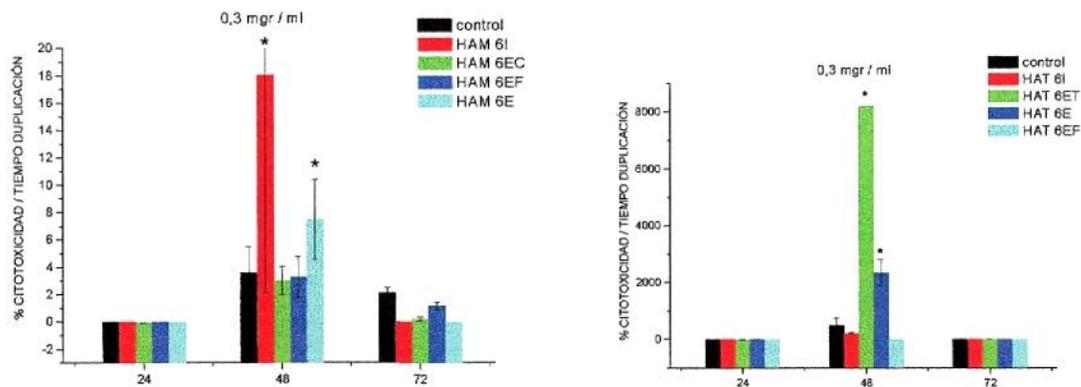


Fig. 1: % citotoxicidad/tiempo duplicación a 24, 48 y 72 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (*Ham-6-I*, *Ham-6-E-F*, *Ham-6-E-C* y *Ham-6-E*) y *H. taeda* (*Hat-6-E*, *Hat-6-E-T*, *Hat-6-E-F* y *Hat-6-I*) a una concentración de 0,3 mg/mL. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar (EE). $P < 0.05$ (*) con respecto al control.

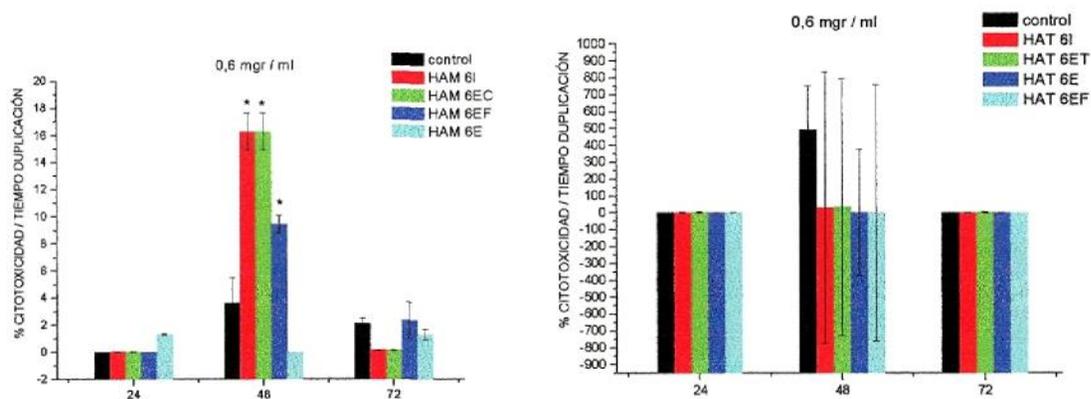


Fig. 2: % citotoxicidad/tiempo duplicación a 24, 48 y 72 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (*Ham-6-I*, *Ham-6-E-F*, *Ham-6-E-C* y *Ham-6-E*) y *H. taeda* (*Hat-6-E*, *Hat-6-E-T*, *Hat-6-E-F* y *Hat-6-I*) a una concentración de 0,6 mg/mL. Los resultados corresponden al promedio \pm EE. $P < 0.05$ (*) con respecto al control.

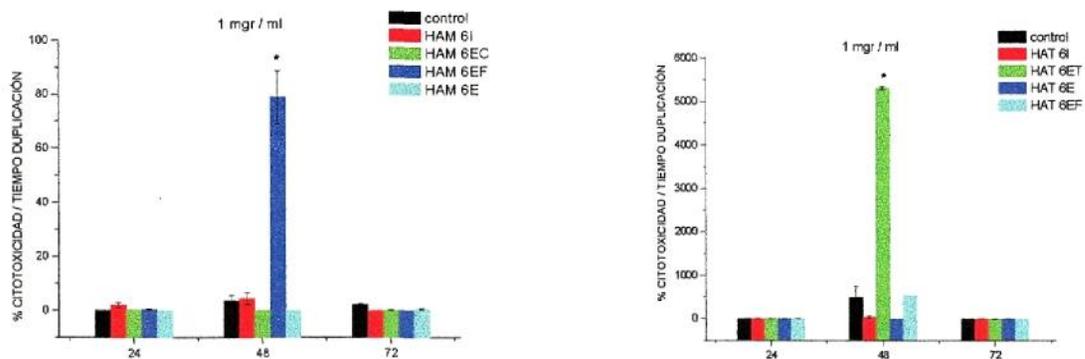


Fig. 3: % citotoxicidad/tiempo duplicación a 24, 48 y 72 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (*Ham-6-I*, *Ham-6-E-F*, *Ham-6-E-C* y *Ham-6-E*) y *H. taeda* (*Hat-6-E*, *Hat-6-E-T*, *Hat-6-E-F* y *Hat-6-I*) a una concentración de 1 mg/mL. Los resultados corresponden al promedio \pm EE. $P < 0.05$ (*) con respecto al control.

Las **Fig. 1, 2 y 3** muestran el % de citotoxicidad normalizado por el tiempo de duplicación en presencia de ambos extractos. A las 24 y 72 horas de incubación, la toxicidad por parte de todas las sustancias se mantiene constante sin cambios significativos tanto a 0,3; 0,6 y 1 mg/mL, sin embargo, a 48 horas de aplicados los extractos **Ham-6-E-F** exhibe un aumento en el % citotoxicidad de 22 (**CIT**: 78.6 v/s 3.6, **Ham-6-E-F** v/s control) y 3 veces a 1 y 0,6 mg/mL respectivamente (n=3 p< 0.05), comparada con cultivos controles.

Hat-6-E-T por su parte, exhibe un aumento de 11, 3 y 1 veces a 1 (**CIT**: 5302 v/s 492, **Hat-6-E-T** v/s control), 0,6 y 0,3 mg/mL respectivamente (n=3 p<0.05), comparada con controles. Esta toxicidad se ve levemente disminuida a una concentración de 0,3 mg/mL en comparación con 0,6 y 1 mg/mL.

Si bien los subextractos **Ham-6-E-F** y **Hat-6-E-T** provenientes del extracto etanólico seco total presentan una clara citotoxicidad a las 48 hrs. a concentraciones de 1,0 y 0,6 mg/mL, en estas mismas condiciones el extracto etanólico total no presenta actividad tóxica sin embargo ésta se hace evidente a concentraciones menores (0,3 mg/mL).

2. Citotoxicidad (CIT) en hepatocitos:

La planificación de este ensayo se realizó en base a los resultados obtenidos en la línea celular UCHT1.

En este caso se determinó el % de citotoxicidad a las 48 horas de aplicados los extractos (a una concentración de 0,3 mg/mL) en la línea celular de hepatocitos de rata (RLC). Se evaluaron los extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**) y *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**). Como referencia, se usó silimarina (extracto de *Silybum marianum* (utilizado en clínica como hepatoprotector) en la misma concentración.

Sustancia	Tiempo duplicación	% CIT	X	EE	n
Control	24,07	0	0	0	6
		0			
		0			
		0			
		0			
		0			
Ham-6-E	45,78	3,1	3,88	1,54	6
		1,92			

		10			
		1,96			
		2,44			
Ham-6-E-C	-32,99	0	0	0	3
		0			
		0			
Ham-6-E-F	-31,38	100	59,96	23,13	4
		22,2			
		100			
		17,65			

Tabla 1: Análisis de LIVE/DEAD realizado después de 48 horas de agregado el estímulo. El promedio (X) calculado se refiere al % de células muertas promedio a una concentración de extracto de 0,3 mg/mL. El análisis se realizó con anova y Test de student.

Sustancia	Tiempo duplicación	% CIT	X	EE	n
Control	24,07	0	0	0	6
		0			
		0			
		0			
		0			
		0			
Hat-6-E	142,68	0	0	0	6
		0			
		0			
		0			
		0			
		0			
Hat-6-E-F	93,79	0	0	0	4
		0			
		0			
		0			
Hat-6-E-T	56,79	0	0	0	4
		0			
		0			
		0			
Silimarina	29,19	100	50,83	22	6
		100			
		100			
		0			
		5			
		0			

Tabla 2: Análisis de LIVE/DEAD realizado después de 48 horas de agregado el estímulo. El promedio (X) calculado se refiere al % de células muertas promedio a una concentración de extracto de 0,3 mg/mL. El análisis se realizó con anova y Test de student

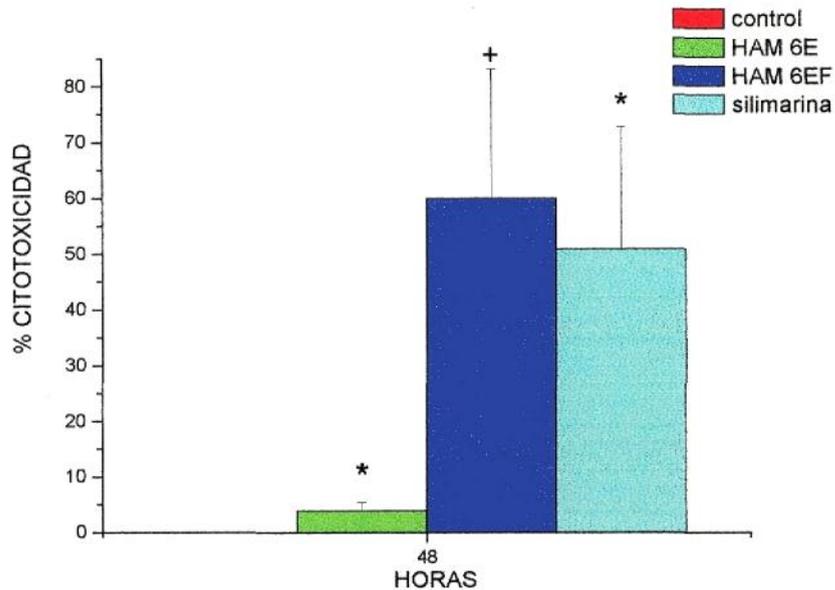


Fig. 4: % de citotoxicidad a las 48 horas de aplicados 0,3 mg/mL de extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y silimarina en hepatocitos de rata (RLC). Los resultados corresponden al promedio \pm EE. $p < 0,01$ (+), $p < 0,05$ (*) con respecto al control.

Los resultados de los análisis de citotoxicidad y tiempo de duplicación (**Tabla 1**) indican que en el caso de **Ham-6-E-F** existe una correlación en la disminución de células vivas y la disminución en el tiempo de duplicación mostrando diferencias significativas con respecto al control. Manifestando una gran toxicidad por parte de este extracto. Sin embargo, en el caso de **Ham-6-E**, a pesar que presenta un aumento de dos veces en el tiempo de duplicación en relación al control, mostró una alta toxicidad con una diferencia significativa $p < 0,05$. En este caso, la disminución en el número de células no se debió a la inducción de la muerte celular, sino a un efecto sobre los eventos proliferativos de las células RCL.

En relación a los datos obtenidos (**Tabla 2**) por parte de los extractos **Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**, el promedio de las células muertas corresponde a un 0% del total, datos que coinciden con un aumento en el tiempo de duplicación.

Finalmente, la silimarina, a pesar que el tiempo de duplicación se mantuvo relativamente constante en comparación al control, presentó un aumento en el % de toxicidad de 50 veces ($n=6$ $p < 0,05$) en relación al control.

3. Lipoperoxidación:

La planificación de este ensayo se realizó en base a los resultados obtenidos en la línea celular UCHT1.

En este caso se evaluaron los niveles de lipoperoxidación presentes en la línea celular de hepatocitos de rata (RLC) a las 48 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** a una concentración de 0,3 mg/mL.

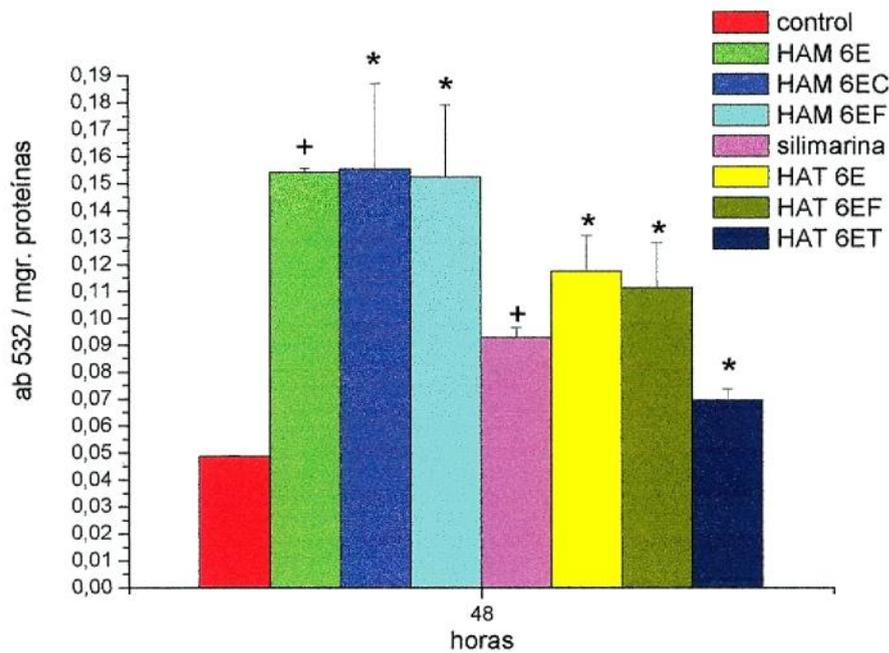


Fig. 5: Niveles de lipoperoxidación en hepatocitos después de 48 horas de aplicados los extractos (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C**, **Ham-6-E**, **Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F** y **silimarina**) en concentraciones de 0,3 mg/mL. Los resultados corresponden al promedio \pm EE. n=3 p<0,01 (+), p<0,05 (*) con respecto al control.

En la **Fig. 5** se grafican los niveles de lipoperoxidación expresados en absorbancia a 532 nm/mg de proteínas, en la línea celular de hepatocitos de rata (RLC) en presencia de los extractos ya indicados. Con todos ellos, se observa un nivel de productos de peroxidación lipídica superior al control, lo cual es signo de deterioro celular por estrés oxidativo. Las diferencias observadas respecto al control, a las 48 horas de aplicados 0,3 mg/mL de extracto, son significativas: n=3 p<0,01 (+), p<0,05 (*).

4. Hepatoprotección:

La planificación de este ensayo se realizó en base a los resultados obtenidos en la línea celular UCHT1.

En este experimento, se evaluaron los niveles de lipoperoxidación presentes en hepatocitos de rata (RLC) a las 24 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** a una concentración de 0,3 mg/mL. El ensayo se repitió después de 30 minutos de la adición de agua oxigenada a una concentración de 2 mM como inductor de lipoperoxidación.

Sustancia	Ab 532/ (mg/proteína)	X	EE	n
Sin H ₂ O ₂				
Control	0,016	0,021	0,003	3
	0,020			
	0,027			
Ham-6-E	0,013	0,018	0,003	3
	0,020			
	0,020			
Ham-6-E-C	0,020	0,019	0,003	3
	0,023			
	0,014			
Ham-6-E-F	0,019	0,022	0,003	3
	0,019			
	0,028			
Silimarina	0,045	0,033	0,008	3
	0,035			
	0,019			
Hat-6-E,	0,029	0,025	0,004	2
	0,021			
Hat-6-E-F	0,019	0,019	0,002	3
	0,024			
	0,016			
Hat-6-E-T	0,029	0,025	0,009	3
	0,039			
	0,006			

Tabla 3: Niveles de lipoperoxidación en hepatocitos después de 24 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** en concentraciones de 0,3 mg/mL. El análisis se realizo con anova y Test de student.

Sustancia	Ab 532/ (mg/proteína)	X	EE	n
Con H ₂ O ₂				
Control	0,043	0,046	0,004	3
	0,041			
	0,054			
Ham-6-E	0,059	0,049	0,008	3
	0,054			
	0,033			
Ham-6-E-C	0,066	0,052	0,007	3
	0,045			
	0,045			
Ham-6-E-F	0,106	0,084	0,015	3
	0,088			
	0,056			
Silimarina	0,055	0,056	0,013	3
	0,079			
	0,035			
Hat-6-E	0,047	0,041	0,009	3
	0,022			
	0,055			
Hat-6-E-F	0,075	0,052	0,012	3
	0,047			
	0,036			
Hat-6-E-T	0,081	0,054	0,015	3
	0,048			
	0,032			

Tabla 4: Niveles de lipoperoxidación en hepatocitos después de 24 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** en concentraciones de 0,3 mg/mL y luego de 30 minutos de aplicación de H₂O₂ a una concentración de 2 mM. El análisis se realizó con anova y Test de student.

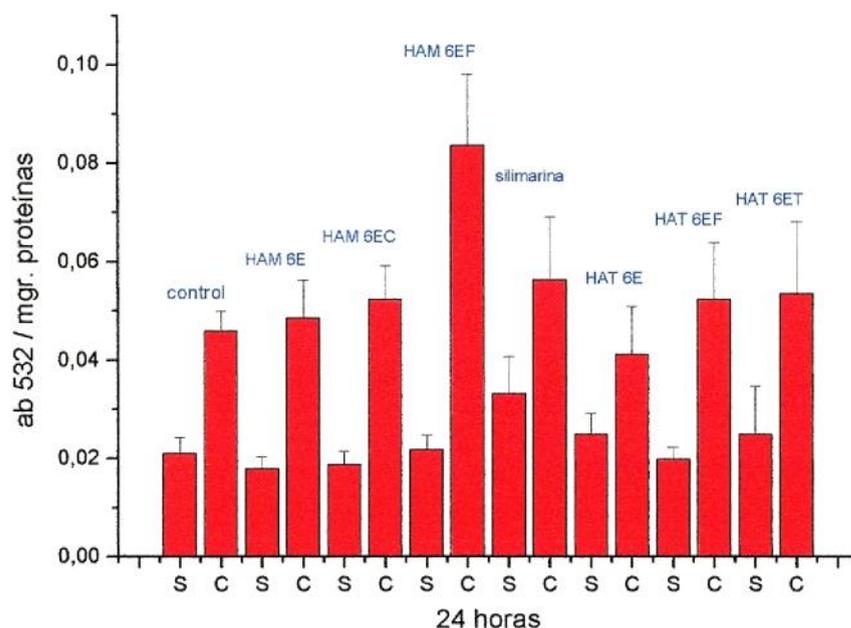


Fig. 6: Niveles de lipoperoxidación en hepatocitos después de 24 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y silimarina en concentraciones de 0,3 mg/mL, en presencia © y ausencia (s) a una concentración de 2 mM. El análisis se realizó con anova y Test de student.

Los resultados obtenidos del análisis de TBARS en ausencia de H₂O₂ no presentaron diferencias significativas entre el efecto de los extractos, lo que era esperable debido a que el estímulo permaneció en contacto con las células solo 24 horas. En experimentos previos realizados en las células UCHT1, en ese periodo de incubación no se observaron cambios importantes. En cambio, los resultados obtenidos en presencia de H₂O₂ a una concentración de 2 mM si bien no presentaron diferencias significativas de acuerdo al análisis de ANOVA, indican que **Ham-6-E-F** a una concentración de 0,3 mg/mL, produjo un aumento de la lipoperoxidación de casi un 100% respecto al control (Ab 532/mg proteínas de 0,084 en comparación a Ab 532/ mg proteínas de 0,046 del cultivo control).

La silimarina no tendría mayor efecto sobre la lipoperoxidación que los extractos ensayados y solo **Hat-6-E** presenta un efecto protector mínimo.

5. Apoptosis:

La planificación de este ensayo se realizó en base a los resultados obtenidos en la línea celular UCHT1.

Se evaluó apoptosis en la línea celular de hepatocitos de rata (RLC), después de 48 horas de aplicados los extractos etanólicos secos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** a una concentración de 0,3 mg/mL.

Sustancia	X % células muertas	% células apoptóticas	X	EE	n
Control	13,7	100	86,4	13,6	2
		72,7			
Ham-6-E	4	33,3	39,6	9,2	4
		66,7			
		25			
		33,3			
Ham-6-E-C	4	0	66,7	33,3	3
		100			
		100			
Ham-6-E-F	5,7	0	0	0	3
		0			
		0			
Silimarina	3,5	0	37,5	23,9	4
		0			
		100			
		50			
Hat-6-E	2,7	0	0	0	3
		0			
		0			
Hat-6-E-F	28,3	83,3	35,4	21,1	4
		0			
		58,1			
		0			
Hat-6-E-T	22	0	8,9	6,8	4
		6,9			
		0			
		28,6			

Tabla 5: Análisis de APOPTOSIS realizado después de 48 horas de agregados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** en concentraciones de 0,3 mg/mL. El análisis se realizó con anova y Test de student.

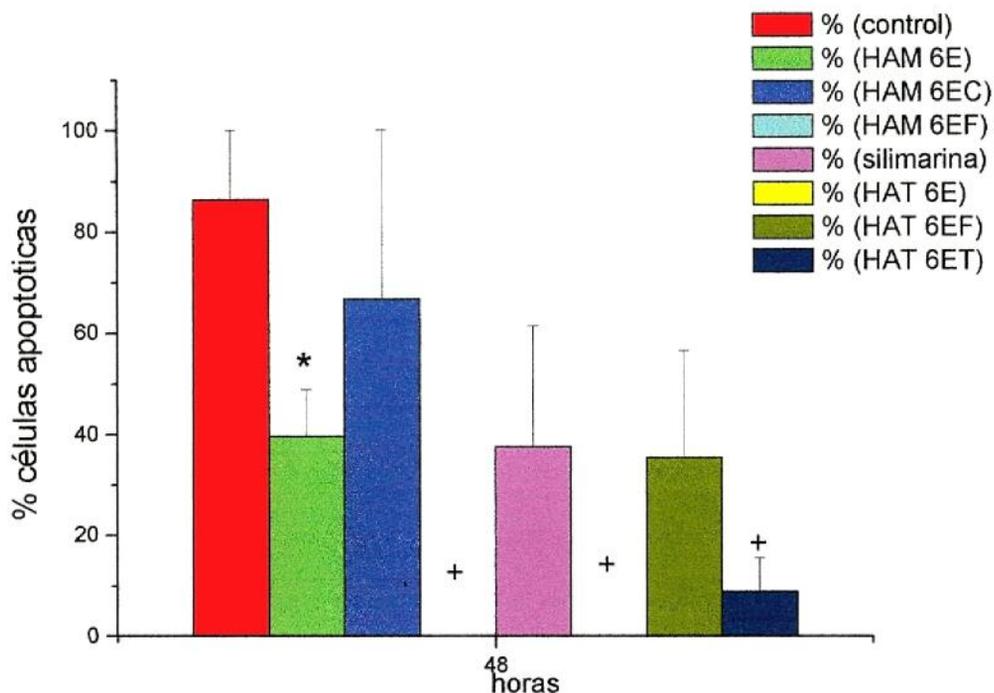


Figura 7: % de células apoptóticas después de 48 horas de aplicados los extractos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E-F**, **Ham-6-E-C** y **Ham-6-E**), *H. taeda* (**Hat-6-E**, **Hat-6-E-T** y **Hat-6-E-F**) y **silimarina** en concentraciones de 0,3 mg/mL. Los resultados corresponden al promedio \pm EE. $p < 0,01$ (+), $p < 0,05$ (*) con respecto al control.

Los resultados obtenidos indican que los extractos **Ham-6-E**, **Ham-6-E-F**, **Hat-6-E** y **Hat-6-E-T**, que exhiben diferencias significativas ($p < 0,01$ (+), $p < 0,05$ (*) revelan una disminución importante en el % células apoptóticas de 39,6 %, 0 %, 0 % y 8,9 % respectivamente en comparación a cultivos controles que presentan un 86,4 %.

A pesar de que la sumatoria del % de células muertas y apoptóticas causada por los extractos **Ham-6-E-C**, **silimarina** y **Hat-6-E-F** alcanza un 70 %, 40 % y 64 % respectivamente en comparación a cultivos controles, estas sustancias no presentan diferencias significativas.

En resumen, podríamos concluir que:

- Existen diferencias en el comportamiento de los extractos de ambas especies, que se explican fundamentalmente por la clara diferencia en sus composiciones químicas. Mientras *Haplopappus multifolius* (**Ham**) acumula cumarinas y flavonoles, en *H. taeda* (**Hat**), predominan los dihidroflavonoles, diterpenos y monoterpénos como ésteres del ácido p-cumárico.
- Cada especie presenta un comportamiento diferente frente a cada tejido. **Ham** (principalmente **Ham-6-E-F**) es tóxico para ambas líneas celulares:

UCHT1 y RLC mientras que **Hat** solo lo es para UCHT1 y su toxicidad recaería en los componentes del subextracto **Hat-6-E-T**.

- A las 48 hrs. de aplicados 0,3 mg/mL de extractos en los hepatocitos, se comprobó en todos ellos un aumento de los niveles de lipoperoxidación. Este efecto fue menor con silimarina.
- En lo que se refiere a la hepatoprotección frente a la lipoperoxidación inducida por H₂O₂ en hepatocitos, a la concentración de extracto ensayada, ésta no fue evidente. Por el contrario, con 0,3 mg/mL de **Ham-6-E-F**, se produjo un aumento de 100% de las especies reactivas de oxígeno u otros radicales libres en comparación a cultivos controles. En este caso, la silimarina no tuvo mayor efecto protector que los extractos ensayados.
- Por ultimo, es necesario mencionar que en hepatocitos de rata en presencia de estos extractos, el % de células apoptóticas no superó en ningún caso los niveles normales.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, es evidente que se requieren mayores estudios para determinar los límites de seguridad en el uso de estos extractos y su concentración como agentes terapéuticos. Sin embargo, será imposible tener valores concretos y exactos si no se tienen mayores antecedentes de biodisponibilidad de extractos y compuestos puros. Independientemente de ello, sería interesante y conveniente realizar otro tipo de análisis para determinar los distintos mecanismos de toxicidad presentados por ambas especies

Objetivo específico N°5 Confirmar el efecto antiinflamatorio presentado por el “bailahuén” tanto en aplicaciones tópicas como administrado por vía oral. Estudiar un posible mecanismo de acción.

Actividad 5.1: Cultivo de células RAW, inducción y detección de COX-2.

Metodología.

Metodología para estudiar el efecto de extractos etanólicos de hojas de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda* en la línea celular macrofágica RAW 264.7 sobre la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y 5' Lipooxigenasa (LOX-5) inducida por lipopolisacáridos (LPS).

1. Cultivo celular. La línea celular macrofágica RAW 264.7 fueron crecidas en medio RPMI1640 suplementados con 10% de SFB, glutamina (2mM), penicilina (50 µg/ml), estreptomycin (50 µg/ml) (medio completo). Las células fueron crecidas a 37°C con atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. El pasaje de células se realizó 2 veces por semana mediante tripsinización (Tripsina-EDTA).

2. Determinación viabilidad celular. En placa de 96 pocillos se sembraron células RAW 264.7 y se dejaron adherir entre 18 a 20 horas en medio completo. Después de ese tiempo, se retiró el medio y se agregó medio completo con el extracto a analizar en distintas concentraciones o con medio solo para el control. A las 48, 72 o 96 horas de exposición a la droga, las células fueron ensayadas para determinar su viabilidad utilizando “CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” de Promega. Este contiene el compuesto MTS, que es reducido en formazan por las deshidrogenadas presentes en las células metabólicamente activas. La cantidad de formazan formado es medido por la cantidad de absorbancia a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Se agregaron 20 µL de una mezcla 20:1 de MTS : PMS, a cada pocillo. Se incubó entre 1 a 2 horas a 37°C y se detuvo la reacción agregando 10 µL de SDS 10%. Finalmente, se determinó la viabilidad celular por la absorbancia a 490 nm.

3. Inducción de la expresión de COX-2 y tratamiento con extractos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda*. 700.000 células RAW 264.7 se dejaron crecer por 15-18 horas en condiciones normales. Para inducir la expresión de COX-2, a las células se les agregó LPS (1 µg/mL). Para determinar el efecto de los extractos etanólicos de *H. multifolius* y *H. taeda* sobre COX-2, células tratadas con LPS

se incubaron con extractos de la droga vegetal en concentraciones 1×10^{-5} , 1×10^{-7} y 1×10^{-9} (mg/mL) por 48h. Al completar el tiempo de exposición a las drogas, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS en frío. Se retiraron las células de la placa en 1 mL de PBS con una mezcla de inhibidores de proteasas (Benzamidina 10 μ g/mL Antipaina 2 μ g/mL, Leupeptina 1 μ g/mL y PMSF 1 mM) y un inhibidor de fosfatasas (Na_3VO_4 1 mM). Se centrifugaron las células a 400 xg por 5 min. y se guardó el pellet a -20°C para su posterior solubilización y cuantificación.

4. Determinación de la expresión de COX-2 por inmunowesternblot. Los pellet de células fueron lisados con tampón de lisis RIPA (Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 0,15 M, Deoxicolato de sodio 1%, NP-40 1%, SDS 0,1%, EDTA 5 mM) que contenía los inhibidores de proteasas y fosfatasas descritos en el punto anterior. Después de homogenizar, los extractos fueron sonicados 2 veces por 10 segundos cada uno, para luego determinar la concentración de proteínas mediante el ensayo de proteínas BCA de Pierce, según las indicaciones del fabricante. El equivalente a 30 μ g de proteína total fue denaturado a 95°C por 5 minutos en tampón Laemmli (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM, DTT 100 mM y azul de bromofenol 0,01%). Las muestras fueron separadas por electroforesis en minigeles denaturantes de poliacrilamida al 12% en tampón de corrida (Glicina 0,23 M, Tris 25 mM y SDS 0,1%). Después de la separación, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Glicina 0,23 M, Tris 25 mM y Metanol 20%). La membrana fue posteriormente teñida con una solución de Rojo Ponceau (Ponceau S 0,3% en ácido acético 0,5%) para verificar la correcta transferencia. Luego se lavó la membrana con PBS 1X y posteriormente se bloqueó en leche descremada 5% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo primario: anti-COX-2 hecho en ratón (1:250) (Transduction laboratories), anti 5-LOX hecho en ratón (1:250) (Transduction laboratories) o anti-actina hecho en conejo (1:5000) (Sigma) diluidos en solución de bloqueo. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces en PBS 1X con Tween-20 0,05%, por 7 minutos cada vez e incubadas con anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a HRPO (1:2500) o anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a HRPO (1:2500) diluidos en leche 5% en PBS 1X, según correspondía, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron lavadas 3 veces en PBS 1X con Tween-20 0,05%, por 5 minutos cada vez y reveladas por reacción con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal de Pierce y la señal capturada en film radiográfico BioMax MR de Kodak (Rochester, NY, USA).

Resultados.

A. Estudios del efecto de extractos etanólicos de *H. multifolius* y *H. taeda* sobre viabilidad celular de células RAW 264.7. Los resultados obtenidos en este estudio indican que *H. multifolius* y *H. taeda*, no alteran la viabilidad de células RAW. Los porcentajes de variación de la viabilidad celular en presencia de extractos de ambos *Haplopappus* en relación al control no mostraron cambios estadísticamente significativos durante los cuatro días de cultivo ni tampoco a ninguna de las concentraciones analizadas. (Fig. 1 y 2).

Células RAW 264.7 fueron tratadas por 24, 48, 72 y 96 h con las concentraciones de extractos indicadas en las figuras. La viabilidad celular se cuantificó por el ensayo de MTS (ver Metodología) y los resultados se muestran relativos a la viabilidad de las células control sin tratamiento. Los resultados están expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm el error estándar.

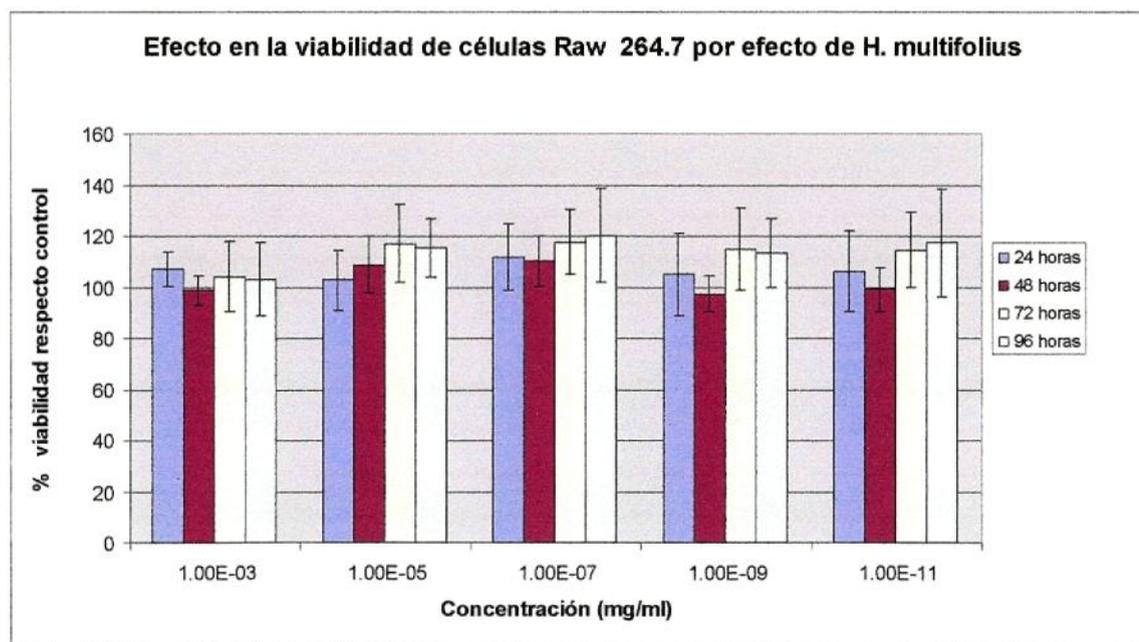


Fig. 1. Efecto de extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* sobre la viabilidad de células RAW 264.7.

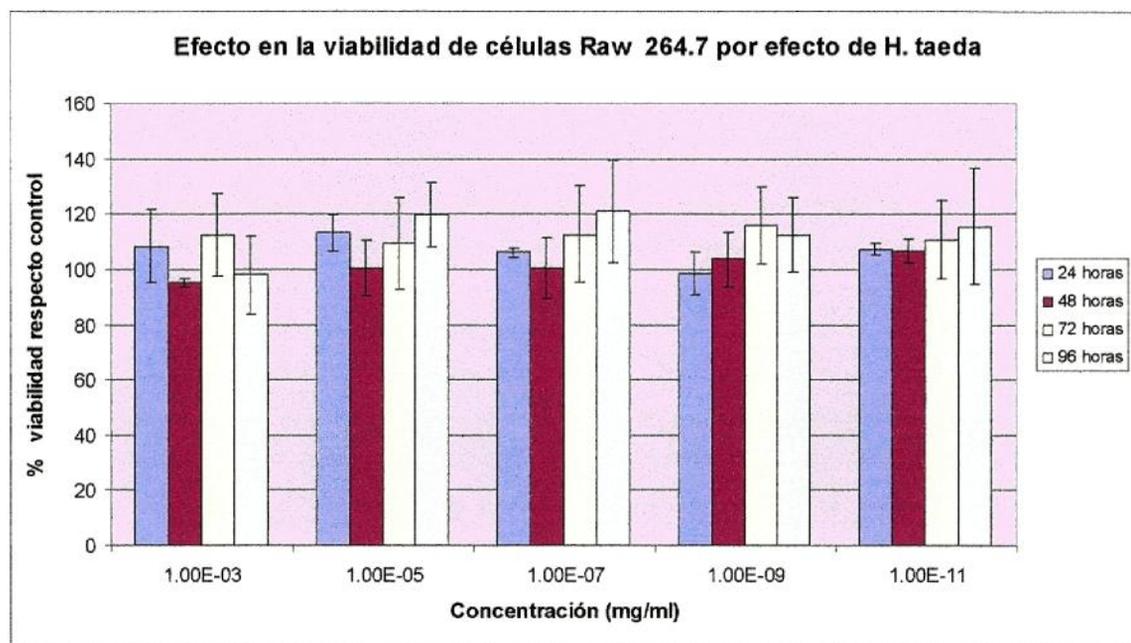


Fig. 2. Efecto de extractos etanólicos de *Haplopappus taeda* sobre la viabilidad de células RAW 264.7.

B. 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 (1×10^{-5} , 1×10^{-7} y 1×10^{-9} (mg/mL)). Nuestros resultados (**Fig. 3**) muestran que la expresión de COX-2 inducida por LPS es inhibida por *Haplopappus multifolius*. Esta inhibición fue estadísticamente significativa en las tres concentraciones estudiadas. De la misma forma *H. taeda* también inhibe la expresión de COX, pero este efecto se observó sólo en las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-9} mg/mL. Por otro lado, en la **Fig. 4**, se observa que tanto los polifenoles como la fracción de cumarinas de *H. multifolius* inducen la inhibición de la expresión de COX-2. Del mismo modo, en *H.taeda* tanto las fracciones de polifenoles como terpenoides ejercen una inhibición de la expresión de COX-2 estimulada por LPS.

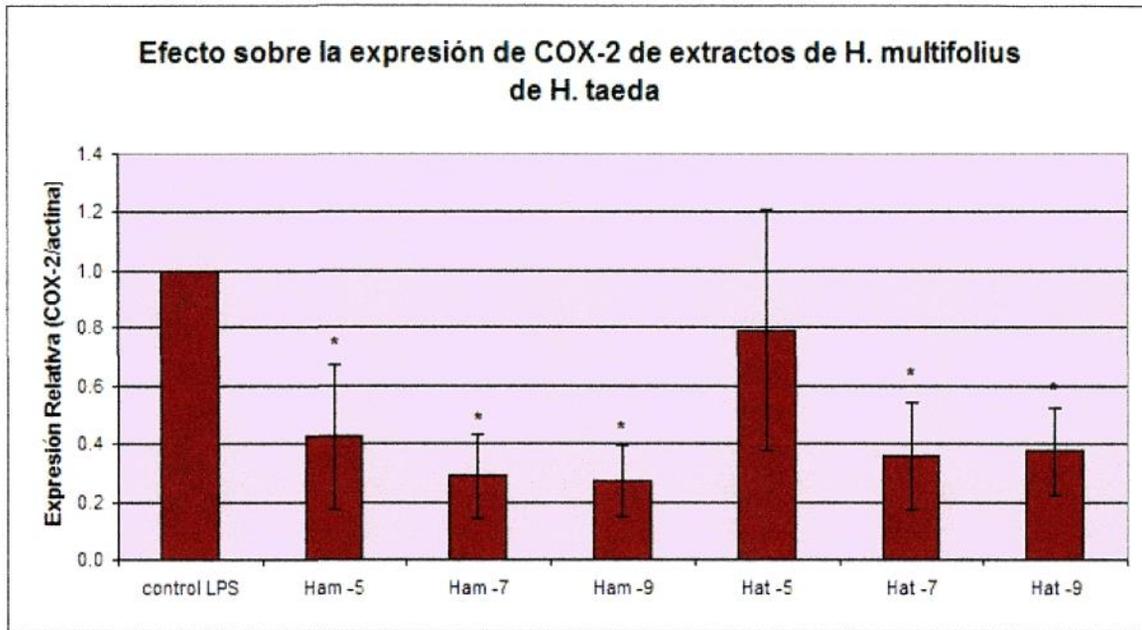


Fig. 3. Efecto de extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus taeda* sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS en células RAW 264.7. Células RAW 264.7 fueron tratadas por 48 h con las concentraciones de extractos ya sea de *H. multifolius* o *H. taeda* indicadas en las figuras y LPS 10µg/mL. Promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar.

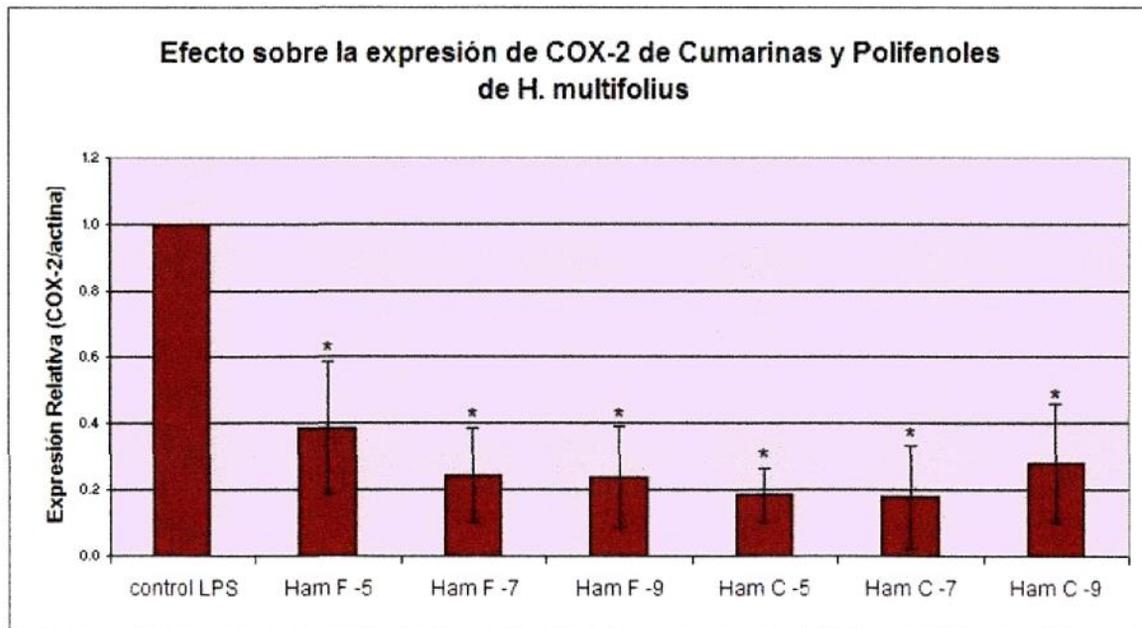


Fig. 4. Efecto de subextractos enriquecidos en cumarinas y polifenoles de *Haplopappus multifolius* sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS en células RAW 264.7. Células RAW 264.7 fueron tratadas por 48 h con las concentraciones de subextractos de *H. multifolius* (**Ham-6-E-F** y **Ham-6-E-C**) indicadas en la figura. LPS 10 µg/mL. Promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar.

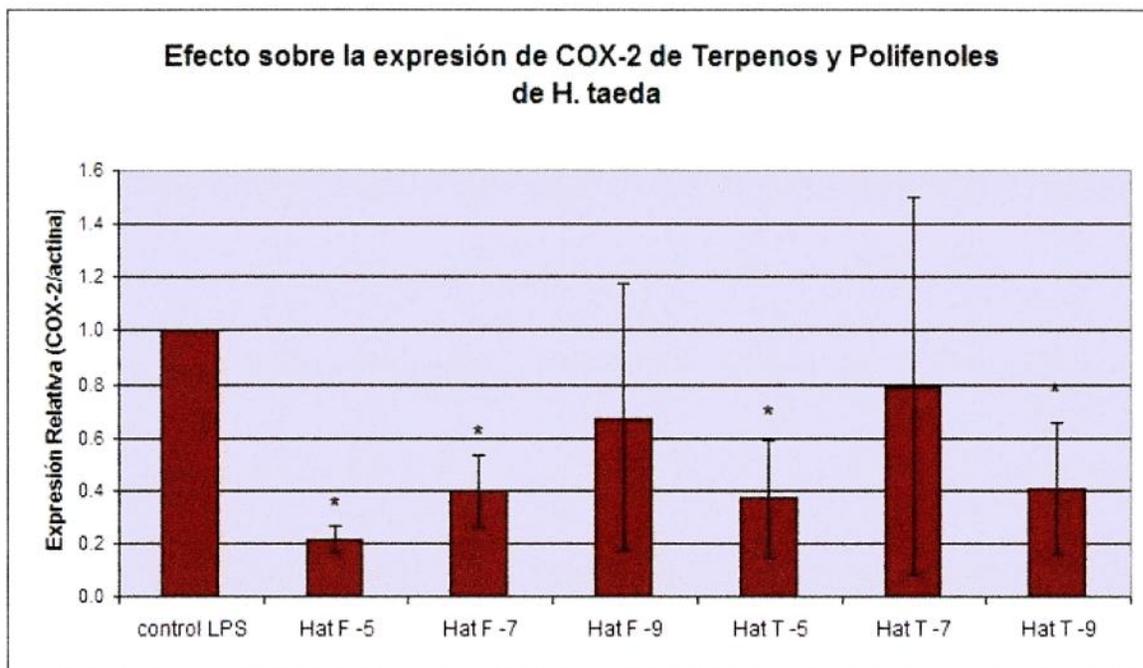


Fig. 5. Efecto de subextractos enriquecidos en terpenos y polifenoles de *Haplopappus taeda* sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS en células RAW 264.7. Células RAW 264.7 fueron tratadas por 48 h con las concentraciones de subextractos de *H. taeda* (**Hat-6-E-F** y **Hat-6-E-T**) indicadas en la figura. LPS 10 µg/mL. Promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar.

C. Análisis de la expresión de 5-LOX mediante inmunowesternblot. Con las curvas de viabilidad, se escogieron distintas concentraciones de los extractos, para realizar los ensayos (1x10E-5, 1x10E-7 y 1x10E-9 (mg/mL).

Los resultados de los estudios de 5-LOX mediante inmunoblot muestran que ambos extractos *H. multifolius* y de *H. taeda* no modifican la actividad de la enzima 5-LOX (**Fig. 6**). No se observaron cambios a ninguna de las concentraciones utilizadas.

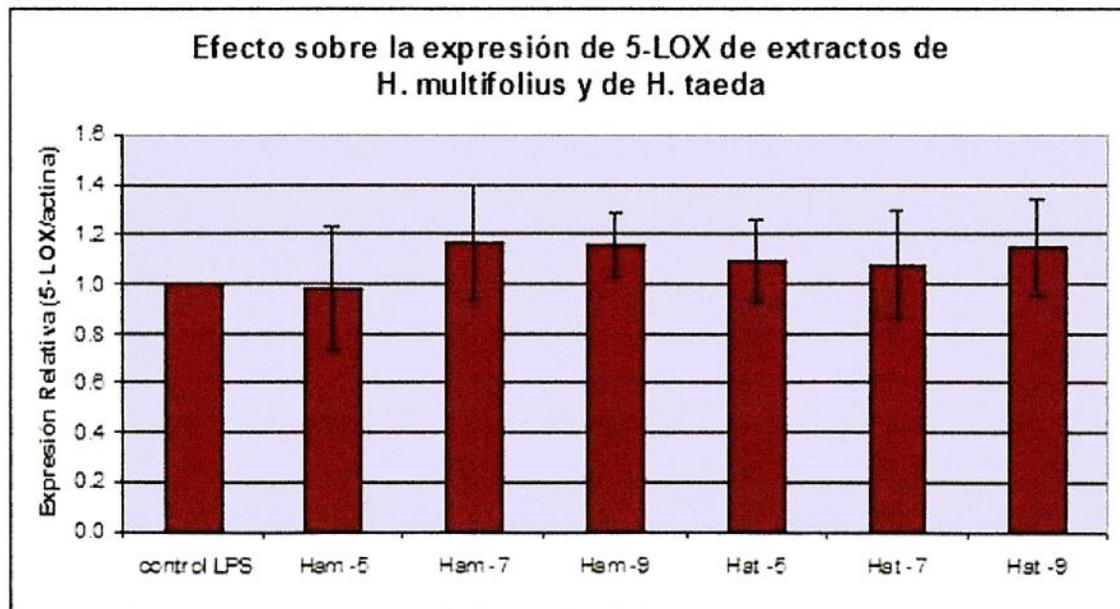


Fig. 6. Efecto de extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda* sobre la expresión de 5 LOX en células RAW 264.7.

Actividad 5.2: Determinación de la actividad antiinflamatoria oral.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda de extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda* a través del método del edema plantar

Metodología.

La actividad antiinflamatoria aguda se evaluó por vía oral en cobayos de la cepa Pirbright de Estados Unidos de 200–300 g de peso, con 2 a 4 semanas de edad y de ambos sexos, en ayunas por 12 horas antes del ensayo con agua ad libitum, a una temperatura de 18 a 20 °C induciéndoles edema plantar con inyección subcutánea de 0,1mL de una solución salina estéril de λ -carragenano al 1% en la aponeurosis plantar.

Los extractos etanólicos secos correspondientes a las especies *Haplopappus multifolius* y *H. taeda* se suspendieron en goma arábica al 5%, se sonicaron y posteriormente se separaron los residuos insolubles por filtración, para obtener soluciones de 25 mg/mL

Se dejaron 8 animales por cada grupo muestra y 12 controles a los que se les midió el volumen inicial de la pata (V_i) (previamente marcada) en un pletismómetro UGO BASILE.

* Grupo control: Se les administró el vehículo goma arábica al 5% (1 mL por 250 g cobayo).

* Grupo muestra: Se les administró la muestra en estudio por vía oral, mediante sonda gástrica de 6 french, a la dosis de 100 mg/Kg (volumen de 1mL considerando 250 g como peso promedio de los cobayos). Luego de una hora se les inyectó en la aponeurosis plantar 0.1 mL de la solución de λ -carragenano al 1 % en una solución salina estéril. A las tres horas de recibir el agente algésico se midió el volumen final (V_f) de la pata de cada animal. Se calculó la mediana del porcentaje de inflamación (% Imed) y la mediana del efecto antiinflamatorio (% EAImed) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Imed} = (V_f - V_i) / V_i \times 100$$

$$\% \text{ EAImed} = (I_c - I_m) / I_c \times 100$$

Donde:

I_c = inflamación de los animales controles (mediana)

I_m = inflamación de los animales que recibieron la muestra (mediana)

Se calculó el error típico (SEM) y la significancia del efecto de acuerdo al método no paramétrico de Wilcoxon, considerando significativo para un $p \leq 0,05$.

Como **fármaco de referencia** se usó **Naproxeno sódico**.

Resultados.

Tabla1: Actividad antiinflamatoria oral (% EAI) de los extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**) y de *H. taeda* (**Hat-6-E**)

Extracto	n	Dosis	% INFmed	% EAI ±SEM	p
Hat-6-E	8	100 mg/Kg	54,50	0 ± 10,28	0,5424
Ham-6-E	8	100 mg/Kg	55,60	0 ± 12,34	0,7562
Control	12	-	47,08		
Naproxeno sódico	12	4,0 mg/Kg	17,1	54,6 ± 0,8	0,0001

n = número de animales tratados con las respectivas muestras o controles

Se consideran significativos resultados con $p \leq 0.05$

Conclusión:

Los extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* (**Ham-6-E**) y de *H. taeda* (**Hat-6-E**) no mostraron actividad antiinflamatoria oral evaluada por el método del edema plantar en cobayos a la dosis de 100 mg/kg. No se pudo evaluar a dosis superiores por la insolubilidad de los extractos en el vehículo a utilizar.

Actividad 5.3: Determinación de actividad antiinflamatoria tópica

La actividad antiinflamatoria tópica se evaluará en ratones de la cepa CF1, de 25-30 g de peso, a los que se les induce inflamación tópica por aplicación de ácido araquidónico (AA) a la dosis de 2mg/oreja, de acuerdo a lo descrito por Lloret y Moreno^{LL}. Los extractos se administrarán usando como vehículo acetona, etanol o hexano, dependiendo de la solubilidad de éstos, a la dosis de 3 mg/ por oreja.

Como **fármaco de referencia** se usó **Nimesulida**.

Resultados:

Tabla: actividad antiinflamatoria de extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda*.

		Ácido araquidónico Dosis = 2 mg/oreja		
MUESTRA	Dosis mol/oreja	dosis mg/oreja	% efecto antiinflamatorio ± SEM	P
<i>Ham-6-E</i>		3	18,9 ± 7,6	0,0416
<i>Ham-6-E-C</i>		3	78,3 ± 4,5	0,0075
<i>Ham-6-E-F</i>		3	0	0,5731
<i>Hat 6-E</i>		3	72,7 ± 23,1	0,0001
<i>Hat 6-E-F</i>		3	41,3 ± 26,2	0,0004
<i>Hat 6-E-T</i>		3	56,6 ± 26,4	0,0006
Nimesulida	3,2x10⁻⁶	1,0	↑48,8 ± 4	0,01

Nimesulida: fármaco de referencia y cuyo % efecto máximo fue ↑ 48,8

SEM: error estandar de la media

P: porcentaje de significancia (los efectos son significativos si el $p \leq 0,05$)

N= número de ratones tratados: 8; **m=** número de ratones controles: 16

El **Hat-6-E** fue el extracto más activo como antiinflamatorio tópico frente a ácido araquidónico con un % de efecto de 72,7, siendo este efecto mayor que el efecto máximo obtenido con la Nimesulida. El **Ham-6-E** presentó un % de efecto menor, de 18,9 %, pero aún significativo. Sin embargo, cabe resaltar que el subextracto **Ham-6-**

E-C (de composición prevalentemente cumarínica) mostró el mayor efecto de todas las muestras ensayadas.

Los resultados presentados por los subextractos de *H. taeda* muestran que la subfracción **Hat 6-E-T** (subfracción rica en diterpenos y ésteres de monoterpenos), presentó mayor actividad antiinflamatorio tópica (56,6%) que el subextracto **Hat 6-E-F** (subfracción rica en flavonoides: dihidroflavonoles) cuyo efecto antiinflamatorio fue de 41,3%. Los efectos de ambas subfracciones fueron significativos.

Objetivo específico N°6: Establecer límites de seguridad en el consumo del “bailahuén” mediante estudios de toxicidad en la línea RLC de hepatocitos, en líneas celulares de origen epitelial (UCHT1) y con la determinación de toxicidad aguda (DL₅₀).

Actividad 6.1: Cultivo de células RLC, UCHT1. Ensayos de toxicidad celular.

Esta actividad se informó en conjunto con la actividad 4.5.

Actividad 6.2 Determinación de toxicidad oral aguda en ratas (DL₅₀).

Metodología.

Toxicidad oral aguda de bailahuén: Ham-6-E y Hat-6-E.

El estudio se realizó con ratones machos CF-1 (18-21 g), comprados en el Instituto de Salud Pública de Chile. Previo al estudio, los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad de Talca durante 5 días para su aclimatación. Los animales fueron separados en 7 grupos de 10 individuos cada uno y dejados en ayuno por 24 horas. Luego del ayuno, los animales recibieron en forma oral, por intubación gástrica, 1 mL/100 g las siguientes dosis de la muestra en estudio, suspendida en 8 % Tween 80:

GRUPO	Dosis (g/kg)
1	3,0
2	2,0
3	1,0
4	0,5
5	0,25
6	0,125
7 Control	vehículo

Los animales fueron observados cada 15 min durante la primera hora, cada media hora durante las dos horas siguientes, a las 6, 8 y 12 horas post-tratamiento y luego un vez por día durante 14 días. Durante los 14 días post-tratamiento los animales fueron mantenidos en un bioterio a 22 °C, 50 % humedad ambiental, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h y libre acceso a alimentación y agua.

Resultados.

Toxicidad de *Ham-6-E*

En las horas y días siguientes a la administración oral de la muestra, ningún animal presentó diarrea, vómitos, inapetencia, alteraciones locomotoras o algún otro signo de intoxicación.

Al final de los 14 días de observación, ningún animal había muerto ni presentaba algún tipo de alteración visible. Los pesos de los animales control y del grupo de dosis máxima (3,0 g/kg), al inicio y al final del experimento fueron los siguientes:

GRUPO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
1	19,8 ± 1,7	26,2 ± 1,7
7 Control	19,4 ± 1,4	27,6 ± 1,3

El valor de la DL₅₀ de la muestra se encuentra sobre los 3,0 g/kg.

Toxicidad de *Hat-6-E*

En las horas y días siguientes a la administración oral de la muestra, ningún animal presentó diarrea, vómitos, inapetencia, alteraciones locomotoras o algún otro signo de intoxicación.

Al final de los 14 días de observación, ningún animal había muerto ni presentaba algún tipo de alteración visible. Los pesos de los animales control y del grupo de dosis máxima (3,0 g/kg), al inicio y al final del experimento fueron los siguientes:

GRUPO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
1	19,7 ± 1,4	24,1 ± 1,6
7 Control	19,5 ± 1,5	23,6 ± 1,8

El valor de la DL₅₀ de la muestra se encuentra sobre los 3,0 g/kg.

Conclusión: el alto valor de la DL₅₀ indica ausencia de toxicidad oral aguda.

Objetivo específico N°7: Evaluar la actividad antibacteriana descrita para el “bailahuén” en infecciones intestinales, urinarias y cutáneas.

Actividad: Bioensayos de actividad antibacteriana de extractos y compuestos puros.

Metodología.

1.- Extractos vegetales

La actividad antibacteriana se evaluó en extractos etanólicos, subextractos de éstos y en liofilizados de infusiones acuosas de *Haplopappus multifolius* y *H.taeda* así como también, en compuestos puros aislados de las fracciones más activas de estos extractos.

Para mayor simplicidad en el trabajo experimental, los extractos se denominaron en forma abreviada:

Ham-E: extracto etanólico seco de *H. multifolius*.

Ham-E-C: subextracto de **Ham-E**, compuesto principalmente por cumarinas.

Ham-E-F: subextracto de **Ham-E**, compuesto principalmente por flavonoides.

Hat-E: extracto etanólico seco de *H. taeda*.

Hat-E-T: subextracto de **Hat-E**, compuesto principalmente por terpenos.

Hat-E-F: subextracto de **Hat-E**, compuesto principalmente por flavonoides.

Ham-I: infusión liofilizada de *H. multifolius*.

Hat-I: infusión liofilizada de *H.taeda*.

2. Microorganismos patógenos:

Los microorganismos estudiados son causantes de enfermedades infecciosas y pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica de la Universidad de Talca.

Se ensayaron las siguientes bacterias grampositivas: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*; las bacterias gramnegativas ensayadas fueron: *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp. *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*. Se utilizó además la levadura *Candida albicans*.

3. Preparación de los discos impregnados con extractos y subextractos:

Los extractos y subextractos se evaluaron impregnando discos de papel filtro (Whatman N°3) de 6 mm de diámetro con 5 y 10 mg de **Ham** y **Hat** pesados en una balanza Sartorius

4. Actividad antimicrobiana de extractos y subextractos:

Se utilizó la técnica de difusión en agar basándose en el Manual de Laboratorio Clínico Básico de Microbiología¹³. Cuatro o cinco colonias se hacen crecer en caldo soya (MERCK, Darmstadt Alemania) durante 2-5 horas, ajustando el inóculo a 0.5 de escala de McFarland. Esta suspensión se siembra en una placa de agar Mueller Hinton (MERCK, Darmstadt Alemania) con técnica en césped. Mediante pinzas estériles se incorporan a una placa los sensidiscos preparados con los extractos y en otra placa se incorporan los sensidiscos preparados con los subextractos. Se incuban a 37°C durante 18 horas en una estufa de cultivo MEMMERT BE600. Se usó como control positivo el antibiótico cloranfenicol.

La actividad antimicrobiana se determinó por el diámetro de los halos de inhibición, los que se informaron mediante cruces: + (7-9 mm de diámetro), ++ (10-16) y +++ (17-23).

5. Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros.

El estudio de la actividad antimicrobiana continuó sólo con las especies susceptibles. La detección de los compuestos posibles responsables de la actividad presentada por extractos y subextractos, se realizó mediante bioautografía. Para ello, todos los subextractos y un liofilizado activo, se cromatografiaron en cromatofolios de sílica gel 60 F254, MERCK, lográndose una buena separación de los compuestos mayoritarios de cada muestra. En cada placa cromatográfica, además de **Hat-E-T**, **Hat-E-F**, **Hat-I**, **Ham-E-C** y **Ham-E-F** se agregaron Ampicilina y Cloramfenicol como controles.

Paralelamente, se continúa el procedimiento de la siguiente manera: en 2 ml de caldo BHI (MERCK, Darmstadt, Alemania) se inócula el microorganismo correspondiente, este caldo se deja en la estufa a 37°C durante 6 horas. Luego de las seis horas, los 2 ml de caldo con los microorganismos se incorporan a 40 ml de agar BHI al 0.8% previamente reconstituido y enfriado hasta una T° óptima que permita la viabilidad de los microorganismos y que impida la solidificación del agar. Posterior a ésto, la mezcla es vertida sobre la placa cromatográfica contenida en una placa Petri de 12 cm. Se deja enfriar hasta que solidifique el agar y se incuban a 37 °C con la placa semiabierta. Después de seis horas, se revisa el crecimiento y formación de halo en cualquier región del agar sobre el cromatofolio donde están los compuestos. En caso de no existir halo o de haber poco crecimiento, se deja en la estufa y se revisa cada 2 horas.

Al momento de evidenciar halos de inhibición en cualquier sector del cromatofolio, se retira la placa Petri que lo contiene de la estufa con el fin de evitar un sobre crecimiento que interfiera en la visualización del halo y se interprete como un falso negativo.

Conociendo los R_f de los halos de inhibición, que corresponden a los de los compuestos allí presentes, se repite el ensayo sobre placas cromatográficas con los compuestos puros, sólo utilizando las especies susceptibles.

Finalmente, se determina la CMI de los compuestos puros activos de acuerdo a la técnica de Ericsson y Cherris¹⁴.

Resultados.

Actividad antimicrobiana de extractos

Luego de las 18 horas de cultivo, se observaron halos de inhibición en las placas con *B. cereus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *P. vulgaris* y *E. faecalis*, siendo entre ellos, *Bacillus cereus* la bacteria más afectada como muestra la **Tabla 1** y la **Fig. 1**:

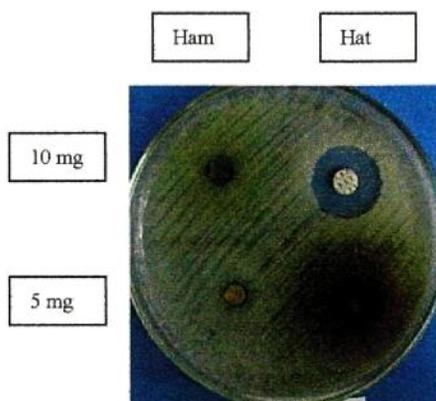


Fig. 1: *B. Cereus*

Tabla 1: actividad antimicrobiana de extractos

	5 mg	10 mg
<i>Bacillus cereus</i>		
Hat	++	+++
Ham	+	+
<i>S. epidermidis</i>		
Hat	+	+
Ham	+	+
<i>Str. A</i>		
Hat	+/-	+/-
Ham	-	-
<i>Str. B</i>		
Hat	+/-	+/-
Ham	-	-
<i>P. vulgaris</i>		
Hat	-	-
Ham	+	+
<i>S. aureus</i>		
Hat	+/-	+/-
Ham	+	+
<i>Ent. Faecalis</i>		
Hat	+	+
Ham	-	-

Actividad antimicrobiana de subextractos

Con los subextractos, se observó mayor actividad frente a *B. cereus* (Fig. 2), *S. aureus* (Fig. 3) y *S. epidermidis* (Tabla 2), razón por la cual el estudio siguió solo con estas bacterias.

Tabla 2: actividad antimicrobiana de subextractos

	<i>Ham-I</i>	<i>Hat-E-F</i>	<i>Hat-I</i>	<i>Ham-E-C</i>	<i>Hat-E-T</i>	<i>Ham-E-F</i>	<i>Cloranfenicol</i>
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+++
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+++
<i>S. agalactiae</i>	-	-	+	-	-	-	+++
<i>S. pyogenes</i>	++	++	+++	-	-	+	+++
<i>B. cereus</i>	-	+	++	+	+	++	+++
<i>S. aureus</i>	++	++	+++	++	+	+++	+++
<i>S. epidermidis</i>	-	+	++	++	+/-	+++	+++
<i>Proteus. sp</i>	-	-	-	-	-	+	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-

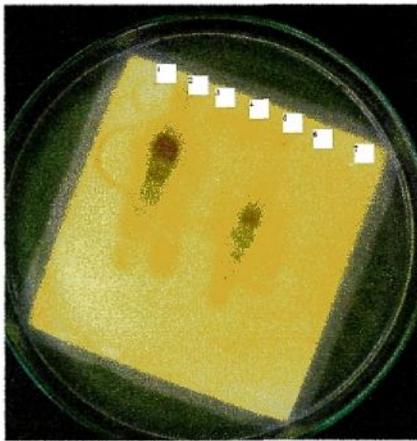


Fig. 2: *B. Cereus*:

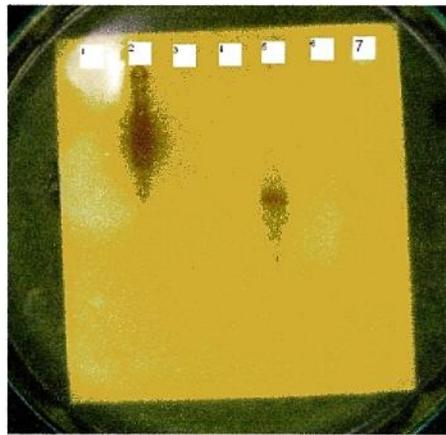


Fig. 3: *S. aureus*

1) Cloranfenicol, 2) *Ham-E-F*, 3) *Ham-E-C*, 4) *Hat I*, 5) *Hat-E-F*, 6) *Hat-E-T*, 7) Ampicilina

En los cromatogramas bidimensionales de cada subextracto (Fig.4 y 5), se observaron las zonas de inhibición de crecimiento de *B. Cereus* y *S. aureus* donde se encuentran los compuestos activos responsables de ello. Lo mismo ocurrió con *S. epidermidis*.

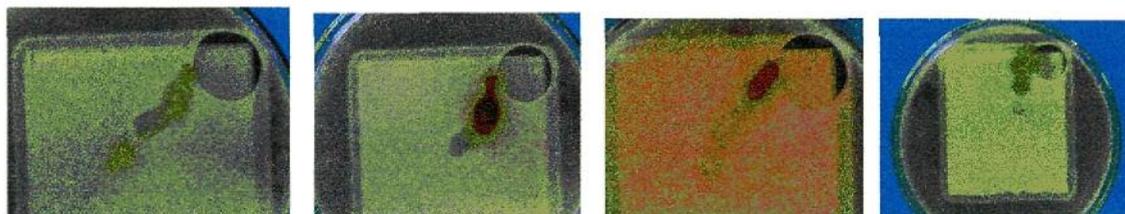


Fig. 4: *B. cereus* con los subextractos **Ham-E-C**, **Ham-E-F**, **Hat-E-F** y **Hat-I** respectivamente.

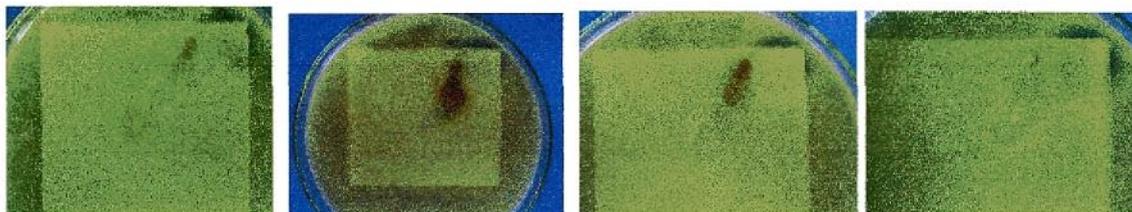


Fig. 5: *S. aureus* con los subextractos **Ham-E-C**, **Ham-E-F**, **Hat-E-F** y **Hat-E-T** respectivamente.

Una vez identificadas en el cromatograma las zonas activas, se ensayaron con *B. cereus*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, los compuestos puros coincidentes con aquellos valores de R_f . En los tres casos, se obtuvo inhibición significativa para los compuestos identificados con las siglas **S2**, **F8 C10-6** y **Tae-7** (**Fig. 6**, **7**, **8** y **Tabla 3**)



Cloranfenicol (+++), **Hat-6-E-T**(++), S1(-), S2 (++), S3 (+), S6 (++)

Ham-6-E-C (++) , Cloranf., **Ham-6-E-F** (++) , F8 C10-6 (+), Ham 12 (-), Geranicumar (-)

Hat-6-E-F (++) , espacio vacío, Cloranf.(+++), Tac-31 (+), Tac 50 (+), espacio vacío, Tac-7 (++) , Tac-34 (-), Tac 30 (+)

Fig. 6: Actividad antimicrobiana de compuestos puros contra *B. cereus*.



Cloranfenicol (+++), **Hat-6-E-T**(++), S1(-), S2 (++), S3 (+), S6 (++)

Ham-6-E-C (++) , Cloranf., **Ham-6-E-F** (++) , F8 C10-6 (+), Ham 12 (-), Geranicumar (-)

Hat-6-E-F (++) , espacio vacío, Cloranf.(+++), Tac-31 (+), Tac 50 (+), espacio vacío, Tac-7 (++) , Tac-34 (-), Tac 30 (+)

Fig. 7: Actividad antimicrobiana de compuestos puros contra *S. aureus*



Hat-6-E-T (+), S1 (-), Cloranfenicol (+++), S2 (+), S3 (-), S6 (-)



Ham-6-E-C (+), **Ham-6-E-F** (+++), Cloranf. (+++), F8 C10-6 (+), Geranilcumar (-), Ham-12 (-)

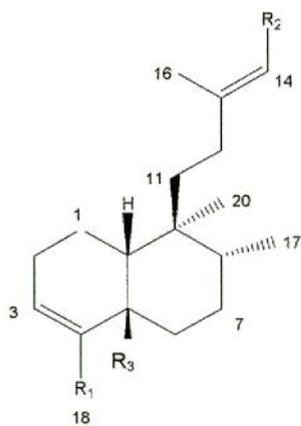


Hat-6-E-F, espacio vacío, Cloranf. (+++) Tae-31 (-), Tae 50 (-), espacio vacío, Tae-7 (+), Tae-34 (-), Tae 30 (-)

Fig. 8: Actividad antimicrobiana de compuestos puros contra *S. epidermidis*.

Tabla 3: actividad antimicrobiana de compuestos puros

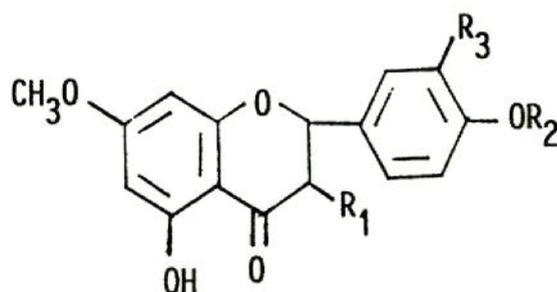
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Hat-6-E-T	++	++	+
S1	-	-	-
S2	++	+	+
S3	+	+	-
S6	++	++	-
Ham-6-E-C	++	++	+
Ham-6-E-F	++	++	+++
F8 C10-6	+	+	+
Ham-12	-	-	-
Geranilcumarina	-	-	-
Hat-6-E-F	++	+++	++
Tae-31	+	++	-
Tae-50	+/-	+	-
Tae-7	++	+++	++
Tae-34	+	++	-
Tae-30	+	+	-



R₁ R₂ R₃ (S2)

CH₂OCOCH₃ COOH CH₃

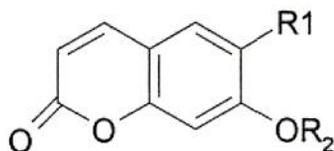
Clerodano 13



R₁ R₂ R₃

7 OH H H

7-metilaramadendrina (Tae-7)



R₁ OH

R₂ H

esculetina (F8 C10-6)

Las CMI de los compuestos antibacterianos más activos, aislados de los extractos etanólicos de *Haplopappus multifolius* (F8C10-6=esculetina) y de *H. taeda* (S2=clerodano-13 y Tae-7=7-metilaramadendrina), están en proceso de determinación.

Objetivo específico N°8: Difundir los conocimientos alcanzados a todos los sectores involucrados en el tema: profesionales del área Salud, empresarios de la industria farmacéutica, agricultores y público en general.

Actividades 8.1: 3 Charlas (Santiago, La Serena y Talca).

8.2: Edición de Folletos de divulgación.

8.3: Presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales.

Con la necesidad de mantener los resultados obtenidos en la privacidad ante la eventualidad de patentar los extractos, por acuerdo con el Jefe de la Unidad de Estudios y Proyectos, se dió por cumplido el Objetivo específico N°8 con las actividades 8.1 y 8.3 cuyos resultados están detallados en la sección 5 (Logros e impactos del Proyecto).

Objetivo específico N°9: Verificar “*in vivo*”, actividad hepatoprotectora de *Haplopappus multifolius*.

Actividad: Ensayos del efecto hepatoprotector de un extracto etanólico seco de *Haplopappus multifolius* en ratas Sprague Dawley con daño hepático agudo causado por una inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono.

Metodología.

1. 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".

2. Diseño experimental y tratamiento de los animales. Se utilizaron 48 animales, 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 solamente una solución hidroalcohólica (0,0005% V/V). El grupo **2** recibió por 7 días oralmente el extracto de *H. multifolius* y fue sacrificado al siguiente día. Para inducir daño hepático se aplicó una dosis única de tetracloruro de carbono (CCl₄) (0,5 mL/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 72h después de la dosis de CCl₄. Los grupos **5** y **6** recibieron el extracto de *H. multifolius* durante 7 días. Luego de 1,5 h de la última dosis del bailahuén ambos grupos recibieron una dosis de CCl₄, siguieron recibiendo *H. multifolius* y posteriormente fueron sacrificados a las 24h el grupo **5** y a las 72h el grupo **6**. A los grupos **7** y **8** se les administró la misma dosis intraperitoneal de CCl₄ y luego 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** fue sacrificado a las 72h después de la dosis de CCl₄.

Además, se incluyeron dos grupos, uno que fue pretratado con Silimarina por 7 días y 1,5 h de la última dosis se les administró la misma dosis intraperitoneal de CCl₄. El otro grupo, recibió el CCl₄ intraperitonealmente y luego de 2 h se comenzó la administración de Silimarina.

En todos los casos que correspondía, el extracto de *H. multifolius* administrado fue de 100µg 3 veces al día, entregado en volúmenes de 200 µL. La Silimarina fue suministrada en 3 dosis diarias de 200µg cada una en 200 µL de volumen. En el caso del control (grupo **1**), también fueron administrados 200µl de la solución hidroalcohólica 3 veces al día. El extracto natural se administró directamente al esófago de las ratas mediante una aguja de intubación especialmente diseñada para estos fines, la cual posee un diámetro adecuado a la especie y una punta roma en

forma esférica que evita el daño y por consiguiente el rechazo del animal. Las ratas fueron anestesiadas y las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca.

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) 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, se perfundieron los hígados de 3 ratas *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 fueron utilizadas para determinar la actividad GSH-transferasa. A los otros 3 animales de cada grupo, se les tomó una biopsia del hígado el cual fue fijado en formalina tamponada al 10%. A estas biopsias se les realizó una tinción con hematoxilina-eosina y analizadas por el anatómo patólogo.

3. 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, \square GT, FA, bilirrubina total y bilirrubina directa. Además, a los grupos control tratados solamente con la solución hidroalcohólica y los tratados con la solución 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 veterinario especializado.

Resultados.

1. Evaluación del efecto de la administración oral de *H. multifolius* analizado mediante pruebas sanguíneas. Muestras de sangre fueron extraídas de cada animal por punción cardíaca, 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, globulinas, Bilirrubina total, Fosfatasa alcalina (FA), Lactato deshidrogenada (LDH), Aspartato amino-transferasa (GOT o AST), Creatinina.

La **Tabla 1** muestra los resultados obtenidos para los grupos controles **1** y **2**. **Grupo 1:** animales tratados vía oral con 200 μ L de solución hidroalcohólica (0,0005%), 3 veces al día; **Grupo 2:** animales tratados vía oral 3 veces al día con 200 μ L de una solución de *H. multifolius* de 0,5 μ g/ μ L. Los animales no mostraron cambios

significativos en ningún parámetro, producto del tratamiento con este extracto vegetal a la dosis utilizada, permaneciendo dentro de los rangos normales.

Tabla 1. Perfil bioquímico de ratas tratadas con extracto etanólico seco de *Haplopappus multifolius*.

día 7 de tratamiento	Grupo 1 (vehículo)		Grupo 2 (<i>H. multifolius</i>)	
	Promedio	DS	Promedio	DS
calcio (mg/dL)	10.0	0.1	9.9	0.3
fosforo (mg/dL)	7.5	0.3	7.6	0.2
glicemia (mg/dL)	93	5	80	4
NUS (mg/dL)	16.1	1.1	16.6	0.7
Colesterol total (mg/dL)	32.8	2.2	36.8	3.2
Proteínas (g/dL)	6.0	0.1	5.9	0.1
Albumina (A) (g/dL)	3.3	0.0	3.3	0.0
Globulinas (G) (g/dL)	2.6	0.1	2.6	0.1
Indice A/G	1.27	0.04	1.28	0.07
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.07	0.01	0.07	0.01
Fosfatasas alcalinas (U/L)	269	25	304	17
GPT (U/L)	47	3	44	1
GOT (AST) (U/L)	172	9	148	9
Creatinina (mg/dL)	0.66	0.03	0.73	0.03

Promedio y desviación estándar de 5 animales por cada grupo.

2. Determinación de niveles de transaminasas a nivel plasmático.

En este experimento, se midió la enzima hepática GOT (AST) y GPT (ALT) las cuales son liberadas a la circulación cuando existe daño en hepatocitos. En la **Fig. 1**, se muestra el resultado para los niveles séricos de esta enzima detectados a las 24h de aplicado el CCl₄ i.p. en los diferentes grupos. Como se puede observar, CCl₄, produjo un aumento de la actividad de la GOT sérica, el cual fue protegido parcialmente en el grupo pretratado con el extracto de *H. multifolius*, que estaban tomando el extracto por 7 días previos al insulto. Esta disminución fue estadísticamente significativa respecto al control tratado sólo con CCl₄ (p<0,05). El tratamiento con *H. multifolius*, 2 horas después de la aplicación del CCl₄, no produjo diferencias significativas en la disminución en los niveles plasmáticos de GOT.

Por otra parte, al medir los niveles plasmáticos de GPT, esta mostró una leve disminución en las ratas pretratadas con *H. multifolius*, respecto al control tratado sólo con el hepatotóxico. Sin embargo esta disminución no resultó ser estadísticamente significativa. Esto se puede deber a que esta enzima es menos sensible a la magnitud del daño hepático, debido a que es una enzima citosólica, que es liberada rápidamente frente a daños en los hepatocitos. Por el otro lado, GOT corresponde a una enzima anclada a membrana mitocondrial, que es liberada cuando

el daño en el hepatocito es de mayor magnitud. Por este motivo, la disminución de GOT nos estaría dando cuenta de un daño hepático menos severo.

Al comparar el efecto del extracto etanólico de *H. multifolius*, con un hepatoprotector conocido en uso clínico como es la **Silimarina**, no se observó disminución en los niveles plasmáticos de GPT ni de GOT, al utilizar ésta como tratamiento (posterior al insulto) o como preventivo (7 días previos a la inducción del daño hepático).

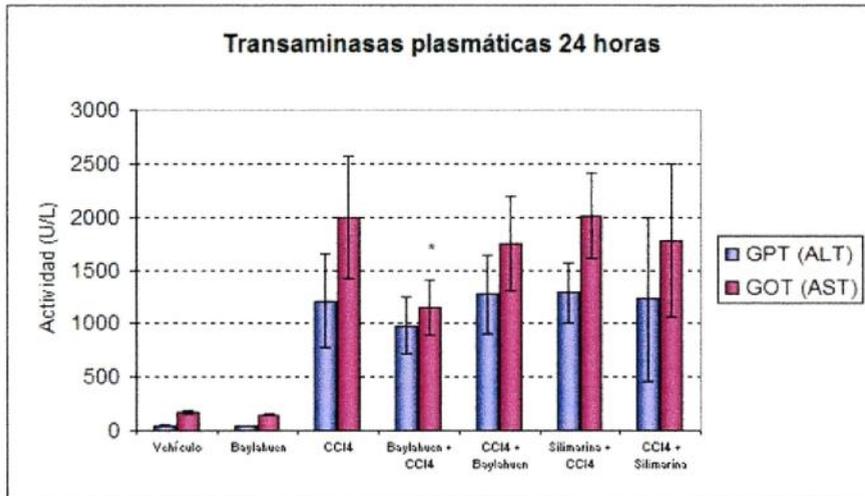


Fig. 1. Transaminasas plasmáticas 24 horas posterior a la inyección intraperitoneal con CCl₄. Al grupo de ratas control, se les produjo un daño hepático agudo mediante la aplicación intraperitoneal de CCl₄. Dos grupos de ratas fueron pretratadas con un extracto de *H. multifolius* (bailahuén) o de Silimarina por 7 días previos a la inyección con CCl₄ (bailahuén+ CCl₄ y Silimarina+ CCl₄, respectivamente). Otros dos grupos fueron inyectados con el CCl₄ y 2 horas después comenzaron con el tratamiento con los extractos (CCl₄+bailahuén y CCl₄+silimarina). También fueron incluidos grupos control del vehículo y *H. multifolius*. Cada grupo está compuesto por 5 ratas. * p<0,05 respecto al control tratado sólo con CCl₄.

En la **Fig. 2**, se muestran los resultados de GOT y GPT después de 72h de producido el daño hepático agudo. Se puede observar que ambas transaminasas bajan significativamente su nivel respecto de las 24 horas, aunque encontrándose aún levemente elevadas. Se observa una pequeña disminución en la GOT y especialmente en la GPT, respecto al control tratado sólo con CCl₄, sin embargo, estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas.

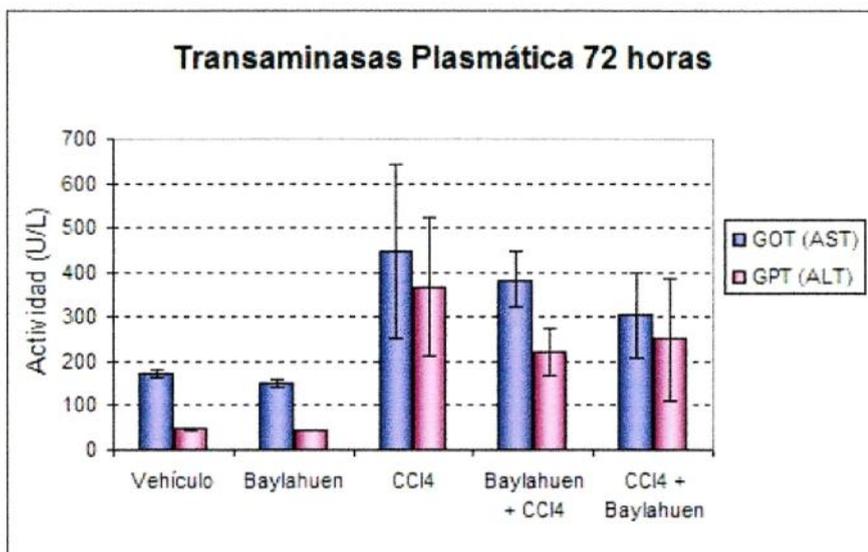


Fig. 2. Transaminasas plasmáticas 72 horas posterior a la inyección intraperitoneal con CCl₄. Grupos de 5 ratas fueron tratadas según se indica en el gráfico (ver detalles en leyenda Fig. 1). A las 72 horas, las ratas se anestesiaron y se les sacó sangre por punción cardiaca para el análisis de los niveles de transaminasas.

5. Impactos y logros del proyecto.

Impactos tecnológicos.

Los resultados obtenidos en las distintas actividades realizadas son suficientemente interesantes lo que permite intentar el patentamiento de los extractos estudiados. Para ello, se presentarán al



CONCURSO DE INCENTIVO AL PATENTAMIENTO PARA PROYECTOS DEL SISTEMA DE EDUCACION SUPERIOR CHILENO-CONVOCATORIA 2007

Impactos científicos.

A. Publicaciones

- Se redactó una publicación que fue enviada a la Revista FITOTERAPIA, actualmente en proceso de revisión. En ésta se describe la composición química en

metabolitos secundarios no flavonoides de *Haplopappus taeda* y su posible contribución a la actividad antioxidante. Se adjunta una fotocopia del artículo en ANEXOS.

Título: **“Non flavonoid compounds from the resinous exudates of *Haplopappus taeda*, a Chilean medicinal plant”.**

Autores: Francesca Faini*, Cecilia Labbé, René Torres, Jesús M. Rodilla, Lucía Silva and Franco Delle Monache.

- Un manuscrito en preparación describiendo la actividad antioxidante de los extractos de *Haplopappus multifolius* y *H.taeda*.
- No se han preparado más trabajos ante la posibilidad de patentar los extractos de *Haplopappus* estudiados lo cual impide su difusión pública. Una vez pasado el periodo de restricción, éstos se harán públicos en artículos científicos y luego en una Monografía.

B. Eventos de divulgación científica

Congresos

XVII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BOTÁNICA DE CHILE, TALCA, ENERO, 2006

- **Poster 1:** “CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE *HAPLOPAPPUS BAYLAHUEN*, III REGION, CHILE”.

Descripción: Trabajo realizado en el marco del proyecto con una especie de *Haplopappus* estrechamente relacionada con *H.multifolius* y *H.taeda*.

Autores: Faini F., Labbé C., Torres R., Vogel H., González B. y San Martín J.

- **Poster 2:** “FLAVONOIDES Y ÉSTERES DE α -TERPINEOL COMO ANTIOXIDANTES EN EXUDADOS RESINOSOS DE *HAPLOPAPPUS*”.

Descripción: Composición química parcial de *Haplopappus taeda*.

Autores: Faini F., Torres R., Villanueva I., Rodilla J. y Silva L.A.

XLIX REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE, PUCÓN, NOVIEMBRE, 2006.

- **Poster:** "CITOTOXICIDAD EN *HAPLOPAPPUS SPP.*".

Descripción: Citotoxicidad de extractos de *Haplopappus multifolius* y *H.taeda*, determinada *in vitro* en líneas celulares inmortales. Biol.Res. **39** (4) supl B, 2006

Autores: Caviedes P., Caviedes R., Opazo P., Faini F., Jaña F., Labbé C. y Torres R.,

PRIMER CONGRESO IBEROAMERICANO DE FITOTERAPIA, MÉXICO DC, MÉXICO, NOVIEMBRE 2006.

- **Poster 1:** "POTENCIAL ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE *HAPLOPAPPUS SPP.*".

Descripción: En el poster se presentan los resultados preliminares de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de los extractos de *Haplopappus multifolius* y *H.taeda*. Revista de Fitoterapia, **6**, Supl.I, 107, 2006

Autores: C. Delporte, N. Backhouse, C. Padilla, V. Carrasco, F. Faini, C. Labbé y R. Torres.

- **Poster 2:** "CITOTOXICIDAD EN *HAPLOPAPPUS SPP.* (BAILAHUÉN)".

Descripción: En el poster se describe la citotoxicidad de extractos de bailahuén en 2 líneas celulares, En la línea UCHT 1(células tiroideas) y RLC, de hepatocitos. Revista de Fitoterapia, **6**, Supl.I, 97, 2006

Autores: Caviedes P., Caviedes R., Opazo P., Faini F., Jaña F., Labbé C. y Torres R.,

1ER SIMPOSIO INTERNACIONAL: MATERIAS PRIMAS PARA LA INDUSTRIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS, LOS ANGELES, CHILE, NOVIEMBRE 2006.

Participación de F. Faini en Mesa Redonda presentando

"AVANCES EN LA MONOGRAFÍA DEL BAILAHUÉN"

Copia del material de las presentaciones se encuentra en ANEXOS.

C. Integración a redes de Investigación

Laboratorios:

- **Dr. José San Martín.** Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología., Universidad de Talca.

- **Dr. Fernando Gable.** Anatómo Patólogo. Campus Centro-Sur. Facultad de Medicina. Hospital Clínico San Borja-Arriarán.

Impactos en Formación.

Pasantías y Unidades de Investigación de pregrado: 3

- **Pablo Díaz y José Awad.** Estudiantes de Química y Farmacia, Universidad de Chile. **“Evaluación de la actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda*”.**
- **Fabián Jaña.** Estudiante de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile **“Efecto de extractos de baylahuen en cultivos de líneas celulares”.**
- **Alfredo Molina.** Estudiante de Química y Farmacia. Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. **“Efectos antioxidantes de extractos naturales medidos por la protección de lípidos y los tioles microsómicos”**

Tesis de Pregrado: 2

- **Verónica del Carmen Carrasco Sánchez.** Tesis para obtener el grado de Licenciado en Tecnología Médica de la Escuela de Tecnología Médica, Universidad de Talca. **“Actividad antimicrobiana de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda*” sobre bacterias Gram positivo, negativo y *Candida albicans*.**
- **Consuelo Belén Castro Galdames.** Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. **“Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y antiinflamatoria in vivo de dos especies de *Haplopappus*: *H.taeda* y *H.multifolius*”.**

Unidad de investigación de Postgrado: 1

- **Víctor Manuel González Lira:** Estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. **“Efectos antioxidantes de extractos secos de hojas de *Haplopappus multifolius* y *H. taeda* medidos por la**

protección de lípidos y los tioles microsómicos de la oxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato”.

6. Problemas enfrentados durante el Proyecto.

- El principal problema enfrentado durante el proyecto, fue la pérdida de resultados que se habían obtenido en la **Actividad 2** a causa del incendio ocurrido en la Facultad en agosto del 2006 y que destruyó totalmente el Laboratorio de investigación de la Prof. Sylvia Copaja, integrante del equipo técnico de este Proyecto. El mayor daño estuvo en la pérdida total del equipamiento de alto costo (HPLC), imposible de reponer en un corto plazo y necesario para cumplir con el objetivo propuesto. Esto significó reponer todo el material perdido (Columnas, material de vidrio, reactivos, disolventes, etc) y conseguir un espacio para trabajar en un equipo a préstamo en algún Laboratorio de otra Institución. No fue fácil, puesto que estos equipos son escasos y de uso bastante restringido. Finalmente los análisis se pudieron repetir entre enero y marzo del presente año. Para solventar económicamente esta actividad, se recurrió a parte del dinero destinado a difusión (previa autorización del Supervisor), a gastos generales y recortes a las otras actividades. No se utilizó el dinero destinado a imprevistos. Este hecho también explica en parte, el mayor gasto del Item Materiales e Insumos.

- En el mismo mes de agosto, hubo una contaminación bacteriana en el Laboratorio del Dr. Caviedes, lo que significó la pérdida de algunos experimentos que requieren de bastante tiempo. Esta situación obligó a la repetición de dichos ensayos y la prolongación del contrato de una persona técnico que los realizaba (Patricia Opazo), por 2 meses adicionales.

En noviembre del 2006, se contrató con un n° mayor de horas a Margarita Montoya con el fin de repetir ensayos de hepatoprotección “in vivo”. Esta actividad, no contemplada originalmente, también abultó el Item Materiales e insumos.

Ambos contratos explican el mayor gasto del programado inicialmente en el Item Recursos Humanos y se financiaron con el dinero destinado a Servicios a terceros.

IV. INFORME DE DIFUSION

Con la aprobación del Jefe de la Unidad de Estudios y Proyectos, Sr. Mauricio Cañoles, las actividades de difusión realizadas e informadas en la sección Impactos y Logros del Proyecto (Impactos científicos), fueron aceptadas en reemplazo de las acciones propuestas inicialmente. En ANEXOS, se incluye el material presentado.

V. ANEXOS

ANEXO 1: Escrito enviado a publicar a la revista FITOTERAPIA:

Phytochemical communication

Non flavonoid compounds from the resinous exudates of *Haplopappus taeda*, a Chilean medicinal plant.

Francesca Faini^{a,*}, Cecilia Labbé^a, René Torres^b, Jesús M. Rodilla^c, Lucía Silva^c and Franco Delle Monache^d.

^a*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.*

^b*Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Avenida Bernardo O'Higgins 3363, Santiago, Chile.*

^c*Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilha, Portugal*

^d*Dipartimento di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive, Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italia*

*Corresponding autor. Tel. : + 56-2-978 7402, Fax + 56-2-271 3888.

E-mail address : ffaini@uchile.cl

Abstract

Two new phenolic esters: 9-*trans*-p-coumaroyloxy- α -terpineol (**1**) and 7-*trans*-p-coumaroyloxy-taedol (**2**) with free radical scavenger activity; taedol; 3-phenylpropanoic acid and three known clerodanes: 18-acetoxy-*cis*-cleroda-3,13 E-dien-15-*oic* acid, 18-hydroxy-*cis*-cleroda-3,13 E-dien-15-*oic* acid and *cis*-cleroda-3,13 E-dien-15,18-diol (**3**), were isolated from the extract of resinous exudates from *Haplopappus taeda* upper parts. Structures for the new compounds are proposed on spectroscopic evidence and a *cis* stereochemistry at the decalin junction for **3**, is reported.

Keywords: *Haplopappus taeda*; Resinous exudates; α -terpineol and taedol derivatives; Free radical scavenger activity; *cis-ent*-clerodanes.

1. Plant

Aerial parts of *Haplopappus taeda* Reiche (Asteraceae) [1], were collected in January (Summer) 2004 at Termas "El Flaco", San Fernando (VI Región, Chile) and identified by Dr. José San Martín, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. A voucher specimen (AJIM 2488) is deposited at the Herbarium of the same University.

2. Uses in traditional medicine

Resinous leaves of the plant are popularly used as digestive, as antiseptic, and also in relief of liver ailments or intestinal and urinary disorders [2].

3. Previously isolated classes of compounds

Flavonoids [3], a monoterpene (taedol) [3], diterpenoids [3, 4, 5].

4. New isolated constituents

9-*trans*-p-coumaroyloxy- α -terpineol (**1**): Mp 108° C, $[\alpha]_D^{20} + 15.8$ (c 0.44, CH₂Cl₂); UV_{max} (MeOH): 244, 290 nm; IR bands (KBr): 3550, 1725, 1640, 1585 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.19 (3H, s, H-10), 1.63 (3H, s, H-7), 1.25 and 1.75 (2H, m, H-5), 1.82 (2H, m, H-6), 1.85 (1H, m, H-4), 1.98 (2H, m, H-3); 4.15 and 4.28 (2H, d, J 11.4 Hz, H-9), 5.40 (1H, bs, H-2), 6.26 (1H, d, J 16.0 Hz, H-2'), 6.82 (2H, d, J 8.5 Hz, H-6', H-8'), 7.37 (2H, d, J 8.5 Hz, H-5', H-9'), 7.62 (1H, d, 16.0 Hz, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 21.1 (C-10), 23.2 (C-7), 24.1 (C-3), 25.8 (C-5), 30.9 (C-6), 41.1 (C-4), 69.6 (C-9), 73.9

(C-8), 114.3 (C-2'), 116.0 (C-6', C-8'), 120.3 (C-2), 126.3 (C-4'), 130.3 (C-5', C-9'), 133.9 (C-1), 145.4 (C-3'), 159.1 (C-7'), 167.8 (C-1'); Relevant HMBC connections: H-2/C-4, C-6, C-7; H-7/C-1, C-2, C-6; H-9/C-3, C-4, C-8, C-10, C-1'; H-10/C-4, C-9; H-2'/C-1', C-4'; H-3'/C-1', C-5', C-9'; Relevant NOESY correlations: H-4/H-9 and H-10; EIMS m/z (rel. int.): 316 (M^+ , 10), 298 ($M^+ - H_2O$), 147 (p-coumaroyl $^+$, 100); HREIMS. m/z (rel.int.) 316.3813 (M^+ , 20). Calc. for $C_{19}H_{24}O_4$. All spectroscopic data are very similar to haplofolin, a diastereomer with a *cis* configuration at C-2'-C-3' double bond isolated from *Haplopappus multifolius* [6].

DPPH scavenging activity: IC_{50} 75.5 $\mu g/mL$ (quercetin as positive control: IC_{50} 15.3 $\mu g/mL$).

7-*trans*-p-coumaroyloxy taedol (**2**): Mp 107 ° C, $[\alpha]_D^{20} + 25.8$ (c 0.50, CH_2Cl_2); UV $_{max}$ (MeOH): 244, 290 nm; IR bands (KBr): 3550, 1725, 1640, 1585 cm^{-1} ; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.43 (3H, *s* H-10), 1.85 (1H, *m*, H-4) 1.88 and 2.16 (4H, *m*, H-5 and H-6), 3.54 and 3.72 (2H, *d*, J 9.5 Hz, H-9), 4.29 (1H, *m*, H-3), 4.63 (2H, *bs*, H-7), 5.83 (1H, *bs*, H-2), 6.34 (1H, *d*, J 16.0 Hz, H-2'), 6.80 (2H, *d*, J 8.5 Hz, H-6', H-8'), 7.45 (2H, *d*, J 8.5 Hz, H-5', H-9'), 7.62 (1H, *d*, 16.0 Hz, H-3'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 20.9 (C-5), 26.0 (C-6), 27.6 (C-10), 48.4 (C-4), 67.9 (C-7), 76.2 (C-3), 78.1 (C-9), 79.4 (C-8), 114.9 (C-2'), 116.9 (C-6', C-8'), 123.3 (C-2), 127.1 (C-4'), 131.2 (C-5', C-9'), 140.3(C-1), 146.9 (C-3'), 161.4 (C-7'), 168.9 (C-1'); Relevant HMBC connections: H-2/C-4, C-6, C-7; H-7/ C-1, C-2, C-6, C-1'; H-9/C-3, C-4, C-8, C-10; H-10/C-4, C-9; H-2'/C-1', C-4'; H-3'/C-1', C-5', C-9'. Relevant NOESY correlations: H-4/H-3 and H-10; TOF-EIMS m/z (rel. int.): 353.1359 (70, $M^+ + Na$). Calc. for $C_{19}H_{22}O_5$ (330.1462). This is the first report of this compound.

DPPH scavenging activity: IC_{50} 65.7 $\mu g/mL$ (quercetin as positive control: IC_{50} 15.3 $\mu g/mL$).

ent-5 α -*cis*-cleroda-3,13 E-dien-15,18-diol (**3**) Colourless oil, $[\alpha]_D^{20} -13,9$ (c 0.36, $CHCl_3$), IR bands (KBr): 3346, 3330 cm^{-1} ; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 0.74 (3H, *d*, J 6.0 Hz, H-17), 0.78 (3H, *s*, H-20), 1.14 (3H, *s*, H-19), 1.29 and 1.35 (2H, *m*, H-7), 1.10 and 1.98 (2H, *m*, H-6), 1.33 (1H, *m*, H-10), 1.45 (1H, *m*, H-8), 1.41 and 1.62 (2H, *m*, H-11), 1.69 (3H, *s*, H-16), 2.16 (2H, *m*, H-2), 4.15 (4H, *m*, H-15, H-18,), 5.40 (1H, *t*, J 6,6 Hz, H-14), 5.60 (1H, *bs*, H-3), ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 15.8 (C-17), 16.9 (C-20), 17.5 (C-16), 17.5 (C-1), 23.8 (C-2), 28.9 (C-7), 34.7 (C-19), 32.7 (C-12), 36.5 (C-11), 40.1 (C-9), 36.9 (C-6), 37.5 (C-8), 59.6 (C-15), 64.8 (C-18), 122.9 (C-14), 124.9 (C-3), 143.3 (C-4), 140.9 (C-13).

All signals were confirmed by HSQC and HMBC experiments. Relevant NOESY correlations: H-10/H-8 and H-19, H-19/H-7 β and H-2 β , H-14/H-12; HREIMS m/z (rel. int.): 306.2261(M⁺, 28) Cal. for C₂₀ H₃₄ O₂. NOESY correlations are consistent with a *cis* stereochemistry at the decalin junction which has not been reported before for this compound.

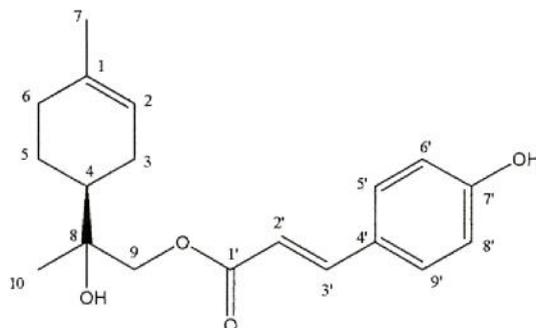
A previous chemical study done on a whole extract of *H. taeda* reported that the species produces only labdane diterpenoids in great amount [3]. The isolation of a *cis-ent*-clerodane in our study would therefore suggest botanical differences in the plant material used in each case.

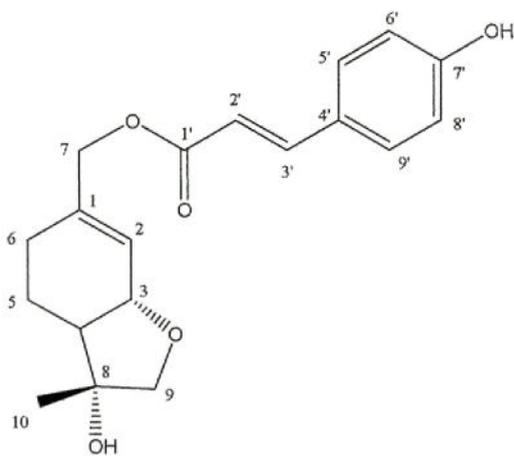
Acknowledgements

Financial support from FIA (CHILE) (Grant FIA-ES-C-2005-1-A-007), FONDECYT (CHILE) (Grant 103-0813) and CYTED (Grant IV.12) is gratefully acknowledged.

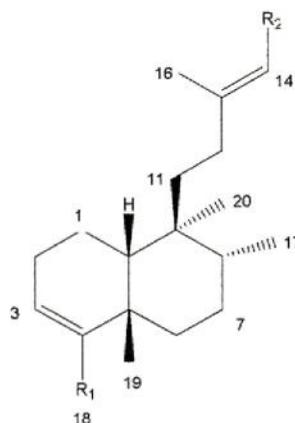
References

- [1] Reiche C. Flora de Chile. Tomo III. Litografía i Encuadernación Barcelona, Santiago, Chile, 1902. p 215.
- [2] Muñoz M, Barrera E. Meza I. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Publicación ocasional 33. 1981. p. 29.
- [3] Marambio O, Silva M. Bol Soc Chil Quim 1989; 34 : 105.
- [4] Tojo E, Rial M E, Urzúa A, Mendoza L. Phytochemistry 1999; 52 : 1531.
- [5] Borquez J, Mancilla A, Pedreros A S, Loyola L A, Morales G, Wittke O, Brito I. Bol Soc Chil Quim 1995; 40 : 157.
- [6] Maatooq G T, Gohar A A, Hoffmann J J. Pharmazie 2002; 57 : 282.





2



3

$R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$

ANEXO 2: Resúmenes y Poster de presentaciones a Congresos (5).

XVII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BOTÁNICA DE CHILE, TALCA, ENERO, 2006

Poster 1

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE *HAPLOPAPPUS BAYLAHUEN*, III REGION, CHILE

(Chemical profile of *Haplopappus baylahuen* Remy, III Region, Chile).

Faini E.¹, Labbé C.¹, Torres R.², Vogel H.³, González B.³ y San Martín J.⁴

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. ffaini@uchile.cl ²Universidad de Santiago, Facultad de Química y Biología, Departamento de Ciencias del Ambiente. rtorres@usach.cl

³Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Horticultura. hvogel@utalca.cl

⁴Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. jsanmart@utalca.cl

Haplopappus baylahuen ("Bailahuén"), Asterácea nativa de Chile y Argentina, es utilizada medicinalmente por sus propiedades hepatoprotectoras. Ha sido descrita químicamente desde 1960, pero la información disponible es poco confiable por problemas taxonómicos. Esta especie ha sido confundida con otras de la misma y/o diferentes áreas geográficas.

Para aclarar la composición química de especies del "Complejo Bailahuén", se realizó una revisión químico-biológica de las cuatro de mayor consumo del país. Se encontraron claras diferencias en metabolitos secundarios, se logró definir la composición química de *H. taeda* y *H. multifolius* y se estudió la resina de *H. baylahuen*. Esta última, se fraccionó por métodos cromatográficos y los compuestos puros se identificaron por análisis espectroscópico y cocromatografía con patrones.

Aquí, se informa la identidad química de *Haplopappus baylahuen* Remy de la alta Cordillera de la III Región de Chile: alto contenido de diterpenos, flavonoles derivados de canferol y quercetina y ausencia de la cumarina preniletina. Estos rasgos permiten diferenciarla de otras especies y precisar su identificación.

Agradecimientos: Proyectos FIA (V99-0-S-032) y FONDECYT (P 103-0813).

CARACTERIZACION QUIMICA DE HAPLOPAPPUS BAYLAHUEN, III REGION, CHILE
(Chemical profile of *Haplopappus baylahuen* Wamy, III Region, Chile)

Francisco Faini^a, Cecilia Lobos^b, David Torres^b, Hernán Vogel^b, Emilio González^b y José San Martín^c

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Universidad de Santiago, Facultad de Química y Biología, Departamento de Ciencias del Ambiente
Universidade de Beira Interior, Departamento de Química, Covilha, Portugal

Introducción

Resúmenes

Abstract

Actuobiología

Resultados

Conclusiones

Referencias

Agradecimientos

Poster 2

FLAVONOIDES Y ESTERES DE α -TERPINEOL COMO ANTIOXIDANTES EN EXUDADOS RESINOSOS DE *HAPLOPAPPUS*

(Flavonoids and α -terpineol esters as antioxidants in resinous exudates from *Haplopappus*)

Faini F.^a, Torres R.^b, Villanueva I.^b, Rodilla J.^c y Silva L.A.^c

^a Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. ffaini@uchile.cl

^b Universidad de Santiago, Facultad de Química y Biología, Departamento de Ciencias del Ambiente. rtorres@usach.cl

^c Universidade de Beira Interior, Departamento de Química, Covilha, Portugal

Haplopappus es un género de la familia Asteráceas con especies que habitan en condiciones de grandes presiones ambientales, las que han inducido la producción de una resina protectora que cubre la superficie foliar.

En un estudio destinado a conocer los responsables de la protección frente a los agentes oxidantes del medio ambiente, hemos examinado la capacidad antioxidante de las resinas de *Haplopappus taeda* y *H. latifolius* y de sus respectivos componentes mayoritarios. Esta propiedad, se midió mediante el apagamiento de radicales libres de ABTS y DPPH de acuerdo a técnicas habituales ya descritas para estos ensayos.

Los resultados mostraron una mayor capacidad antioxidante para la resina de *Haplopappus taeda*, constituida por una compleja mezcla de siete flavonoides (flavonoles, dihidroflavonoles y flavanonas) y ésteres de p-cumaroil α -terpineol, no descritos previamente en la naturaleza. La resina de *H. latifolius*, de menor capacidad antioxidante, presentó otros ésteres del mismo monoterpeneo, pero sin actividad. Esta residiría en el conjunto de flavonoides (flavonoles, dihidroflavonoles y flavanonas) presentes en la resina.

Agradecimientos: Proyectos FIA (V99-0-S-032) y FONDECYT (P 103-0813).

**XLIX REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE, PUCÓN,
NOVIEMBRE, 2006.**

CITOTOXICIDAD EN *HAPLOPAPPUS* SPP.
(Cytotoxicity of *Haplopappus* spp.)

Caviedes P.^a, Caviedes R.^a, Opazo P.^a, Faini F.^b, Jaña F.^b, Labbé C.^b y Torres R.^c.

^aICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile. pcaviede@med.uchile.cl

^bDepto de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Santiago, Chile. ffaini@uchile.cl

^cFacultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, B.O'Higgins 3363, Santiago, Chile. rtorres@lauca.usach.cl

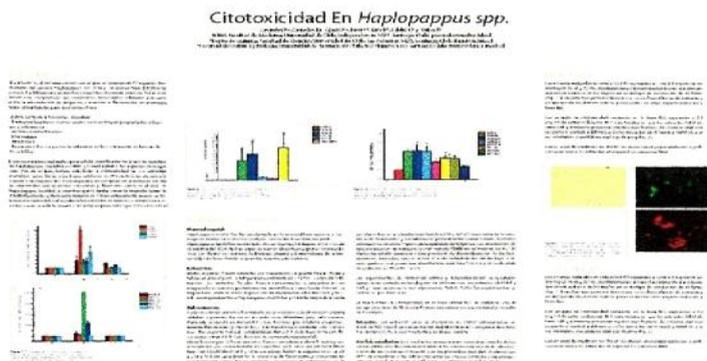
"Bailahuén" es el nombre común con el que se conocen al menos 9 especies de *Haplopappus* (Asterácea) de uso medicinal en Chile. Todas ellas son utilizadas desde tiempos ancestrales como hepatoprotectoras¹ sin que se tenga antecedentes concretos de toxicidad. Dada la necesidad de validar científicamente el uso terapéutico de estas especies, hemos realizado un estudio de toxicidad de *Haplopappus multifolius* (HAM) y *H.taeda* (HAT), ambas de conocida composición química. Se determinó la toxicidad oral aguda en ratones de los extractos etanólicos secos, obteniéndose valores de DL₅₀ superiores a 3,0 g/K de peso. Sin embargo, los análisis de citotoxicidad en la línea celular UCHT1², mostraron que a 48 hrs. de aplicados los extractos y a la misma concentración ensayada (0,3 mg/mL), ambas especies mostraron citotoxicidad, siendo la de HAT, el doble que la de HAM. En HAM, la citotoxicidad reside en la fracción que contiene flavonoides (HAM-6EF exhibe un aumento en la citotoxicidad de 22, 3 y 2 veces a 1, 0,6 y 0,3 mg/mL respectivamente, comparada con cultivos controles) mientras que en HAT, los responsables podrían ser diterpenos o derivados del ácido p-cumárico (HAT-6ET exhibe un aumento de 11, 3 y 1 veces a 1, 0,6 y 0,3 mg/mL respectivamente, en iguales condiciones).

Referencias :

¹ Montes M., Wilkomirsky T. (1985) Medicina Tradicional Chilena, Ed. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

² Caviedes, P., Olivares, E., Caviedes, R., Jaimovich, E., (1993). J. Molec. Cell Cardiol. 25, 829-845.

Agradecimientos: FIA (ES-C-2005-1-A-007), FONDECYT (P1030813-2006).



**PRIMER CONGRESO IBEROAMERICANO DE FITOTERAPIA, MÉXICO DC,
MÉXICO, NOVIEMBRE 2006.**

Poster 1

POTENCIAL ACTIVIDAD TERAPEUTICA DE *HAPLOPAPPUS SPP.*

C. Delporte^a, N. Backhouse^a, C. Padilla^b, V. Carrasco^b, F. Faini^c, C. Labbé^c y R. Torres^d.

^aDepto de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Vicuña Mackenna

20, Santiago, Chile. cdelpor@uchile.cl

^bDepto de Microbiología, Facultad de Ciencias de Salud, Universidad de Talca, Av. Lircay s/n, Talca, Chile.

cpadilla@utalca.cl

^cDepto de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.

ffaini@uchile.cl

^dFacultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, B.O'Higgins 3363, Santiago, Chile.

rtorres@lauca.usach.cl

Haplopappus multifolius y *H. taeda* (Asteráceas), son yerbas medicinales nativas de la zona Central de Chile conocidas bajo el nombre vernáculo de "bailahuén". Desde tiempos remotos, sus infusos, han sido utilizados principalmente en enfermedades del hígado pero también se describen como desinfectantes y cicatrizantes de heridas (1). El objetivo de este trabajo es respaldar científicamente estos usos populares con ensayos de actividad antimicrobiana y antiinflamatoria tópica inducida por ácido Araquidónico, realizados en extractos etanólicos totales secos de estas especies (Hat-6-E : *Haplopappus taeda* y Ham-6-E : *H. multifolius*).

En ensayos realizados en discos de Petri de agar, los extractos de ambas especies no mostraron efecto alguno frente a bacterias Gram negativo : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*. Sin embargo, en estos mismos ensayos, mostraron una interesante actividad sobre bacterias Gram positivo: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus cereus*. No se observó actividad sobre *Enterococcus faecalis*.

Respecto a la acción antiinflamatoria, ambos extractos mostraron una actividad significativa siendo el Hat-6-E el más activo como antiinflamatorio tópico frente a ácido araquidónico con un % de efecto de 72,7, superior al efecto máximo obtenido con nimesulida utilizada como fármaco de referencia (48,8%). Los resultados obtenidos hasta el momento, avalan satisfactoriamente el uso que tienen estas especies en medicina folclórica.

Referencias :¹ Muñoz M., Barrera E. y Meza I. (1981) El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Museo Nacional de Historia Natural. Publicación Ocasional N°33. Santiago de Chile, Chile.

Agradecimientos: FIA Gobierno de Chile (P FIA-ES-C-2005-1-A-007), FONDECYT(P 1030813-2006) y Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

PRIMER CONGRESO IBEROAMERICANO DE FITOTERAPIA "Contribuciones de la flora regional a la medicina actual"

POTENCIAL ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE HAPLOPAPPUS SPP.

C. Deboite, N. Bachouse, C. Padilla, V. Carrasco, E. Ekim, C. Labbé y R. Torres

EXEQUESIS

PLANTAS

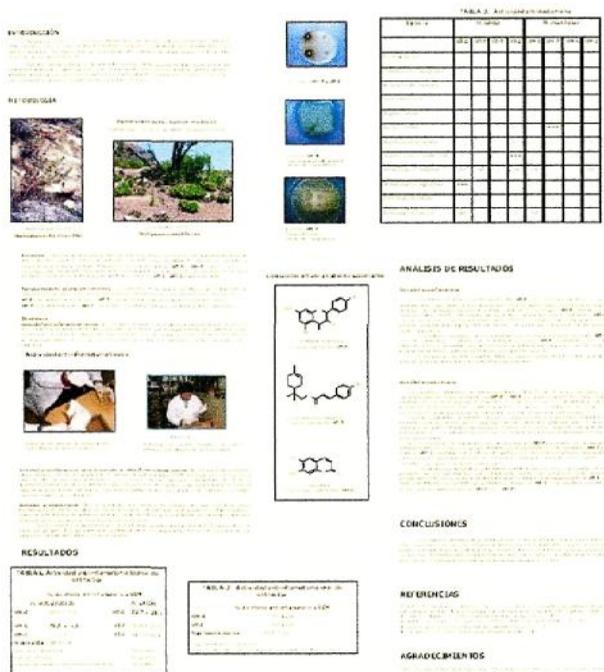
ANÁLISIS DE RESULTADOS

RESULTADOS

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

AGRADECIMIENTOS



Especie	Gram (+)				Gram (-)			
	Staph	Strep	Ent	Pro	Ent	Pro	Ent	Pro
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

Poster 2

CITOTOXICIDAD EN HAPLOPAPPUS SPP. ("BAILAHUÉN")

Caviedes P.^a, Caviedes R.^a, Opazo P.^a, Faini F.^b, Jaña F.^b, Labbé C.^b y Torres R.^c

^aPrograma de Farmacología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile. pcaviede@med.uchile.cl

^bDepto de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Santiago, Chile. ffaini@uchile.cl

^cFacultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, B. O'Higgins 3363, Santiago, Chile. rtorres@lauca.usach.cl

"Bailahuén" es el nombre común de al menos 9 especies de *Haplopappus* (Asterácea) de uso medicinal en Chile. Todas ellas son utilizadas desde tiempos ancestrales como hepatoprotectoras¹ sin que se tenga antecedentes concretos de toxicidad. Para validar científicamente el uso terapéutico de *Haplopappus multifolius* (HAM) y *H. taeda* (HAT), ambas de composición química conocida, se determinó la toxicidad oral aguda en ratones de los extractos etanólicos secos, obteniéndose valores de DL₅₀ superiores a 3,0 g/Kg de peso. Para determinar toxicidad en células, se utilizó un método de análisis de citotoxicidad *in vitro* (CIT) en la línea celular UCHT1², definiéndose como % células muertas / tiempo duplicación, usando para ello la técnica para medir muerte celular LIVE/DEAD³ y realizando recuento bajo microscopio fluorescente. Los resultados mostraron que a 48 hrs. de aplicados los extractos, HAM-6EF, fracción rica en flavonoides, exhibe un aumento en la citotoxicidad de 22, 3 y 1 veces a concentraciones de 1, 0,6 y 0,3 mg/mL respectivamente (n=3 p< 0.05), comparada con cultivos de UCHT1 controles (CIT: 78.6 ± 9.8 v/s 3.6 ± 1.2; HAM-6EF v/s control respectivamente a 1 mg/ml). Por otra parte, el subextracto HAT-6ET, constituido fundamentalmente por terpenos, mostró un aumento de 11, 3 y 1 veces a concentraciones de 1, 0,6 y 0,3 mg/mL respectivamente (n=3 p< 0.05), comparada con UCHT1 controles (CIT: 5302 ± 34 v/s 492 ± 102; HAT-6ET v/s control respectivamente a 1 mg/ml), en iguales condiciones. Los estudios muestran que existe toxicidad en los extractos ensayados, requiriéndose más estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar índice terapéutico. Se discutirán detalles metodológicos y proyecciones.

Referencias :¹ Montes M., Wilkomirsky T. (1985) Medicina Tradicional Chilena, Ed. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.² Caviedes, P., Olivares, E., Caviedes, R., Jaimovich, E., (1993). J. Molec. Cell Cardiol. 25, 829-845.

³ Paris, I., Dagnino, A., Marcelaine, K., Bennet, L., Caviedes, P., Caviedes, R., Olea Azar, C. y Segura-Aguilar, J. (2001) J. Neurochem. 77, 519-529.

Agradecimientos: FIA (ES-C-2005-1-A-007), FONDECYT (P1030813-2006) y Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

PRIMER CONGRESO IBEROAMERICANO DE FITOTERAPIA "Contribuciones de la flora regional a la medicina actual"

CITOTOXICIDAD EN *HAPLOAPPUS* SPP. ("BAILAHUEN")

P. Caviedes, R. Caviedes, P. Ojeda, F. Fariá, P. Jafra, C. Lobbló y S. Turres

Investigación financiada por FONDECYT (P1030813-2006) y FIA (ES-C-2005-1-A-007)

INTRODUCCIÓN

Haploappus spp. ("Bailahuen") es una planta medicinal utilizada en la medicina tradicional chilena. Se ha reportado que posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antitumorales. El presente estudio evalúa la citotoxicidad de extractos de *Haploappus* spp. en líneas celulares de cáncer humano.

OBJETIVOS

Evaluar la citotoxicidad de extractos de *Haploappus* spp. en líneas celulares de cáncer humano (HepG2, MCF7, HCT116, H1975).

MÉTODOS

Se utilizaron extractos de *Haploappus* spp. preparados en diferentes solventes (agua, etanol, acetona). Se evaluó la citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano (HepG2, MCF7, HCT116, H1975) mediante el método de reducción de MTT.

RESULTADOS

Los extractos de *Haploappus* spp. mostraron actividad citotóxica en todas las líneas celulares evaluadas. La actividad citotóxica fue mayor en el extracto de etanol y menor en el extracto de agua. La actividad citotóxica fue mayor en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, H1975) y menor en las líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2, HCT116).

CONCLUSIONES

Los extractos de *Haploappus* spp. mostraron actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano. La actividad citotóxica fue mayor en el extracto de etanol y menor en el extracto de agua. La actividad citotóxica fue mayor en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, H1975) y menor en las líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2, HCT116).

REFERENCIAS

Montes M., Wilkomirsky T. (1985) Medicina Tradicional Chilena, Ed. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Caviedes, P., Olivares, E., Caviedes, R., Jaimovich, E., (1993). J. Molec. Cell Cardiol. 25, 829-845.

Paris, I., Dagnino, A., Marcelaine, K., Bennet, L., Caviedes, P., Caviedes, R., Olea Azar, C. y Segura-Aguilar, J. (2001) J. Neurochem. 77, 519-529.

AGRADECIMIENTOS

FONDECYT (P1030813-2006) y FIA (ES-C-2005-1-A-007)

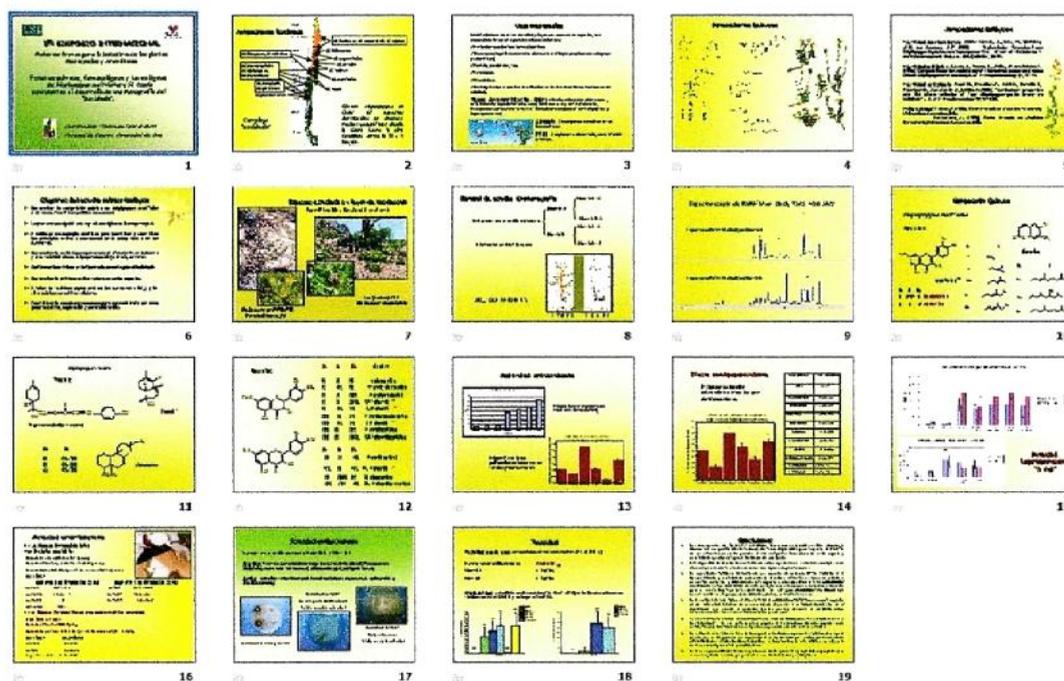
CONTACTO

Dr. P. Caviedes, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 136, Santiago, Chile. Correo electrónico: pcaviedes@uc.cl

ABSTRACT

Haploappus spp. ("Bailahuen") is a medicinal plant used in traditional Chilean medicine. It has been reported to possess anti-inflammatory, analgesic and antitumor properties. The present study evaluates the cytotoxicity of *Haploappus* spp. extracts in human cancer cell lines. The cytotoxicity of *Haploappus* spp. extracts prepared in different solvents (water, ethanol, acetone) was evaluated in human cancer cell lines (HepG2, MCF7, HCT116, H1975) using the MTT reduction method. The extracts showed cytotoxic activity in all cell lines. The cytotoxic activity was higher in the ethanol extract and lower in the water extract. The cytotoxic activity was higher in the breast cancer cell lines (MCF7, H1975) and lower in the liver cancer cell lines (HepG2, HCT116).

ANEXO 3: Charla de Mesa redonda en el 1er Simposio Internacional: materias primas para la industria de las plantas medicinales y aromáticas, Los Angeles, Chile, Noviembre 2006.



VI. BIBLIOGRAFIA

1. "Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*". René Torres, Francesca Faini, Brenda Modak, Francisco Urbina, Cecilia Labbé, Juan Guerrero. *Phytochemistry* **67**, 984-7 (2006)
2. "Antioxidant properties of two Chilean medicinal *Haplopappus* species". P 347. F. Faini, C. Labbé, M.E .Letelier, H. Vogel and R. Torres. G.A. 53rd Annual Congress. Florencia, Italia, Agosto, 2005.
3. "Non flavonoid compounds from the resinous exudates of *Haplopappus taeda*, a Chilean medicinal plant". Francesca Faini, Cecilia Labbé, René Torres, Jesús M.Rodilla, Lucía Silva and Franco Delle Monache. *FITOTERAPIA* (2007), en revisión.
4. H.Vogel, I.Razmilic, J.San Martín, U.Dollz y B.González."Plantas

Medicinales Chilenas”, Editorial Universidad de Talca, Talca, 2005.

5. C. Viturro, A Molina, G. Schmeda-Hirschmann. *Phytother. Res.* **13**, 422 (1999).
6. “Chemoenzymatic Preparation of Silybin B-Glucuronides and their Biological Evaluation”. V. Kren, J. Ulrichova, P. Kosina, D. Stevenson et al. *Drug Metabolism and Disposition.* **28** (15), 13-17 (2000).
7. “Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin”. J. Zhao, M. Lahiri-Chatterjee, Y. Sharma, R. Agarwal. *Carcinogenesis*, **21**(8)11-16,
8. “Role of flavonoids in oxidative stress”. N. Cotelle. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* **1**, 569-90, (2001).
9. “Carbon-nutrient balance hypothesis in within species phytochemical variation of *Salix lasiolepis*”. P.W. Price, G.L. Waring, R. Julkunen-Tiitto, J. Tahvanainen, H.A. Mooney, T.P. Craig . *J. Chem. Ecol.* **15**, 1117-1131 (1989).
10. “Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity”. M.E. Letelier, A.M. Lepe, M. Faúndez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. Speisky. *Chem. Biol. Interact.* **151**, 71-82 (2005).
11. “Protein measurement with the Folin phenol reagent”. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L Farr, R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-273 (1951).
12. “Effects of an antiinflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application”. S. Lloret and J. Moreno. *Biochemical Pharmacology* **50** (3), 347-353 (1995).
13. A. Delgado-Iribarren y col. *Manual de Laboratorio Clínico Básico Microbiología.* Mc GrawHill Interamericana, Colombia, 2000.
14. “Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study HM. Ericsson and J.C. Sherris. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica.* 271:1, (1971).