

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	22 OCT. 2012
Hora	10:05
Nº Ingreso	4258

INFORME FINAL TECNICO

INFORME FINAL TECNICO

ANTECEDENTES GENERALES

CODIGO : EST - 2010 - 0157

NOMBRE DEL PROYECTO

“ESTUDIO QUÍMICO Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE PLANTAS MEDICINALES
DE LA PUNA ATACAMEÑA”

SEGUNDA REGIÓN; ANTOFAGASTA

AGENTE EJECUTOR: UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA

AGENTES ASOCIADOS: INDAP y CONAF.

COORDINADOR DEL PROYECTO: GLAUCO MORALES BORCOSQUE

COSTO TOTAL PROGRAMADO:

COSTO TOTAL REAL :

APORTE DE FIA

PERIODO DE EJECUCIÓN (Programado: 1 de Abril de 2011 a 31 de Marzo de
2012) (Real 1 de Abril de 2011 a 10 de Octubre de 2012)

INFORME TECNICO

1.- OBJETIVOS

El proyecto plantea como Objetivo General “Caracterizar las especies botánicas: *Senecio nutans*, *Xenophyllum poposum*, *Haplopappus rigidus*, *Parastrephia quadrangularis* y *Lampaya medicinalis*, de la flora nativa de la Puna atacameña usadas como plantas medicinales por las comunidades indígenas, a fin de establecer las bases para fomentar el cultivo, propagación, producción y comercialización en la Región de Antofagasta.

Como Objetivos específicos se plantean los siguientes:

- 1.- Medir los efectos antimicrobiano-bactericida o bacterostático, efecto hipoglicemiante o antiinsulinémico, efecto hipotensor o antihipertensivo, efecto antioxidante, efecto hepatoprotectivo, efecto antiinflamatorio, toxicidad, efecto inhibitorio de la división celular en huevos de erizo fecundados, de los extractos hidroalcohólicos, y de los otros extractos derivados, así como de los productos puros que se aíslen.
- 2.- Fraccionar los extractos hidroalcohólicos bioactivos, por métodos de bioorientación.
- 3.- Aislar, Purificar, caracterizar y determinar la estructura química de los materiales bioacumulados en las especies botánicas bajo estudio.
- 4.- Procurar establecer relación entre las propiedades biológicas de los extractos y de los compuestos puros y las propiedades medicinales que se atribuyen, a fin de buscar respaldo científico a la utilización de las plantas bajo estudio.

Como lo demostraremos con la descripción de las metodologías, actividades y resultados, se ha logrado un completo cumplimiento de los objetivos propuestos,

toda vez que, por primera vez, se han cuantificado unas pocas propiedades biológicas de las plantas en estudio y se han asociado con los usos medicinales. Los resultados respaldan científicamente la utilización que las comunidades altoandinas le dan a sus plantas y, por lo tanto, estas comunidades pueden valorar y conocer mejor su flora nativa y divulgar sus cualidades terapéuticas.

En esta presentación las metodologías, procedimientos y resultados aparecerán en el siguiente orden: Recolección de material vegetal, extracción del material botánico, partición con solventes, medición de actividad antibacteriana, biotoxicidad frente a *Artemia salina*, capacidad antioxidante, medición del efecto antihiper glucémico de los extractos hidroalcohólicos, medición del efecto hipotensor y reactividad vascular o vasodilatación de los extractos hidroalcohólicos, medición de la toxicidad aguda de los extractos hidroalcohólicos, medición del efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos, medición del efecto inhibitorio de la división celular en huevos fecundados de erizos.

En cada caso se presentará la metodología, los resultados obtenidos y las conclusiones pertinentes.

RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL.

Desde el 28 de Marzo hasta el 04 de Abril y en las cercanías de las localidades de Ollagüe, Socaire, Paniri y Caspana se recolectaron partes aéreas de las plantas en estudio.

Durante estas colecciones se obtuvo muestras de las siguientes plantas incorporadas en el presente proyecto: *Senecio nutans*, *Parastrephia quadrangularis*, *Haplopappus rigidus*, *Lampaya medicinalis* y *Xenophyllum poposum*.

La autenticación botánica fue realizada por el Prof. Dr. Roberto Rodríguez de la Universidad de Concepción.

El material botánico, secado al aire y a la sombra, fue finamente molido.

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL BOTÁNICO

Unos 300 gramos de partes aéreas de cada una de las plantas fueron mezclados con 2 litros de agua destilada hirviendo y dejadas en extracción por 24 horas.

La mezcla se filtró, se evaporó en rotavapor a no más de 50 °C y luego se secó en un liofilizador, para obtener un “Extracto Acuoso” o “Infusión”.

2.5 – 4.3 Kg de cada una de las plantas se mezcló con 18 L de una mezcla de H₂O-EtOH (1:1). La extracción se dejó por 5 días y la mezcla se filtró. Este proceso se repitió hasta que la solución hidroalcohólica resultó incolora.

El volumen de la solución resultante fue disminuido en un evaporador rotatorio hasta la eliminación del etanol, produciendo un Extracto Hidroalcohólico. Unos 150 g del mismo fueron liofilizados hasta obtener un residuo sólido que, en frasco sellado, se refrigeró hasta su posterior utilización en las pruebas *in vitro* o *in vivo*.

RELACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS (HA) OBTENIDOS			
Nombre de la Planta	Masa Planta Recolectada	Masa Extracto (HA) obtenido	Masa extracto HA liofilizado
<i>Haplopappus rigidus</i>	3,340 Kg	920 g	80,5 g
<i>Xenophyllum poposum</i>	2,486 Kg	747 g	40,7 g
<i>Senecio nutans</i>	2,860 Kg	710 g	38,7 g
<i>Lampaya medicinalis</i>	4,240 Kg	1020 g	105 g
<i>Parastrephia quadrangularis</i>	4,260 kg	1230 g	126 g

El rendimiento en extracto hidroalcohólico está en un rango entre 25 y 30%, respecto a planta seca.

PARTICIÓN CON SOLVENTES

La porción mayoritaria del Extracto Hidroalcohólico fue mezclada con una solución de agua – MeOH (9:1) y particionada sucesivamente con n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y n-butanol.

Cada uno de las soluciones orgánicas resultantes se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó al máximo en un evaporador rotatorio. Luego fueron debidamente liofilizadas y refrigeradas hasta su posterior uso. En el anexo se muestra un esquema de fraccionamiento.

En la tabla adjunta se muestra los extractos orgánicos derivados desde el extracto hidroalcohólico de las cinco especies en estudio.

RELACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS OBTENIDOS (gramos)				
Nombre de la Planta	n-hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n-Butanol
<i>H. rigidus</i>	170	690	340	540
<i>X. poposum</i>	135	175	310	300
<i>S. nutans</i>	225	600	170	300
<i>L. medicinalis</i>	20	150	300	200
<i>P. quadrangularis</i>	134	530	320	410

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Microrganismos usados:

Las siguientes cepas de bacterias fueron usadas en los ensayos antimicrobianos:

Gram-positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Gram-negativo: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Salmonella typhi* (ATCC 3492), *Escherichia coli* (ATCC 25922), y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Los siguientes hongos fueron ensayados en la revisión antifúngica: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *Aspergillus niger* (ATCC 9092), *Microsporum gypseum* (C115), *Trichophyton tubrum* (C113) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9972).

Para detectar la presencia de bacterias en los propios extractos, cada extracto se inoculó en 2,5 mL de caldo Mueller-Hinton y se incubó a 37 °C por 36 horas y, al

término del experimento, no se observó la presencia de ninguna colonia de bacterias. Luego, los extractos no están infectados por bacterias y resultaron ser completamente asépticos.

ENSAYO ANTIBACTERIANO.

La actividad antibacterial se determinó usando el método de difusión de disco. Cada inóculo de bacteria fue incubado en 2,5 mL de caldo Mueller-Hinton a 37 °C por 18 horas y agar Sabouraud dextrosa para hongos. El inóculo bacteriano fue diluido con solución salina 0.85% para obtener una turbidez visualmente comparable con el standard McFarland N° 0.5. Cápsulas de Petri conteniendo agar Mueller-Hinton fueron inoculadas con esta suspensión de bacterias. Discos de papel de filtro estéril de 6 mm de diámetro se impregnaron con 250 µL de solución de extracto de concentración 100 mg/mL, por tanto equivalente a 25 mg de extracto por disco. Estos discos fueron colocados sobre el agar de las placas de Petri con bacterias y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

La actividad antibacteriana fue medida como el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano y expresado en mm y traducido a signos (+). La ampicilina (10 µg/ disco), estreptomycin (25 µg/ disco), cloranfenicol (30 µg/disco) fueron usados como controles antibióticos positivos en todas las placas. Las zonas de inhibición frente a *Escherichia coli* fueron de 17, 9 y 18 mm, respectivamente. La Nistatina (100 µg/ disco) y la Anfotericina B (200 µg/ disco) fueron usados como controles antifúngicos positivos en todas las placas. Las zonas de inhibición frente a *Candida albicans* fueron de 26 y 17 mm, respectivamente. El dimetilsulfoxido, etanol y metanol fueron incluidos en cada experimento como controles negativos.

Todos los ensayos fueron llevados por triplicado.

Usando el Extracto Hidroalcohólico liofilizado de cada planta en estudio se ha medido la actividad antibacteriana y antifúngica mediante la técnica descrita y se ha obtenido los siguientes resultados. Los resultados se expresan como el número de mm de diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias. Mientras mayor es el diámetro mayor es la actividad antibacteriana. Como antibiótico control

positivo se usó estreptomicina, cloramfenicol, ampicilina y nistatina y amfotericina B para hongos.

Actividad Antimicrobiana en ensayo difusión de disco de los extractos hidroalcohólicos.								
Extracto Hidroalcohólico	S.a	E. f.	B. s.	A. b.	S. t.	E. c.	P. s.	C. a.
<i>H. rigidus</i>	++	+	++	-	-	-	-	-
<i>L. medicinalis</i>	+++	++	++	-	-	-	-	-
<i>S. nutans</i>	+	+	++	+	+	-	-	++
<i>P. quadrangularis</i>	+++	++	++	-	-	-	-	-
<i>X. poposum</i>	++	+	+	-	-	-	-	-

Las bacterias abreviadas corresponden a: ^a S.a *Staphylococcus aureus*; E.f *Enterococcus faecalis*, B.s *Bacillus subtilis*, A.c *Acinetobacter baumannii*, S.t *Salmonella typhi*, E.c *Escherichia coli*, P.a *Pseudomona aeruginosa*, y C.a *Candida albicans*.

– sin zona de inhibición, + (6 – 10 mm), ++ (11 – 20 mm), +++ (21 – 30 mm), ++++ (>30 mm).

Estos resultados indican que frente al patógeno *Staphylococcus aureus* los 4 extractos hidroalcohólicos liofilizados analizados muestran importante actividad inhibitoria, siendo los extractos de *Lampaya medicinalis* y *Parastrephia quadrangularis* los más activos antibióticos. Se aprecia también que los extractos estudiados muestran frente al bacterio Gram–positivo *Bacillus subtilis* una buena actividad antibiótica. Los extractos fueron evaluados en su actividad antifúngica frente a 10 hongos. Sólo el extracto de *Senecio nutans* muestra una buena actividad anti-*Candida albicans*.

No hubo actividad antifúngica de ningún otro extracto, esto es, los diámetros de los halos de inhibición fueron todos menores que 5 mm frente a los hongos.

Loa extractos son, preferentemente, antibióticos frente a bacterias patógenas Gram positivas

Adicionalmente, se probó la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de las plantas *Senecio nutans*, *Haplopappus rigidus* y *Xenophyllum popusum* frente a las bacterias marinas *Vibrio cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* y *Yersinia ruckeri* usando el método de difusión de disco y ampicilina y cloramfenicol como controles antibióticos positivos.

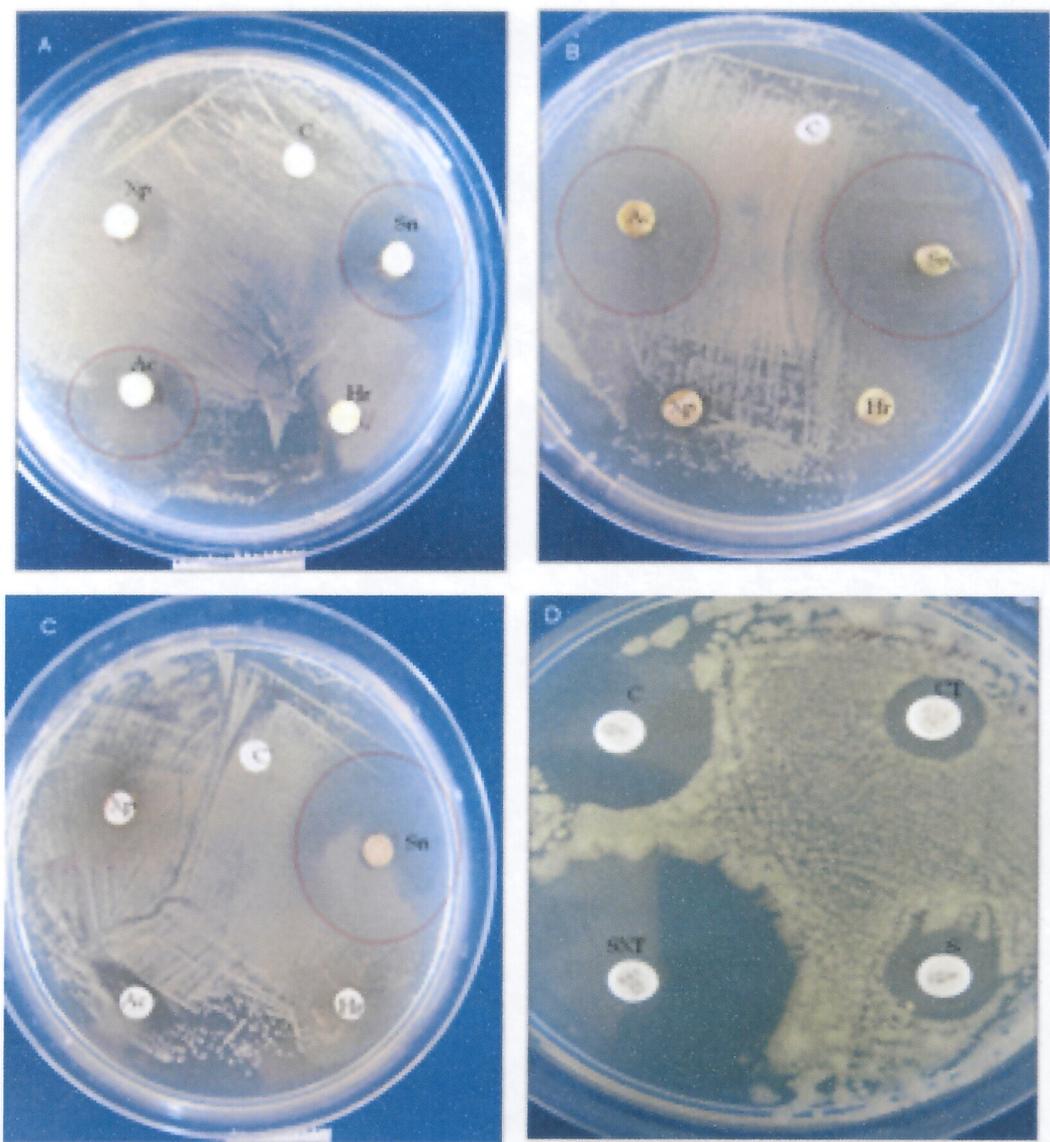
El ensayo consistió en incubar durante 24 horas a 20°C una alícuota de 100 µL de cada bacteria patógena sembrada sobre agar Mueller – Hinton y sobre ella los discos de papel de filtro que contenían 7 mg de extracto hidroalcohólico de cada planta en estudio. Un halo mayor que 5 mm alrededor del filtro, evidencia la ausencia de crecimiento y fue considerado como inhibición antimicrobiana. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Antibiogramas de extractos hidroalcohólico y antibióticos					
		Vp	Va	Vc	Yr
Extracto Hidroalcohólico	<i>S. nutans</i>	++	++	+++	+
	<i>H. rigidus</i>	+	+	+	-
	<i>X. popusum</i>	-	-	++	-
Controles Antibióticos	C	+++	+++	+++	+++
	S	++	++	++	++
	SXT	+++	+++	+++	+++
	CT	+++	+++	++	++

El grado de Inhibición, se expresan en la siguiente tabla como: (-) no hay inhibición; (+) 6 – 10 mm; (++) 11 – 20 mm y (+++) 21 – 30 mm. Los antibióticos controles fueron: C – Cloramfenicol (30 µg/disco), S – Estreptomicina (10 µg/disco), SXT – Sulphamethoxazone – trimethoprime (25 µg/disco) y CT – Cefotaxime(30µg/disco).

Bacterias Vp: *Vibrio parahaemolyticus*, Va: *Vibrio anguillarum*, Vc: *Vibrio cholerae tor1*, Yr: *Yersinia rucker*

Los mejores resultados fueron observados por el extracto hidroalcohólico de *S. nutans* con 25 mm y el de *X. popusum* con 18 mm de halo de inhibición frente al patógeno *V. cholerae*, valores comparables a los antibióticos controles positivos.



Actividad antibacteriana de extractos y frente a *V.cholerae* (*tor1*) (mejores resultados). **A:** Aceites Esenciales **B:** Extractos Clorofórmicos **C:** Extractos Hidroalcohólicos **D:** Controles Antibióticos. (C – Cloramfenicol, CT – Cefotaxima, SXT- Sulphamethoxazone – trimethoprime, S – Estreptomicina.

Concentración Inhibidora contra las bacterias Patógenas.

La Medición de Concentración Inhibitoria se realizó por el método de microdilución. En este ensayo se expuso una población definida de bacterias cultivadas en medios líquidos en tubos contra diferentes concentraciones de extractos. Los tubos se incubaron por 72 horas a 20 °C. El rango de concentraciones en este estudio fue desde 0.0125 a 6.4 mg/mL.

La medición del efecto bacteriano se cuantificó mediante un lector de placas por método espectrofotométrico haciendo lecturas a 620 nm.

Concentración Inhibidora (mg/mL)				
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Y.ruckeri</i>
<i>S. nutans</i>	.05 – 0.2	.05 – 0.4	.05 – 0.8	.0125-1.6
<i>H. rigidus</i>	0.4 – 0.8	.2 – 0.8	0.2	0.2–0.8
<i>X. popusum</i>	.0125 – .05	.0125 -.025	.0125- 0.8	0.125–0.8

En la mayoría de los tratamientos se identificó un rango de concentraciones de los extractos que inhibió el crecimiento en los diferentes patógenos. Un menor rango de inhibición nos permitió determinar a partir de que concentraciones se obtuvo una inhibición significativa del crecimiento bacteriano respecto al control

BIOENSAYO DE TOXICIDAD FRENTE A *Artemia salina*

Para el bioensayo de toxicidad se ocupó el crustáceo *Artemia salina*. Las larvas de este pequeño crustáceo, son muy sensibles a materiales tóxicos en su hábitat. El bioensayo consiste en desarrollar larvas desde huevos de *A. salina* y exponerlas a la presencia de los diferentes extractos en diferentes concentraciones y, luego, analizar la mortalidad que se produce y definir la LD₅₀. (Dosis letal 50) Este parámetro, LD₅₀., indica la concentración que produce la mortalidad de la mitad de las larvas expuestas.

En este ensayo vigorosas larvas de *Artemia salina* se expusieron a la presencia de los extractos hidroalcohólicos y de los derivados de los mismos y, luego se contaron los animales vivos para determinar el parámetro LD₅₀.

En una cámara de incubación que contiene agua de mar se colocó aproximadamente 30 mg de los huevos de *Artemia salina* y se expuso a luz artificial por 36-48 horas. En estas condiciones los huevos eclosionaron y produjeron una gran cantidad de larvas que sirven como modelos biológicos. Se preparó una solución stock disolviendo 20 mg del extracto en 2 mL de una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH (1:1). Para preparar tres réplicas se colocaron en viales separados 5, 50 y 500 µL de la solución stock. A cada uno de ellos se adicionó, con ayuda de una pipeta pasteur y una lupa de gran aumento, 10 larvas vivas. Inmediatamente se completó el volumen con agua de mar hasta 5 mL, obteniendo así concentraciones de 1000, 100 y 10 µg/mL.

Después de 24-36 horas de exposición a la luz artificial se contaron los animales vivos y, aplicando el software estadístico Probit Finney, se estableció el correspondiente LD₅₀.

Los resultados muestran que los extractos son biológicamente activos por tener LD₅₀ menor que 300 ppm. De aquí se concluye que los extractos más activos biológicamente son el de acetato de etilo y el de n-butanol, ya que presentan un LD₅₀ de ~ 7.2 ppm, lo que significa que a una concentración de ~ 7.2 mg de extracto por Litro de solución se induce la muerte del 50% de las larvas del modelo biológico.

Ensayo de Biotoxicidad sobre <i>Artemia salina</i>					
	LD₅₀ (mg/mL)				
Extractos	<i>L. medicinalis</i>	<i>P. quadrangularis</i>	<i>S. nutans</i>	<i>X. poposum</i>	<i>H. rigidus</i>
Acuoso	13.09	9.57	18.33	5.91	7.64
Hidroalcohólico	8.89	2.40	25.77	5.91	10.75
n-hexano	33.36	4.33	7.78	0.61	2.34
Diclorometano	33.36	1.18	9.27	11.75	23.10
Acetato de Etilo	7.29	8.90	7.47	<1000	8.45
n-Butanol	7.14	2.31	26.04	14.79	25.43

En ambas plantas se observa que los extractos de acetato de etilo producen el mayor efecto tóxico a las larvas de *Artemia salina*, dado que presenta la menor LD₅₀, indicando que esos extractos son buenos contenedores de interesantes productos químicos.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

La actividad antioxidante *In vitro* fue evaluada midiendo la capacidad de los extractos como atrapadores de radicales libres, frente al DPPH, al ABTS; midiendo la concentración total de polifenoles y midiendo la concentración de flavonoides.

La capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de las plantas en estudio como atrapadores de radicales libres se realizó frente al radical libre derivado del ABTS (ácido 2,2'-azino bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).

El ABTS produce un radical libre coloreado muy estable en agua. El DPPH, por su parte, es un radical libre coloreado muy estable en solución alcohólica. La intensa coloración de los radicales libres del ABTS y del DPPH es directamente proporcional a la concentración de los radicales libres presentes en la solución. La intensidad de un color se puede medir en un espectrofotómetro evaluando la Absorbancia (A), como una propiedad de una solución coloreada

El ensayo consistió, entonces, en la medición de la pérdida del color del ABTS y del DPPH y, por lo tanto, se midió la disminución en la Absorbancia de la solución debido a la presencia de atrapadores de radicales libres en los diferentes extractos. Este efecto se comparó con la capacidad de atrapador de radicales libres que poseen los antioxidantes conocidos tales como quercetina, vitamina E, Trolox y α -tocoferol y que aquí fueron usados como controles positivos.

La actividad antiradical (AA) de los extractos en diferentes dosis y de quercetina y Trolox se evaluó como el porcentaje de inhibición AA%, calculado según la siguiente fórmula

$$AA\% = 100 (\text{Absorbancia}_{(\text{blanco})} - \text{Absorbancia}_{(\text{muestra})}) / \text{Absorbancia}_{(\text{blanco})},,$$

donde Absorbancia (blanco) corresponde a la Absorbancia de la solución que contiene todos los reactivos excepto el extracto de la muestra.

Este valor AA% representa la capacidad de la muestra como atrapador de radicales libres.

Se preparó una solución stock de 750 ppm de cada extracto, pesando 0,0187 g y aforados a 25 mL con agua o agua-etanol. A partir de esta solución se realizó diluciones para obtener concentraciones de 100, 200, 300, 500 ppm, respectivamente, soluciones que corresponden a las muestras de análisis.

Se preparó una solución de ABTS 7 mM en agua, pesando 192 mg de ABTS y se aforó a 100 mL con agua. Se preparó una solución de persulfato de potasio 2,45 mM, pesando 33 mg de la sal y se aforó 50 mL con agua. La solución de buffer fosfato pH 7 se preparó mezclando 9,42 g de KH_2PO_4 con 15,7 g de Na_2HPO_4 y aforando a 1000 mL con agua. La solución stock del Trolox de 750 ppm y sus correspondientes diluciones a 100, 300 y 500 ppm se prepararon de la misma manera que los extractos.

Para formar el radical libre $\text{ABTS}^{\cdot+}$ la solución de ABTS 7 mM se hizo reaccionar con persulfato potasio 2,45 mM, en la oscuridad durante 16 h. Generado el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ se utilizó el tampón fosfato recién preparado para ajustar la Absorbancia hasta obtener 0,700 unidades a la longitud de onda de 734 nm.

Muestras de 10, 20, 30, 40 μL de cada extracto se adicionaron sobre 2,5 mL del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ y se agregó solución de tampón fosfato pH 7 hasta completar un volumen de 3 mL. La muestra se dejó reaccionar por 15 minutos y se midió la Absorbancia a 734 nm.

La curva de calibrado se obtuvo utilizando el control Quercetina que reaccionó con el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, repitiendo el procedimiento que se utilizó para los extractos. Todas las muestras fueron medidas por triplicado a 734 nm.

Actividad Antioxidante de Extractos de <i>Lampaya medicinales</i> Sobre el Radical ABTS							
Conc (ppm)	% AA						
	Quercetina	Acuoso	Hidroalcohólico	Éter de Petróleo	Clorofórmico	Acetato de etilo	n-Butanol
500	92.74	40.03	35.26	18.41	24.56	50.37	33.2
250	56.70	30.21	29.66	20.18	25.66	34.94	28.8
125	38.50	25.29	23.15	18.98	19.53	27.35	21.5
62.5	27.38	21.97	22.02	20.79	21.07	23.84	20.69
32.25	21.80	19.53	19.62	18.34	19.83	21.83	18.34

Actividad Antioxidante de Extractos de <i>Xenophyllum poposum</i> Sobre el Radical ABTS							
Conc (ppm)	% AA						
	Quercetina	Acuoso	Hidroalcohólico	Éter de Petróleo	Clorofórmico	Acetato de etilo	n-Butanol
500	96.65	5.73	4.53	4.53	7.53	11.73	6.93
400	78.95	4.53	3.73	4.33	6.73	11.53	5.93
300	54.89	4.13	3.53	3.33	5.73	10.33	4.93
200	36.78	3.33	2.73	2.73	4.53	7.93	3.73
100	19.56	2.13	1.93	2.13	3.13	4.13	2.53

Actividad Antioxidante de Extractos de <i>Parastrephia quadrangularis</i> Sobre el Radical ABTS							
Conc (ppm)	% AA						
	Quercetina	Acuoso	Hidroalcohólico	Éter de Petróleo	Clorofórmico	Acetato de etilo	n-Butanol
500	97.30	56	58	--	42,50	70	49
400	67.98	40	43	--	29,10	66	34
200	49.35	28	35	--	21,00	54	21
100	23.65	21	21	--	9,30	45	17

Los extractos acuosos, hidroalcohólicos y de acetato de etilo de *L. medicinalis* y *P. quadrangularis* son potentes atrapadores de radicales libres derivados del ABTS. Los extractos de *X. poposum* muestran una gran ineficiencia de atrapadores de radicales

libres del ABTS. El extracto de acetato de etilo de *X. popusum* muestra una actividad antiradicalaria sólo del orden de un 10 %.

Para el ensayo con DPPH se preparó una solución stock de 750 ppm de cada extracto pesando 0,0187 g y completando el volumen a 25 mL con etanol. Se preparó diluciones para obtener soluciones de 100, 200 y 500 ppm.

La solución del radical libre fue preparada disolviendo 0,019 g de DPPH en 250 mL de etanol.

La solución stock de 750 ppm del control positivo quercetina se preparó de la misma forma que los extractos y, luego, por dilución se preparó soluciones de 100, 200, 300 y 500 ppm.

El procedimiento del ensayo consistió en agregar a 50 µL de cada extracto 1,95 µL de solución del radical DPPH. Esta mezcla se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se midió la Absorbancia a 517 nm. Todas las muestras se midieron por triplicado.

Los datos experimentales obtenidos en el ensayo DPPH fueron calculados usando el parámetro conocido como porcentaje de inhibición del DPPH., calculado según la fórmula

$$AA\% = 100 (\text{Absorbancia}_{(\text{blanco})} - \text{Absorbancia}_{(\text{muestra})}) / \text{Absorbancia}_{(\text{blanco})}.$$

Actividad Antioxidante de Extractos de <i>Parastrephia quadrangularis</i> Sobre el Radical DPPH							
Conc (ppm)	% AA						
	Quercetina	Acuoso	Hidroalcohólico	Éter de Petróleo	Clorofórmico	Acetato de etilo	n-Butanol
750	83.00	26.00	23,80	--	10,40	27,30	19,20
500	70.50	18.00	16,90	--	7,50	22.00	13,90
300	50.00	12,30	12,50	--	4,20	12.00	8,60
100	28.00	8,10	8,80	--	1,40	8,50	3,50

Actividad Antioxidante de Extractos de <i>Lampaya medicinales</i> Sobre el Radical DPPH							
	% AA						
Conc (ppm)	Quercetina	Acuoso	Hidroalcohólico	Éter de Petróleo	Clorofórmico	Acetato de etilo	n-Butanol
500	92.74	32.00	29.90	17.10	23.90	38.00	29.90
400	56.70	28.6	25.00	16.60	22.20	31.00	26.30
300	38.50	25.00	24.90	14.60	21.20	28.00	22.70
200	27.38	19.30	16.60	13.00	18.00	22.00	19.60
100	21.80	18.90	13.60	12.70	13.50	22.00	15.00

Actividad Antioxidante de Extractos de <i>Xenophyllum poposum</i> Sobre el Radical DPPH							
	% AA						
Conc (ppm)	Quercetina	Acuoso	Hidroalcohólico	Éter de Petróleo	Clorofórmico	Acetato de etilo	n-Butanol
500	93.80	23.00	21.78	15.43	29.52	36.65	27.98
250	74.58	18.67	18.29	14.30	26.84	25.49	21.75
125	49.15	25.29	16.12	14.04	24.45	20.27	18.68
62.5	27.98	21.97	12.42	13.94	20.35	18.27	16.71
31.25	14.87	19.53	9.08	13.59	16.82	16.52	15.33

Actividad Antioxidante de Extractos Hidroalcohólicos de <i>Senecio nutans</i> y <i>Haplopappus rigidus</i> Sobre el Radical DPPH		
	% AA	
Conc (ppm)	<i>S. nutans</i>	<i>H. rigidus</i>
1280	89.61	80.16
640	69.09	59.18
360	40.33	38.41
160	37.34	27.93
80	27.19	16.77
40	20.08	14.91
20	15.42	13.38

Frente a los radicales libres derivados del DPPH los diferentes extractos actúan de diferente manera que frente al ABTS. Los extractos acuosos, hidroalcohólicos y de acetato de etilo resultaron ser los más activos frente al DPPH.

En la cuantificación de polifenoles se usó el método de Folin-Ciocalteu. El procedimiento experimental consistió en agregar 750 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:50) sobre 150 μ L de solución de cada extracto de concentración 750 ppm. Esta mezcla se dejó reaccionar por 5 minutos, luego se agregó 600 μ L de solución de bicarbonato de sodio al 7,5%. Después de la incubación a temperatura ambiente por 2 horas, se midió la Absorbancia de 760 nm contra metanol como blanco. Para este ensayo se utilizó quercetina como patrón y para trazar la curva de calibrado se usó concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 ppm. Se usó el promedio de tres lecturas independientes y el contenido de polifenoles se expresó como mg equivalentes de quercetina por cada gramo de extracto, lo que se calculó desde la curva de calibración y la ecuación de la recta correspondiente.

Contenido Total de Fenoles					
Extracto	mEq de Quercetina por g de Extracto				
	<i>L. medicinalis</i>	<i>X. poposum</i>	<i>P. quadrangularis</i>	<i>S. nutans</i>	<i>H. rigidus</i>
Acuoso	13,87	1,55	6.45	----	----
Hidroalcohólico	13,33	6,74	16.75	14.73	21.36
Éter de Petróleo	6,31	9,65	---	----	6.96
Clorofórmico	10,92	11,86	3.11	----	17.93
Acetato de Etilo	21,79	23,08	18.07	----	26.58
n-Butanol	12,12	11,04	4.66	----	----

De los resultados se aprecia claramente que el extracto que posee la mayor concentración de polifenoles totales es el de acetato de etilo, lo que se puede asociar a su gran poder antioxidante. El valor máximo observado es de casi 27 mEq de quercetina por cada gramo de extracto de *H. rigidus*. Se observa también que los diferentes extractos de *S. nutans* no contienen polifenoles.

El contenido total de flavonoides fue determinado usando el reactivo Cloruro de Aluminio, el que reacciona con algunos flavonoides produciendo una coloración amarilla cuya intensidad es dependiente de la concentración de flavonoides y su magnitud se puede medir espectrofotométricamente. El ensayo consistió en mezclar 5 mL de $AlCl_3$ al 2 % en MeOH con 5mL de solución de los extractos en MeOH en concentraciones de 0.02 mg/mL. Las lecturas de las Absorbancias a 415 nm , se hicieron después de 10 min de incubación usando como blanco una solución de los extractos con MeOH sin $AlCl_3$. El contenido total de flavonoides se determinó usando una curva de calibración con quercetina en concentraciones desde 0 a 50 mg/L como standard. Se usó el promedio de tres replicas y el resultado se expresó como mg de quercetina equivalente a 1 g de extracto.

MEDICIÓN DEL EFECTO ANTINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

La actividad antiinflamatoria se midió usando el método de la inducción de formación de edema provocado por el carragenano. El ensayo consistió en administrar extracto de las plantas en estudio, luego, generar un edema en una pata trasera de una rata. La medición del cambio en el volumen del edema respecto al tiempo se usó como indicador del efecto antiinflamatorio del extracto.

Los animales usados fueron ratas hembras Sprague-Dawley de 150-220 g de peso corporal mantenidas en el Bioterio de la Universidad de Antofagasta a una temperatura de 22 ± 3 °C, con una humedad del 60 ± 4 %, ciclo de luz natural y alimentadas con la dieta standard y agua *ad libitum*. El cuidado de los animales respetó las regulaciones sobre protección de animales usados con fines científicos experimentales y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Antofagasta.

Las ratas, separadas en 7 grupos de 4 animales cada uno, fueron mantenidas en ayuna por 12 horas antes del experimento. Cada rata fue numerada y pesada adecuadamente. A todos los animales se les inyectó 0,1 mL de solución de carragenano 1 % en suero salino en la zona plantar de la pata trasera izquierda. Los extractos y los controles se administraron 60 minutos antes de la inyección del

proinflamatorio carragenano. 5 grupos de ratas recibieron, separadamente, vía intragástrica, usando gavage, soluciones de los extractos hidroalcohólicos de las 5 plantas en estudio (100 mg/mL) de modo que cada animal recibiera una dosis de 500 mg/Kg de peso de animal. A un sexto grupo se le trató con indometacina, conocido antiinflamatorio, en dosis de 10 mg/Kg, como control positivo. Al último grupo de animales se le administró sólo suero salino como control negativo o blanco

La evolución del edema en la pata de la rata se midió por el volumen de desplazamiento de agua usando el plestímetro (Ugo Basile, modelo 7150) a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la inyección de carragenano. El efecto se expresó como % de Inhibición de la inflamación y se calculó como

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - D / C) 100,$$

donde D es el volumen del edema del animal tratado y C es el volumen del edema del control.

Actividad Antiinflamatorio Extractos Hidroalcohólicos					
	% Inhibición de la Inflamación				
	1 hr.	2 hrs.	3 hrs.	4 hrs.	5 hrs.
Control +	50.94 ± 0.30	48.15 ± 1.16	40.30 ± 1.44	34.98 ± 0.81	36.16 ± 0.42
<i>L. medicinalis</i>	20.97 ± 1.42	62.01 ± 2.60	56.84 ± 0.41	64.61 ± 1.22	26.45 ± 1.07
<i>S. nutans</i>	89.79 ± 0.70	74.36 ± 2.26	65.58 ± 0.48	64.88 ± 0.58	40.29 ± 0.79
<i>H. rigidus</i>	39.11 ± 1.42	9.50 ± 1.04	18.51 ± 1.99	47.10 ± 1.34	45.45 ± 1.02
<i>X. poposum</i>	73.25 ± 0.24	71.42 ± 0.95	35.36 ± 1.34	42.25 ± 1.20	12.81 ± 2.33
<i>P. quadrangularis</i>	2.28 ± 1.58	62.96 ± 2.68	54.42 ± 0.59	73.94 ± 0.63	55.99 ± 1.25

Control + = Indometacina 10 mg/Kg.
Extractos HA= 500 mg/Kg

Prácticamente los extractos hidroalcohólicos de todas las plantas bajo estudio muestran una capacidad inhibitoria notable de la inflamación frente al modelo inducido

por el carragenano. Las más significativas diferencias se observan en los cambios de capacidad antiinflamatoria respecto a los tiempos después del carragenano. Esto podría ser explicado asumiendo que los mecanismos de la acción antiinflamatoria son diversos y pueden variar de un extracto a otro.

MEDICIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERGLICÉMICO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

La evaluación del efecto antihiperglucémico de los extractos de las plantas en estudio se realizó induciendo una diabetes experimental en ratas, inyectando streptozotocina. Los animales usados fueron ratas hembras y machos Sprague-Dawley de 150-220 g de peso corporal mantenidas en el Bioterio de la Universidad de Antofagasta a una temperatura de 22 ± 3 °C, con una humedad del 60 ± 4 %, ciclo de luz natural y alimentadas con la dieta standard y agua *ad libitum*. Las ratas fueron mantenidas en ayuna durante toda la noche. Cada rata fue numerada y pesada adecuadamente. La solución de streptozotocina (20 mg/mL) fue preparada en suero salino inmediatamente antes de inyectarla a los animales. La diabetes fue inducida por inyección intraperitoneal, en dosis de 40 mg/Kg de peso del animal. Muestras de sangre para medir la concentración de glucosa se obtuvo de cortes en la cola de la rata, desde las 72 horas de la aplicación de la streptozotocina. A los 15 días, se dispuso de un número adecuado de animales con niveles de glucosa en la sangre por sobre los 200 mg/dL y fueron seleccionados para el estudio. Se separó 7 grupos de 4 ratas (2 hembras y 2 machos), 5 grupos recibieron, separadamente, via intragastrica, usando gavage, soluciones de los extractos hidroalcohólicos de las 5 plantas en estudio (100 mg/mL) de modo que cada animal recibiera una dosis de 250 mg/Kg de peso de animal. Un sexto grupo recibió intraperitonealmente disolución de clorpropamida 5 mg/mL en suero salino tal que cada rata incorporó 10 mg/Kg, usado como control positivo antidiabético. Un séptimo grupo sólo recibió suero salino y se usó como control diabético. La concentración de glucosa en la sangre de los animales fue medida a 0, 2, 4 y 6 horas después del tratamiento. Una gota de sangre obtenida por un pequeño corte en la cola del animal fue colocada sobre la tira reactiva y se leyó en un equipo One Touch Ultra

de *Johnson and Johnson*, lo que indicó directamente el nivel de la glicemia expresada en mg de glucosa por decilitro de sangre.

El efecto antihiperглиcémico se expresó como % de disminución de la glicemia en extractos y control positivo respecto a la glicemia de tiempo 0 y se calculó usando la fórmula

$$\% \text{ Disminución glicemia} = (1 - G_t / G_0) \times 100$$

donde G_t y G_0 son valores de glicemia de extracto o control positivo a un tiempo dado y a un tiempo 0, respectivamente.

Niveles de Glicemia por efecto de Extractos Hidroalcohólicos (mg/dL)							
Control	Control (+)	<i>H. rigidus</i>	<i>L. medicinalis</i>	<i>P. quadrangularis</i>	<i>S. nutans</i>	<i>X. popusum</i>	Tiempo
129	112	114	117	123	220	148	0 min
128	93	225	254	109	114	139	2 hrs
97	98	174	106	106	125	102	4 hrs
-----	107	140	112	100	105	114	6 hrs

Valores de glicemia en promedio de cada grupo de 4 animales tratados con una sola dosis del extracto de 250 mg/Kg, y su variación respecto al tiempo. Claramente se aprecia que los extractos de *H. rigidus* y *L. medicinalis* son hiperглиcémicos, es decir aumentan el nivel de glucosa circulante.

Este resultado es muy importante para tener cuidado de no recomendar el consumo de estas plantas *H. rigidus* y *L. medicinalis* a personas con problemas de glicemia alta.

Efecto antihiperглиcémico de Extractos Hidroalcohólicos (%)							
Control	Control (+)	<i>H. rigidus</i>	<i>L. medicinalis</i>	<i>P. quadrangularis</i>	<i>S. nutans</i>	<i>X. popusum</i>	Tiempo
1% ↓	17% ↓	97% ↑	117% ↑	11% ↓	48% ↓	6% ↓	2 h
25% ↓	13% ↓	53% ↑	9% ↓	14% ↓	43% ↓	31% ↓	4 h
-----	4% ↓	23% ↑	4% ↓	19% ↓	52% ↓	23% ↓	6 h

En la tabla anterior se aprecia el efecto sobre el nivel de glucosa en sangre en los animales de experimentación, expresados en % respecto al valor del promedio a las 0

horas. Los valores expresan el % de glicemia y el sentido de la flecha ↓ indica una disminución.

Los extractos de *S. nutans* y *X. popusum* muestran una actividad antiglicémica importante. *S. nutans* reduce el contenido de glucosa en un 50 % a partir de la 2 horas de administración

El mismo diseño experimental se usó para evaluar el efecto antihiperглиcemiante de *P. quadrangularis* y de *S. nutans* a concentraciones de 50 mg/Kg y 100 mg/Kg.

Niveles de Glicemia por efecto de Extractos Hidroalcohólicos (mg/dL)						
Control (D)	Control (+)	Pq 50 mg/Kg	Pq 100 mg/Kg	Sn 50 mg/Kg	Sn 100 mg/Kg	Tiempo
109	127	132	130	127	190	0 min
111	120	119	111	117	165	2 h
105	108	130	119	126	100	4 h
93	106	124	100	115	83	6 h

Efecto antihiperглиcémico de Extractos Hidroalcohólicos (%)						
Control (D)	Control (+)	Pq 50 mg/Kg	Pq 100 mg/Kg	Sn 50 mg/Kg	Sn 100 mg/Kg	Tiempo
2% ↑	6% ↓	10% ↓	15% ↓	8% ↓	13% ↓	2 h
4% ↓	15% ↓	2% ↓	8% ↓	1% ↓	47% ↓	4 h
15% ↓	17% ↓	6% ↓	23% ↓	9% ↓	56% ↓	6 h

Estos resultados indican que el mayor efecto antidiabético observado ocurre cuando la dosis que se administra es de 100 mg/Kg. A esta dosis *S. nutans* muestra un 50 % de reducción de la glicemia desde las 4 horas de la administración.

MEDICIÓN DEL EFECTO HIPOTENSIVO Y REACTIVIDAD VASCULAR O VASODILATACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

Los animales usados fueron ratas hembras Sprague-Dawley mantenidas en el Bioterio de la Universidad de Antofagasta a una temperatura de 22 ± 3 °C, con una humedad del 60 ± 4 %, ciclo de luz natural y alimentadas con la dieta standard y agua *ad libitum*. Se utilizó dos grupos de animales divididos según su edad:

- Grupo I: Ratas de 10-14 meses de edad con un peso promedio de 400 ± 70 g, para los experimentos *in vivo*, escogidos de acuerdo a su condición basal de una leve hipertensión como consecuencia de la edad.
- Grupo II: Ratas de 3-5 meses de edad con un peso promedio de 270 ± 30 g, para los experimentos de reactividad vascular.

Los animales fueron sometidos a condiciones de ayuno 24 horas previa realización de cada experimento.

Estudios *in vivo* efecto hipotensor en ratas anestesiadas.

Ratas del Grupo I, fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de solución acuosa al 5 % de tiopental sódico (50 mg/Kg de peso corporal del animal). Se expuso la vena femoral y se canuló con un catéter de poliestireno PE-10 para la administración de extractos, metabolitos y drogas. Se expuso la arteria carótida derecha y se canuló usando un catéter de poliestireno PE-50, con suero heparinizado (100 UI/mL), conectado a un transductor de presión (TSD104A) junto a una unidad de adquisición de datos MP100 (*BIOPAC Systems Inc*) para el registro de la presión arterial. Se expuso la tráquea y se canuló para facilitar la respiración espontánea de los animales. Simultáneamente, se realizó el registro electrocardiográfico en derivada II (ECG-DII) utilizando un módulo ECG100B (*BIOPAC Systems Inc*) conectado a una unidad de adquisición de datos MP100. Se vigiló constantemente el nivel de anestesia de los animales, de modo que se mantuviera dentro de niveles quirúrgicos, corroborado por la ausencia de reflejos motores somáticos.

Tras 30 minutos de estabilización post-cirugía, a los animales se les administró, en experimentos individuales, 0,1 mL de extracto de cada planta, en concentraciones crecientes de 5, 10, 20 y 40 mg/Kg de peso del animal, seguidos de igual volumen de suero fisiológico. Antes de la administración de las siguientes dosis, se vigiló la presión arterial y el registro electrocardiográfico hasta completa recuperación de los parámetros basales (presión y ECG). Los efectos de cada dosis administrada fueron medidos respecto a los cambios de la presión arterial media, presión arterial diastólica y sistólica para cada uno de los experimentos, junto con las alteraciones electrocardiográficas y fueron comparadas respecto al control positivo propranolol en concentración 10^{-6} M. Concluido cada experimento los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico, vía femoral.

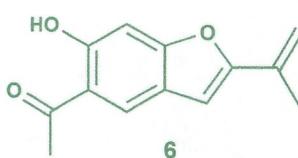
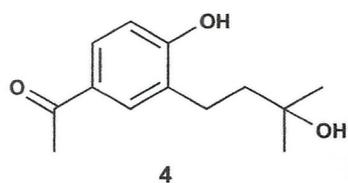
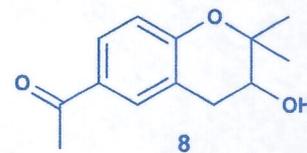
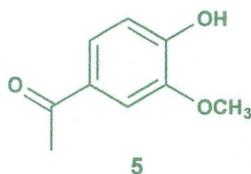
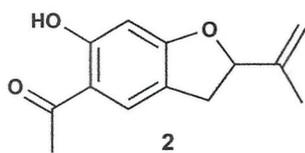
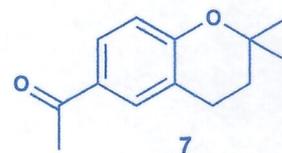
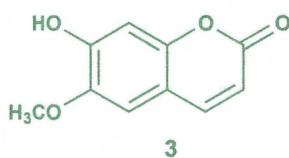
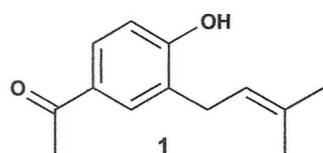
Para el estudio de los metabolitos aislados, se prepararon soluciones stock de concentración 10^{-1} M en dimetilsulfoxido (DMSO), debido a la hidrofobicidad de los productos naturales. Posteriormente, se realizaron diluciones en suero fisiológico, en el rango de concentraciones 10^{-10} – 10^{-4} M, de modo que la cantidad de DMSO no excediera el 0,1 % en cada solución. Previa inyección de cada metabolito, se verificó el efecto del vehículo por la administración vía femoral de 0,1 mL de éste, seguido de igual volumen de suero fisiológico.

Todos los registros fueron realizados utilizando el software AcqKnowledge 3.9.6.1 (*BIOPAC Systems Inc*) y el análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.03. (*GraphPad Software Inc.*)

Aislación e identificación de metabolitos de *S. nutans* y *X. poposum*.

Por sucesivas cromatografías en silica gel se logró aislar 8 metabolitos secundarios desde el extracto clorofórmico de *X. poposum* y del extracto de acetato de etilo de *S. nutans*. Las estructuras moleculares fueron determinadas por aplicación de técnicas espectroscópicas tales como: IR, UV, EM, ^1H - RMN y ^{13}C - RMN mono y bidimensional.

Estructura Química de Metabolitos Aislados desde *Senecio nutans* y *Xenophyllum poposum*.



El recuadro negro indica las estructuras químicas de los metabolitos comunes para *S. nutans* y *X. poposum*, el recuadro verde la estructura de los metabolitos aislados solo desde *X. poposum* y el azul para los metabolitos aislados solo desde *S. nutans*.

EFFECTO HIPOTENSOR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE X. poposum Y S. nutans

		<i>X. poposum</i>		<i>S. nutans</i>	
Extracto	Dosis (mg/Kg _{peso})	PAM (mmHg)	% disminución PAM	PAM (mmHg)	% disminución PAM
Acuoso	Basal	139.5 ± 6.19	----	143.3 ± 5.65	----
	Control +	131.4 ± 10.0	5.81 ± 3.92	114.2 ± 3.38	20.31 ± 3.26
	5	93.06 ± 8.18	33.29 ± 4.92	87.23 ± 11.18	33.13 ± 8.79
	10	89.93 ± 6.63	35.53 ± 1.49	72.43 ± 12.35	49.46 ± 9.16
	20	81.71 ± 6.10	41.43 ± 1.06	59.17 ± 7.15	58.71 ± 3.26
	40	63.83 ± 4.30	54.24 ± 3.76	54.11 ± 5.21	62.24 ± 1.36
Hidroalcohólico	Basal	140.1 ± 5.09	----	141.5 ± 6.26	----
	Control +	112.4 ± 9.34	19.06 ± 4.62	113.4 ± 2.94	19.86 ± 4.35
	5	110.5 ± 9.22	21.13 ± 5.01	103.0 ± 11.68	27.21 ± 9.56
	10	84.08 ± 3.14	39.99 ± 2.17	79.02 ± 3.10	44.16 ± 3.26
	20	66.46 ± 8.34	52.56 ± 3.14	69.75 ± 4.37	50.71 ± 4.29
	40	58.43 ± 3.58	58.29 ± 1.72	54.34 ± 5.30	61.60 ± 1.75
Hexanico	Basal	142.2 ± 4.68	----	142.6 ± 5.04	----
	Control +	113.4 ± 9.34	20.25 ± 3.26	110.5 ± 6.26	22.51 ± 1.35
	5	56.00 ± 15.10	60.62 ± 7.98	57.85 ± 2.35	59.43 ± 3.26
	10	33.03 ± 6.10	77.48 ± 2.35	31.50 ± 2.12	77.98 ± 2.49
Clorofórmico	Basal	134.7 ± 3.69	----	134.0 ± 6.75	----
	Control +	113.4 ± 9.34	15.81 ± 4.32	104.3 ± 9.65	22.16 ± 8.46
	5	107.6 ± 2.79	20.12 ± 1.47	93.63 ± 6.45	29.88 ± 1.76
	10	82.53 ± 4.16	38.73 ± 1.12	82.46 ± 1.73	38.46 ± 4.75
	20	64.07 ± 2.51	52.44 ± 1.72	61.15 ± 0.68	54.37 ± 5.42
	40	47.58 ± 2.11	64.68 ± 1.27	46.93 ± 3.46	64.98 ± 4.32
Acetato de Etilo	Basal	136.6 ± 7.16	----	151.8 ± 6.72	----
	Control +	114.8 ± 7.62	15.96 ± 1.52	113.7 ± 11.48	25.10 ± 8.72
	5	97.97 ± 6.25	28.28 ± 5.49	94.92 ± 13.05	37.47 ± 7.96
	10	77.82 ± 7.53	43.03 ± 4.32	66.00 ± 6.00	56.52 ± 1.32
	20	65.43 ± 3.00	52.10 ± 3.26	56.92 ± 11.03	62.50 ± 6.46
	40	45.61 ± 2.96	65.88 ± 2.29	44.17 ± 4.77	70.90 ± 3.76
Butanólico	Basal	146.4 ± 7.13	----	133.3 ± 4.87	----
	Control +	115.7 ± 6.12	20.97 ± 1.32	109.2 ± 9.34	18.08 ± 4.31
	5	112.7 ± 8.97	23.02 ± 3.26	127.4 ± 3.79	4.43 ± 3.72
	10	121.4 ± 4.65	17.08 ± 2.73	120.0 ± 2.01	9.98 ± 3.10
	20	118.9 ± 7.82	18.78 ± 1.76	110.6 ± 5.05	17.03 ± 4.70
	40	110.2 ± 10.17	24.77 ± 6.92	106.7 ± 3.13	19.96 ± 1.75

Control + = propranolol 10 mg/Kg_{peso}.

EFECTO HIPOTENSOR DEL COMPUESTO 1 y SU OXIMA				
	Compuesto 1		Oxima 1	
Dosis (mg/Kg _{peso})	PAM (mmHg)	% disminución PAM	PAM (mmHg)	% disminución PAM
Basal	135.9 ± 2.98	----	141.70 ± 4.06	----
Control +	110.1 ± 6.03	18.99 ± 4.35	108.70 ± 8.55	22.29 ± 3.20
10 ⁻¹⁰	113.4 ± 12.59	16.56 ± 9.38	89.84 ± 10.88	36.60 ± 7.90
10 ⁻⁹	103.8 ± 7.98	23.62 ± 5.76	87.28 ± 1.90	38.41 ± 2.35
10 ⁻⁸	101.0 ± 8.06	25.68 ± 5.24	59.05 ± 2.09	58.31 ± 3.26
10 ⁻⁷	95.56 ± 5.01	29.68 ± 3.42	41.65 ± 0.85	70.61 ± 4.32
10 ⁻⁶	87.09 ± 1.14	35.92 ± 2.01	----	----
10 ⁻⁵	74.24 ± 2.76	45.37 ± 1.09	----	----
10 ⁻⁴	72.12 ± 2.92	46.93 ± 1.01	----	----

Valores de PAM (mmHg) y % de disminución de la PAM obtenidos luego de la administración intravenosa del compuesto 1 aislado de *X. poposum* y *S. nutans* Valores de PAM (mmHg) y % de disminución de la PAM obtenidos luego de la administración intravenosa de la oxima del compuesto 1, obtenido en el laboratorio por reacción de compuesto 1 con hidrocloreuro de hidroxilamina. Este derivado semisintético del compuesto 1 ha resultado ser bastante más activo que el precursor natural. A la concentración de 10⁻⁷ M, por ejemplo, el compuesto 1 muestra una disminución de la PAM de un 30 %, mientras que a esa misma concentración la oxima derivada disminuye la PAM en un 70 %

EFECTO HIPOTENSOR de Extracto Hidroalcohólico de <i>P. quadrangularis</i>			
Extracto	Dosis (mg/Kg _{peso})	PAM (mmHg)	% disminución PAM
P.q	Basal	128.1 ± 3.76	-----
	10	102.7 ± 2.44	19.83 ± 1.31
	20	93.55 ± 7.76	26.97 ± 3.22
	40	82.24 ± 6.31	35.80 ± 3.40
	60	64.44 ± 5.68	49.70 ± 1.89
	80	55.42 ± 3.25	56.74 ± 1.20
Control + = propranolol 10 mg/Kg _{peso} .			

Valores de PAM (mmHg) y % de disminución de la PAM obtenidos luego de la administración intravenosa de extracto hidroalcohólico de *P. quadrangularis*

Estudios del efecto vasodilatador *in vitro*

Medición de la actividad dilatadora en anillos de aorta de rata.

El procedimiento utilizado para determinar la contractilidad en anillos de aortas de rata, requiere de la descripción de las siguientes etapas:

Obtención de anillos de Aorta. Se sacrificó ratas del Grupo II con ayuno de 24 horas mediante fractura cervical. La arteria aorta torácica se extirpó cuidadosamente, desde la bifurcación abdominal hasta el callao aórtico y depositada en una cápsula de Petri que contenía solución Krebs-Ringer a temperatura ambiente con la siguiente composición mM: NaCl 120; KCl 4,2; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 1,3; C₆H₁₂O₆ 5 y NaHCO₃ 25 a pH 7.4. Este medio de incubación se mantuvo gasificado con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Después de remover sangre, grasa y tejido conectivo, la arteria aorta fue cortada transversalmente en anillos cilíndricos de 2-3 mm de diámetro.

Montaje de los Anillos. Cada anillo fue montado entre dos ganchos triangulares de acero inoxidable. Uno de los ganchos fue suspendido en un vástago de vidrio (Anclaje) y depositado en un cámara de órgano aislado de 10 mL con solución Krebs-Ringer aireada constantemente con mezcla gaseosa 95 % O₂ y 5 % CO₂ y mantenida a 37 °C por una bomba termorreguladora. El segundo gancho fue conectado mediante un hilo a un transductor isométrico de tensión XDRCR (*Radnoti Glass Technology Inc. USA*), conectados a una unidad de adquisición de datos PowerLab 8/30 (*ADInstruments*). La información fue procesada utilizando el software LabChart 7 Pro proporcionado por ADInstruments.

Acondicionamiento del tejido. Tras el montaje los anillos fueron dejados en condición de reposo sin tensión durante 30 minutos, posteriormente, se realizó recambio de la solución Krebs-Ringer y se dejó nuevamente en reposo por 10 minutos. Luego los anillos fueron cuidadosamente tensionados dos veces a intervalos de 10 minutos cada uno a valores de 1,00 gramo de tensión utilizando micromanipuladores. Luego se realizaron dos ajustes de tensión a 1,40 gramo a intervalos de 10 minutos cada uno. Tras el periodo de estabilización del tejido, la viabilidad del tejido fue evaluada por la adición de cloruro de potasio (KCl) 60 mM. Después de 10 minutos de contracción del tejido, se realizaron dos lavados a intervalos de 5 minutos cada uno, antes de la siguiente adición de KCl. Cuando dos controles de contracción sucesivas mostraron amplitudes similares, la preparación se consideró equilibrada y lista para determinar la actividad vasodilatadora de las sustancias.

Medición de la actividad vasodilatadora. Anillos con endotelio intacto, fueron precontraídos con fenilefrina 1 µM. Luego de la estabilización de la respuesta contráctil inducida por FE, se adicionaron de forma acumulativa a cada baño de órgano aislado, los extractos obtenidos de las plantas, en el rango de concentración de 0,6 – 10.000 µg/mL, una vez alcanzado el máximo de contracción de FE. El efecto vasodilatador fue registrado por un periodo de 30 minutos para cada una de las concentraciones utilizadas. Los resultados son expresados como porcentaje de relajación.

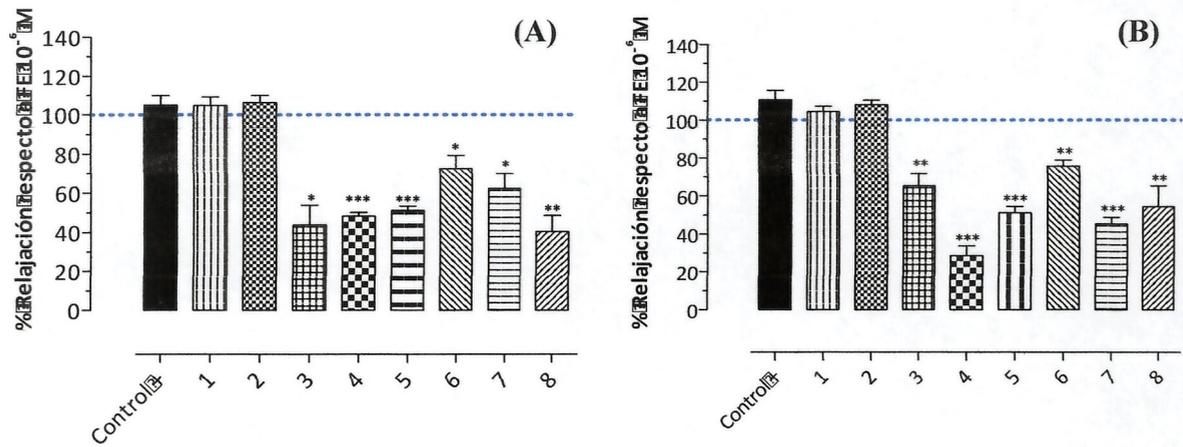
$$\% \text{ Relajación} = (1 - R_2 / R_1) 100$$

donde: R_1 es la respuesta inducida por FE y R_2 es la respuesta después de adicionados los extractos.

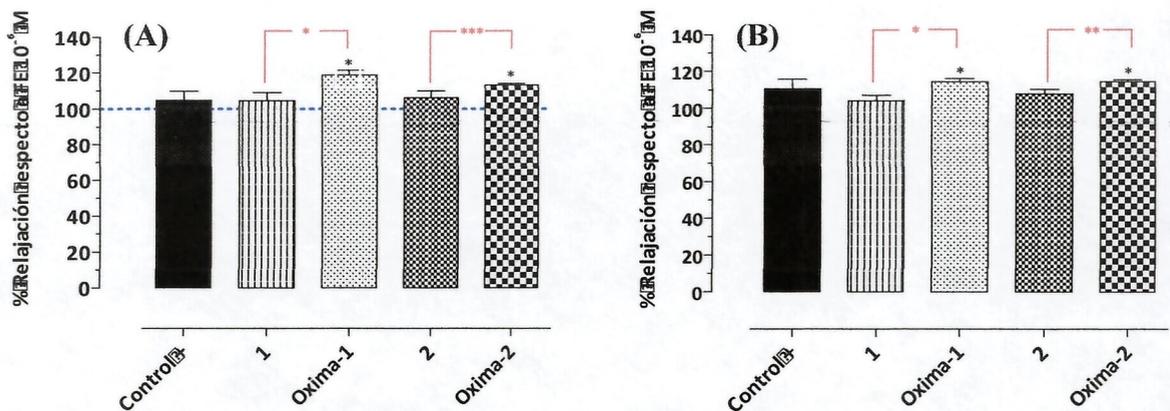
La integridad del endotelio fue evaluada por la adición de acetilcolina 1 μM a anillos precontraídos con fenilefrina 1 μM , cuando la respuesta dilatadora de acetilcolina fue superior al 80 % los anillos fueron considerados con endotelio intacto, mientras que los anillos con respuesta inferior al 10 % fueron descartados.

Para determinar la actividad vasodilatadora de los metabolitos aislados se prepararon soluciones stock de concentración 10^{-1} M en DMSO, posteriormente se realizaron diluciones en el rango de concentraciones de 10^{-10} - 10^{-4} M en agua destilada, de modo que la concentración final en los baños de órgano, no excediera el 0,1 % de DMSO.

EFEECTO VASODILATADOR LOS EXTRACTOS DE <i>X. poposum</i> y <i>S. nutans</i>				
	<i>X. poposum</i>		<i>S. nutans</i>	
Extracto	EC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E_{max} (%)	EC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E_{max} (%)
Acuoso	1231.0	123.7 \pm 3.0	472.8	132.7 \pm 3.5
Hidroalcohólico	126.9	121.7 \pm 4.3	53.81	143.9 \pm 2.2
Hexanico	57.6	145.8 \pm 7.3	21.8	130.4 \pm 2.1
Clorofórmico	2.5	134.3 \pm 5.7	7.5	130,6 \pm 5.9
Acetato de Etilo	14.3	123.1 \pm 1.3	5.8	131.9 \pm 0.9
Butanolico	479.5	112.5 \pm 11.8	44.3	103.2 \pm 4.4



Efecto Vasodilatador de compuesto aislados (A) Compuestos aislados en concentración 10^{-4} M comparados con ACh 10^{-6} M como control positivo en anillos con endotelio intacto. **(B)** Compuestos aislados en concentración 10^{-4} M en anillo sin endotelio comparados frente a NPS 10^{-6} M como control positivo. $n=5$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$



Efecto Vasodilatador de las oximas y precursores (A) Compuestos en concentración 10^{-4} M frente a ACh 10^{-6} M como control positivo en anillos con endotelio intacto. **(B)** Compuestos en concentración 10^{-4} M frente a NPS 10^{-6} M como control positivo en anillos sin endotelio. Los valores son expresados como la media \pm EE. $n=5-6$, * $p<0.01$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

Concentración efectiva 50 (EC ₅₀) y efecto máximo de relajación en arterias aortas (E _{max}) del compuesto 1 y su oxima.				
	Compuesto 1		Oxima 1	
Anillos	EC ₅₀ (M)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (M)	E _{max} (%)
E+	8.98x10 ⁻⁹	111.1 ± 7.62	6.00x10 ⁻⁹	118.8 ± 10.03
E-	7.31x10 ⁻⁹	108.82 ± 7.53	6.46x10 ⁻⁹	113.7 ± 6.19
	Compuesto 2		Oxima 2	
Anillos	EC ₅₀ (M)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (M)	E _{max} (%)
E+	7.16x10 ⁻⁹	111.5 ± 6.21	4.30x10 ⁻⁹	109.3 ± 2.72
E-	5.94x10 ⁻⁹	112.7 ± 6.25	4.65x10 ⁻⁹	110.33 ± 4.40

MEDICIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

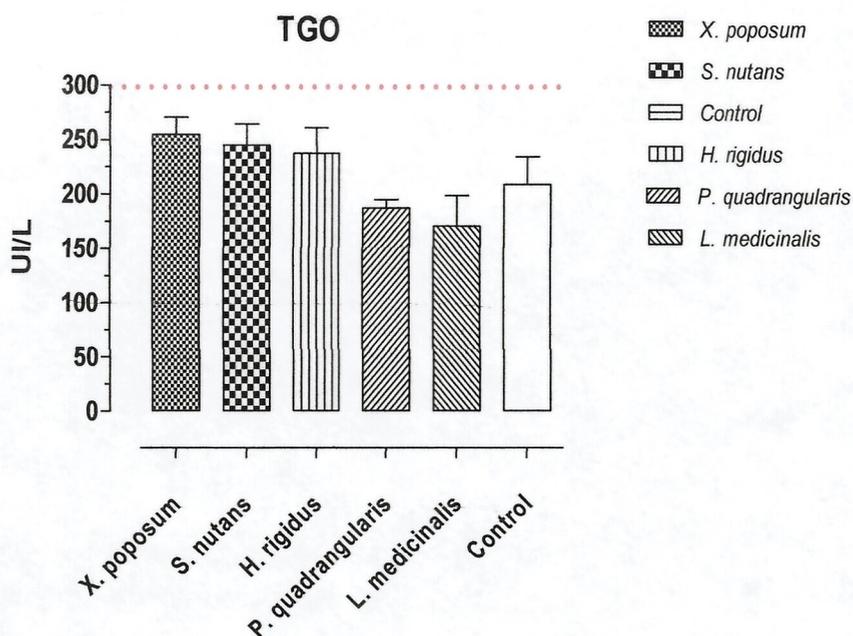
Los animales usados fueron ratas de ambos sexos Sprague-Dawley de 150-220 g de peso corporal mantenidas en el Bioterio de la Universidad de Antofagasta a una temperatura de 22 ± 3 °C, con una humedad del 60 ± 4 %, ciclo de luz natural y alimentadas con la dieta standard y agua *ad libitum*. Cada rata fue numerada y pesada adecuadamente. Las ratas se separaron por sexo y en grupos de 3, se les suspendió el alimento por 12 horas

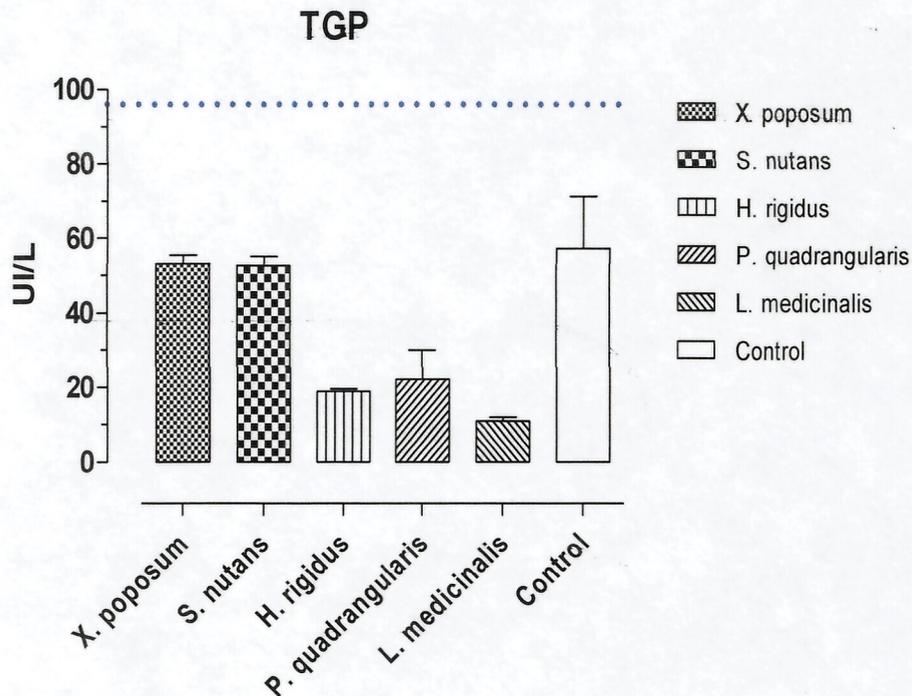
Los extractos se agregaron por vía oral mediante una cánula intragástrica. A cada rata se le dió una dosis de 3 g/kg. Las ratas fueron observadas atentamente durante las primeras 3 horas. Durante los siguientes 14 días las ratas quedaron en permanente observación.

Desde el comienzo y durante todo el experimento el comportamiento corporal de todos los animales tratados fue idéntico al de los animales controles. No hubo mortalidad. No hubo piloerección, ni agresividad, ni respiración agitada, ni problemas digestivos ni renales, ni agitación ni inmovilidad. El consumo de alimento y agua fue normal.

Después de los 14 días de atenta observación, las ratas se anestesiaron con éter y a través de una punción cardiaca fue obtenida una muestra de 3-5 mL de sangre. Los tubos de ensayo con muestra de sangre se colocaron en un baño de agua a 37 °C hasta la formación del coágulo. Por centrifugación se obtuvo el suero que permitió la cuantificación de las transaminasas hepáticas (TGP y TGO). Esta medición de las transaminasas fue realizada por el Laboratorio Louis Pasteur de Antofagasta.

Niveles de Transaminasas en Sangre post administración oral de extractos Hidroalcohólico en ratas.		
Plantas	TGO (UI/L)	TGP (UI/L)
<i>X. poposum</i>	254.50 ± 34.67	53.24 ± 5.04
<i>S. nutans</i>	244.98 ± 46.38	52.65 ± 6.20
<i>H. rigidus</i>	236.75 ± 34.01	19.05 ± 0.92
<i>P. quadrangularis</i>	186.75 ± 11.10	22.25 ± 10.96
<i>L. medicinalis</i>	170.40 ± 39.32	11.00 ± 1.41
Control	208.60 ± 43.45	57.40 ± 27.86





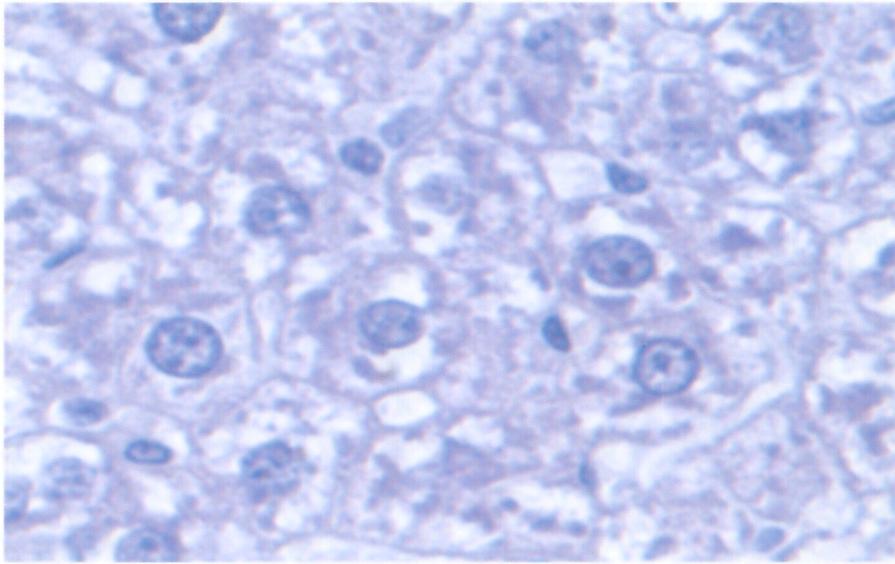
Luego de obtenida la sangre, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y desde cada animal se extrajo el hígado, el riñón, el corazón, los pulmón, los testículos y los ovarios y se fijaron en Bouin Alcohólico por 18 horas. Posteriormente, los tejidos se lavaron en alcohol de 80%. Luego se deshidrataron, sumergiendo los tejidos, a través de una batería de etanol de concentraciones ascendentes. Después de aclarar las muestras con xilol, incluir las muestras en paraplast y formar el bloque de parafina, cortar con el micrótopo rotatorio tipo Minot ($5\mu\text{m}$), montar sobre los portaobjetos, teñir con hematoxilina-eosina, se analizaron las placas histológicas en un microscopio fotónico a 400x de aumento.

El análisis histológico en microscopía óptica muestra que no hay ninguna evidencia de daño o alteración tisular ni anatómico, a nivel de hepatocitos ni en los intersticios intratrabeculares. No se aprecia daño en el núcleo del hepatocito ni se observa presencia de coágulos lipídicos

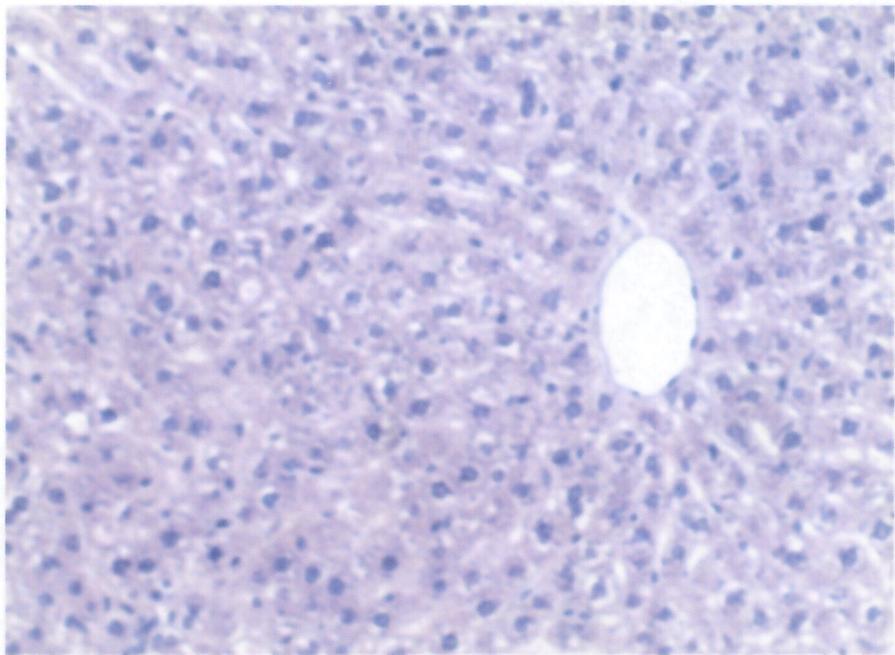
Del mismo modo no se aprecia modificaciones anatomopatológica cuando se compara placas histológicas de riñón de animales tratados con las de animales controles

Los resultados muestran que todos los animales de los grupos tratados a los que se les administró una alta dosis de extractos de planta, tienen comportamientos globales, conductas corporales, motilidad, formas de respiración, consumo de alimento y de agua , aumento o disminución de peso , idénticos con los animales controles a los que sólo se les dio suero salino. Además no hubo mortalidad.

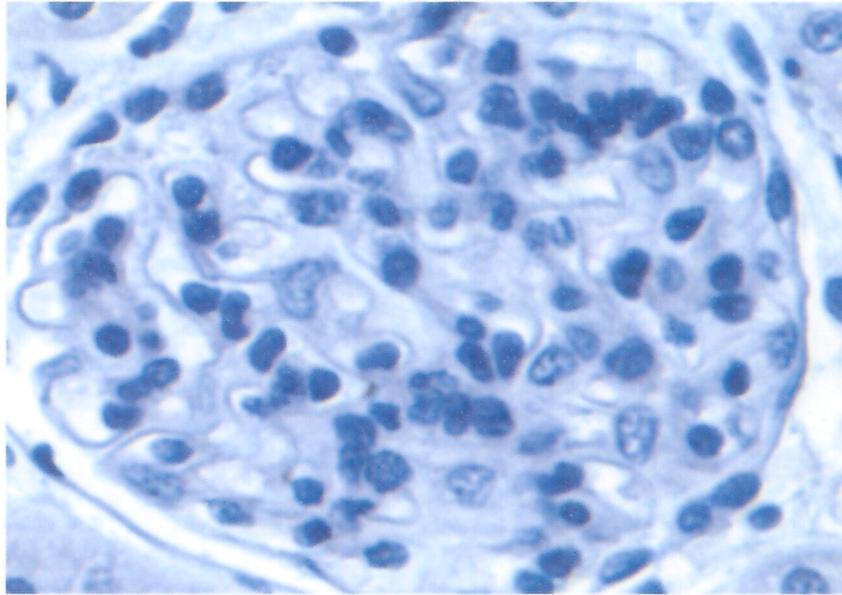
Los niveles de las transaminasas, importantes biomarcadores de daño hepático, en todos los animales tratados y no tratados, están en los rangos aceptados como normales. Esto significa que, hasta la dosis de 3000 mg por Kg de rata usada en estos experimentos, los animales tratados con los cinco extractos de la plantas en estudio muestran completa normalidad, sin indicios de malignidad ni de toxicidad alguna.



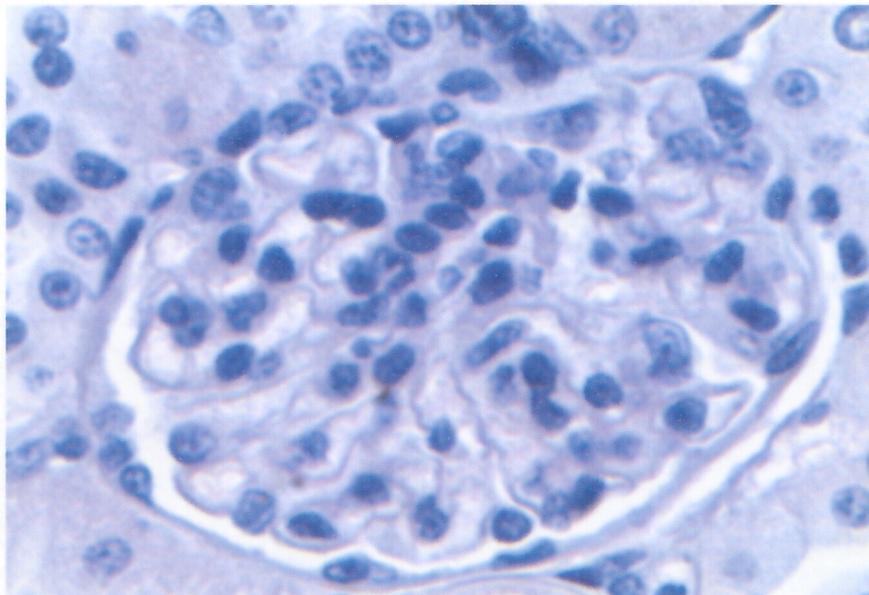
Hígado control



Hígado rata tratada con *X. poposum*



Riñón control

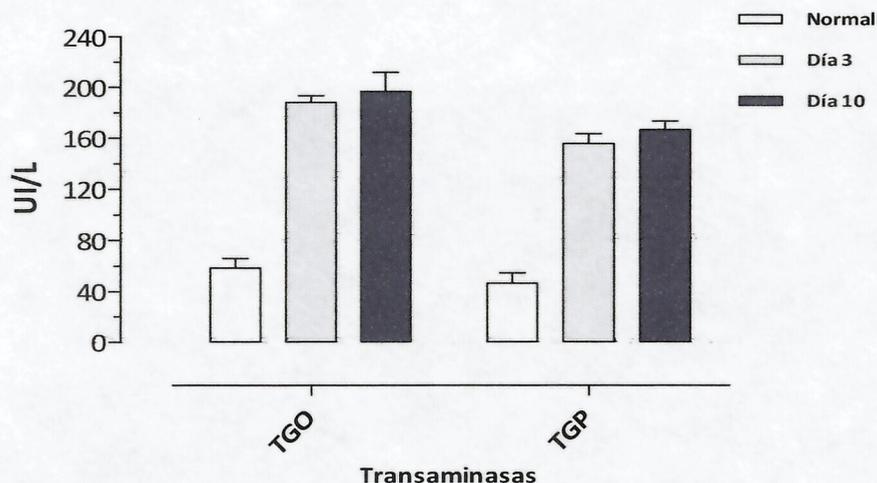


Riñón rata tratado con *H. rigidus*

MEDICIÓN DEL EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

El efecto hepatoprotector de los extractos se configuró en varios ensayos independientes, que utilizaron ratas machos adultos de la cepa Sprague-Dawley de 150-220 g de peso corporal disponibles desde el Bioterio de la Universidad de Antofagasta, a las que, en diferentes grupos, se les administró paracetamol como hepatotoxina, y extractos de plantas. La dosis de paracetamol usada en todos los experimentos es de 1 gramo por cada Kg de peso corporal de la rata. Los efectos se han evaluado midiendo la concentración de transaminasas (TGO y TGP) y la inspección histológica de preparaciones de hígados de animales tratados y controles. Los ensayos midieron el efecto de daño hepático producido por paracetamol y el efecto hepatoprotector de los extractos. El diseño experimental para estudiar el daño causado por el paracetamol, brevemente, contempló el uso de tres grupos de 4 animales cada uno. Al Grupo I, grupo control se les administró en forma oral y usando gavage agua durante 10 días y luego sacrificio del animal. Al Grupo II, se le administró paracetamol, luego agua por tres días y sacrificio. Al Grupo III se le administró paracetamol, luego agua por diez días y sacrificio. Los resultados se muestran a continuación.

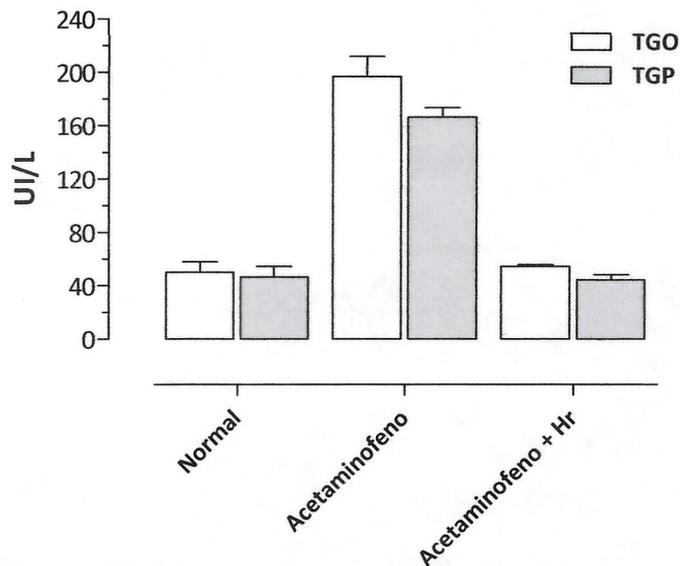
Niveles de Transaminasas post daño Hepático Inducido por Acetaminofeno



Se observa un aumento significativo de los niveles de las transaminasas por efecto del paracetamol tanto a los 3 como a los 10 días, indicando un severo daño hepático.

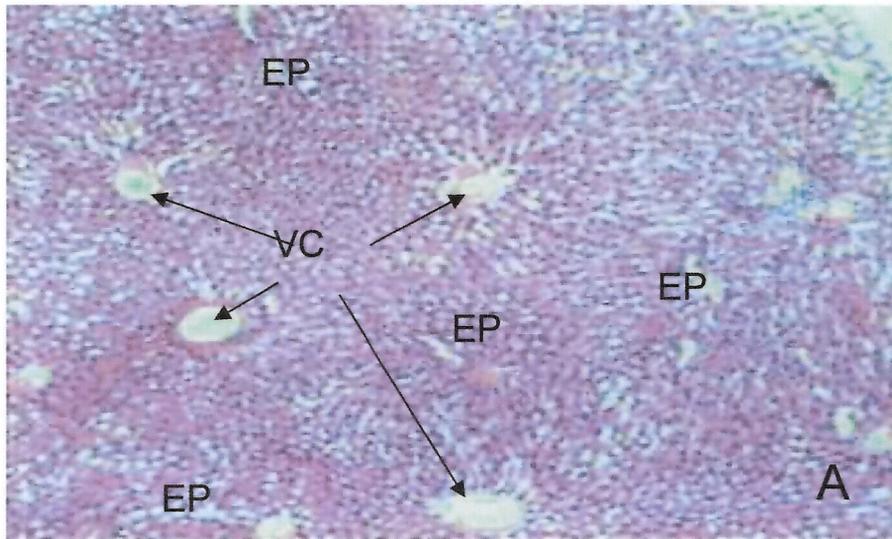
El diseño experimental para estudiar el efecto hepatoprotector de los extractos, brevemente, contempló el uso de tres grupos de 4 animales cada uno. Al Grupo IV, grupo control se les administró agua durante 10 días y luego sacrificio del animal. Al Grupo V se le administró extracto hidroalcohólico de *Haplopappus rigidus* en dosis de 200 mg/Kg por 10 días, luego agua y sacrificio a las 48 horas. Al Grupo VI se le administró extracto hidroalcohólico de *Haplopappus rigidus* en dosis de 200 mg/Kg por 10 días, luego paracetamol y sacrificio a las 48 horas.

Efecto de *H. rigidus* post Daño Hepático Sobre los Niveles de Transaminasas.

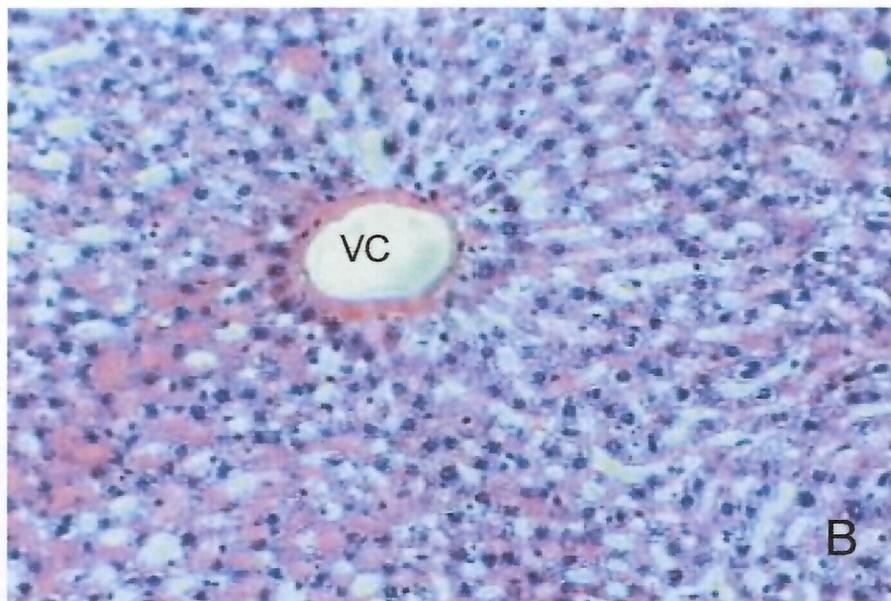


Se observa que el tratamiento con paracetamol induce un aumento significativo de los niveles de transaminasas, aún cuando se evalúa 10 días después de la administración del tóxico. El tratamiento con *Haplopappus rigidus* (bailahuén) a dosis de 200 mg/Kg produce una marcada reducción de los niveles de transaminasas, siendo semejante a los encontrados en los animales normales.

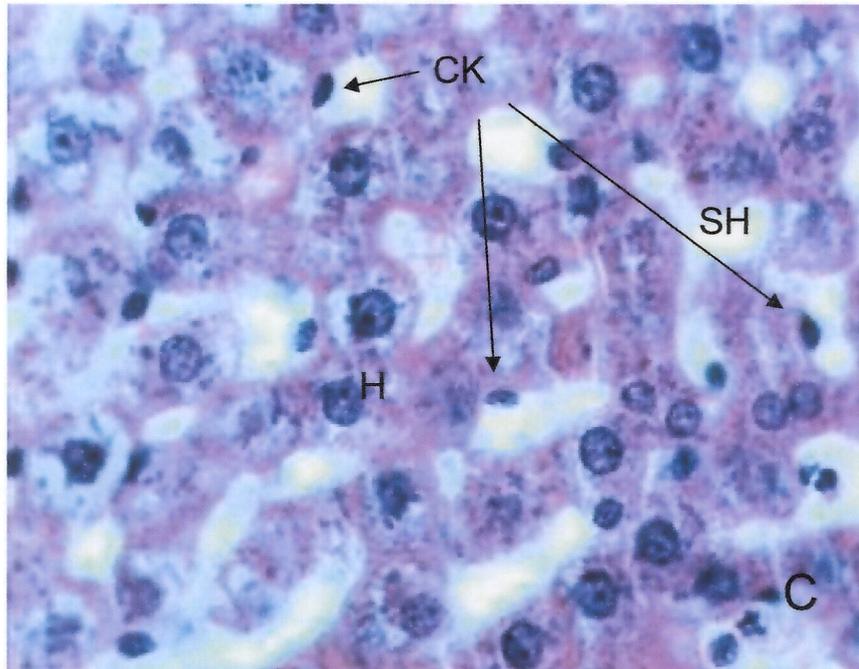
Los exámenes histológicos realizados concuerdan exactamente con estos resultados.



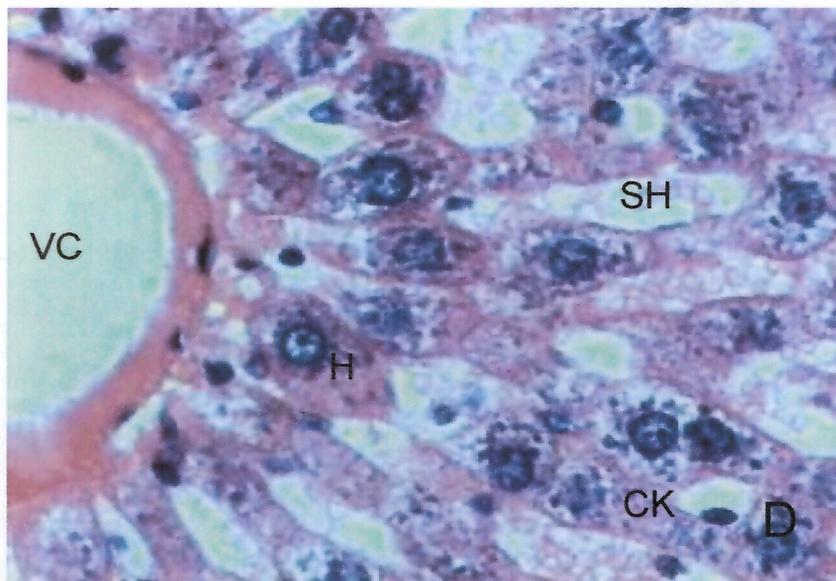
Se muestra un corte de hígado de animal control a bajo aumento (4x) donde se observan varios lobulillos hepáticos de aspecto normal, cada uno con su vena central (VC) y sus respectivos espacios porta (EP).



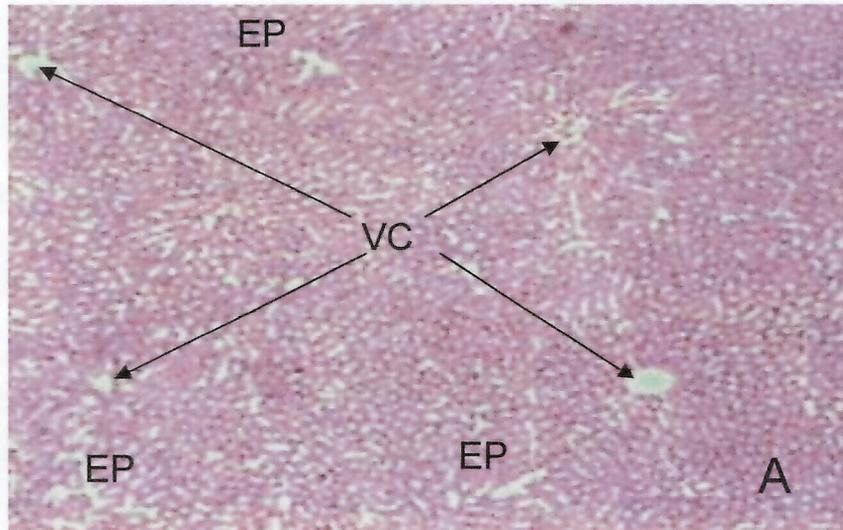
Se muestra parte de un lobulillo y la vena central a mediano aumento (10x) del hígado de un animal control. Nótese la disposición normal de los hepatocitos en cordones celulares o trabéculas dirigidas hacia la vena central



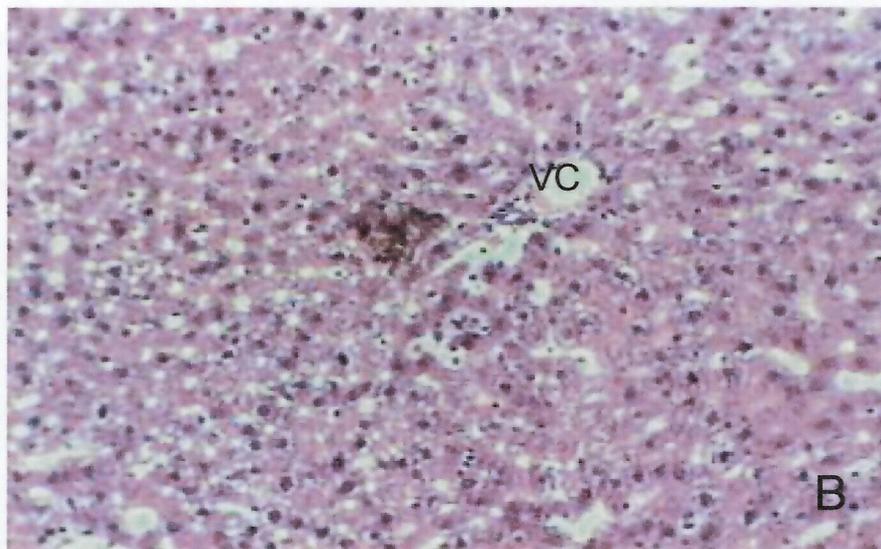
Corte del hígado de un animal control. Se observan los hepatocitos de aspecto normal (H) separados por los sinusoides hepáticos (SH), donde se alojan algunas células de Kupffer (CK).



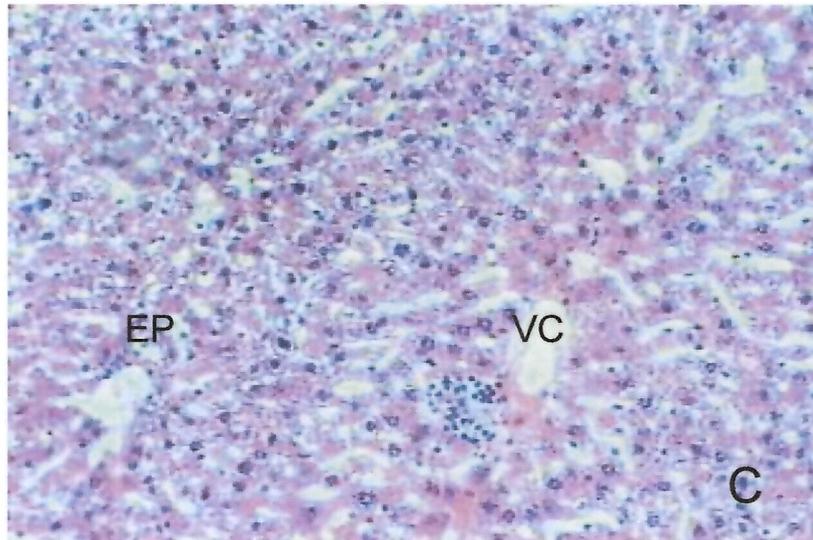
Corte del hígado de un animal control. Se observan los hepatocitos de aspecto normal (H) separados por los sinusoides hepáticos (SH), donde se alojan algunas células de Kupffer (CK). Adicionalmente se observa parte de la vena central (40x).



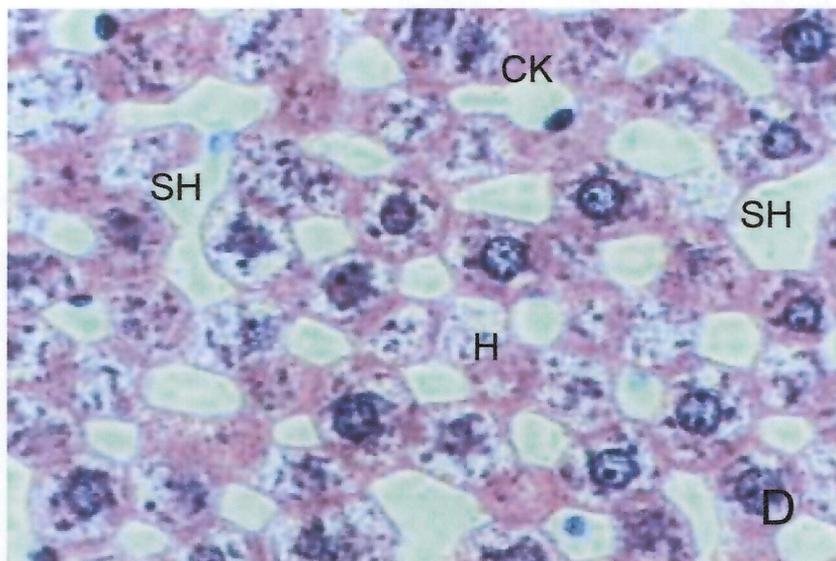
Cortes de un hígado de animal tratado con extracto de *Haplopappus rigidus* por 10 días y que recibió una dosis de agua el día 10 del tratamiento. Se muestra un corte de hígado de aspecto normal donde se observan varios lobulillos hepáticos (4x), cada uno con su vena central (VC) y sus respectivos espacios porta (EP).



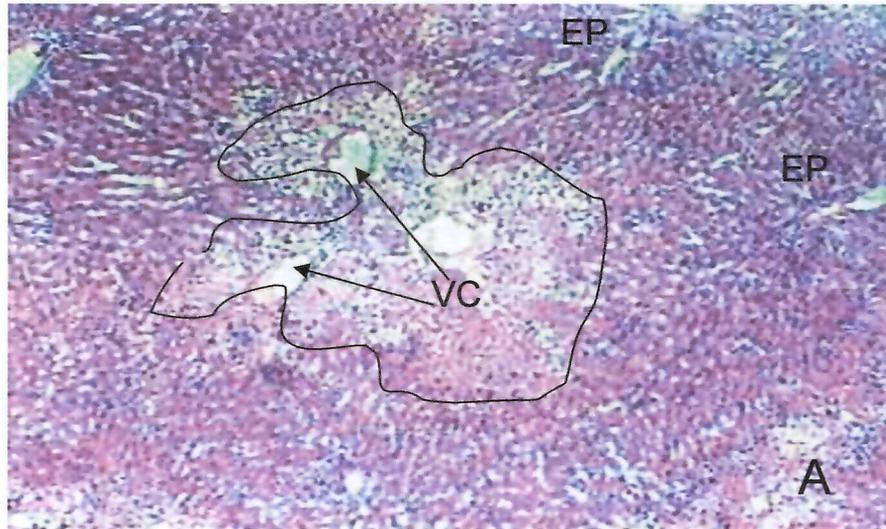
Hígado de animal tratado. Se muestra parte de un lobulillo y la vena central a mediano aumento (10x). Los hepatocitos se disponen de manera normal como en cordones celulares dirigidos hacia la vena central.



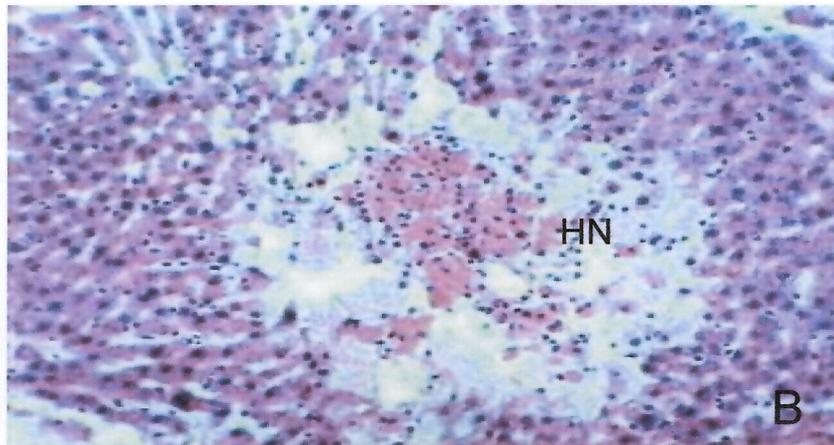
Corte de un hígado de animal tratado con extracto de *Haplopappus rigidus* por 10 días y que recibió una dosis de agua el día 10 del tratamiento. Se muestra parte de un lobulillo y la vena central a mediano aumento (10x). Los hepatocitos se disponen de manera normal como en cordones celulares dirigidos hacia la vena central. Adicionalmente se observa un espacio porta (límite del lobulillo).



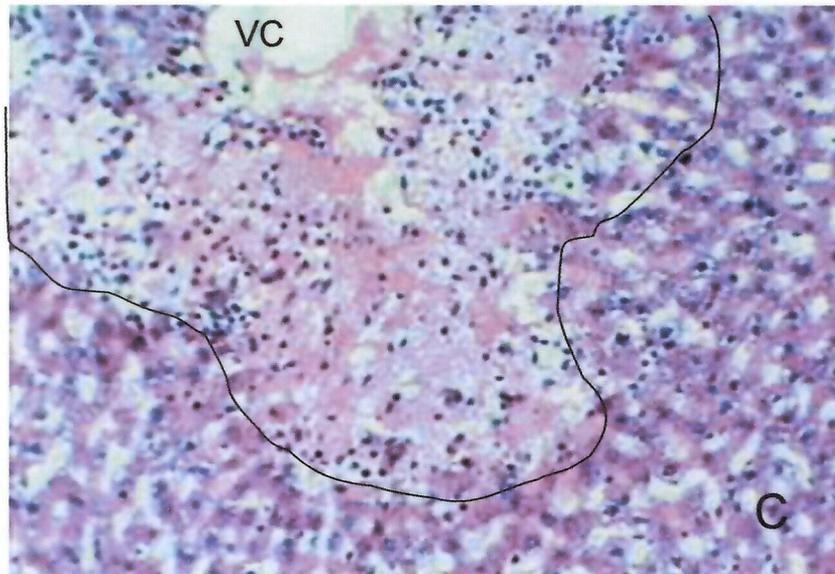
Observación a gran aumento (40x) de hepatocitos de aspecto normal (H) separados por los sinusoides hepáticos (SH), donde se alojan algunas células de Kupffer (CK) de un animal tratado con bailahuen.



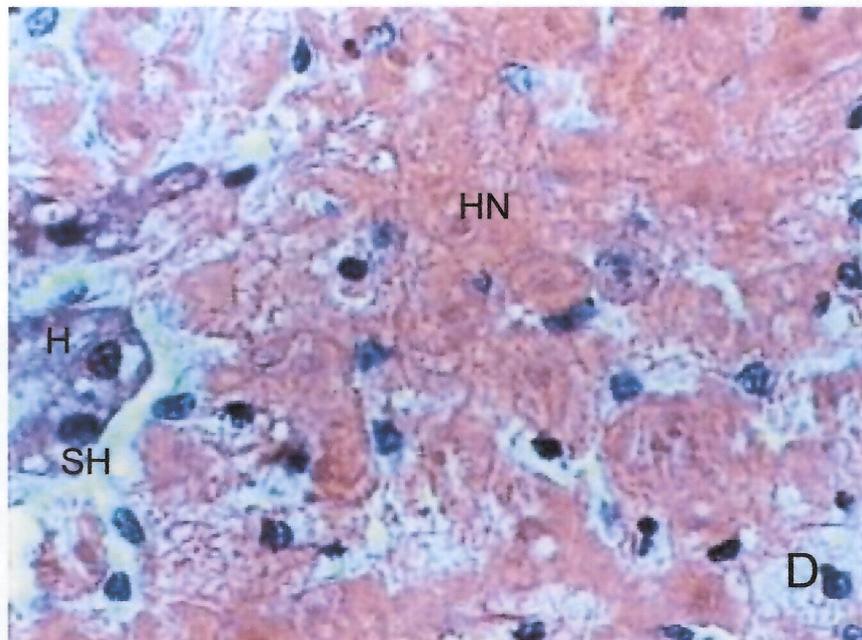
Corte de hígado de animales tratados con agua potable por 10 días y que recibieron una dosis de paracetamol el día 10 del tratamiento. Se muestra un corte de hígado a bajo aumento (4x) donde se observan varios lobulillos hepáticos que han perdido su organización normal. La zona demarcada muestra áreas en que coexisten inflamación y necrosis celular. Estas zonas están distribuidas por todo el corte y destacan por una fuerte eosinofilia, Vena central (VC), Espacios portas (EP).



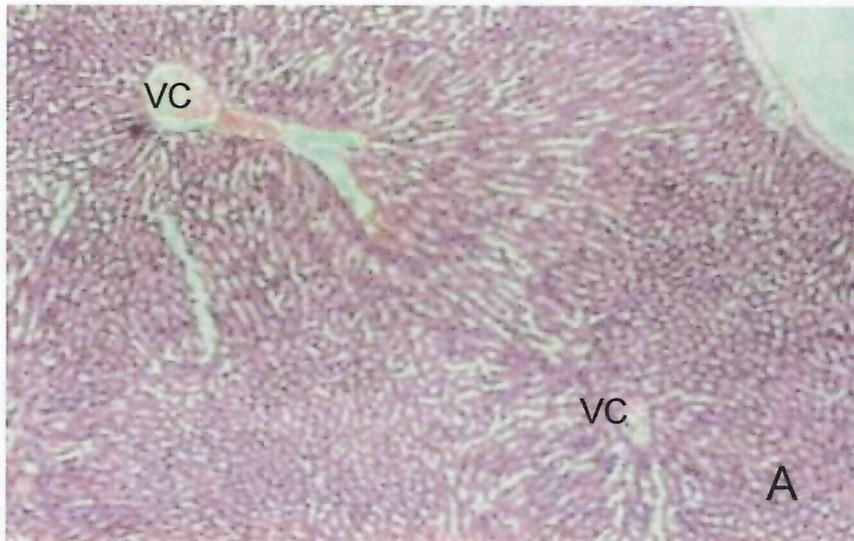
Animal tratado con paracetamol. Se muestra parte de un lobulillo (10x). Nótese que existe una marcada zona de necrosis con hepatocitos que muestran claros signos de muerte celular por este mecanismo. La disposición normal de los hepatocitos se ha perdido y ha desaparecido la vena central. Nótese la eosinofilia de los hepatocitos necróticos (HN).



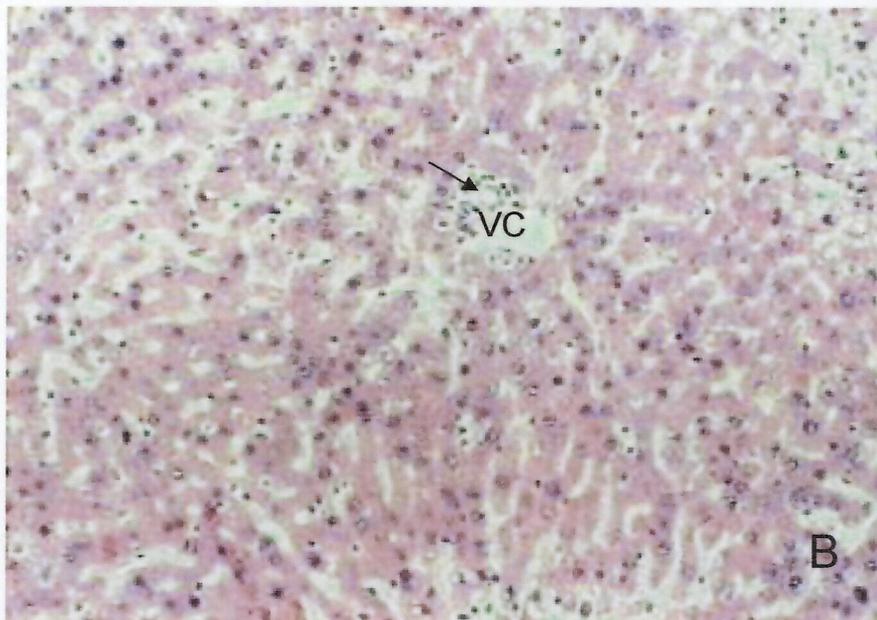
Se muestra otro lobulillo del hígado de un animal tratado con paracetamol en el que se observa parte de la vena central (VC) y donde existe una marcada zona de inflamación y necrosis alrededor de esta.



Se observan los hepatocitos necróticos (HN) y unos pocos normales (H) como así también unos pocos sinusoides hepáticos (SH) (40x) de un hígado de un animal tratado con paracetamol



Corte de hígado de animal tratados con extracto de *H.rigidus* por 10 días (100 mg/Kg) y que recibieron una dosis de paracetamol. Se observa un corte de hígado de aspecto casi normal (4x) se muestran varios lobulillos hepáticos normales, cada uno con su vena central (VC). Nótese la falta de necrosis alrededor de las venas centrales.



Hígado de animal tratados con extracto de *H.rigidus* por 10 días (100 mg/Kg) y que recibieron una dosis de paracetamol. Se muestra a mayor aumento (10x) parte de un lobulillo y la vena central. Los hepatocitos aún conservan la disposición normal de cordones celulares dirigidos hacia la vena central. En esta placa se observa un pequeño foco inflamatorio (↓).

EFFECTO INHIBITORIO DE LA DIVISIÓN CELULAR EN HUEVOS DE ERIZO FECUNDADOS.

El bioensayo sobre fecundación, división celular del huevo y motilidad de los espermios de erizo negro *Tetrapigus niger*, animal que vive a menos de un Km de nuestro laboratorio, se hizo con el siguiente protocolo:

Colección de los gametos: A un erizo adulto se le inyectó 2-5 mL de una solución de KCl 0.5 M en la zona ventral, entre la linterna de Aristóteles y la boca y se agitó fuertemente. Después de algunos minutos el animal exudó sus gametos. Si el material efluyente resultó ser rosado -amarillento se trató de óvulos, y el animal fue colocado sobre un vaso que contenía agua de mar hervida, enfriada y filtrada. Mientras que los espermios que son blancos, fueron recibidos en "seco" sobre una pequeña cápsula de petri.

En nuestro caso la temperatura del agua de mar óptima resultó ser 14 °C.

Los óvulos fueron lavados con suficiente agua de mar para retirar en protección gelatinosa, para esto se decantó los óvulos por unos 10 min. El agua sobrenadante de los óvulos se reemplazó por agua de mar fresca. Se dejó decantar los óvulos por unos 10 min adicionales. Esta mezcla de óvulos se usó para la fecundación.

Fecundación. Inmediatamente antes de que los óvulos fueran fecundados, se diluyó una gota del concentrado de espermios en 3-5 mL de agua de mar en un vaso. En otro vaso de precipitado se colocó tres porciones de la mezcla de óvulos obtenidas con una pipeta Pasteur y se agregó 2-3 gotas de la solución diluída de espermios. En los primeros minutos de mezcla se agitó suavemente con una varilla de vidrio.

La extensión de la fecundación se observó con un microscopio óptico con aumento 10x cada 5 min

En *Tetrapigus niger*, la fecundación tarda sólo algunos minutos, mientras que las primeras divisiones celulares se observaron a partir de las 2 horas en los sistemas controles de agua de mar.

El ensayo consistió en realizar la fecundación agregando soluciones de extractos de concentración definida y expresada en mg/mL. Se estudió, por simple observación al microscopio, el efecto de los productos sobre la magnitud de la fecundación y sobre

la velocidad de la división celular. Los parámetros medidos son morfología de óvulos y espermios, % de óvulos fecundados, % de células divididas, % de células muertas con la concentración de las dosis y en comparación con controles blancos.

Otro aspecto estudiado resultó de la observación microscópica del efecto de los extractos sobre la motilidad y sobre cambios anatómicos que han sufrido los espermios y de los óvulos. El examen microscópico indicó alteraciones morfológicas importantes y pérdida de motilidad de espermios.

En términos de resultados se encontró una actividad inhibitoria de la división celular en todos los extractos hidroalcohólicos estudiados dependiente de la dosis tratada.

A modo de ejemplo, se encontró que a la dosis de 20 mg/mL del extracto de *Xenophyllum popusum* en el medio de fecundación todos los espermios están muertos. En los óvulos no se aprecia actividad biológica. Luego de cuatro horas se observa un 4% de óvulos en proceso de desintegración. Después de cinco de cinco horas transcurridas desde la fecundación se observa un 28 % de óvulos fecundados en proceso de desintegración, sin llegar a la división celular,

A la dosis de 1,25 mg/mL de *Xenophyllum popusum* se observa división celular en un 4,3 % (células divididas en 2 blastómeros) óvulos y espermios intactos, espermios inmóviles. Luego de tres horas transcurridas se observa un 8,2 % de células divididas en dos blastómeros y un 2% de células divididas en cuatro blastómeros.

Mientras que en el control, todo es normal, los espermios vivos y los óvulos han sido fecundados, Luego de dos horas de realizada la fecundación se observa un 11,4 % división celular(células divididas en cuatro blastómeros), luego de cuatro horas se observa división celular(células divididas en 8 blastómeros).Se observa luego de seis horas transcurridas un 26,2 % división celular (células divididas en 16 blastómeros) luego de siete horas transcurrida la fecundación se observa un 32,4 % de células divididas en 32 blastómeros, aun se observan espermios con vida.

Al estudiar el efecto de los extractos sobre la motilidad de los espermatozoides se observa un efecto dosis dependiente muy claramente.

A modo de ejemplo, a dosis de 4 mg/mL del extracto de *Xenophyllum popusum* quedan muy pocos espermios vivos y la motilidad se retarda seriamente, finalmente mueren todos.

A una dosis de 2mg/mL, todos los espermios vivos, pero al cabo, de 1 o 2 minutos todos los espermios mueren.

A una dosis de 1mg/mL, todos los espermios están vivos con hiper movilidad hasta que, finalmente después de 15 min, todos mueren.

En el experimento control, todos los espermios permanecen vivos durante más de 60 min.