



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FARMACOLOGICA Y TOXICOLOGICA  
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO**

**"ESTUDIO FITOQUIMICO, MICROBIOLOGICO Y  
FARMACOLOGICO DE *LOPHOPAPPUS TARAPACANUS*  
(PHIL.) CABR. ASTERACEAE.  
ESPECIE VEGETAL DE LA REGIÓN ALTOANDINA."**

**PROFESOR PATROCINANTE**  
Prof. ROSA NEGRETE CORDOVA.

**DIRECTORES DE MEMORIA**  
Prof. SILVIA ERAZO GIUFFRA.  
Prof. MERCEDES ZALDIVAR SAN ROMAN.

**MACARENA ISABEL PEDRASA PIZARRO**

SANTIAGO DE CHILE  
OCTUBRE 2004

*A dos hombres muy importantes en mi vida, Christian y mi hijo Juan Ignacio.*

***“Las ciencias tienen las raíces  
amargas, pero dulces los frutos”***

Aristoteles

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a los profesores que entregaron parte de sus conocimientos para formarme como un buen profesional.

A los profesores Silvia Erazo, Nadine Backhouse, Carla Delporte, Rosita Negrete, Rubén García y Mercedes Zaldivar por su entrega incondicional al desarrollo de esta memoria y por las muchas horas compartidas con ellos.

A Mónica, Vanesa, Tania y Claudia por toda la ayuda prestada en el desarrollo de esta memoria.

A los QF Ximena Silva y Juan Otorola, de la unidad de mantención de animales del ISP, por las facilidades otorgadas para la realización de los ensayos.

A David y José por la ayuda prestada en el laboratorio y a Patricio por su trabajo en el cuidado de los animales de experimentación.

A mis compañeros tesisistas Cristina A., Paola M., Juanita F., Andrea L. y Felipe G. por la ayuda prestada, conocimiento y experiencias compartidas.

Agradezco sinceramente a todos mis compañeros en el transcurso de esta bella carrera, que de una u otra manera me ayudaron y acompañaron en este camino, como son Claudita M, Gabriela Z, Marina A, Jorge S, Ximena E y muchos otros.

También quiero agradecer a Christian por su incansable apoyo, a mi hijo por la fuerza que generaba en mí para realizar todo esto, a mi familia y hermanos para que les sirva de guía y motivación para su futuro, el tener una linda profesión.

En virtud al trato humanitario y mitigador del dolor de los animales utilizados en esta investigación, se consideran las “Normas Internacionales en investigación Biomédicas que involucra el uso de animales”. Esta reglamentación ha sido elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas en Ginebra 1986 (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 108(5-6): 637-641), y son aplicadas por la Unidad de Mantención de Animales del Instituto de Salud Pública de Chile (I.S.P.), lugar donde se desarrollaron las pruebas farmacológicas.

Por otra parte, los ensayos que se realizaron por el grupo de investigación del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, con animales de experimentación, cuentan con la aprobación de la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

---

Este estudio fue realizado gracias a la colaboración de la Q.F. señora Ximena Silva de la Unidad de Mantenimiento de Animales del Instituto de Salud Pública (I.S.P.).

---

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>CAPITULO I</b>	
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO II</b>	
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO III</b>	
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
3.1 Descripción de los objetivos.....	5
3.1.1 Objetivo general.....	5
3.1.2 Objetivos específicos.....	5
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>ANTECEDENTES GENERALES.....</b>	<b>6</b>
4.1 Introducción.....	6
4.2 Clasificación taxonómica.....	7
4.3 Descripción geográfica.....	7
4.4 Descripción botánica.....	8
4.5 Usos en la medicina popular.....	10
4.6 Otros usos.....	10
4.7 Estudios previos.....	10
4.7.1 Estudios químicos anteriores.....	10
4.7.2 Estudios farmacológicos anteriores.....	11
4.7.3 Algunos estudios farmacológicos de la pinocembrina.....	12

## CAPITULO V

<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>14</b>
5.1 Estudio químico.....	14
5.1.1 Recolección.....	14
5.1.2 Obtención de los extractos y del infuso.....	14
5.1.3 Estudio cromatográfico.....	16
5.1.4 Técnicas espectroscópicas.....	19
5.1.5 Purificación y fraccionamiento.....	19
5.1.5.1 Primera columna rápida de gel de sílice.....	19
5.1.5.2 Segunda columna rápida de gel de sílice.....	20
5.1.5.3 Tercera columna de Sephadex.....	20
5.1.5.4 Cuarta columna de mediana presión.....	21
5.1.5.5 Placas preparativas MERCK con marcador de fluorescencia.....	21
5.1.5.6 Quinta columna rápida de gel de sílice.....	21
5.1.5.7 Sexta columna rápida de gel de sílice.....	22
5.1.5.8 Séptima columna rápida de gel de sílice.....	22
5.2 Estudio farmacológico.....	23
5.2.1 Análisis estadístico.....	24
5.2.2 Estudios <i>in vivo</i> .....	24
5.2.2.1 Determinación de la actividad analgésica.....	24
5.2.2.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica.....	25
5.2.2.2.1 AA.....	27
5.2.2.2.2 TPA.....	27
5.2.3 Estudios <i>in vitro</i> .....	28
5.2.3.1 Ensayo de decoloración DPPH.....	28
5.2.3.2 Ensayo de xantina oxidasa.....	30
5.2.3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar.....	32



5.2.3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía.....	33
5.2.3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los compuestos activos aislados.....	35
5.2.3.6 Determinación de la actividad bactericida y bacteriostática de los compuestos activos aislados.....	36
<b>CAPITULO VI</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>37</b>
6.1 Estudio químico.....	37
6.1.1 Obtención de los extractos e infuso.....	37
6.1.2 Estudio cromatográfico.....	37
6.1.3 Técnicas espectroscópicas.....	38
6.1.4 Purificación y fraccionamiento.....	42
6.2 Evaluación de las actividad farmacológica.....	43
6.2.1 Estudios <i>in vivo</i> .....	44
6.2.1.1 Evaluación analgésica vía oral.....	44
6.2.1.2 Evaluación antiinflamatoria tópica.....	45
6.2.2 Actividad <i>in vitro</i> .....	49
6.2.2.1 Ensayo de decoloración de DPPH.....	49
6.2.2.2 Ensayo frente a xantina oxidasa.....	53
6.2.2.3 Actividad antibacteriana por siembra superficial en placa de Petri.....	54
6.2.2.4 Actividad antimicrobiana bioensayo bioautografía.....	56
6.2.2.5 Actividad antimicrobiana CMI y evaluación bacteriostática y bactericida.....	57

<b>CAPITULO VII</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>CAPITULO VIII</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>65</b>
8.1 Referencias bibliográficas.....	65
<b>CAPITULO IX</b>	
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO 1</b>	
Espectros UV visible (pinocembrina y galangina)	
<b>ANEXO 2</b>	
Espectros <sup>1</sup> H RMN (pinocembrina y galangina)	
<b>ANEXO 3</b>	
Espectros <sup>13</sup> C RMN (pinocembrina y galangina)	
<b>ANEXO 4</b>	
Estructura molecular, nombre científico y P.M de compuestos aislados.	
<b>ANEXO 5</b>	
Placas cromatográficas c.c.f.	
<b>ANEXO 6</b>	
Plantillas analgesia y antiinflamación.	
<b>ANEXO 7</b>	
Plantilla xantina oxidasa.	
<b>ANEXO 8</b>	
Siembra superficial en placas de Petri	
<b>ANEXO 9</b>	
Bioensayo bioautografía	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tablas:</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 5.1</b>	Fases móviles utilizadas en la c.c.f.....	16
<b>Tabla 5.2</b>	Reactivos reveladores y patrones utilizados en las c.c.f.....	17
<b>Tabla 5.3</b>	Fraciones de segunda columna rápida de gel de sílice.....	20
<b>Tabla 5.4</b>	Fraciones de tercera columna de Sephadex.....	20
<b>Tabla 5.5</b>	Fraciones de cuarta columna de mediana presión.....	21
<b>Tabla 5.6</b>	Fraciones de quinta columna rápida de gel de sílice.....	22
<b>Tabla 5.7</b>	Fraciones de sexta columna rápida de gel de sílice.....	22
<b>Tabla 5.8</b>	Fraciones de séptima columna rápida de gel de sílice.....	23
<b>Tabla 5.9</b>	Dosis de compuestos aislados de <i>L. tarapacanus</i> utilizadas en determinación de efecto antiinflamatorio tópico.....	28
<b>Tabla 5.10</b>	Protocolo de ensayo de decoloración DPPH.....	29
<b>Tabla 5.11</b>	Protocolo del ensayo xantina oxidasa.....	30
<b>Tabla 5.12</b>	Microorganismos utilizados para todas las pruebas microbiológicas.....	33
<b>Tabla 5.13</b>	Fases móviles de cromatogramas de bioautografías.....	34
<b>Tabla 6.1</b>	Rendimiento del proceso de extracción.....	37
<b>Tabla 6.2</b>	Screening de los extractos y del infuso.....	38
<b>Tabla 6.3</b>	Asignación de señales obtenidos al realizar técnica de ultravioleta-visible a compuesto Lopho-1 (pinocembrina).....	39

<b>Tabla 6.4</b>	Asignación de señales obtenidos al realizar técnica de ultravioleta-visible a compuesto Lopho-2 (galangina).....	39
<b>Tabla 6.5</b>	Asignación de señales obtenidos al realizar <sup>1</sup> H RMN a compuesto Lopho-1 (pinocembrina).....	40
<b>Tabla 6.6</b>	Asignación de señales obtenidos al realizar <sup>1</sup> H RMN a compuesto Lopho-2 (galangina).....	40
<b>Tabla 6.7</b>	Asignación de señales obtenidos al realizar <sup>13</sup> C RMN a compuesto Lopho-1 (pinocembrina).....	41
<b>Tabla 6.8</b>	Asignación de señales obtenidos al realizar <sup>13</sup> C RMN a compuesto Lopho-2 (galangina).....	42
<b>Tabla 6.9</b>	Compuestos aislados desde exudado resinoso de <i>L. tarapacanus</i> .....	43
<b>Tabla 6.10</b>	Actividad analgésica comparativa de pinocembrina, galangina y naproxeno sódico.....	44
<b>Tabla 6.11</b>	Actividad antiinflamatoria tópica comparativa frente a AA de pinocembrina, galangina y nimesulida.....	45
<b>Tabla 6.12</b>	Actividad antiinflamatoria tópica comparativa frente a TPA de pinocembrina, galangina e indometacina.....	46
<b>Tabla 6.13</b>	Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante decoloración del DPPH de los extractos de <i>L. tarapacanus</i> .....	50
<b>Tabla 6.14</b>	Evaluación de la actividad decolorante del DPPH de galangina.....	51
<b>Tabla 6.15</b>	Evaluación de la actividad decolorante del DPPH de Lopho-5.....	51
<b>Tabla 6.16</b>	Evaluación de la actividad frente a xantina oxidasa de los extractos de <i>L. tarapacanus</i> .....	53
<b>Tabla 6.17</b>	Evaluación de la actividad frente a xantina oxidasa de los compuestos aislados del exudado resinoso de <i>L.</i>	

	<i>tarapacanus</i> .....	53
<b>Tabla 6.18</b>	Actividad antibacteriana en siembra en placa de Petri de los extractos que presentaron actividad de <i>L. tarapacanus</i> .....	55
<b>Tabla 6.19</b>	Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante bioensayo bioautografía de los compuestos activos aislados.....	56
<b>Tabla 6.20</b>	CMI y actividad bacteriostática y bactericida de pinocembrina.....	58
<b>Tabla 6.21</b>	CMI y actividad bacteriostática y bactericida de galangina.....	59
<b>Tabla 6.22</b>	CMI y actividad bacteriostática y bactericida de Lopho-5.....	59

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figuras:</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 4.1</b>	Flor de <i>Lophopapus tarapacanus</i> .....	9
<b>Figura 4.2</b>	Pinocembrina.....	10
<b>Figura 5.1</b>	Esquema de extracción de <i>Lophopapus tarapacanus</i> .....	15

**INDICE DE FOTOS**

<b>Fotos:</b>		<b>Página</b>
<b>Foto 4.1</b>	<i>Lophopapus tarapacanus</i> .....	9

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Gráficos:</b>		<b>Página</b>
<b>Gráfico 6.1</b>	Actividad analgésica comparativa de pinocembrina, galangina y naproxeno sódico.....	45
<b>Gráfico 6.2</b>	Actividad antiinflamatoria tópica comparativa frente a AA de pinocembrina, galangina y nimesulida.....	46
<b>Gráfico 6.3</b>	Actividad antiinflamatoria tópica comparativa frente a TPA de pinocembrina, galangina e indometacina.....	47
<b>Gráfico 6.4</b>	Actividad decolorante del DPPH de los extractos de <i>L. tarapacanus</i> .....	50



## INDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuaciones:</b>		<b>Página</b>
<b>Ecuación 5.1</b>	Error estandar (SEM).....	24
<b>Ecuación 5.2</b>	Porcentaje de dolor (%D).....	25
<b>Ecuación 5.3</b>	Porcentaje de efecto analgésico (%Ean).....	25
<b>Ecuación 5.4</b>	Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico (%EAIT).....	27
<b>Ecuación 5.5</b>	Porcentaje de decoloración.....	29
<b>Ecuación 5.6</b>	Porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa.....	31

## ABREVIATURAS

<b>AA</b>	:	Ácido araquidónico
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	:	Tricloruro de aluminio
<b>Cc</b>	:	Mediana de las contorsiones de los animales controles
<b>c.c.f.</b>	:	Cromatografía de capa fina
<b>Cm</b>	:	Mediana de las contorsiones de los animales que reciben muestras
<b>CMI</b>	:	Concentración mínima inhibitoria
<b>COX</b>	:	Enzima ciclooxigenasa
<b>DCM</b>	:	Diclorometano
<b>DL<sub>50</sub></b>	:	Dosis letal cincuenta
<b>DMSO</b>	:	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	:	Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo
<b>EDCM</b>	:	Extracto diclorometano
<b>EHEX</b>	:	Extracto hexánico
<b>EMET</b>	:	Extracto metanólico
<b>ERES</b>	:	Extracto del exudado resinoso
<b>EtAc</b>	:	Acetato de etilo
<b>Esp</b>	:	Espectro
<b>Ext</b>	:	Extracto
<b>FrDCMERES</b>	:	Fracción DCM del exudado resinoso de <i>L. tarapacanus</i>
<b>FDCM</b>	:	Fracción del EDCM
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	:	Tricloruro de fierro
<b>FMET</b>	:	Fracción del EMET
<b>HEX</b>	:	Hexano
<b>IND</b>	:	Indometacina
<b>INF</b>	:	Infuso
<b>i.p.</b>	:	Intraperitoneal
<b>KOH</b>	:	Hidróxido de potasio

<b>Lopho-1</b>	:	Flavonona pinocembrina
<b>Lopho-2</b>	:	Flavonol galangina
<b>Lopho-3</b>	:	Tercer compuesto aislado de ERES
<b>Lopho-5</b>	:	Quinto compuesto aislado de ERES
<b>MET</b>	:	Metanol
<b>m.s.n.m.</b>	:	Metros sobre nivel del mar
<b>n</b>	:	Número de animales
<b>NaOH</b>	:	Hidróxido de sodio
<b>NAP</b>	:	Naproxeno sódico
<b>NH<sub>3</sub></b>	:	Amoniaco
<b>NIM</b>	:	Nimesulida
<b>NO</b>	:	Óxido nítrico
<b>NP/PEG</b>	:	Natural products – polyethylene glycol reagent
<b>OD</b>	:	Oreja derecha
<b>OI</b>	:	Oreja izquierda
<b>OD-OI</b>	:	Diferencia de peso entre cada porción de orejas
<b>ODc-OIc</b>	:	Mediana de las diferencias de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales controles
<b>Odm-Oim</b>	:	Mediana de las diferencias de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra
<b>PDA</b>	:	Potato dextrose agar
<b>PDB</b>	:	Potato dextrose broth
<b>Pinoc</b>	:	Pinocembrina
<b>p/v</b>	:	Peso volumen
<b>SEM</b>	:	Error estándar
<b>SN</b>	:	Sistema nervioso
<b>SNC</b>	:	Sistema nervioso central
<b>TMS</b>	:	Tetrametil silano
<b>TNF</b>	:	Factor de necrosis tumoral

<b>TPA</b>	:	12-miristato- 13-acetato forbol
<b>TSA</b>	:	Tryptic soy agar
<b>TSB</b>	:	Tryptic soy broth
<b>Tr</b>	:	Tiempo de retención
<b>UV</b>	:	Ultravioleta
<b>% D</b>	:	Porcentaje de dolor
<b>% EAIT</b>	:	Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico
<b>% Ean</b>	:	Porcentaje efecto analgésico
<b>% I</b>	:	Porcentaje de inflamación
<b><math>\sigma</math></b>	:	Desviación estandar

## RESUMEN

*Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr., Asteraceae, nombre vulgar “cari, moñe y tola”, es utilizada por la medicina folclórica para dolores estomacales y lastimaduras del ganado. Es una planta que crece en la Provincia de Tarapacá, I Región, entre la pre-puna y parte de la puna a los 2800 - 3500 m.s.n.m. En Chile existen dos especies y el género está representado por cinco, distribuidas desde los Andes del sur del Perú, Bolivia y el extremo noreste de Argentina. En la bibliografía consultada hay escasos estudios químicos y farmacológicos, y no existen estudios microbiológicos. En un estudio preliminar se demostró la actividad antiinflamatoria y analgésica de los extractos de *L. tarapacanus*.

La investigación del material vegetal, constituido por la parte aérea de la especie en estudio, comenzó con la remoción del exudado resinoso (ERES) usando como disolvente diclorometano, para continuar con la molienda y secado. Posteriormente el material se sometió a extracción usando disolventes de polaridad creciente, comenzando con hexano (EHEX), siguiendo con diclorometano (EDCM) y con metanol (EMET), para posterior evaluación microbiológica.

El único extracto que presentó actividad antimicrobiana, fue ERES. Su fraccionamiento se realizó mediante columnas rápidas de gel de sílice, columnas de Sephadex, columnas de mediana presión y placas preparativas Merck con marcador de fluorescencia, según fue necesario para lograr aislar los potenciales compuestos activos responsables de la actividad antimicrobiana. De este fraccionamiento fue posible aislar cuatro compuestos activos: Lopho-1, Lopho-2 Lopho-3 y Lopho-5, de los cuales dos de ellos fueron identificados.

La elucidación de las estructuras se realizó mediante estudios espectroscópicos, abarcando técnicas ultravioleta realizadas en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y estudios

de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN, los que fueron realizados en Italia en la Universidad Católica del Sacro Cuore Facolta' di medicina e chirurgia “Agostino Gemelli” de Roma, logrando identificar 2 compuestos: Lopho-1 Pinocembrina (Flavanona) y Lopho-2 Galangina (Flavonol).

Los ensayos realizados para evaluar la actividad antimicrobiana mediante siembra superficial del ERES de *L. tarapacanus*, afectaron el crecimiento de bacterias aerobias Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus flavus*. Mediante el bioensayo bioautografía se verificó la actividad antibacteriana frente a las mismas bacterias por parte de los cuatro compuestos aislados, además Lopho-1 presentó actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue determinada para los tres compuestos aislados, ya que para Lopho-3 no existía cantidad suficiente para dicho ensayo:

- Lopho-1: *S. aureus* 150  $\mu\text{g/mL}$ , *B. subtilis* 90  $\mu\text{g/mL}$  *M. flavus* 120  $\mu\text{g/mL}$
- Lopho-1: *C. albicans* 120  $\mu\text{g/mL}$  y *S. cerevisiae* 170  $\mu\text{g/mL}$
- Lopho-2: *S. aureus* 140  $\mu\text{g/mL}$ , *B. subtilis* 80  $\mu\text{g/mL}$  y *M. flavus* 100  $\mu\text{g/mL}$
- Lopho-5: *S. aureus* no fue posible establecerla ya que no se detectó efecto inhibitorio a la concentración de 350  $\mu\text{g/mL}$ ; para *B. subtilis* fue de 270  $\mu\text{g/mL}$  y para *M. flavus* fue de 150  $\mu\text{g/mL}$ .

El estudio farmacológico fue evaluado en ratones de la cepa CF1 de ambos sexos (20 a 25 g). Se determinó la actividad analgésica vía oral de los compuestos Lopho-1 y Lopho-2 mediante la inducción del efecto algésico por ácido acético al 0,6% vía i.p. y utilizando como fármaco de referencia naproxeno sódico, aquí se observó que ambos compuestos presentaron una débil actividad analgésica. También fue evaluada la actividad antiinflamatoria tópica, mediante el método de edema en oreja de ratón utilizando como agente inflamatorio ácido araquidónico (AA) y 12-miristato-13-acetato forbol (TPA); como agentes inflamatorios y como fármacos de referencia se utilizaron la nimesulida y la indometacina respectivamente. Lopho-1 y Lopho-2 presentaron

actividad frente al edema producido por TPA (Lopho-2 90,2% a una dosis de 1 mg/oreja) y por AA, siendo dosis-dependiente con ambos agentes inflamatorios.

Con el fin de evaluar la actividad atrapadora de radicales libres y antioxidante de *L. tarapacanus*, se realizó el ensayo de decoloración de DPPH utilizándose quercetina como sustancia patrón y para la enzima xantina oxidasa (XO) se utilizó como fármaco de referencia alopurinol. De los extractos evaluados (EHEX, EDCM, EMET y ERES), EMET fue el que presentó mayor actividad en DPPH y frente a XO la fracción DCM de ERES. Para Lopho-2 fue confirmada una leve actividad frente a DPPH (Russo, 2002) al igual que frente a XO (Cos, 1998).

Con todo lo anteriormente descrito, se podrían en parte respaldar las propiedades atribuidas por la medicina folclórica a *Lophopappus tarapacanus*, como es en la lastimadura del ganado.

## SUMMARY

### **PHYTOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDY OF *LOPHOPAPPUS TARAPACANUS* (PHIL.) CABR. ASTERACEAE. SPECIES OF THE ALTOANDINO REGION**

*Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr., Asteraceae, known as “cari, moñe and tola”, is used by the folklore medicine for stomach pains and wounded cattle. It grows in the Province of Tarapacá, I Region, from 2800 to 3500 m over sea level. The genus *Lophopappus* is represented by five different species distributed in Los Andes Mountains from southern Peru, Bolivia and the northwest of Argentina, where only two of them, *L. tarapacanus* and *L. foliosus* grow in Chile. No microbiological and only few chemical and pharmacological studies of the species growing in Chile have been reported. In a preliminary study, anti-inflammatory and analgesic activities were found for *L. tarapacanus*.

In this research, the fresh vegetable material, constituted by the aerial part of the *L. tarapacanus*, was extracted with dichloromethane for removing the resinous exudates (ERES); after that the vegetable material was dried and ground to be submitted to several successive extractions using solvent of increasing polarity: hexane (EHEX), dichloromethane (EDCM) and methanol (EMET), for the evaluation of their microbiological properties.

As ERES resulted the only extract with antimicrobial activity, it was submitted to fractionation using flash column chromatography of silica gel, columns of Sephadex, and medium pressure columns, together with preparative thin layer chromatography using UV fluorescence (366 nm) as marker, to isolate the potential active compounds responsible for the antimicrobial activity. Four active compounds: Lopho-1, Lopho-2, Lopho-3 and Lopho-5 were isolated, were the first two were identified.



Elucidation of the structures was carried out by spectroscopic studies, the UV spectra was carried out at the Laboratorio de Productos Naturales of the Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, and the <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR, were carried out in Italy at the Universidad Católica del Sacro Cuore Facolta' di medicina e chirurgia “Agostino Gemelli” of Rome, being able to identify the following compounds: Lopho-1 pinocembrin (flavanone) and Lopho-2: galangin (flavonol).

The antimicrobial activity of the ERES evaluated in plate assay, affected the growth of aerobic bacteria Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus flavus*. By means of the bioautography bioassays the antibacterial activity against the same bacteria was verified for the four isolated compounds, and only Lopho-1 presented antifungal activity against *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The minimum inhibitory concentration (CIM) was determined for the three of the isolated compounds, as not enough amount of Lopho-3 was obtained:

- Lopho-1: *S. aureus* 150 µg/mL, *B. subtilis* 90 µg/mL and *M. flavus* 120 µg/mL
- Lopho-1: *C. albicans* 120 µg/mL and *S. cerevisiae* 170 µg/mL
- Lopho-2: *S. aureus* 140 µg/mL, *B. subtilis* 80 µg/mL and *M. flavus* 100 µg/mL
- Lopho-5: *S. aureus* was not possible to establish as CIM was higher than 350 µg/mL; for *B. subtilis* was of 270 µg/mL and *M. flavus* was of 150 µg/mL.

The anti-inflammatory and analgesic activities for Lopho-1 and Lopho-2 were evaluated in CF1 mice (20 to 25 g). The analgesic activity was determined by the abdominal writhing method induced by acetic acid, and the topical anti-inflammatory activity, inducing ear edema using two different agents: araquidonic acid (AA) and phorbol-12-myristate, 13-acetate (TPA). As reference drugs sodium naproxen was used for the analgesic assays, where nimesulide and indomethacin for the anti-inflammatory AA and TPA assays respectively.

Lopho-1 and Lopho-2 presented a weak analgesic activity, though they showed a dose-dependent anti-inflammatory activity, being higher against TPA (Lopho-2 effect max. 90,2% a 1mg/ear) induced edema than for AA.

Free radical scavenger and antioxidant activity of *L. tarapacanus* were also evaluated by the DPPH, and xanthine oxidase inhibition method using quercetin and allopurinol as reference respectively. All the extracts were evaluated (EHEX, EDCM, EMET, ERES), resulting the EMET the most active in the DPPH method, meanwhile the DCM and ERES gave positive though weak inhibition of xanthine oxidase. Also, the compounds Lopho-2 (galangin) and Lopho-5 were evaluated, where a weak scavenger and antioxidant activity was confirmed for galangin (Russo, 2002; Cos, 1998).

With the results obtained in this research we could support in part the properties attributed by the folklore medicine to *Lophopappus tarapacanus* for the treatment of pain and wounded cattle.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

El Altiplano chileno y la Región Altoandina constituyen una zona geográfica única en el mundo, encontrándose dentro de las zonas consideradas críticas; es por ello que se le ha calificado como reserva de la biósfera. Más del 46% de las plantas que allí existen, no se encuentran en ningún otro lugar del mundo (Montenegro, 2003). El altiplano es una de las mayores mesetas elevadas de la Tierra con una altura promedio de casi 4000 m.s.n.m. Se ubica en Los Andes centrales y es un territorio compartido por Argentina, Bolivia, Chile y Perú. Debido a que las condiciones ambientales extremas existentes en esta zona, como son grandes cambios de temperatura entre el día y la noche, la gran altura y el aislamiento, han permitido el desarrollo de un delicado equilibrio ecológico muy sensible a la contaminación y a la intervención del hombre. Las especies vegetales que allí crecen presentan características únicas, constituyendo un valioso material de estudio, para el desarrollo de diferentes investigaciones científicas que permitan alcanzar un mayor conocimiento de la vegetación con el fin de contribuir a preservar el recurso vegetal y permitir una explotación racional de su flora autóctona medicinal (Negrete, 1993).

Es por esto, que el conocimiento de la composición química de las diferentes especies, unido a sus propiedades farmacológicas, microbiológicas y posible toxicidad, permitirán valorizarlas, dándoles el respaldo científico que avale su correcta aplicación en el campo terapéutico. Se puede observar que estos estudios fitoquímicos, microbiológicos y farmacológicos de las diferentes especies de Chile, son bastante escasos (Negrete, 1993). Es por este motivo que en el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Cs. Qcas. y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se están realizando este tipo de estudio, para que existan respaldos científicos del uso folclórico de las plantas que habitan nuestro país.

La especie *Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr., que crece en la zona vegetacional andina de la pre-puna y parte de la puna (2800-3500 m s.n.m.) (Villagrán *et al.*, 1981) de la Provincia de Tarapacá (I Región, Chile) y de Los Andes de Bolivia y Argentina (Cabrera, 1978; Ricardi y Marticorena, 1964), es utilizada para dolores de estómago y lastimaduras del ganado (Castro *et al.*, 1982). Estos usos dados por la medicina popular nos podrían sugerir que esta especie presenta efectos antiinflamatorio, analgésico y antibacteriano entre otros, y por las extremas condiciones en que habita se puede pensar en un efecto antioxidante como autodefensa.

En el estudio de Hoeneisen *et al.* (1993) se describen la presencia de pinocembrina y de su derivado 7-O-benzoato de pinocembrina en las partes aéreas de *L. tarapacanus*, dos flavanonas. Las flavanonas corresponden a una clase de flavonoides, grupo de sustancias naturales de estructuras fenólicas variables que se encuentran en los vegetales, frutas, semillas, cortezas, raíces, tallos, flores y hojas, como también en productos de ellos tales como el vino. Estos productos naturales son conocidos por sus efectos terapéuticos en la salud. Entre las propiedades atribuidas a los flavonoides se encuentran las antiinflamatoria, antialérgica, antiviral, anticarcinogénica y antioxidante (Nijveldt *et al.*, 2001; Pietta, 2000). Para la pinocembrina se han demostrado actividad antiinflamatoria al inhibir fuertemente la inflamación tópica producida por TPA, actividad inhibitoria de la formación de leucotrienos B<sub>4</sub>, actividad de disminución del edema plantar inducido por fosfolipasa A<sub>2</sub> y del edema producido por una reacción de hipersensibilidad retardada y efectos inhibitorios de la infiltración de neutrófilos medida como disminución de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (Sala *et al.*, 2003). Además, existen estudios donde se demostraron las actividades analgésica vía oral y antiinflamatoria tópica de los extractos e infuso de *L. tarapacanus* y se analizó la toxicidad aguda de los diferentes extractos (Farias, 2003).

En la presente memoria de título evaluaremos para la especie en estudio las potenciales actividades antimicrobianas *in vitro*, tanto de los extractos, como de las fracciones de

ellos y de los compuestos aislados desde el exudado resinoso, así como su potencial actividad analgésica vía oral y el posible efecto antiinflamatorio vía tópica de los compuestos aislados desde el ERES: Lopho-1 y Lopho-2. Y se evaluará su actividad captadora de radicales libres mediante el método de decoloración de DPPH y la actividad inhibitoria frente a la xantina oxidasa.

## **CAPÍTULO II**

### **HIPÓTESIS**

El exudado resinoso de la especie vegetal *Lophopappus tarapacanus* presenta efectos antibacterianos, analgésicos y/o antiinflamatorios. Estos efectos se deberían a la presencia de metabolitos secundarios farmacológicamente activos.

Esta hipótesis se basa en:

- a) Los resultados previos obtenidos en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.
- b) Las propiedades que le atribuye la medicina folclórica a la especie en estudio.
- c) La extrema rigurosidad del medio ambiente en que esta especie habita, lo cual hace posible pensar en una posible actividad antioxidante.

## CAPÍTULO III

### OBJETIVOS

#### 3.1 Descripción de los Objetivos

Según la hipótesis planteada se detallan a continuación los siguientes objetivos para esta memoria:

##### 3.1.1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento científico de las especies que crecen en la Región Altoandina, desde un punto de vista fitoquímico y farmacológico, con el fin de dar un respaldo científico a las propiedades que la medicina folclórica atribuye a esta especie.

##### 3.1.2 Objetivos Específicos

- Preparación de los extractos e infuso, y comprobación de la actividad antimicrobiana de ellos.
- Aislar e identificar desde el exudado resinoso y/o extractos activos de *L. tarapacanus* por un fraccionamiento cromatográfico bioguiado los metabolitos secundarios activos responsables de la actividad antimicrobiana detectada a través del bioensayo bioautografía.
- Dilucidar las estructuras químicas de los metabolitos secundarios activos responsables de la actividad antimicrobiana detectada, mediante un completo estudio espectroscópico.
- Determinar en los metabolitos aislados con actividad microbiológica la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- Determinar la actividad bacteriostática y bactericida de los metabolitos secundarios que presentaron actividad antimicrobiana.
- Evaluar la actividad analgésica y antiinflamatoria de los metabolitos aislados.
- Investigar una posible acción antioxidante de los extractos.

## CAPÍTULO IV

### ANTECEDENTES GENERALES

#### 4.1 Introducción

El nombre científico, *Lophopappus*, puede traducirse a nuestro idioma como penacho lanugo o peludo, o bien, vilano como penacho, siendo estas denominaciones, para quienes conocen esta especie una descripción representativa de su flor. Su nombre es el resultado de la composición tanto del idioma griego, donde Lopho como prefijo significa penacho o cresta y del latín donde el sufijo pappus significa lanugo, vilano (Diccionario Botánico, 1953).

El género *Lophopappus* fue citado por primera vez, para Chile, por Ricardi y Marticorena (1964). El género *Lophopappus* está representado por cinco especies distribuidas en Los Andes desde el sur de Perú, hasta el norte de Chile, Bolivia y el extremo noroeste de Argentina. (Hoeneisen *et al.*, 1993; Cabrera, 1978).

En Chile antes del trabajo presentado por Faúndez y Macaya (1998), se conocía solamente *Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr. como componente de la vegetación andina de la pre-puna y parte de la puna (2800-3500 m s.n.m.) (Villagrán *et al.*, 1981) de la región de Tarapacá (Ricardi y Marticorena, 1964; Marticorena y Quezada, 1985; Hoeneisen *et al.*, 1993), estos autores encontraron a *Lophopappus foliosus* Rusby en el mismo sector geográfico, pero en diferentes condiciones ecológicas. Esta especie también existe en las altas montañas y punas del sur del Perú, Bolivia y extremo noroeste de la Argentina, creciendo sobre los 3000 m s.n.m. (Cabrera, 1978). Con estos estudios el género *Lophopappus* queda representado en Chile por dos especies: *Lophopappus foliosus* Rusby y *Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr., las que se pueden diferenciar por las siguientes características según Cabrera (1978):

Hojas lineal-lanceoladas, enteras.....*Lophopappus foliosus*  
 Hojas oblanceolado-espátuladas, obtusas..... *Lophopappus tarapacanus*



## 4.2 Clasificación Taxonómica

FAMILIA	: Asteraceae (Compositae)
NOMBRE CIENTÍFICO	: <i>Lophopappus tarapacanus</i> (Phil.) Cabr.
BASIÓNIMO	: <i>Gochnatia tarapacana</i> Phil.
SINÓNIMO	: <i>Lophopappus cuneatus</i> R.E. Fries (Faúndez y Macaya, 1998)
NOMBRE VULGAR	: Arica: chari, moñe, leña dura, tola Iquique: tajana, tajtaga (Castro <i>et al.</i> , 1982) (Villagrán <i>et al.</i> , 1999)

## 4.3 Distribución Geográfica

*L. tarapacanus* está presente en el sur de Bolivia y noroeste de Argentina, en la Puna de la provincia de Jujuy. Vegeta en lugares rocosos entre 3400 y 3600 m s.n.m. y florece en verano. En Chile es un componente de la vegetación andina de la pre-puna y parte de la puna, 2800-3500 m s.n.m. (Villagrán *et al.*, 1981), de la Provincia de Tarapacá, 18° 20' S, 20° 05' W. En la zona del Portezuelo de Chapiquiña forma parte del matorral arbustivo característico (Ricardi y Marticorena, 1964; Cabrera, 1978).

#### 4.4 Descripción Botánica

*Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr. es un arbusto muy ramoso, de 30-100 cm de altura; ramas viejas gris oscuras con la corteza resquebrajada, ramas nuevas hojosas, angulosas, de color amarillento, glanduloso-punteadas. Hojas rígidas, coriáceas, sésiles, glabras, oblanceolado-espátuladas u obovadas, agudas o redondeadas en el ápice y cuneiforme en la base, glanduloso-resinosas, alternas, de 4-25 mm de largo, por 1,5-10 mm de ancho, mucronadas; mucrón curvo rígido, de más o menos 1 mm de largo, margen con 1-2-3 dientes hacia la mitad superior o entero; dientes con mucrones curvos; nervadura sobresaliente en el revés. Capítulos solitarios, sésiles o subsésiles, generalmente con 7 flores; involucre angostamente campanulado, de más o menos 12 mm de alto, por 5 mm de diámetro; brácteas del involucre de color pardo-rojizo, rígidas, glanduloso-resinosas, glabras, brevemente mucronadas en el ápice; las exteriores ovalado-trianguulares, agudas; las medianas más largas, oblongas o subredondeadas y apiculadas; las internas linear-oblongas hasta 12 mm de largo, redondeadas y apiculadas. Corolas blancas, tubulosas en la base, algo ensanchadas hacia arriba y bilabiadas, de 10-12 mm de largo; labio interior partido hasta la base en 2 lacinias lineares revolutas, labio exterior con el ápice profundamente tridentado. Anteras largamente sagitadas en la base, de color vinoso en el ápice. Estilo bifido, con las ramas divergentes y curvas. Pelos del vilano de 8-9,5 mm de largo, numerosos, de color blanco o fulvo, denticulados, algo ensanchados y cortamente penicilados hasta el ápice. Aquenios fusiformes, costados, adpreso-pubescentes, lineares, de 5-5,5 mm de largo. (Ricardi y Marticorena, 1964; Cabrera, 1978).



Foto 4.1: *Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr. Fotografía  
Testigo de Herbario SQF n°22216

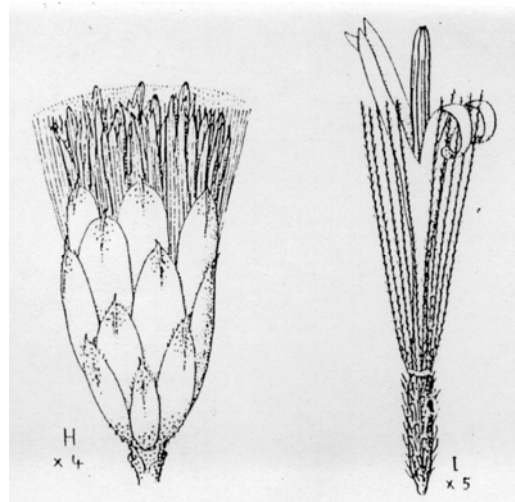


Figura 4.1: Flor de *Lophopappus tarapacanus*. H: capítulo. I: flor.

#### 4.5 Usos en la Medicina Popular

En la medicina popular o folclórica es usada para aliviar los dolores de estómago y para las lastimaduras del ganado (Castro *et al.*, 1982).

#### 4.6 Otros Usos

En los Andes de Iquique se usa su madera leñosa en la fabricación de palillos para tejer (Villagrán *et al.*, 1999). Y en Arica para hacer escobas para barrer la iglesia (Belmonte, 1999). También se usa como combustible (Castro *et al.*, 1982).

#### 4.7 Estudios Previos

Referente a *Lophopappus tarapacanus* existen pocas investigaciones científicas siendo una de ellas la de Hoeneisen *et al.* (1993) de la Universidad de Concepción, a continuación se presentan algunos estudios referente a esta especie de la región altoandina y sus compuestos aislados hasta esa fecha.

##### 4.7.1 Estudios Químicos Anteriores

En un estudio realizado por Hoeneisen *et al.* (1993) fueron aislados e identificados dos flavonoides (flavanonas) : pinocembrina (5,7-dihidroxi flavanona, ver Figura 4.2) y un nuevo derivado el 7-O-benzoato de pinocembrina en las partes aéreas de *Lophopappus tarapacanus*.

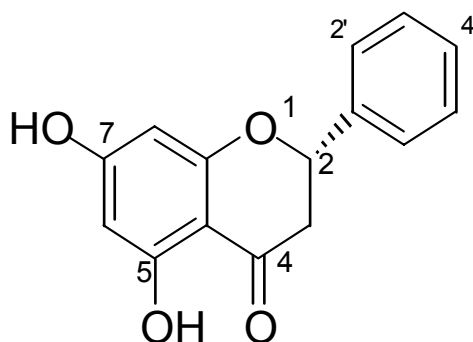


Figura 4.2 : Pinocembrina.

#### 4.7.2 Estudios Farmacológicos Anteriores

Estos estudios han sido realizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile lo que originó una memoria de título (Farías, 2003) y una unidad de investigación (Olivares, 2003).

Referente a la toxicidad aguda evaluada por Olivares (2003) se observó que ningún extracto (ERES, EHEX, EDCM y EMET) presentó efecto tóxico.

La actividad analgésica oral también fue evaluada en los extractos (600 mg/kg) e infuso (10%), por Farías (2003), utilizando como fármaco de referencia naproxeno sódico (12,5 mg/kg), el que presenta un 70% de efecto analgésico. De este ensayo se obtuvo para los extractos ERES un 24,1% de efecto analgésico, para EHEX un 34,7%, para EMET un 50%, y para INF un 58,3%; el extracto EDCM no presentó actividad.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria tópica mediante el agente inflamatorio AA de los extractos e infuso a la dosis de 3 mg y utilizando como fármaco de referencia la nimesulida (1 mg), se observó que ERES presentó un 76% efecto antiinflamatorio, EHEX presentó un 80,9%, EDCM un 58,7%, EMET un 40,2% y el INF presentó un 70,6% de efecto, siendo casi todos los efectos mayores al fármaco de referencia (48,8%).

La actividad antiinflamatoria tópica mediante el agente inflamatorio TPA, también fue evaluada por Farías (2003), en los cuatro extractos y el infuso a una dosis de 3 mg/oreja y utilizando como fármaco de referencia la indometacina a 0,5 mg/oreja. Los resultados obtenidos para los extractos ERES, EHEX, EDCM, EMET e INF son 92,4%, 88,1%, 81,7%, 80,9% y 80% de efecto antiinflamatorio respectivamente.

### 4.7.3 Algunos estudios Farmacológicos previos de la Pinocembrina

Actividad antioxidante (*in vitro*): Fue evaluada la inhibición de la peroxidación lipídica enzimática en microsomas de hígado de rata por Sala *et al.*(2003); la actividad antioxidante según el método tiocianato férrico y la leve capacidad atrapadora de radicales libres por el método del radical DPPH por Habsah *et al.*(2003).

Actividad antiinflamatoria: Fue evaluada la inhibición *in vitro* de la producción de leucotrienos B<sub>4</sub> desde leucocitos del peritoneo de ratas, estimulados con catión ionóforo A-23187; la disminución del edema en pata de ratón, inducido por fosfolipasa A<sub>2</sub>, a los 30 y 60 minutos, además de la inducida por serotonina; la disminución del edema en la reacción de hipersensibilidad retardada; la disminución del edema en oreja de ratón producido por TPA y la reducción de la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) por Sala *et al.*(2003). Además Rossi *et al.*(2002) evaluó la inactividad frente a la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2. .

Actividad antimicrobiana: Fue identificada como un compuesto antifúngico (fitoalexina), en la infección producida por nemátodos de la madera (*Bursaphelenchus xylophilus*) por Hanawa *et al.*(2001), además no exhibió actividad contra *Candida albicans* dentro del rango de concentración estudiada por López *et al.*(2002), demostró actividad antifúngica al inhibir la germinación de esporas de agentes patógenos fúngicos de *Populus deltoides* por Shain y Miller (1982), demostró actividad bacteriostática al inhibir el desarrollo de *Bacillus subtilis* por Villanueva *et al.*(1970) y se evaluó la actividad antimicrobiana para hongos del género *Alternaria* Miyakado *et al.* (1976).

Actividad antitumoral: Se evaluó el efecto antitumoral según el ensayo del disco de papa y citotoxicidad para las células 9PS, pero no presentó toxicidad para las líneas celulares tumorales humanas estudiadas por Jung *et al.*(1990); potencial inductor de las enzimas de la fase 2 de detoxificación en mamíferos, con una inducción bifuncional, aumentando

las enzimas de la fase 1 y fase 2 de detoxificación, lo que podría atribuirle características quimioprotectoras por Fahey y Stephenson (2002); inhibición de enzimas monoxigenasas del citocromo P-450 involucradas en la activación carcinogénica por Siess *et al.*(1995); no modifica la actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  frente a células tumorales L-929 por Habtemariam (1997); actividad antimutagénica contra aminas heterocíclicas mutagénicas por Trakoontivakorn *et al.*(2001).

Actividad sobre enzimas: Inhibición de la enzima  $\Delta^4$ -3-cetosteroides ( $5\alpha$ ) reductasa, la cual convierte testosterona a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona y 4-androsteno-3,17-diona por Komoda (1989).

## CAPÍTULO V

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1 Estudio Químico

##### 5.1.1 Recolección

La parte aérea de *L. tarapacanus* fue recolectada en la precordillera de Arica a 3400 m s.n.m. (I Región, Chile) e identificada por la botánica profesora Eliana Belmonte de la Universidad de Tarapacá, durante el mes de Enero-2002. Una muestra testigo de la planta se conserva en el herbario (SQF N° 22216) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Figura 4.2).

##### 5.1.2 Obtención de los Extractos y del Infuso

El exudado resinoso de la planta fue extraída sumergiendo el material vegetal fresco (1.600 g) en diclorometano (DCM) hasta su total extracción, obteniéndose el extracto del exudado resinoso (ERES). Posteriormente el material vegetal agotado, fue secado a la sombra a temperatura ambiente y molido.

La planta seca y molida (1.370 g) se sometió a extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y metanol, obteniéndose los extractos correspondientes, el hexánico (EHEX), el diclorometánico (EDCM) y el metanólico (EMET) (ver Figura 5.1).

Cada extracción se realizó hasta total agotamiento, dejando entre cada una, secar la planta a temperatura ambiente, antes de adicionar el nuevo disolvente.

Todos los extractos fueron llevados a sequedad, hasta total eliminación del disolvente, para ser sometidos a las pruebas farmacológicas y microbiológicas.



Para obtener el infuso al 10%, la parte aérea de la planta seca fue pesada y molida, luego se agregó agua hirviendo y después de 30 minutos de maceración, se procedió a filtrar para obtener el infuso (INF), el cual fue utilizado para el ensayo de analgesia. Para las pruebas de antiinflamación tópica y para los estudios en c.c.f. del INF, el infuso obtenido, desde 30 g de planta seca, se llevó a total sequedad por medio de un evaporador rotatorio con vacío, a temperatura adecuada. Para el ensayo farmacológico el residuo seco se redisolvió en una mezcla hidroalcohólica (8:2) y para la c.c.f. se redisolvió en metanol.

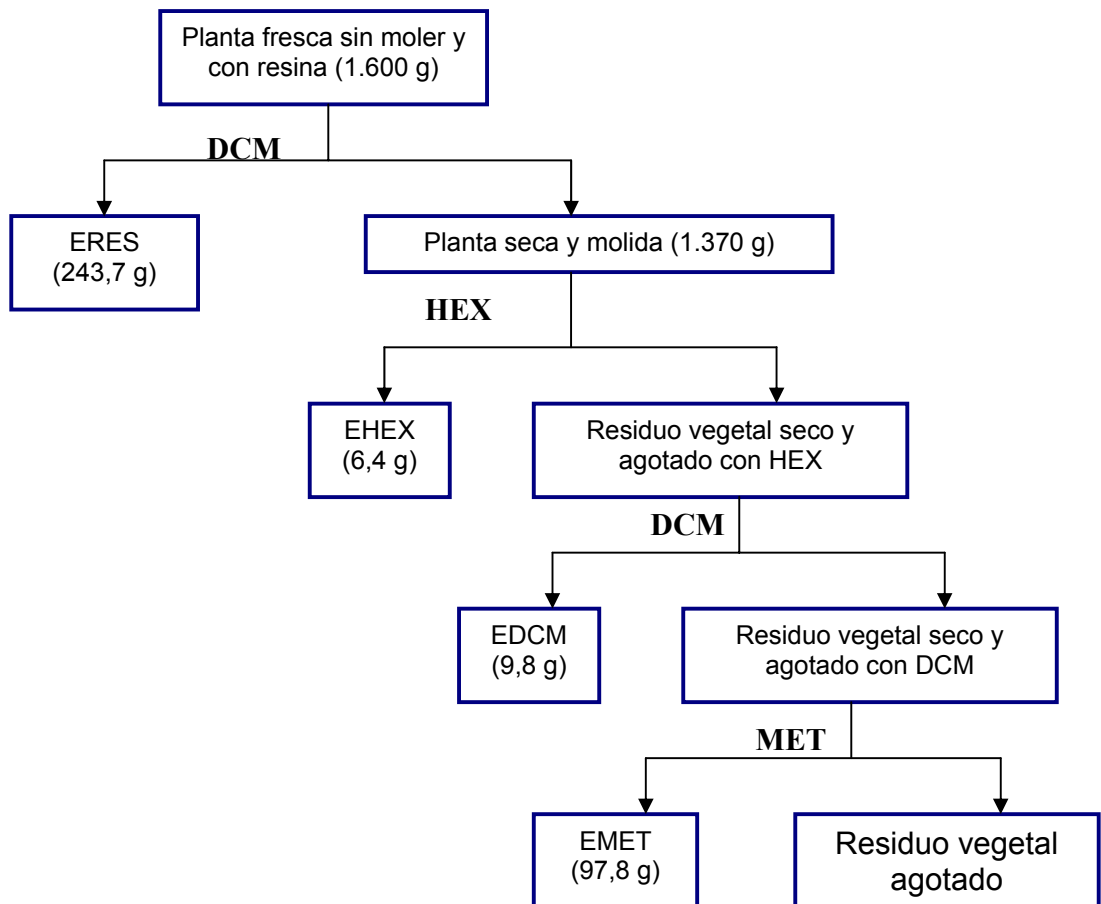


Figura 5.1: Esquema de Extracción de *Lophopappus tarapacanus*.

### 5.1.3 Estudio cromatográfico

Se realizó un screening de los diferentes extractos y del infuso de *L. tarapacanus* mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.), para investigar la presencia de metabolitos secundarios, empleándose como fase estacionaria cromatoláminas de gel de sílice G tipo 60 con indicador de fluorescencia (Merck), las fases móviles utilizadas fueron las mezclas de disolventes, con el cual se logró la mejor separación lo que permitió visualizar los diferentes grupos químicos de los constituyentes del extracto o infuso, las cromatografías fueron reveladas con diferentes reactivos y además fueron analizadas a la luz UV a las longitudes de onda de 254 y 366 nm.

En la Tabla 5.1 se señalan las fases móviles utilizadas y en la Tabla 5.2 los reactivos reveladores y los patrones:

**Tabla 5.1: Fases Móviles Utilizadas en las c.c.f.**

<b>Fase móvil</b>	<b>Grupos químicos analizados</b>
DCM:EtAc (9:1)	Alcaloides Triterpenos-Esteroles Terpenos Antraquinonas
DCM:EtAc (1:1)	Flavonoides Cumarinas

Tabla 5.2: Reactivos Reveladores y Patrones Utilizados en las c.c.f.

Metabolitos secundarios	Sustancia patrón	Reactivo revelador
Alcaloides	-----	Dragendorff
Triterpenos-Esteroles	ácido oleanólico/ β-sitosterol	Lieb.-Bürchard y p-anisaldehído
Antraquinonas	-----	Börntrager
Flavonoides	quercetina-canferol	Luz UV, NP/PEG, AlCl <sub>3</sub> y NH <sub>3</sub>
Terpenos	-----	p-anisaldehído
Cumarinas	Escopoletina	Luz UV: AlCl <sub>3</sub> y NP/PEG

Los reactivos reveladores utilizados fueron los siguientes:

- Reactivo de Dragendorff: reactivo constituido por yoduro doble de bismuto y potasio que reacciona con compuestos que contengan pares de electrones no compartidos como el nitrógeno, como es el caso de los alcaloides, formando sales dobles que se visualizan por la aparición de una coloración anaranjada (Merck, 1972).
- Reactivo de Liebermann-Bürchard: mezcla en partes iguales de anhídrido acético y ácido sulfúrico que sirve para revelar la presencia de compuestos orgánicos como triterpenos, que producen una coloración violeta y esteroides que dan coloraciones que varían del rosa al verde y finalmente pardas (Merck, 1972).
- Reactivo de p-anisaldehído sulfúrico: este reactivo preparado con p-anisaldehído, ácido acético glacial, metanol y ácido sulfúrico concentrado, permite detectar la presencia de terpenos, aceites esenciales y saponinas triterpénicas, por medio de la aparición de coloraciones que varían del azul al violeta (Wagner and Blatt, 1996).

- Reacción de Börntrager: reactivo que detecta grupos antraquinónicos y puede practicarse sobre las placas cromatográficas o directamente sobre una porción del vegetal molido y seco. Consiste en agregar una solución alcalina de KOH al 5 ó 10% y la aparición de una coloración roja indica la presencia de estos grupos (Merck, 1972).
- Vapores de NH<sub>3</sub>: al exponer a los flavonoides a vapores de NH<sub>3</sub> se produce una coloración amarilla al espectro visible y se intensifica su fluorescencia al espectro UV.
- Reactivo de AlCl<sub>3</sub> al 2% en metanol: permite la identificación de flavonoides y cumarinas, los que se caracterizan por presentar fluorescencia al espectro de luz UV, a longitudes de onda de 254 y 366 nm (Mabry *et al.*, 1970). Al revelar las cromatografías a la luz UV los flavonoides se intensifican o cambian de coloración y las cumarinas dan color celeste.
- Reactivo NP/PEG: este reactivo constituido por difenil-boriloxietilamina más polietilenglicol-4000, permite la detección de flavonoides. Se produce una intensificación de su fluorescencia a la luz UV a una longitud de onda de 366 nm (Wagner and Blatt, 1996).
- Reactivo de FeCl<sub>3</sub>: se utiliza para identificar compuestos que posean en su estructura una función fenólica, como los taninos. Según la naturaleza química del tanino se observarán coloraciones que varían desde el azul-negro (pirogálicos) hasta verde (catéquicos). Compuestos como los flavonoides pueden generar coloraciones verdes (Merck, 1972).

La identificación de taninos se realizó con los EMET, ERES y el INF disueltos en agua destilada agregando una o dos gotas de FeCl<sub>3</sub>, el ERES fue disuelto en metanol.

- Índice de espuma: este ensayo permite detectar la presencia de saponinas (sustancias con propiedades tensoactivas) a través de la formación de espuma persistente (durante 15 min), usando un 1 g de droga o de extracto vegetal seco, en un volumen apropiado de agua destilada (Gautier, 1954; Tyler *et al.*, 1979).

La búsqueda de saponinas se realizó en los EMET e INF disueltos en agua destilada, al agitar por 5 min y dejando reposar por 15 min, observando la formación de espuma persistente y homogénea.

#### 5.1.4 Técnicas Espectroscópicas

La elucidación de las estructuras se realizó mediante estudios espectroscópicos, abarcando técnicas ultravioleta (Mabry, 1970) en un espectrofotómetro UNICAM realizadas en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y el estudio de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN, fueron registrados en un instrumento Bruker a 300 MHz usando como referencia interna TMS y como solvente  $\text{CD}_3\text{OD}$  en la Universidad Católica del Sacro Cuore Facoltà di medicina e chirurgia "Agostino Gemelli" de Roma, Italia.

#### 5.1.5 Purificación y Fraccionamiento

El fraccionamiento fue realizado al exudado resinoso de *L. tarapacanus* por presentar mayor actividad antimicrobiana, mediante columnas rápidas de gel de sílice, columnas de Sephadex, columnas de mediana presión y placas preparativas Merck con marcador de fluorescencia, por lo que se pudieron diferenciar 7 grandes columnas.

##### 5.1.5.1 Primera Columna Rápida de Gel de Sílice

Inicialmente se obtuvieron cinco grandes fracciones del ERES (243,7 g) eluyendo con:

- Hexano (100%)
- Hexano:DCM (1:1)
- DCM (100%)
- DCM:MeOH (1:1)
- MeOH (100%)

Los extractos de DCM (26.04 g) y DCM:MeOH (1:1) (48.81 g) fueron los únicos que presentaron actividad antimicrobiana, por lo cual se continuó con su estudio químico.

### 5.1.5.2 Segunda Columna Rápida de Gel de Sílice

Esta segunda columna se realizó con el fin de extraer los compuestos que presentaron actividad antimicrobiana en el extracto de DCM proveniente de la primera columna rápida. Se utilizó gel de sílice tipo 60 y se eluyó con disolventes de polaridad creciente, con aumentos de 10% del disolvente de mayor polaridad, comenzando con HEX, HEX/DCM, DCM/EtAc, EtAc/MET hasta llegar a MET. Aquí fue posible obtener fracciones ricas en compuestos Lopho-1, Lopho-2 y Lopho-3.

**Tabla 5.3: Fracciones de Segunda Columna Rápida de Gel de Sílice**

Extracto o Fracción inicial	Fracciones (vaso)	Sustancia aislada
Columna DCM del ERES	221 – 258	Mezcla rica en Lopho-1, Lopho-2 y Lopho-3

### 5.1.5.3 Tercera Columna de Sephadex

Esta tercera columna fue realizada con la mezcla obtenida por elución con DCM de la segunda columna rápida de sílica gel. Siendo posible obtener de esta tercera columna el compuesto Lopho-1 aislado, una segunda fracción rica en mezcla de Lopho-1, Lopho-2 y Lopho-3 y una tercera fracción que contenía Lopho-2 y Lopho-3.

**Tabla 5.4: Fracciones de la Tercera Columna de Sephadex**

Fracciones (vaso)	Mezcla disolventes	Proporción disolventes	Sustancia aislada
16 – 25	HEX:DCM:MET	1.5:2:0.5	Lopho – 1 Pinocembrina
26 – 37	HEX:DCM:MET	1.5:2:0.5	Mezcla de Lopho – 1, Lopho – 2 y Lopho-3
38 – 70	HEX:DCM:MET	1.5:2:0.5	Mezcla de Lopho – 2 y Lopho-3

#### 5.1.5.4 Cuarta Columna de Mediana Presión

El objetivo de esta cuarta columna fue aislar Lopho-2 de Lopho-3, proveniente de la tercera columna de Sephadex, de las fracciones 38 - 70. Aquí se obtuvieron dos fracciones, una contenía Lopho-2 aislado y una segunda fracción que contenía una mezcla de Lopho-2 y Lopho-3.

**Tabla 5.5: Fracciones de la Cuarta Columna de Mediana Presión**

Fracciones (vaso)	Mezcla disolventes	Proporción disolventes	Sustancia aislada
19 -37	DCM:EtAc	95:5	Lopho-2
38 - 45	DCM:EtAc	94:6	Lopho 2-3

#### 5.1.5.5 Placas preparativas Merck con marcador de fluorescencia

Esta técnica fue aplicada para separar Lopho-2 de Lopho-3 proveniente de la cuarta columna. De las fracciones 38 – 45 se sembraron los compuestos disueltos en metanol lo más junto posible en placas preparativas Merck las cuales poseen marcador de fluorescencia para poder diferenciar un compuesto de otro con luz UV de  $\lambda$  366 nm. Una vez desarrolladas las placas en la fase móvil DCM:EtAc (9:1) y detectado cada compuesto se raspa mecánicamente la sílica de la placa con una espátula para luego ser extraída con metanol hasta total separación del compuesto de la sílica, aislándose Lopho-3.

#### 5.1.5.6 Quinta Columna Rápida de Gel de Sílica

Esta columna proviene de la fracción DCM:MET (1:1), la cual también presentó actividad antimicrobiana en la primera columna rápida. Se realizó con el fin de separar los compuestos responsables de dicha actividad, para ellos se utilizó gel de sílice tipo 60 y disolventes de polaridad creciente desde HEX, HEX/DCM, DCM/EtAc, EtAc/MET hasta MET con aumentos sucesivos de un 10%. Como resultado de esta columna se obtuvo una fracción rica en una mezcla que contenía Lopho-5, Lopho-6 y Lopho-7.

**Tabla 5.6: Fracciones de la Quinta Columna Rápida de Gel de Sílica**

Extracto o Fracción inicial	Fracciones (vaso)	Mezcla disolventes	Proporción disolventes	Sustancia aislada
Columna DCM:MET (1:1) del ERES	6 y 7	DCM:EtAc	1:1	Mezcla rica en Lopho-5, Lopho-6 y Lopho-7

### 5.1.5.7 Sexta Columna Rápida de Gel de Sílica

La realización de esta sexta columna tuvo por objetivo separar los tres compuestos de la anterior columna rápida, fue por ello que nuevamente se utilizaron disolventes de polaridad creciente desde HEX HEX/DCM, DCM/EtAc, EtAc/MET hasta MET con aumentos sucesivos de un 10%, para obtener una fracción que contenían mezclas de Lopho-5, Lopho-6 y Lopho-7 con menor cantidad de impurezas.

**Tabla 5.7: Fracciones de la Sexta Columna Rápida de Gel de Sílica**

Extracto o Fracción inicial	Fracciones (vaso)	Mezcla disolventes	Proporción disolventes	Sustancia aislada
6 y 7	14 - 36	HEX:DCM	2:8	Mezcla rica Lopho-5, Lopho-6 y Lopho-7

### 5.1.5.7 Séptima Columna Rápida de Gel de Sílica

Esta séptima columna tuvo por objetivo aislar los tres compuestos de la anterior columna rápida, fue por ello que nuevamente se utilizaron disolventes de polaridad creciente desde HEX hasta MET con aumentos sucesivos de 10%. De aquí fue posible obtener tres fracciones siendo la primera de ellas la que contenía Lopho-5 puro, el cual presentó actividad antimicrobiana y dos fracciones más que contenían Lopho-5 y Lopho-6 y la tercera que contenía Lopho-6 y Lopho-7, las cuales no presentaron actividad.



**Tabla 5.8: Fracciones de la Séptima Columna Rápida de Gel de Sílica**

Extracto o Fracción inicial	Fracciones (vaso)	Mezcla disolventes	Proporción disolventes	Sustancia aislada
14 - 36	62 - 63	DCM:EtAc	7:3	Lopho - 5
14 - 36	69 - 77	DCM:EtAc	4:6	Mezcla rica en Lopho-5 y Lopho-6.
14 - 36	78 - 90	DCM:EtAc	1:9	Mezcla rica en Lopho-6 y Lopho-7

## 5.2 Estudio Farmacológico

El estudio farmacológico *in vivo* comprendió las evaluaciones de las actividades analgésica oral y antiinflamatoria tópica de los compuestos aislados desde el ERES que fue posible obtener cantidad suficiente para cada estudio.

Para estas evaluaciones se usaron ratones de la cepa CF-1 no consanguíneos, de ambos sexos, cuyo peso varió entre los 20 a 25 g y su edad entre 30 a 35 días en la unidad de mantención de animales del Instituto de Salud Pública (ISP).

En todos los casos los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas previas al ensayo con agua *ad libitum* y a una temperatura controlada de 20°C.

En cada ensayo se trabajó con 10 animales, dejando 2 de ellos como controles, los que eran agregados a un "pool" de animales controles, que en total formaban un número de 16 controles.

Una vez concluido los ensayos, los animales fueron sacrificados inmediatamente, por dislocación cervical (método indoloro).

### 5.2.1. Análisis Estadístico

Para todos los ensayos se calcularon los efectos usando los valores de la mediana, como medida de tendencia central de los datos y el error estándar (SEM), como medida de dispersión. Los resultados se analizaron estadísticamente por el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos si su  $p$  era  $\leq$  a 0,05.

(Ver Anexo 6)

$$\text{SEM} = \sigma / \sqrt{n}$$

#### Ec. 5.1: Error Estándar (SEM).

Donde:

$\sigma$  = Desviación estándar.

$n$  = Número de animales.

### 5.2.2 Estudios In Vivo

#### 5.2.2.1 Determinación de la Actividad Analgésica

Se evaluó utilizando el método de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético (agente algésico), comparando la respuesta de dolor (número de contorsiones) de los animales de experimentación (ratones CF-1), a los cuales se les administró previamente las muestras en estudio de *Lophopappus tarapacanus*, con los animales del grupo control, a los que sólo se les administró el vehículo, goma arábiga salina al 5% y el agente algésico. El efecto analgésico se evaluó de acuerdo a la disminución de contorsiones abdominales, expresado en porcentaje.

Se les administró los compuestos aislados (previamente disuelto en goma arábiga salina al 5%) en una dosis de 13 mg/kg para Lopho-1 y 14,2 mg/kg para Lopho-2 por medio de una sonda de 4 french vía oral, en volúmenes de 0,4 mL/25g. Después de una hora se administró vía i.p. una solución acuosa de ácido acético al 0,6% (agente algésico) en volúmenes de 0,5 mL/25 g, los animales se colocaron individualmente en recipientes de

vidrio transparente sobre una rejilla de metal y luego de 5 minutos se comenzó a contar el número de contorsiones de cada uno de ellos, durante 30 minutos (Delporte *et al.*, 2002).

Para obtener el porcentaje de analgesia se determinó primero el porcentaje de dolor, el cual se obtiene a partir de la mediana de las contorsiones del grupo que recibió la muestra y la del grupo control.

$$\%D = (Cm/Cc) \times 100\%$$

**Ec. 5.2: Porcentaje de Dolor (%D).**

Donde:

Cm: Mediana de las contorsiones de los animales que reciben muestra.

Cc : Mediana de las contorsiones de los animales controles.

Una vez obtenido el %D se calculó el porcentaje de efecto analgésico.

$$\%Ean = 100-\%D$$

**Ec. 5.3: Porcentaje de Efecto Analgésico (%Ean).**

El fármaco de referencia utilizado en el ensayo correspondió a naproxeno sódico (NAP), cuyo efecto es dosis dependiente y el efecto máximo se presentó a la dosis de 12,5 mg/kg, siendo de un 70%.

### **5.2.2.2 Determinación de la Actividad Antiinflamatoria Tópica**

Se evaluó mediante el método de inducción de edema en oreja. El ensayo se realizó utilizando dos tipos de agente inflamatorio, AA (ácido araquidónico) y TPA (12-miristato-13-acetato forbol), los cuales al ser aplicados localmente producen una reacción inflamatoria aguda caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular,

edema e influjo celular, diferenciándose en el tiempo de acción y mediadores químicos involucrados en los diferentes procesos (Lloret y Moreno, 1995). Se indujo inflamación en la oreja derecha de cada animal, dejando la izquierda de control. La inflamación quedó establecida por la diferencia de peso de la oreja derecha con agente inflamatorio (edema), respecto del peso de la oreja izquierda. Se evaluó la propiedad antiinflamatoria de las muestras aplicadas en función de la disminución de peso del edema de las orejas inflamadas, comparadas con el peso del edema de las orejas del grupo control, que recibieron sólo el vehículo (acetona) y el agente inflamatorio. El resultado se expresó en porcentaje.

Sobre la oreja derecha del ratón se aplicó la muestra en estudio a diferentes dosis como se puede observar en la Tabla 5.9, siendo 10µL aplicados con una micro pipeta en la cara externa de la oreja y los otros 10µL en la cara interna; de igual forma se procedió en la oreja izquierda, pero en este caso se aplicó solamente el vehículo utilizado (Delporte *et al.*, 2003). Los vehículos utilizados fueron etanol o etanol:agua (8:2), dependiendo de la solubilidad de los compuestos aislados y acetona para ambos agentes inflamatorios, éstos disolventes no interfieren en el proceso de la inflamación. Luego de la aplicación de la muestra en estudio se esperó 5 minutos y se procedió de la misma forma en la oreja derecha pero esta vez con el agente inflamatorio. Luego se aplicó sólo el vehículo (acetona) en la oreja izquierda. Pasado el tiempo de inflamación máximo (4½ horas en el ensayo con TPA y 1 hora en el ensayo con AA), los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a cortar ambas orejas con un sacabocados de 6mm de diámetro, obteniendo así porciones uniformes. Éstas posteriormente fueron pesadas obteniéndose el peso de la oreja derecha y de la izquierda de cada uno de los ratones, para así obtener la diferencia de peso entre ambas orejas, la cual fue comparada con la obtenida con el "pool" de animales controles.

La actividad antiinflamatoria tópica de cada muestra se obtuvo comparando la inflamación alcanzada por el grupo control con el que recibió la muestra. Luego el

porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico (% EAIT) queda definido por la siguiente fórmula:

$$\%EAIT = \left[ \frac{(OD_C - OI_C) - (OD_M - OI_M)}{(OD_C - OI_C)} \times 100 \right]$$

**Ec. 5.4: Porcentaje Efecto Antiinflamatorio Tópico (% EAIT).**

Donde:

( $OD_C - OI_C$ ) : Mediana de la diferencia de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales controles.

( $OD_M - OI_M$ ): Mediana de la diferencia de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra.

#### 5.2.2.2.1 AA

El tiempo óptimo para la máxima inflamación con ácido araquidónico (AA) fue de 1 hora en dosis de 2 mg/20µL/oreja. La determinación de la dosis de los compuestos aislados fue de 0.5 mg/20µL/oreja y 2 mg/20µL/oreja. El fármaco de referencia utilizado fue nimesulida (NIM) en dosis de 1 mg/20µL/oreja, dosis a la cual se produce el efecto antiinflamatorio máximo (48,8%).

#### 5.2.2.2.2 TPA

El tiempo al cual se produce la máxima inflamación con TPA correspondió a 4½ horas y media con una dosis de 5 µg/20µL/oreja. Para la determinación del fármaco de referencia junto a la dosis a administrar se utilizó la que aparecía en la bibliografía (Lloret y Moreno, 1995), siendo la indometacina (IND) a una dosis de 0,5 mg/20µL/oreja, dosis a la cual se produce el efecto antiinflamatorio máximo (92,9%). La determinación de las dosis de los compuestos aislados fueron según lo indicado en la Tabla 5.9

**Tabla 5.9: Dosis de Compuestos Ailados de *L. tarapacanus* Utilizadas en Determinación de Efecto Antiinflamatorio Tópico.**

Concentración Lopho -1	Agente inflamatorio	medio disolución
0,5 mg/20uL/oreja	AA	etanol:agua (8:2)
1 mg/20uL/oreja	AA	etanol:agua (8:2)
2 mg/20uL/oreja	AA	etanol:agua (8:2)
0,5 mg/20uL/oreja	TPA	etanol:agua (8:2)

Concentración Lopho -2	Agente inflamatorio	medio disolución
0,25 mg/20uL/oreja	AA	etanol
0,5 mg/20uL/oreja	AA	etanol:agua
1 mg/20uL/oreja	AA	etanol:agua
1,5 mg/20uL/oreja	AA	etanol:agua
0,125 mg/20uL/oreja	TPA	etanol
0,25 mg/20uL/oreja	TPA	etanol
0,5 mg/20uL/oreja	TPA	etanol
1 mg/20uL/oreja	TPA	etanol

### 5.2.3 Estudios In Vitro

Los estudios *in vitro* fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en los laboratorios de Microbiología en la evaluación de actividad antimicrobiana y en el laboratorio de Productos Naturales en el ensayo de Decoloración de DPPH y el ensayo de xantina oxidasa.

#### 5.2.3.1 Ensayo de Decoloración de DPPH

El bioensayo se fundamenta en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) de color violeta intenso, al ser capturado por compuestos atrapadores de radicales libres forma un compuesto estable incoloro. Con esto es posible cuantificar la capacidad capturadora 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 utilizó una solución metanólica recién preparada del radical DPPH de 20 mg/mL. Se prepararon soluciones metanólicas de los compuestos a ensayar en un rango

de concentraciones de 1 a 200 µg/mL de acuerdo a la actividad encontrada. De acuerdo al siguiente protocolo Tabla 5.5 se mezclaron volúmenes de DPPH y soluciones de las muestras por triplicado, para luego de cinco minutos leer la absorbancia en el espectrofotómetro UNICAM a una longitud de onda 517 nm.

**Tabla 5.10: Protocolo de Ensayo de Decoloración DPPH**

	<b>Muestra</b>	<b>Blanco de muestra</b>	<b>Control</b>
Muestra (µL)	375	375	0
DPPH (µL)	750	0	750
Metanol (µL)	0	750	375
Volumen total (µL)	1.125	1.125	1.125

El cálculo del porcentaje de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres), se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Decoloración} = [1 - (A \text{ compuesto} / A \text{ blanco})] * 100$$

**Ec. 5.5 : Porcentaje de Decoloración**

Un valor igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libres y un valor cercano a cero indica una nula capacidad, por lo que el grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como captadoras de radicales libres. Como compuesto de referencia de captador de radicales libres se utilizó la quercetina usando concentraciones entre 1,25 a 7,5 µg/mL.

Los valores son presentados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 determinaciones (Viturro *et al.*, 1999).

### 5.2.3.2 Ensayo frente Xantina Oxidasa

La solución de xantina (X) de (Sigma) se preparó tomando 11,4 mg en 500 mL de agua bidestilada sonicando durante 2 a 3 horas a 60°C. La enzima (Sigma) se utiliza a la concentración de 0,003 u/mL en buffer de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a un pH de 7,5. Para determinar la concentración de enzima a utilizar se ensayó a distintas concentraciones de enzima para obtener el gráfico A vs concentración. La concentración de enzima que dió la A requerida para trabajar (0,300-0,400) fue de 0,006 u/mL.

Los extractos fueron evaluados a 50 µg/mL (Theoduloz et al., 1991). A las muestras en estudio (extracto o producto puro) se les adiciona 3 a 4 gotas de DMSO y a continuación el agua bidestilada y si corresponde se sonicó. Los compuestos aislados se evaluaron a la IC<sub>50</sub> del alopurinol 0,257 µM y a concentraciones descritas por bibliografía para Lopho-2 (Cos, 1998). Las muestras fueron evaluadas en duplicado. Para finalizar el ensayo se utilizó HCl 1 N (40,9 mL de ácido concentrado en 500 mL de agua bidestilada).

**Tabla 5.11: Protocolo del Ensayo de Xantina/Xantina Oxidasa**

<b>TUBOS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
1. Extracto	-	-	1 mL	1 mL
2. Agua bidestilada	1mL	1mL	-	-
3. Buffer	2,9mL	3mL	2,9mL	3mL
4. Xantina Oxidasa	0,1mL	-	0,1mL	-
Pre.incubar a 25 por 15 min				
5. Xantina	2mL	2mL	2mL	2mL
Incubar a 25° C por 30 min				
6. HCl	1mL	1mL	1mL	1mL
Medir A ácido úrico a 290 nm	Ác. Úrico total	Blanco de A	Ác. Úrico remanente	Blanco de C
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>7 mL</b>	<b>7 mL</b>	<b>7 mL</b>	<b>7 mL</b>



Una vez agregados 1,2,3 y 4 se preincubó las mezclas a 25°C por 15 min. A continuación se adicionó a todos los tubos X y se incubó a 25°C por 30 min (para que la X esté a la temperatura de las muestras se colocó en el baño junto con éstas). Para finalizar, la reacción fue detenida con HCl y se procedió a leer la absorbancia (A) del ácido úrico a 290 nm (Noro et al., 1983), en un espectrofotómetro UNICAM (Kalckar, 1947).

El porcentaje de inhibición (%I) se calcula según la siguiente fórmula:

$$\%I = [(AA - AB) - (AC - AD) / (AA - AB)] * 100$$

**Ec. 5.6: Pcentaje de inhibición de la XO**

A : absorbancia; AA: absorbancia del tubo A

AA-AB: absorbancia del ácido úrico total (debe tener una A entre 0,300-0,400)

AC- AD: absorbancia del ácido úrico remanente

El fármaco de referencia utilizado fue el alopurinol y para determinar su concentración inhibitoria cincuenta (IC<sub>50</sub>) se ensayaron diferentes concentraciones de este fármaco. Del gráfico %I vs concentración se obtuvo el IC<sub>50</sub> que resultó ser 0,035 µg/mL.

La significancia de los resultados se calculó con el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos si su **p** era ≤ a 0,05.

### 5.2.3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar

Para realizar la evaluación antibacteriana y antifúngica de los extractos, es necesario preparar dos alícuotas de 20 mL c/u de agar fundido de TSA (Tryptic soy agar), con una concentración final de extracto de 100 y 200 µg/mL. Para esto se prepara una solución madre de extracto de 100 mg por 1 mL de DMSO y se incorpora a cada porción de 20 mL de agar fundido, 0,02 y 0,04 mL de dicha solución. Se homogeniza bien cada fracción y se deja solidificar en cápsula de Petri. Una vez fría se procede a sembrar los microorganismos en forma lineal con un asa de micrón estéril y en superficie (Erazo *et al.*, 1997) cada uno de los microorganismos de prueba, indicados en farmacopea (USP XXII) para la valoración de antibióticos, obtenidos de *American Type Culture Collections* que se encuentran descritos en la Tabla 5.12.

Los microorganismos en las placas fueron incubados por 24 horas a 37°C para bacterias y 48 horas a 28 °C para hongos.

Los extractos utilizados para este ensayo fueron: ERES, EHEX, EDCM, EMET y FrDCMERES.

Los controles estaban constituidos por placas que contenían el agar fundido sobre el cual se aplicaron las distintas cepas en estudio.

**Tabla 5.12: Microorganismos Utilizados para Todas las Pruebas Microbiológicas .**

<b>Bacterias Gram Negativas</b>		
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC14207
	<i>Salmonella aviatum</i>	ATCC 12228
<b>Bacterias Gram Positivas</b>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
	<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10290
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 14884
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Muestra clínica
<b>Hongo</b>		
	<i>Candida albicans</i>	Muestra aislada clínico desde laboratorio de microbiología de la Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas, U. de Chile
<b>Levadura</b>		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Muestra aislada del ambiente desde laboratorio de microbiología de la Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas, U. de Chile

#### 5.2.3.4 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana por el Bioensayo

##### Bioautografía

Para la realización de este bioensayo se hicieron cromatogramas de gel de sílice 60 (Merck) de 5 cm de ancho por 7 cm de alto y se sembraron las fracciones o compuestos aislados. Se determinó la fase móvil más apropiada para cada muestra a ensayar (ver Tabla 5.13)

**Tabla 5.13: Fases Móviles de Cromatogramas de Bioautografías**

Fracción o Compuesto	Fase Móvil
ERES	DCM:EtAc (9:1)
EHEX	DCM:EtAc (9:1)
EDCM	DCM:EtAc (9:1)
EMET	DCM:EtAc (9:1)
Ext Hexano 100% ERES	DCM:EtAc (9,5:0,5)
Ext Hex:DCM (1:1) ERES	DCM:EtAc (9,5:0,5)
Ext DCM 100% ERES	DCM:EtAc (9,5:0,5)
Lopho – 1 (pinoembrina)	DCM:EtAc (9:1)
Lopho – 2 (galangina)	DCM:EtAc (9:1)
Lopho - 3	DCM:EtAc (9:1)
Lopho – 4 (mezcla racémica)	DCM:EtAc (9:1)
Lopho - 5	EtAc (100%)
Lopho – 6	EtAc (100%)
Lopho - 7	EtAc (100%)

Se prepararon cultivos de los microorganismos a ensayar en un medio de cultivo líquido (TSB para las bacterias y PDB para hongos y levaduras) con 24 horas y 48 horas de anticipación respectivamente. Se tomó una alícuota de 1 mL de microorganismo la que se resuspende en 9 mL de medio de cultivo líquido, y se colocó un agitador orbital a 37 °C por 2 horas, con el fin de obtener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento.

El cromatograma se expuso a la radiación U.V. ( $\lambda$  254 nm) durante 30 minutos con el fin de ser esterilizados para luego ser utilizados. En un tubo estéril se adicionó la suspensión del microorganismo al medio de cultivo sólido (TSA para las bacterias y PDA para hongos y levaduras) fundido. La suspensión se homogeneizó mecánicamente mediante un agitador y se agregó sobre el cromatograma, quedando cubiertos completamente con la película de agar inoculado con cada bacteria u hongo. Finalmente los cromatogramas fueron puestos cada uno en placas de Petri estériles con tapa en un

ambiente húmedo con agua destilada esterilizada y se incubaron durante 24 horas en una estufa termorregulada a 37°C para bacterias y por 48 horas a 28°C para hongos. Las bioautografías se revelaron con una sal de tetrasolium (MTT) y se dejaron incubando por 1 hora más. Al ser agregado el reactivo revelador se tornaron con un color violeta intenso, exceptuando la zona donde se produjo la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de los metabolitos activos presentes, quedando de color marfil y a los cuales se les midió su Rf (Rahalison *et al.*, 1991; Hamburger and Hostettman *et al.*, 1991; Erazo *et al.*, 1997).

#### **5.2.3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los compuestos activos aislados**

Este bioensayo da cuenta de la mínima concentración de la sustancia aislada a la que se presenta inhibición del crecimiento bacteriano "*in vitro*".

Se preparó un cultivo para el microorganismo a ensayar (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus flavus*) en medio TSB por 24 horas a 37°C. Para esto se siembra con asa de micrón estéril el microorganismo en el medio de cultivo líquido. Después de incubar los microorganismos bajo estas condiciones se tomó 1 mL del microorganismo y se inoculó sobre 9 mL de TSB, se agitó por 1 hora con el fin de obtener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente se les midió la transmitancia en un SPECTRONIC 20D que debía resultar igual a 50% a una longitud de onda de 580 nm. Una vez obtenida esta transmitancia los cultivos de microorganismos se procedió a preparar un set de 30 tubos que contenían medio de cultivo líquido TSB con cantidad suficiente para completar un volumen final de 2 mL, inóculo del microorganismo a estudiar y concentraciones crecientes del compuesto Lopho-1, Lopho-2 y Lopho-5 desde 10 a 350 µg/mL. Sobre cada tubo que contenía medio de cultivo líquido TSB se le agregó concentraciones crecientes de Lopho-1, Lopho-2 y Lopho-5 según actividad presentada por cada compuesto aislado, y se inocularon con concentración constante de microorganismo por un período de 24 horas a 37°C. Al

mismo tiempo se prepararon tubos controles. El primero de ellos contenía medio de cultivo TSB, el segundo tubo TSB más 125  $\mu\text{L}$  de inóculo del microorganismo y el tercer tubo control contenía TSB más la mayor concentración de la sustancia ensayada. Los tubos en los que no se apreció turbidez, es decir, con total transparencia del TSB (al igual que el tubo control de TSB) se consideró la concentración mínima a la que se produjo la inhibición de crecimiento bacteriano. Este tubo fue comparado con todos los tubos controles visualmente para determinar la inhibición.

Para preparar las distintas concentraciones de la sustancia aislada se preparó una disolución de 1 mg/mL de DMSO. De esta solución de concentración conocida se fueron extrayendo volúmenes exactos con micropipeta con puntas estériles partiendo de 10  $\mu\text{L}$  para ir aumentando en intervalos de 10  $\mu\text{L}$ . Todo este procedimiento fue realizado bajo campana de flujo laminar.

Los resultados obtenidos se compararon con un fármaco de referencia (Ampicilina).

#### **5.2.3.6 Determinación de la Actividad Bactericida y Bacteriostática de los compuestos activos aislados**

Al haber realizado la CMI de cada uno de los productos aislados que presentó actividad antibacteriana, se determinó desde los 2 tubos anteriores a dicha concentración hasta los tubos restantes cual era su actividad antibacteriana.

En nuevos tubos se puso como medio de cultivo 1,9 mL de TSB, y 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo que contenían diferentes concentraciones del compuesto Lopho-1, Lopho-2 o Lopho-5 según correspondiese, provenientes de la CMI, para así completar un volumen final de 2 mL en cada tubo. Luego se disponían en una estufa termorregulada a 37°C por 24 horas. Al observar los tubos luego de las 24 horas de incubación se pudo ver tubos turbios que correspondían a una actividad bacteriostática o tubos traslúcidos que correspondían a una actividad bactericida.

Las concentraciones de cada tubo de las diferentes actividades de los compuestos activos ensayados fueron expresados en concentraciones  $\mu\text{M}$ .

## CAPÍTULO VI

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1 Estudio Químico

El estudio químico realizado a *L. tarapacanus* contó con los siguientes resultados:

##### 6.1.1 Obtención de los Extractos e Infuso

El rendimiento de la extracción sucesiva en frío de la parte aérea de *L. tarapacanus* a partir de 1600 g de planta fresca, 1370 g de planta seca y del infuso se detallan en la Tabla 6.1, de acuerdo al peso de la planta fresca o planta seca según corresponda.

**Tabla 6.1: Rendimiento del Proceso de Extracción.**

	ERES	EHEX	EDCM	EMET	INF
<b>Peso del extracto (g)</b>	243,7	6,4	9,8	97,8	2,8
<b>Rendimiento (%)</b>	15,3	0,47	0,72	7,1	9,3

Los ERES, EMET e INF fueron los que presentaron los mayores porcentajes de rendimiento en este proceso.

##### 6.1.2 Estudio cromatográfico

Los resultados del screening inicial realizado a los extractos y al infuso se muestran en la Tabla 6.2, el símbolo + indica una reacción positiva frente a la reacción de identificación y el símbolo - indica reacción negativa.

Tabla 6.2: Screening de los Extractos y del Infuso.

Metabolito secundario	ERES	EHEX	EDCM	EMET	INF
Alcaloides	-	-	-	-	-
Triterpenos-Esteroles	-	+	+	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	-	+	+	+
Taninos	+	-	-	+	+
Terpenos	+	+	+	-	-
Saponinas	-	-	-	+	+
Cumarinas	+	-	+	-	+

Según los resultados observados en este screening, esta especie podría poseer triterpenos, esteroides, flavonoides, taninos, terpenos, saponinas y cumarinas en los diferentes extractos analizados.

### 6.1.3 Técnicas Espectroscópicas

Generalmente los espectros UV de sustancias flavonoides presentan dos bandas de máximos de absorción, conocidos como Banda I (300 – 380 nm) y Banda II (240 – 280 nm) y que son características de sustancias totalmente conjugadas (flavonoles, Flavonas); además de aquellos flavonoides existen otros en los cuales se rompe esta conjugación a nivel de los carbonos 2 y 3 de la estructura principal, ya sea por hidrogenación del doble enlace de esta posición (Flavanona, dihidroflavonol) o por isomerización, con migración del grupo fenilo de la posición 2 a la 3 (isoflavona).

En la técnica ultravioleta, se obtuvo los siguientes resultados expuestos en las Tablas 6.3 y 6.4 de la Lopho-1 (pinocembrina) y Lopho-2 (galangina) respectivamente y los espectros de ambos se encuentran en Anexo 1:



**Tabla 6.3: Asignación de Señales Obtenidas al Realizar Técnica de Ultravioleta a Compuesto Lopho – 1 (Pinocembrina).**

Disolventes	Datos Literatura Banda II (Mabry, 1970)	Datos Literatura Hombro (Mabry, 1970)	Datos Experimentales Banda II	Datos Experimentales Hombro
MeOH	289	325	288	326
NaOMe	245	324	242	324

El compuesto Lopho-1 correspondería a un flavonoide que no posee conjugación a nivel del carbono 2 y 3 de la estructura básica, ya que presenta solamente la Banda II a 288 nm y un hombro debido a la Banda I no existente a 326 nm.

**Tabla 6.4: Asignación de Señales Obtenidos al Realizar Técnica de Ultravioleta a Compuesto Lopho – 2 (Galangina).**

Disolventes	Datos Literatura Banda II (Mabry, 1970)	Datos Literatura Banda I (Mabry, 1970)	Datos Literatura Hombro (Mabry, 1970)	Datos Experimentales Banda II	Datos Experimentales Banda I	Datos Experimentales Hombro
MeOH	267	359	305	268	358	304
NaOMe	280	412	327	278	392	332

En las tablas anteriores se pueden observar las diferencias existentes entre una flavanona (pinocembrina) y un flavonol (galangina), ya que el segundo flavonoide presenta dos bandas, Banda I a 358 nm y Banda II a 268 nm, debido a que posee un doble enlace entre el carbono 2 y el carbono 3 del anillo C conjugando la estructura principal, a diferencia de la flavanona que no lo presenta.

Al realizar esta técnica se puede observar un desplazamiento hipsocrómico al agregar NaOMe a la solución metanólica de Lopho-1 (pinocembrina), a diferencia del desplazamiento batocrómico que presentó Lopho-2 (galangina).

Con respecto a las técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  RMN se obtuvieron los siguientes resultados expuestos en la Tabla 6.5 para Lopho-1 (pinocembrina) y en la Tabla 6.6 para Lopho-2 (galangina), los espectros se encuentran en el Anexo 2:

**Tabla 6.5: Asignación de Señales Obtenidos al Realizar  $^1\text{H}$  RMN a compuesto Lopho – 1 (Pinocembrina).**

$\delta$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Constante de acoplamiento	Posición de protones (H)
7,43	5 H	Multiplete (m)		2'; 3'; 4'; 5'; 6'
5,94	1 H	Doblete (d)	$J = 2,0$	8
5,9	1 H	Doblete (d)	$J = 2,0$	6
5,44	1 H	Quadruplete (q)	$J_{\text{cis}} = 3; J'_{\text{trans}} = 12,6$	2
3,08	1 H	Doblete doblete (dd)	$J_1 = 12,6; J_2 = 17,1$	3 axial
2,76	1 H	Doblete doblete (dd)	$J_1 = 3,3; J_2 = 17,1$	3 ecuatorial
4,95				$\text{CD}_3\text{OD}$
3,4				$\text{CD}_3$

**Tabla 6.6: Asignación de Señales Obtenidos al Realizar  $^1\text{H}$  RMN a compuesto Lopho – 2 (Galangina).**

$\delta$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Constante de acoplamiento	Posición de protones (H)
8,16	2 H	Multiplete (m)		2'; 6'
7,47	3 H	Multiplete (m)		3'; 4'; 5'
6,39	1 H	Doblete (d)	$J = 2,8$	8
6,19	1 H	Doblete (d)	$J = 2,1$	6
4,95				$\text{CD}_3\text{OD}$
3,4				$\text{CD}_3$

En ambos compuestos se puede apreciar alrededor de 7,4 ppm un multiplete correspondiente a los protones del anillo B, los cuales no se encuentran sustituidos en ninguno de los dos compuestos en estudio, y a diferencia de Lopho-1 en Lopho-2 se puede diferenciar un segundo multiplete que corresponde a 2 H del anillo B (2' y 6'), lo

cual se puede atribuir a la interferencia que provocaría el OH en posición 3 del anillo C, con respecto a estos protones.

A diferencia de Lopho-2 (flavonol), el compuesto Lopho-1 (flavanona) presenta en 5,44 ppm un cuadruplete, en 3,08 ppm un dd y en 2,76 ppm otro dd, los cuales corresponden a los protones H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub><sub>axial</sub> y H<sub>3</sub><sub>ecuatorial</sub> respectivamente, ya que este compuesto no presenta doble enlace en estos carbonos ni otras sustituciones en esta zona.

En los espectros realizados de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C RMN a los compuestos aislados de *L. tarapacanus* los que se encuentran en el Anexo 3, se obtuvo los siguientes resultados expresados en las siguientes Tablas 6.7 y 6.8:

**Tabla 6.7: Asignación de Señales Obtenidos al Realizar <sup>13</sup>C RMN a compuesto Lopho – 1 (Pinocembrina).**

ppm CD <sub>3</sub> OD	Posición de protones (C)	Mabry (1970) DMSO-D <sub>6</sub>
197,3	C4	195,8
168,4	C7	166,6
165,5	C5	163,6
164,7	C9	162,7
140,4	C1'	138,0
129,7	C3'	128,5
129,6	C4'	128,5
128,9	C5'	128,5
128,6	C2'	126,5
127,3	C6'	126,5
103,4	C10	101,9
97,2	C6	96,1
96,3	C8	95,1
80,4	C2	78,4
43,9	C3	42,2

**Tabla 6.8: Asignación de Señales Obtenidos al Realizar  $^{13}\text{C}$  RMN a compuesto Lopho – 2 (Galangina).**

ppm $\text{CD}_3\text{OD}$	Posición de protones (C)	Mabry (1970) $\text{DMSO-D}_6$
177,6	C4	176,2
165,9	C7	164,3
162,6	C5	160,9
158,4	C9	156,6
138,5	C2	146,0
132,6	C3	137,0
130,9	C1'	131,0
130,5	C4'	129,7
129,4	C3' y C5'	128,3
128,7	C2' y C6'	127,5
104,7	C10	103,4
99,4	C6	98,5
94,6	C8	93,7

Este pequeño desplazamiento existente entre los resultados obtenidos y la literatura se puede atribuir al disolvente utilizado en cada caso.

Con los espectros realizados de UV,  $^{13}\text{C}$  RMN y  $^1\text{H}$  RMN se confirma la existencia de ambos compuestos aislados en *L. tarapacanus*, ya que ambos coinciden con los datos encontrados en literatura.

#### 6.1.4 Purificación y Fraccionamiento

Al realizar las columnas de sílica gel, columnas Sephadex y columnas de mediana presión según fue necesario para aislar los compuestos de *L. tarapacanus*, fue posible separar los siguientes compuestos descritos en la Tabla 6.9:

**Tabla 6.9: Compuestos aislados desde el Exudado Resinoso de *L. tarapacanus*.**

Extracto inicial	Sustancia Aislada	Rf	Proporción de disolventes para Rf	Cantidad aislada (mg)
Columna DCM de ERES	Lopho – 1 (Pinocembrina)	0.83	DCM:EtAc (9:1)	368
Columna DCM de ERES	Lopho – 2 (Galangina)	0.70	DCM:EtAc (9:1)	226
Columna DCM de ERES	Lopho – 3	0.61	DCM:EtAc (9:1)	8
Columna DCM:MeOH (1:1) de ERES	Lopho – 5	0.5	EtAc	250

Estos compuestos aislados contenidos en la Tabla 6.9, corresponden a los cuatro que presentaron actividad antimicrobiana, lo cual motivó su fraccionamiento y posterior aislamiento. Su estructura molecular, nombre científico y P.M. se puede apreciar en el Anexo 4.

Los cuatro compuestos activos como antimicrobianos al ser revelados con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico presentan las siguientes coloraciones (cromatografías c.c.f. en Anexo 5):

- Lopho-1: rojo
- Lopho-2: amarillo
- Lopho-3: rojo
- Lopho-5: verde-pardo.

## 6.2 Evaluación de las Actividades Farmacológicas

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de las diferentes actividades farmacológicas a las cuales fueron sometidos los distintos extractos y/o compuestos aislados de la especie en estudio.

### 6.2.1 Estudios *In Vivo*

Al haber evaluado la actividad analgésica vía oral y antiinflamatoria tópica de dos de los cuatro compuestos aislados de *L. tarapacanus*, de los cuales disponíamos en cantidad suficiente para realizar estos ensayos, se obtuvieron los siguientes resultados expuestos en las Tablas 6.10, 6.11 y 6.12 y en los Gráficos 6.1, 6.2 y 6.3. Las planillas utilizadas para el cálculo de los datos presentados en las tablas y gráficos se encuentran en el Anexo 6.

#### 6.2.1.1 Evaluación Analgésica vía oral

Con esta evaluación se pudo determinar que ambos compuestos ensayados presentaron una leve actividad analgésica en comparación con el fármaco de referencia (naproxeno sódico), siendo las concentraciones ensayadas para los dos compuestos aproximadamente equimolares a la dosis del fármaco de referencia que alcanzó el efecto máximo, con el fin de poder comparar sus actividades.

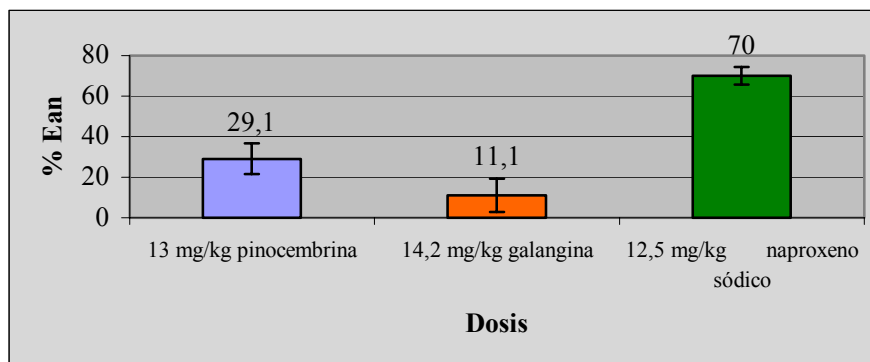
**Tabla 6.10: Actividad Analgésica comparativa de pinocembrina, galangina y naproxeno sódico.**

Dosis	Medio de disolución	% analgesia $\pm$ SEM	p
13 mg/kg pinocembrina	Goma arábica	29,1 $\pm$ 7,6	0,0055
14,2 mg/kg galangina	Goma arábica	11,1 $\pm$ 8,2	0,0354
12,5 mg/kg naproxeno sódico	Goma arábica	70 $\pm$ 4,3	0,0069

\* Resultado significativo con un  $p \leq 0,05$ .

El que pinocembrina presentara mayor actividad analgésica con respecto a galangina se puede atribuir a que, este segundo compuesto presenta mayor cantidad de grupos hidroxilos en su estructura, por lo cual presentaría una menor absorción por vía oral, que es la vía utilizada para este ensayo (ver Gráfico 6.1)(Goodman, 1996).

**Gráfico 6.1: Actividad Analgésica comparativa de pinocembrina, galangina y naproxeno sódico.**



#### 6.2.1.2 Evaluación Antiinflamatoria tópica

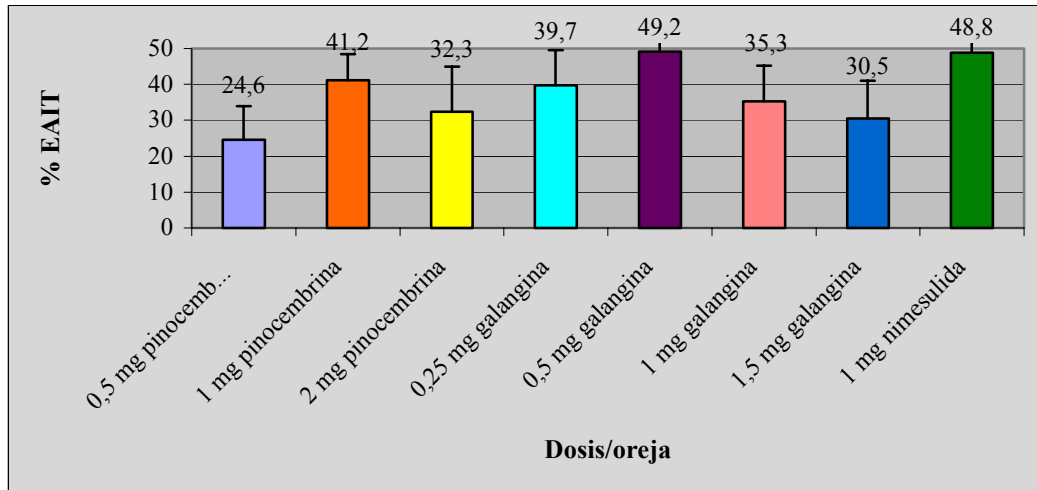
En la Tabla 6.11 y en el Gráfico 6.2 se observan los resultados obtenidos con el agente inflamatorio AA y en la Tabla 6.12 y en el Gráfico 6.3 se puede ver los resultados al utilizar el agente inflamatorio TPA.

**Tabla 6.11: Actividad Antiinflamatoria Tópica comparativa frente a AA de pinocembrina, galangina y nimesulida**

Dosis/oreja	Medio de disolución	%EAIT ± SEM	p
Pinocembrina 0,5 mg	etanol:agua (8:2)	24,6 ± 9,3	0,0233
Pinocembrina 1 mg	etanol:agua (8:2)	41,2 ± 7,2	0,0039
Pinocembrina 2 mg	etanol:agua (8:2)	32,3 ± 12,7	0,0117
Galangina 0,25 mg	Etanol	39,7 ± 9,8	0,0117
Galangina 0,5 mg	etanol:agua	49,2 ± 10,0	0,0232
Galanginan 1 mg	etanol:agua	35,3 ± 9,9	0,0885*
Galangina 1,5 mg	etanol:agua	30,5 ± 10,6	0,0187
nimesulida 1 mg	acetona	48,8 ± 4,0	0,0002

\* Resultado significativo con un  $p \leq 0,05$ .

**Gráfico 6.2: Actividad Antiinflamatoria Tópica comparativa frente a AA de pinocembrina, galangina y nimesulida**



Pinocembrina exhibió un efecto máximo de 41,2% a la dosis de 1 mg/oreja. Respecto a galangina, éste presentó un efecto relacionado con la dosis y su efecto máximo fue de 49,2% a la dosis de 0,5 mg/oreja, efecto similar al del fármaco de referencia la nimesulida.

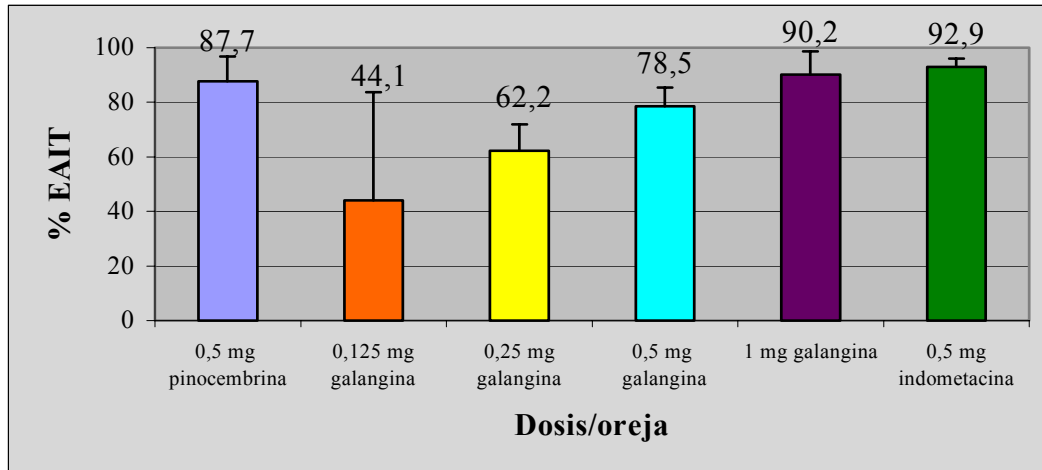
**Tabla 6.12: Actividad Antiinflamatoria Tópica comparativa frente a TPA de Pinocembrina, galangina e indometacina.**

Dosis/oreja	Medio de disolución	%EAIT ± SEM	p
pinocembrina 0,5 mg	etanol:agua (8:2)	87,7 ± 9,0	0,0001
galangina 0,125 mg	etanol	44,1 ± 39,6	0,1909*
galangina 0,25 mg	etanol	62,2 ± 9,8	0,0011
galangina 0,5 mg	etanol	78,5 ± 6,8	0,0001
galangina 1 mg	etanol	90,2 ± 8,4	0,0001
indometacina 0,5 mg	acetona	92,9 ± 3,2	0,0001

\* Resultado significativo con un  $p \leq 0,05$ .



**Gráfico 6.3: Actividad Antiinflamatoria Tópica comparativa frente a TPA de Pinocembrina, galangina e indometacina.**



Al haber evaluado esta actividad frente a TPA como agente inflamatorio se pudo observar según lo expuesto en la tabla anterior y en el Gráfico 6.3 que galangina alcanzó una actividad antiinflamatoria máxima muy cercana al efecto máximo del fármaco de referencia, pero duplicando la dosis.

El estudio de la actividad antiinflamatoria de galangina a diferentes dosis demostró que exhibe un efecto antiinflamatorio tópico dosis-dependiente, alcanzando su máximo efecto de 90,2% a 1 mg/oreja.

Para el compuesto pinocembrina existían datos bibliográficos donde ya se había evaluado esta actividad, por lo cual aquí sólo se corroboró este efecto (Sala *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos con pinocembrina y galangina frente a AA y TPA, muestran que ambos compuestos son más activos frente a este último agente inflamatorio.

La inflamación inducida por TPA es una inflamación más lenta, si la comparamos con la inflamación inducida por AA (Lloret y Moreno, 1995). Como respuesta a la acción del

TPA se desencadenan una serie de eventos en los cuales se sintetizan enzimas pro-inflamatorias como ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) entre otras (Lloret y Moreno, 1995). El hecho de que ambos compuestos sean más activos frente a la inflamación inducida por TPA y si consideramos que además no exhibieron una importante actividad analgésica se puede hipotetizar que estos dos compuestos no inhibirían la COX. Esta hipótesis quedaría confirmada por los estudios realizados por Rossi *et al.* (2002), en éstos se demostró que la pinocembrina no inhibe la COX.

Según Sala *et al.* (2003) el mecanismo por el cual la pinocembrina presenta efecto antiinflamatorio tópico sería por la inhibición la mieloperoxidasa, enzima producida por los leucocitos polimorfonucleares en el sitio inflamado (Lloret y Moreno, 1995), además, Habsah *et al.* (2003) confirmaron que la pinocembrina posee una leve capacidad antioxidante lo que contribuiría al efecto antiinflamatorio encontrado para este compuesto.

Para la actividad antiinflamatoria de los flavonoides se ha evidenciado una relación estructura-actividad, la que se manifiesta en favorecer el efecto por la presencia del doble enlace entre el carbono2 (C2) y carbono3 (C3), debido a la estabilidad por la planaridad que le proporciona al anillo, además los grupos hidroxilos (OH) en las posiciones 5 y 7 del anillo A y en las posiciones 3' y 4' del anillo B favoreciendo el efecto inhibitorio de diferentes mediadores de la inflamación como: iNOS, COX-2 y PLA<sub>2</sub>.

A su vez los efectos antiinflamatorios de los flavonoides que se ven desfavorecidos con la presencia de grupos metoxilos o glicosídicos en la posición 6 y 7 del anillo A; como también disminuyen el efecto la presencia de grupos OH en posición meta del anillo B y sustituciones en 3', 4' y 5' de igual anillo.

Por otra parte, la selectividad por 5-LO o COX, son importantes en los flavonoides que presentan sustituciones en 3' y 4' del anillo B; además de la presencia de grupos OH en el resto de la molécula, que la hace más potente y selectiva como inhibidor de 5-LO, y a su vez la ausencia de estas características la hace menos activa frente a 5-LO o la hace más selectiva frente a COX (Moroney *et al.*, 1988).

Con esto, se podría decir que todos los flavonoides con pocas sustituciones de grupos OH y desprovistos de los hidroxilos en 3' y 4' han demostrado ser más activos contra COX. Ésta selectividad indicaría que los compuestos no inhiben las enzimas que participan en la inflamación por un sólo mecanismo.

### **6.2.2 Actividad *In Vitro***

Al realizar los ensayos *in vitro* en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se pudo obtener los resultados que a continuación se describen.

#### **6.2.2.1 Ensayo de Decoloración de DPPH**

Este ensayo fue realizado tanto a los extractos EHEX, EDCM, EMET como ERES correspondiente de la primera columna rápida de gel de sílice, así como también uno de los compuestos aislados, siendo este galangina para confirmar datos de literatura, este ensayo no fue realizado a pinocembrina ya que se encontraron datos bibliográficos que respaldaban el no realizarlo (Sala *et al.*, 2003; Habsah *et al.*, 2003.).

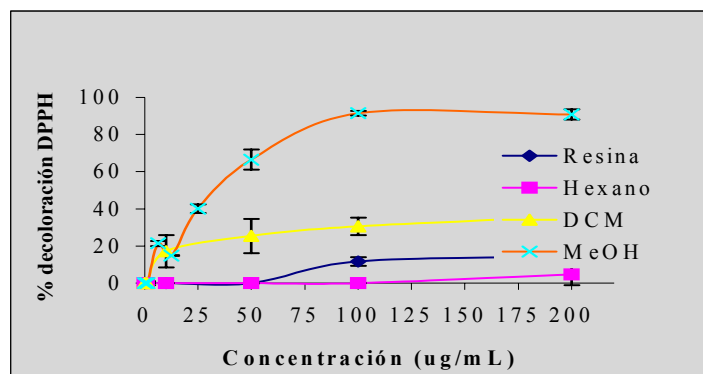
**Tabla 6.13: Evaluación de la Actividad Atrapadora de Radicales Libres mediante la Decoloración del DPPH de los Extractos de *L. tarapacanus***

Extracto	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% Decoloración	$\sigma$
EHEX	200	4,6	5,7062
EDCM	200	35,8	2,3183
EDCM	100	30,5	4,6602
EDCM	50	25,4	9,2272
EDCM	10	17,2	8,7085
ERES	200	14,5	0,4690
ERES	100	11,7	2,3047
ERES	50	0	0,3071
EMET	200	90,9	2,7522
EMET	100	91,5	1,2410
EMET	50	66,5	5,3802
EMET	25	40,1	2,3982
EMET	12,5	14,8	0,1773
EMET	6,25	21,4	1,4071
EMET	1,25	0	1,0784

$\sigma$  : desviación estandar

De los resultados obtenidos se puede concluir que el extracto metanólico presentó la mayor actividad atrapadora de radicales libres, alcanzando su máxima actividad a 100  $\mu\text{g/mL}$ , con 91 % de decoloración, lo cual se puede atribuir a compuestos fenólicos existentes en este extracto como por ejemplo flavonoides (Amié *et al.*, 2003; Benavente-García *et al.*, 1997).

**Gráfico 6.4: Actividad Decolorante del DPPH de los Extractos de *L. tarapacanus***



**Tabla 6.14: Evaluación de la Actividad Decolorante del DPPH de galangina.**

Compuesto	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración $\mu\text{M}$ inicial	Concentración $\mu\text{M}$ final	% Decoloración	$\sigma$
galangina	200	844	281	58,9	1,1120
galangina	100	426	142	43,4	1,5517
galangina	75	319	107	29,6	1,9147
galangina	50	213	71	17,3	4,2712

$\sigma$  : desviación estandar

La Tabla 6.14 muestra la actividad atrapadora de radicales libres del compuesto galangina, confirmando la actividad existente en datos bibliográficos (Russo A., 2002).

Esta actividad no fue evaluada para pinocembrina, por no presentar el doble enlace entre el carbono 2 (C2) y el carbono 3 (C3) del anillo C y por no poseer ningún sustituyente hidroxilo en el anillo B, lo cual se ha demostrado según bibliografía (Amié *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2002; Burda *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999; Benavente-García *et al.*, 1997) que se ve afectada su actividad atrapadora de radicales libres, al no existir esta conjugación y/o sustitución.

**Tabla 6.15: Evaluación de la Actividad Decolorante del DPPH de Lopho-5**

Compuesto	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% Decoloración	$\sigma$
Lopho-5	200	10,1	1,2584
Lopho-5	100	10,7	0,5102
Lopho-5	100	6,3	1,0310

$\sigma$  : desviación estandar

En este ensayo Lopho-5 presentó casi nula actividad atrapadora de radicales libres al no presentar un porcentaje considerable de decoloración de DPPH.

Si ambos compuestos ensayados los comparamos con la sustancia patrón, quercetina ( $\text{CE}_{50}$ , concentración efectiva 50) se puede concluir que ninguno de los dos presenta una actividad atrapadora de radicales libres similar a esta sustancia, ya que a la mayor

concentración inicial (844  $\mu\text{M}$ ) y final (281  $\mu\text{M}$ ) en que se ensayó galangina, presentó un 59% de decoloración del DPPH, lo cual si lo comparamos con los datos de quercetina, en que se utilizaron concentraciones iniciales de 3,26  $\mu\text{M}$  y finales 1,09  $\mu\text{M}$ , siendo éstas mas de 250 veces menor a las de galangina, con un porcentaje de decoloración similar.

Los flavonoides antioxidantes actúan como atrapadores de radicales libres por la rápida donación de un átomo de hidrógeno al radical, su actividad depende de la estructura molecular, de la configuración de los sustituyentes de los grupos hidroxilos sobre la capacidad del hidrógeno fenólico y de la posibilidad de estabilizar al radical fenólico resultante unido a hidrógeno o de la deslocalización de la expansión del electrón. Se debe considerar que la eficacia de un flavonoide está dada por el número y ubicación de los grupos hidroxilos (Amié *et al.*, 2003) y de la capacidad de un flavonoide de combinar estos elementos estructurales (Benavente-García *et al.*, 1997). Es así como en el caso de los flavonoles, como la galangina y flavonas que presentan un doble enlace entre el C2 y el C3 conjugado con el grupo ceto del carbono 4 (C4) del anillo C, el cual es responsable de la deslocalización de los electrones del anillo B, se ve reforzada la capacidad atrapadora de radicales libres. Además es importante para esta actividad, la presencia de grupos hidroxilos en posiciones 3, 5 y/o 7, siempre que no estén sustituidos.

También se puede decir que la presencia de grupos hidroxilos en 3' y 4', formando un dihidroxi en el anillo B, le que confiere un mayor grado de estabilidad a los radicales fenólicos flavónicos, participando en la deslocalización del electrón (Amié *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2002; Burda *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999; Benavente-García *et al.*, 1997). Es por ello que tanto pinocembrina como galangina no presentaron una buena actividad atrapadora de radicales libre, ya que no presentaban sustituciones en el anillo B.

Con estos resultados de los compuestos aislados del ERES se confirma la baja actividad atrapadora de radicales libres que este extracto presentó.

### 6.2.2.2 Ensayo Frente a Xantina Oxidasa

La evaluación realizada en este ensayo se determinó también a los extractos EHEX, EDCM, EMET como ERES correspondiente de la primera columna rápida de gel de sílice, y a dos de los compuestos aislados (Lopho-2 y Lopho-5), para así confirmar los datos bibliográficos sobre galangina y evaluar la actividad de Lopho-5. No fue realizado a pinocembrina por no presentar actividad en los antecedentes bibliográficos correspondientes a este ensayo. Las plantillas utilizadas para calcular los valores de cada tabla se encuentran en el Anexo 7.

**Tabla 6.16: Evaluación de la Actividad frente a Xantina Oxidasa de los Extractos de *L. tarapacanus*.**

Extracto o Fracción	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% Inhibición	p
EHEX	50	16,9	0,0028
EDCM	50	0	0,9171*
EMET	50	8,4	0,0188
FrDCMERES	50	23,6	0,0010

\* Resultado significativo con un  $p \leq 0,05$ .

El extracto que presentó mayor actividad frente a la XO fue la fracción de DCM del ERES (FrDCMERES), siendo ésta baja.

**Tabla 6.17: Evaluación de la Actividad frente a Xantina Oxidasa de los Compuestos Aislados del Exudado Resinoso de *L. tarapacanus*.**

Compuesto	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración $\mu\text{M}$	% Inhibición	p
galangina	0,0069	0,257	0	0,9989
galangina	6,6600	1,800	23,9	0,0020
Lopho-5	0,072	0,257	0	1,0000
alopurinol	0,035	0,257	50	0,0018

\* Resultado significativo con un  $p \leq 0,05$ .

Al realizar este ensayo a los compuestos aislados, se verificó que galangina no presenta actividad a una concentración equimolar a la  $IC_{50}$  del fármaco de referencia, pero si se

aumenta 7 veces su concentración, que es lo descrito según bibliografía (Cos, 1998) presentó una actividad de 24% de inhibición de la enzima.

La enzima xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y esta última a ácido úrico jugando un papel muy importante en la inflamación (Cos, 1998) ya que cuando la XO reacciona con hipoxantina y/o xantina en presencia de elevadas concentraciones de oxígeno forma anión superóxido, siendo este uno de los metabolitos tóxicos presentes tanto en isquemias como otras patologías (Dipak, 1994; Cos, 1998; Pietta, 2000). Según lo descrito en literatura existe una relación estructura-actividad de los flavonoides y la inhibición de la XO y la captura del superóxido, donde la existencia de grupos hidroxilos en 5 y 7 del anillo A y el doble enlace entre C2-C3 del anillo C, aumenta la actividad inhibitoria de la XO, siendo esto mayor en flavonas que flavonoles y la presencia de grupos hidroxilos en 3' del anillo B y 3 del anillo C se asocian con aumento en la actividad capturadora de superóxido (Cos, 1998). Con esto se confirman los resultados de los ensayos realizados a galangina frente a la XO.

### **6.2.2.3 Actividad Antimicrobiana Siembra Superficial en placa de Petri**

Este ensayo tuvo por objetivo poder dilucidar cual extracto de la planta en estudio presentaba actividad antimicrobiana, para continuar su posterior análisis. Es por ello que en placas de Petri con agar y extracto se le sembraron los diferentes microorganismos dando resultados positivos para los ERES y FrDCMERES, los cuales se indican en la Tabla 6.18, (ver Anexo 8).

Los extractos EMET, como EDCM y EHEX no presentaron actividad antimicrobiana frente a 8 cepas ensayadas en las placas de Petri.



**Tabla 6.18: Actividad Antibacteriana en siembra Radial en Placa de Petri de los Extractos que presentaron actividad de *L. tarapacanus***

Microorganismos Aeróbicos	Concentración (ug/mL) Exudado Resinoso		
	0 control	100	200
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+++
<i>S. aviatum</i>	+++	+++	+++
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	-
<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++
<i>M. flavus</i>	+++	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	+++	+++	++
<i>C. albicans</i>	+++	+++	+++

Microorganismos Aeróbicos	Concentración (ug/mL) Fracción DCM Exudado Resinoso		
	0 control	100	200
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+++
<i>S. aviatum</i>	+++	+++	+++
<i>B. subtilis</i>	+++	---	---
<i>S. aureus</i>	+++	+	---
<i>M. flavus</i>	+++	---	---
<i>K. pneumoniae</i>	+++	+++	+++
<i>C. albicans</i>	+++	---	---

Donde:

- +++ : crecimiento total del microorganismo
- ++ : crecimiento parcial del microorganismo
- + : crecimiento mínimo del microorganismo
- --- : inhibición del crecimiento
- - : leve inhibición del crecimiento

Como resultado de esta prueba se pudo observar que el único extracto que presentó actividad fue ERES, frente a tres de las cuatro bacterias Gram (+) con las que contó el estudio. Con este resultado se puede concluir que existen ciertos compuestos en este extracto que serían los responsables de aquella actividad.

#### 6.2.2.4 Actividad Antimicrobiana Bioensayo Bioautografía

Este bioensayo realizó para verificar la actividad de cada compuesto aislado del exudado resinoso de *L. tarapacanus*, (ver Anexo 9).

**Tabla 6.19: Evaluación de la Actividad Antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía de los Compuestos Activos Aislados**

Cepa	Lopho-1 (Pinocembrina)	Lopho-2 (Galangina)	Lopho-3	Lopho-5
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+	--	--
<i>E. coli</i>	+++	+	--	--
<i>K. pneumoniae</i>	+++	--	--	--
<i>S. aviatum</i>	+++	+	--	--
<i>M. flavus</i>	+++	+	+++	+++
<i>S. aureus</i>	+++	++	++	+
<i>B. subtilis</i>	+++	++	+++	+++
<i>C. albicans</i>	+++	--	--	--
<i>S. cerevisiae</i>	+++	--	--	--

Donde:

- +++ : presentó actividad el compuesto
- ++ : presentó menor actividad el compuesto
- + : presentó mínima actividad el compuesto
- -- : presentó nula actividad el compuesto

De los cuatro compuestos aislados que presentaron actividad, pinocembrina lo realizó frente a todos los microorganismos, tanto Gram (+), Gram (-) como hongos y levaduras.

La actividad que presentó pinocembrina frente a *C. albicans* se contrapone con los resultados publicados por López *et al.* (2002), siendo muy importante destacar que la siembra en la placa cromatográfica no presenta una concentración definida.

El segundo compuesto aislado galangina presentó una leve actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram (-): *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aviatum*, lo cual se puede deber a que este compuesto presenta una menor lipofilicidad que pinocembrina, ya que posee doble enlace entre C2-C3 y sustituciones en 3, 5 y 7 de hidroxilos (Modak *et al.*, 2002).

Con los microorganismos Gram (+) *M. flavus*, *S. aureus* y *B. subtilis*, galangina presentó actividad relativamente mayor y frente a los hongos *C. albicans* *S. cerevisiae* no presentó ninguna actividad.

Los compuestos Lopho-3 y Lopho-5 presentaron sólo actividad frente a tres de las cuatro cepas de Gram (+) utilizadas en este ensayo *M. flavus*, *S. aureus* y *B. subtilis* y no se pudo observar ninguna otra actividad frente a las otras cepas ensayadas.

En la literatura se ha descrito el efecto de diversos flavonoides sobre *Escherichia coli*, donde la mayor inhibición la presentan las flavanonas, las cuales no presentan doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo C, siendo también mayor el efecto en aquellas moléculas con mayor números de sustituciones de grupos hidroxilos, y sumado a lo anterior la presencia de algún grupo metoxilo el que aumenta la lipofilia del compuesto. La presencia del doble enlace entre C2-C3, produce una disminución en la capacidad de inhibición, posiblemente asociada al aumento de la conjugación en la molécula y la mayor rigidez que a ella le confiere (Modak *et al.*, 2002).

#### **6.2.2.5 Actividad Antimicrobiana CMI y Evaluación Bacteriostático y Bactericida**

Una vez realizado el bioensayo bioautografía se procedió a medir la concentración mínima inhibitoria de tres de los cuatro compuestos activos aislados y su actividad bacteriostática y/o bactericida. Al compuesto denominado Lopho-3 no fue posible determinar esta actividad por no poseer cantidad suficiente para realizar este ensayo, sólo la cantidad necesaria para su identificación.

Tabla 6.20: CMI y Actividad Bacteriostática y Bactericida de Pinocebrina

Cepa	Compuesto	C.M.I. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Actividad Bacteriostática	Actividad Bactericida
<i>S. aureus</i>	pinocembrina	150	150 $\mu\text{g/mL}$	no
<i>B. subtilis</i>	pinocembrina	90	90 $\mu\text{g/mL}$	no
<i>M. flavus</i>	pinocembrina	120	120 $\mu\text{g/mL}$	no
<i>E. coli</i>	pinocembrina	**	**	no
<i>K. pneumoniae</i>	pinocembrina	**	**	no
<i>S. aviatum</i>	pinocembrina	**	**	no
<i>P. aeruginosa</i>	pinocembrina	**	**	no
<i>C. albicans</i>	pinocembrina	120	**	**
<i>S. cerevisiae</i>	pinocembrina	170	**	**

Donde:

- \*\* : no fue posible establecerla, hasta las concentraciones ensayadas.

Este primer compuesto pinocembrina, aunque presentó actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos ensayados mediante el bioensayo bioautografía, no se logró identificar una CMI menor a 300  $\mu\text{g/mL}$  para las bacterias Gram (-) y para *K. pneumoniae*, esto se puede deber a que las concentraciones que se aplican en las placas c.c.f., de los compuestos a ensayar, no presentan una concentración establecida. Es por esto, que en el bioensayo bioautografía la concentración existente en cada placa tiene que haber sido mucho mayor a las ensayadas en la CMI.

La mayor actividad antimicrobiana que obtuvo pinocembrina fue frente a *B. subtilis* a 90  $\mu\text{g/mL}$  y su actividad fue solamente bacteriostática frente a *S. aureus*, *B. subtilis* y *M. flavus*. Los resultados obtenidos sobre la actividad bacteriostática frente al *B. subtilis*, confirma lo descrito por Villanueva *et al.*(1970).

Tabla 6.21: CMI y Actividad Bacteriostática y Bactericida de Galangina

Cepa	Compuesto	C.M.I. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Actividad Bacteriostática	Actividad Bactericida
<i>S. aureus</i>	galangina	140	140 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
<i>B. subtilis</i>	galangina	80	80 $\mu\text{g/mL}$	no
<i>M. flavus</i>	galangina	100	100 $\mu\text{g/mL}$	180 $\mu\text{g/mL}$
<i>E. coli</i>	galangina	no	no	no
<i>K. neumoniae</i>	galangina	no	no	no
<i>S. aviatum</i>	galangina	no	no	no
<i>P. aeruginosa</i>	galangina	no	no	no
<i>C. albicans</i>	galangina	***	***	***
<i>S. cerevisiae</i>	galangina	***	***	***

Donde:

- \*\*\*: no presentó actividad

Galangina presentó mayor actividad al igual que pinocembrina frente a la bacteria Gram (+) *B. subtilis* a 80  $\mu\text{g/mL}$ . Además este segundo compuesto presentó una actividad bacteriostática a su CMI y bactericida a 200  $\mu\text{g/mL}$  con *S. aureus* y 180  $\mu\text{g/mL}$  frente a *M. flavus*.

Tabla 6.22: CMI y Actividad Bacteriostática y Bactericida de Lopho-5

Cepa	Compuesto	C.M.I. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Actividad Bacteriostática	Actividad Bactericida
<i>S. aureus</i>	Lopho-5	***	***	***
<i>B. subtilis</i>	Lopho-5	270	270 $\mu\text{g/mL}$	no
<i>M. flavus</i>	Lopho-5	150	150 $\mu\text{g/mL}$	no
<i>E. coli</i>	Lopho-5	no	no	no
<i>K. neumoniae</i>	Lopho-5	no	no	no
<i>S. aviatum</i>	Lopho-5	no	no	no
<i>P. aeruginosa</i>	Lopho-5	no	no	no
<i>C. albicans</i>	Lopho-5	***	***	***
<i>S. cerevisiae</i>	Lopho-5	***	***	***

Donde:

- \*\*\*: no presentó actividad

En este tercer compuesto ensayado sólo fue posible determinar la CMI de *B. subtilis* y *M. flavus*, ya que frente a *S. aureus* no fue posible establecerla ya que no se detectó efecto inhibitorio a la concentración de 350 µg/mL aunque presentó actividad en el bioensayo bioautografía. Su actividad frente a ambas bacterias fue bacteriostática.

El que los tres compuestos activos aislados de *L. tarapacanus*, presentaran una actividad solamente bacteriostáticas frente a la bacteria Gram (+) *B. subtilis* se puede atribuir a que este bacilo esporula, con lo cual tiene mayor sobrevivencia a condiciones inapropiadas para su desarrollo y reproducción.

Según los resultados obtenidos en la CMI galangina, que posee un doble enlace entre C2-C3, presentó mayor actividad frente a Gram (+) (*S. aureus*, *B. subtilis* y *M. flavus*), que el compuesto pinocembrina, el cual no posee este doble enlace. Según los resultados y la discusión expuesta en Modak *et al.* (2002) referente a la estructura actividad que presentarían los flavonoides frente a la actividad antibacteriana, esto quedaría limitado a las cepas Gram (-), que es el caso de la cepa utilizada por ellos (*Escherichia coli*), ya que según los resultados obtenidos en la presente investigación no existiría concordancia con aquellos resultados.

El bioensayo bioautografía y la CMI realizadas a la flavanona pinocembrina y al flavonol galangina con las nueve cepas anteriormente nombradas, se llevaron a cabo ya que en literatura se observaron resultados con otras cepas y a diferentes concentraciones, así como son Cushnie *et al.* (2003) que utilizó entre otras *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*; Iain *et al.* (2001) que utilizó las cepas mismas cepas anteriormente nombradas. Además se confirmó la actividad antifúngica que han presentado pinocembrina y galangina con otras cepas, como es el caso de lo realizado por Miyakado *et al.* (1976) en quienes trabajaron con hongos del género *Alternaria*; Shain *et al.* (1982) quienes trabajaron con *Populus deltoides*; Hanawa *et al.* (2001) los cuales utilizaron nemátodos de la madera *Bursaphelenchus xylophilus* y Conseil *et al.* (2000) utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* para comprobar actividad de galangina.

Al comparar los resultados de la CMI, frente al fármaco de referencia, obtenidos con los tres compuestos aislados, se puede concluir que aunque presentaron actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, *B. subtilis* y *M. flavus*, ésta es bastante menor, ya que el fármaco de referencia ampicilina frente a *S. aureus* posee una CMI de 5 µg/mL, *B. subtilis* de 10 µg/mL y *M. flavus* de 20 µg/mL.

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

Del proceso de extracción, al que fue sometida *L. tarapacanus* los ERES, EMET e INF fueron los de mayor rendimiento.

Con el screening químico realizado se pudo observar en los extractos de mayor polaridad (INF y EMET) y de polaridad intermedia (EDCM y ERES) la presencia de flavonoides, taninos y cumarinas, y en los extractos de menor polaridad (EHEX) al igual que los de polaridad intermedia (EDCM y ERES) la presencia de terpenos, triterpenos y esteroides.

De los extractos obtenidos, se seleccionó ERES, para continuar su estudio químico, ya que fue el único que presentó actividad antimicrobiana.

De la fracción DCM del exudado resinoso se aislaron 3 compuestos correspondientes a flavonoides, de los cuales dos se encuentran identificados: pinocembrina, galangina y Lopho-3 se encuentra en vías de identificación. De la fracción DCM:MeOH (1:1) del exudado resinoso se aisló un cuarto compuesto que se encuentra en vías de identificación, el cual, se denominó Lopho-5.

Los cuatro compuestos aislados desde *L. tarapacanus*, presentaron actividad antimicrobiana. Esta actividad fue detectada mediante el bioensayo bioautografía y confirmada con la CMI y la determinación de su actividad bacteriostática y/o bactericida, obteniéndose:

- Pinocembrina: *S. aureus* 150 µg/mL, *B. subtilis* 90 µg/mL y *M. flavus* 120 µg/mL.  
En todos los microorganismos presentó actividad bacteriostática.
- Pinocembrina: *C. albicans* 120 µg/mL y *S. cerevisiae* 170 µg/mL.



- Galangina: *S. aureus* 140 µg/mL, *B. subtilis* 80 µg/mL y *M. flavus* 100 µg/mL. Frente a *B. subtilis* presentó actividad bacteriostática y para las otras dos bacterias fue bactericida a 200 µg/mL y 180 µg/mL respectivamente, además de bacteriostática a su CMI.
- Lopho-3: *S. aureus*, *B. subtilis* y *M. flavus* no fueron posibles establecerlas por no poseer cantidades suficientes para ellos.
- Lopho-5: *S. aureus* no fue posible establecerla ya que no se detectó efecto inhibitorio a la concentración de 350 µg/mL; para *B. subtilis* fue de 270 µg/mL y para *M. flavus* fue de 150 µg/mL.

Pinocembrina y galangina presentaron una leve actividad analgésica, de 29% y 11% respectivamente.

Éstos al ser evaluados frente a la actividad antiinflamatoria tópica, con el agente inflamatorio AA pinocembrina presentó un 41,2% de efecto antiinflamatorio y galangina de 49,2% comparado con el resultado considerado con el fármaco de referencia nimesulida (48,2%). Se pudo confirmar que pinocembrina y galangina presentan una relación dosis-efecto con su concentración máxima de 1 mg/oreja y 0,5 mg/oreja, respectivamente.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria tópica frente al agente inflamatorio TPA, también se observó un efecto significativo, ya que galangina presentó un efecto de 90,2% dosis-dependiente, donde su máximo efecto lo alcanzó a 1 mg/oreja.

Con los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria tópica, la baja actividad analgésica y los datos de estructura-actividad que aporta la bibliografía, se podría concluir que el efecto antiinflamatorio para ambos compuestos, no iría por la vía COX.

Referente a la actividad antioxidante se puede concluir que el EMET presentó la mayor capacidad atrapadora de radicales libres, atribuible a los flavonoides existentes en este extracto, visualizados mediante el screening. Con respecto a los compuestos aislados no se obtuvieron resultados importantes, ya que galangina presentó un 59% de decoloración, a una concentración muy elevada (200 µg/mL).

En el ensayo de XO se pudo observar que la fracción DCM del exudado resinoso (FrDCMERES) fue la que presentó la mayor actividad, aunque siendo ésta baja. Y de los compuestos aislados ensayados se pudo verificar que sólo galangina exhibe actividad frente a esta enzima, y así sería posible atribuirle a este compuesto la actividad que presentó el extracto.

Con todo lo anteriormente descrito, se podrían en parte respaldar las propiedades atribuidas por la medicina folclórica a *Lophopappus tarapacanus*, como son los dolores en la lastimadura del ganado.

## CAPÍTULO VIII

### BIBLIOGRAFIA

#### 8.1 Referencias Bibliográficas

- AMIÉ D., Davidovié-Amié D., Beslo D. And Trinijstić N., Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, Croatica Chemica Acta, 76(1): 55-61, 2003.
- BELMONTE, E., Flora del Parque Nacional Lauca, Proyecto (ED/99/032) Flora del Parque Nacional Lauca, Financia Explora-Conicyt y Universidad de Tarapacá, 1999.
- BENAVENTE-GARCÍA O., Castillo J., Marin F., Ortuño A. and Del Río J., Uses and properties of *Citrus* flavonoids, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(12): 4505-4515, 1997.
- BURDA S. and Oleszek W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6): 2774-2779, 2001.
- CABRERA A., Flora de la provincia de Jujuy, República de Argentina, Parte 10, Compositae. Colección científica del INTA. Buenos Aires., 588 – 590, 1978.
- CANEPA C., Estudio Fitoquímico de *Escallonia illinita* Presl., Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Asignatura de Fitoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 1988.
- CARDENAL L., Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas, Salvat Editores S.A., Sexta Edición, Barcelona, España, 1958.
- CASTRO M., Villagrán C. y Kalin M.T.A., Estudio etnobotánico en la precordillera y altiplano de los Andes de Arica (18-19°S). En Veloso A., y Bustos E., (Eds.). El ambiente natural y las poblaciones humanas de los Andes del norte grande de Chile (Arica, Lat. 18°-28°S). Volumen de síntesis-Proyecto MAB-6-UNEP-UNESCO N°1105-77-01. vol.2. Santiago, Chile, 133 – 205, 1982.
- CONSEIL G., Decottignies A., Jault J., Comte G., Barron D., Goffeau A. and Di Pietro A., Prenyl-Flavonoids as Potent Inhibitors of the Pdr5p Multidrug ABC Transporter from *Saccharomyces cerevisiae*, Biochemistry, 39: 6910-6917, 2000.

- Consejo de organizaciones internacionales en ciencias médicas, Normas internacionales en investigación biomédicas que involucra el uso de animales, Boletín oficina Sanitaria Panamericana, 108 (5-6): 637-641, 1986.
- COS P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J. and Vander Bergehe D., Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers, J.Nat.Prod., 61:71 – 76, 1998.
- CUSHNIE T.P., Hamilton V.E. and Lamb A.J., Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports, Microbiol Res., 158(4): 281-289, 2003.
- DELPORTE C., Muñoz O., Rojas J., Ferrándiz M., Payá M., Erazo S., Negrete R., Maldonado S., San Feliciano A., and Backhouse N., Pharmacotoxicological study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. Z. Naturforsch. 57c: 100-108, 2002.
- DELPORTE C., Backhouse N., Salinas P., San Martín A., Bórquez J., and Loyola A., Pharmacotoxicological study of diterpenoids. Bioorgan. Med. Chem. 11: 1187-1190, 2003.
- DIPAK K.D. and Nilanjana M., Antioxidant Effectiveness in Ischemia-Reperfusion Tissue Injury, Methods in Enzymology, 233: 601- 610, 1994.
- Dr. FONTQUER P., Diccionario de Botánica, Editorial Lobos S.A., Barcelona, España, 1953.
- El Altiplano Ciencia y Conciencia de los Andes. Acta del III Simposio Internacional de estudios altiplánicos: 19 al 21 de Octubre 1993, Arica, Chile, Vicerrectoría académica, Universidad de Chile, 1993.
- ERAZO S., González V., Zaldívar M. and Negrete R., Antibacterial activity of *Psoralea glandulosa*, L. Int. J. Pharmacog 3(1) 1-3, 1997.
- ERAZO S., Zaldívar M., Backhouse N., Delporte C., Belmonte E., Miranda D., Valle T. and Negrete R., Actividad antimicrobiana de *Lophopappus tarapacanus*, especie autóctona chilena. I congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Buenos aires, Argentina 8 al 10 de Mayo de 2002.

- ERAZO S., Negrete R., Zaldívar M., Backhouse N., Delporte C., Silva I., Belmonte E., López-Pérez J.L. and San Feliciano A., Methyl Psilalate: A new antimicrobial metabolite from *Psila boliviensis*. Planta Mad. 68: 66-67, 2002.
- ERAZO S., Zaldívar M., Delporte C., Backhouse N., Tapia P., Belmonte E., Delle Monache F. and Negrete R., Antibacterial diterpenoids from *Fabiana densa* var. *ramulosa*., Planta Med. 68:361-363, 2002.
- ERAZO S., Muñoz O., García M., Lemus I., Backhouse N., Negrete R., San Feliciano A., and Delporte C.; Constituents and biological activities of *Muehlenbeckia hastulata* Z. Naturforsch. 57c:801-804, 2002.
- FAHEY, J.W. and Stephenson, K.K., Pinostrobin from honey Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): a potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes, J. Agr. Food Chem., 50 (25): 7472 – 7476, 2002.
- FARIAS J., Evaluación de las actividades antiinflamatoria tópica y analgésica de *Lophopappus tarapacanus*, Asteraceae, Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2003.
- FAÚNDEZ L. y Macaya J., Presencia de *Lophopappus foliosus* Rusby (Asteraceae) en Chile y antecedentes taxonómicos sobre el género *Lophopappus*. Noticiario mensual Museo Nacional de Historia Natural. , nº 332 , 3-6. 1998.
- GAUTIER E., Apuntes de trabajos prácticos de Farmacognosia, Editorial Universitaria, Santiago, 12 – 13, 1954.
- GOODMAN Gidman A., Hardman J., Limbird L., Molinoff P. Y Ruddon R., Las bases farmacológicas de la terapéutica, Novena edición, Mc Graw-Hill Interamericana, vol.I, 1996.
- HABSAH M., Lajis N.H., Ali A.M., Sukari M.A., Hin Y.Y., Kikusaki H. And Nakatani N., The antioxidative components from *Alpinia nutans*, Pharm. Biol., 41 (1): 7-9, 2003.

- HABTEMARIAM S., Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha in L-929 tumor cell, J.Nat.Prod., 60 (8): 775 – 778, 1997.
- HANAHA F., Yamada T., Nakashima T., Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Phytochemistry, 57 (2): 223 – 228, 2001.
- HARBORNE J.B. y Mabry T.J., The flavonoids advances in Research, London New York, Chapman and Hall Ltd., 1982.
- HOENEISEN M., Silva M., Jakupovic J., Papastergou F. and Peter M.G., Flavanones of *Lophopappus tarapacanus* and triterpenoids of *Pachylaena atriplicifolia*. Phytochemistry, 34(6): 1653, 1993.
- HOLLANDER M. and Wolfe D., Nonparametric Statistical Methods. J. Wiley and Sons, New York, 27-32, 62-70, 1973.
- JUNG J.H., Pummangura S., Chaichantipyuth C., Patarapanich C. And McLaughlin J.L., Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*, Phytochemistry, 29(5): 1667 – 1670, 1990.
- KALCKAR M., Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes, J. Biol. Chem., 167: 429-443, 1947.
- KOMODA Y., Isolation of flavonoids from *Populus nigra* as delta  $\Delta^4$ -3-ketosteroid (5 alpha) reductase inhibitors, Chem. Pharm. Bull., 37(11): 3128-3130, 1989.
- LIU I.X., Durham D.G. and Richards M.E., Vancomycin resistance in enterococci by flavonoids, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53: 129-132, 2001.
- LÓPEZ A., Ming D.S. and Towers G.H.N., Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*, J.Nat.Prod., 65(1): 62-64, 2002.
- LLORET S. and Moreno J.J., Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and edema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. Biochem. Pharmacol. 50(3): 347-353, 1995.
- MABRY T.J., Markham K.R. and Thomas M.B., The systematic identification of flavonoids, Editorial Springer-Verlang, New York, 35, 1970.

- MARTICORENA C. Y Quezada M., Catálogo de la flora vascular de Chile, *Guayana Botánica*, 42: 5-157, 1985.
- MELLA P., Estudio Químico Bioguiado de *Adesmia verrucosa* Meyer, Especie de la Región Altoandina, Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2004.
- MERCK, Reactivos de coloración para cromatografías en capa fina y en papel, Editorial Merck, Darmstadt, Alemania, 1972.
- MIYAKADO M., Kato T., Ohno N. And Mabry T.J., Pinocembrin and (+)- $\beta$ -eudesmol from *Hymenoclea monogyra* and *Baccharis glutinosa*, *Phytochemistry*, 15:846, 1976.
- MODAK B., Arrieta A., Torres R. y Urzúa A., Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: Efecto del tipo de estructura, *Bol.Soc.Chil.Quím.*, 47(1): 19-23, 2002.
- MONTENEGRO S., Biodiversidad y derecho en propiedad. En: Figueroa E., Simonetti J. (Eds.), Globalización y biodiversidad: Oportunidades y desafíos para la sociedad chilena, Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 87-116, 2003.
- MORONEY M-A., Alcaraz M.J., Forder R.A., Carey F. and Houlst J.R.S., Selectivity of neutropil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40: 787-792, 1988.
- NEGRETE R., La vegetación en el Altiplano. En: El altiplano: Ciencia y conciencia en Los Andes. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos. Arica Chile, Octubre 19 al 21, 1993, Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 1997.
- NIJVELDT R., Van Nood E., Van Hoorn D., Boelens P., Van Norren K. and Van Leeuwen P., Flovonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am.J.Clin.Nutr.*, 74(4): 418-425, 2001.

- NORO, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. y Fukushima, S. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and bud of *Daphne genkwa*. Chem. Pharm. Bull., 31(11): 3984-3987, 1983.
- OLIVARES M.B., Toxicidad aguda oral de *Lophopappus tarapacanus*, Asteraceae, Unidad de Investigación, Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2003.
- PIETTA P.G., Flavonoids as antioxidants, J.Nat.Prod., 63(7): 1035-1042, 2000.
- RAHALISON L., Hamburger M., Hostettmann K., Monod M. and Frenk E., A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis, 2, 199-203, 1991.
- RICARDI M. y Marticorena C., Compuestas nuevas o interesantes para Chile. Gayana, Botánica, 11:3-28, 1964.
- ROSSI A., Longo R., Russo A., Borrelli F. and Sautebin L., The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis, Fitoterapia, 73 suppl. 1: S30-S37, 2002.
- RUSSO A., Longo R. and Vanella A., Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin., Fitoterapia, 73 suppl. I 21-29, 2002.
- SALA A., Recio M.C., Schinella G.R., Mánuez S., Giner R.M., Cerdá-Nicolás M. and Ríos J., Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside, Eur.J.Pharmacol., 461(1): 53-61, 2003.
- SANG S., Lapsley K., Jeong W-S., Lachange P., Ho Ch-T. and Rosen R., Antioxidative phenolic compounds isolated from almonds skins (*Prunus amygdalus* Batsch), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(8): 2459-2463, 2002.
- SHAIN L. and Miller J.B., Pinocembrin: an antifungal compound secreted by leaf glands of eastern cottonwood, Phytopathology, 72(7): 877-880, 1982.
- SIESS M.H., Lecler J., Canivernc-Lavier M.C., Rat P. And Suschetet M., Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes, Toxicol.Appl.Pharm., 130(1): 73-78, 1995.

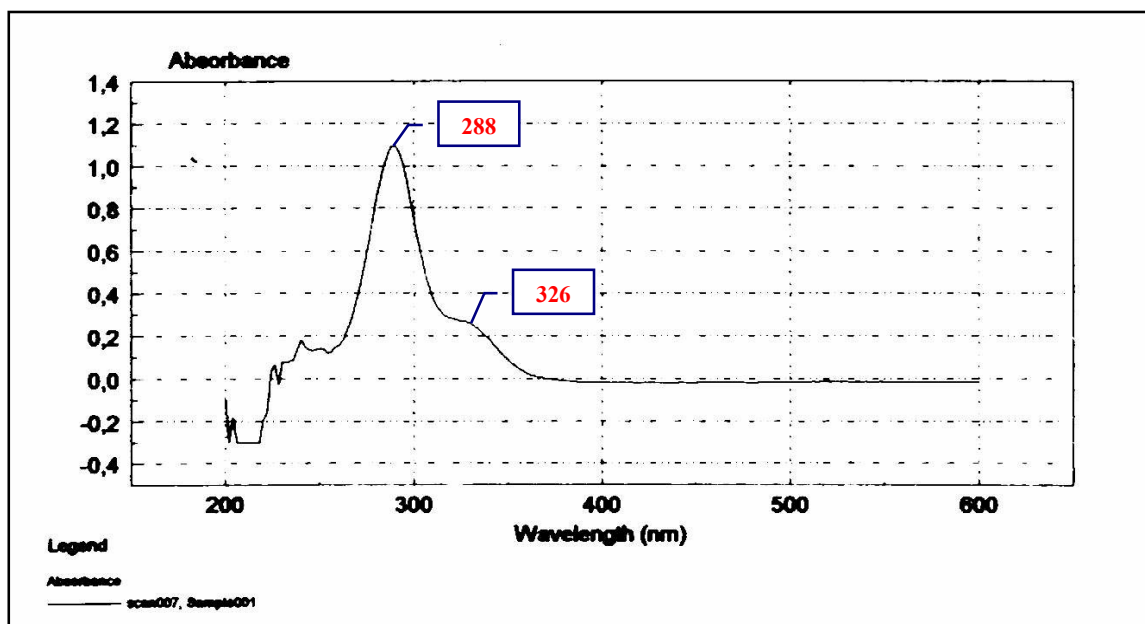


- THEODULOZ, C., Pacheco, P. and Schmeda-Hirschmann, G.. Xanthine oxidase inhibitory activity of chilean Myrtaceae. Journal of ethnopharmacology, 33: 253-255, 1991.
- TRAKOONTIVAKORN G., Nakahara k., Shinmoto H., Takenaka M., Onishi-Kameyama M., Ono H., Yoshida M., Nagata T. And Tsushida T., Structural analysis of a novel antimutagenic compound, 4 hydroxypanduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a Thai spice fingerrot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines, J.Agr.Food Chem., 49(6): 3046-3050, 2001.
- TYLER V.E., Brady L.R. y Robbers J.E., Farmacognosia. Editorial El Ateneo. Segunda edición, Buenos Aires, 75, 1979.
- VILLAGRAN C., Armesto J.J., y Arroyo, Kalin M.T., Vegetation in a high Andean transect between Turi and Cero León in Northern Chile. Vegetation, 48:3 – 16., 1981.
- VILLAGRÁN C., Castro V., Sánchez G., Hinojosa F. y Latorre C., La tradición altiplánica. Estudio etnobotánico en Los Andes de Iquique, 1ª Región, Chile, Chungará, 31(1): 81-186, 1999.
- VILLANUEVA V.R., Barbier M., Gonnet M. and Lavie P., The flavonoids of propolis. Isolation of a new bacteriostatic substance: pinocembrin (dihydroxy-5,7 flavanone), Annales de L'Institut Pasteur, 118(1): 84-87, 1970.
- VITURRO C., Armesto A. and Schmeda-Hirschmann G., Vegetation in a high Andean transect between Turi and Cero León in Northern Chile, Vegetation, 48: 3-16, 1999.
- WAGNER H. and Bladt S., Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Segunda edición, Editorial Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 359-362, 1996.
- WANG H., Nair M., Strasburg G., Booren A. and Gray J., Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(3): 840-844, 1999.

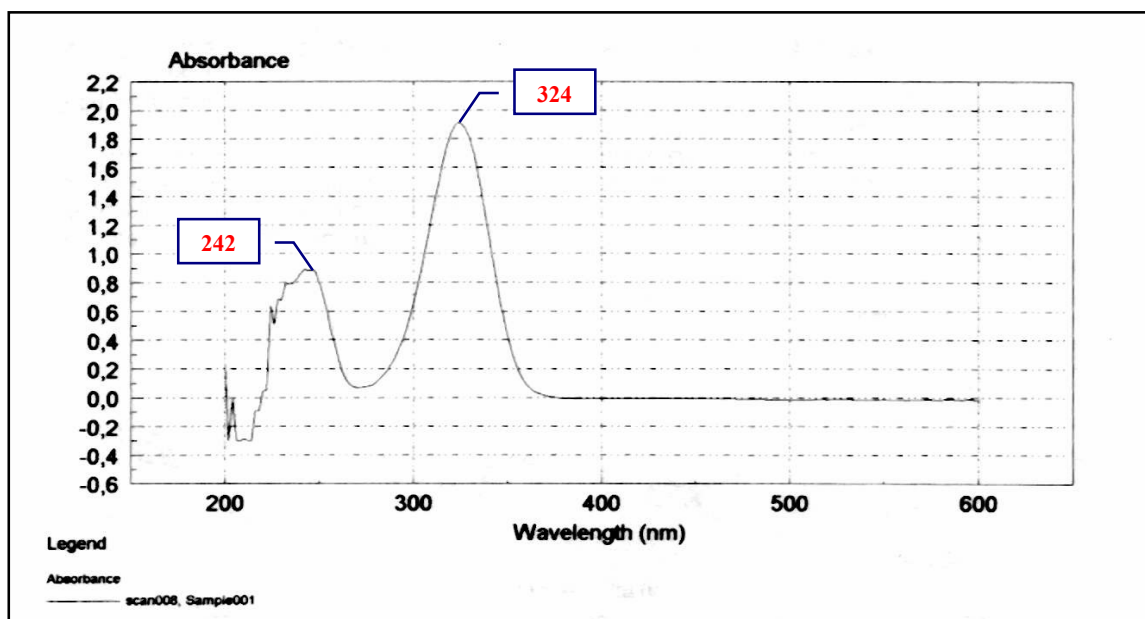
## CAPÍTULO XI ANEXOS

### ANEXO 1: Espectros UV visible

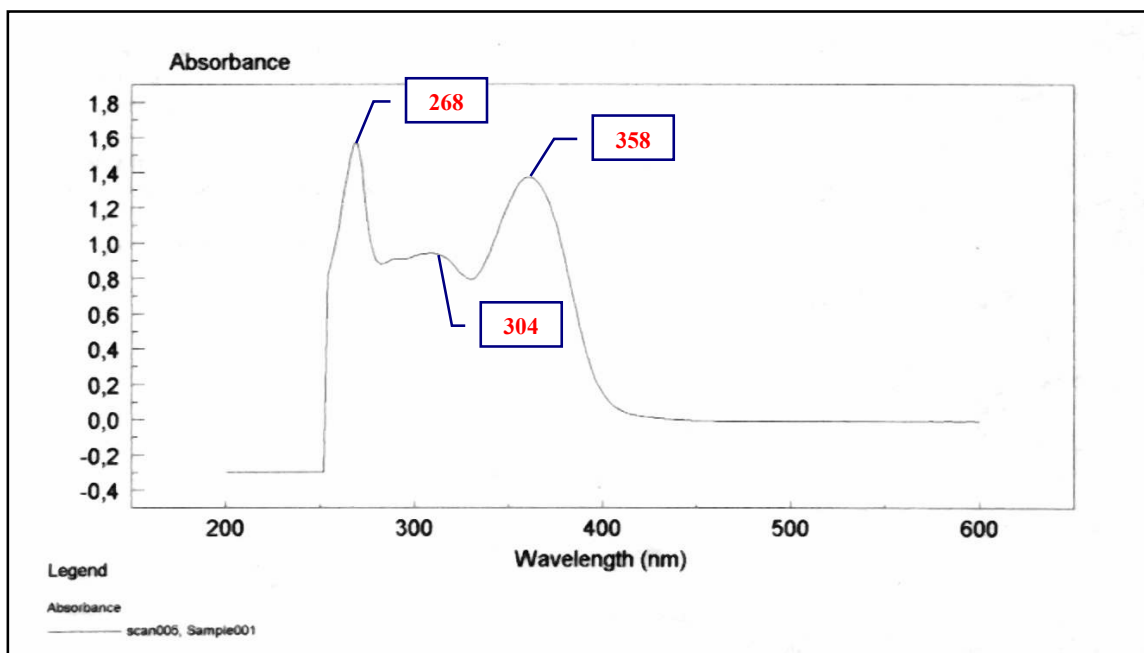
- Lopho-1 (Pinocembrina): Metanol



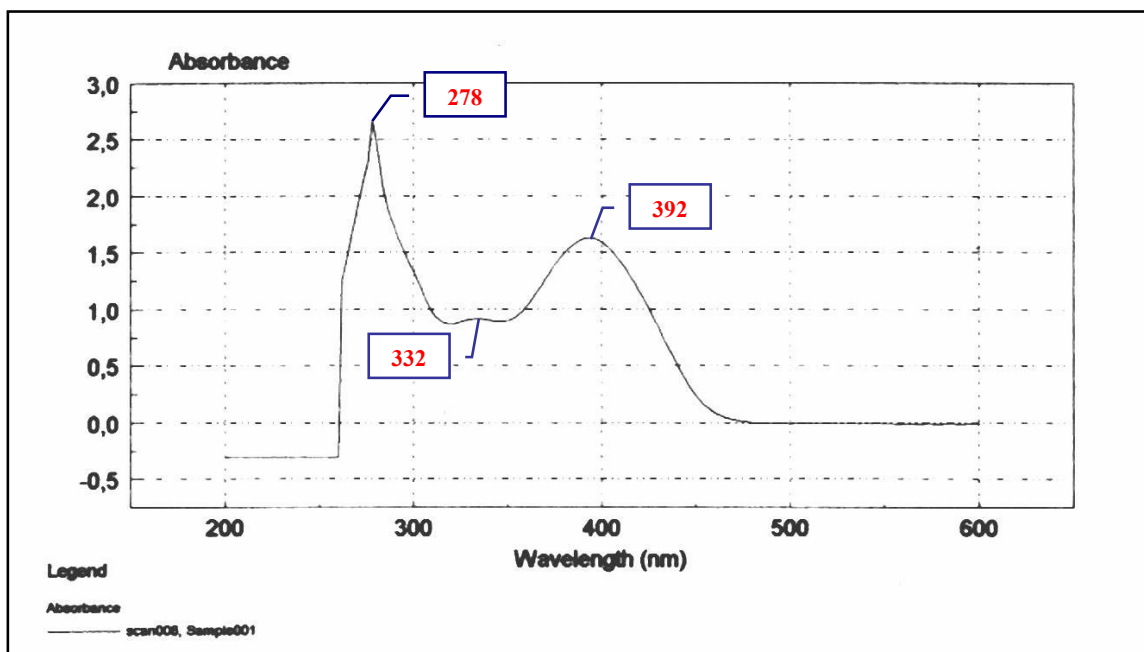
- Lopho-1 (Pinocembrina): Metóxido de sodio (NaOMe)



▪ Lopho-2 (galangina): Metanol

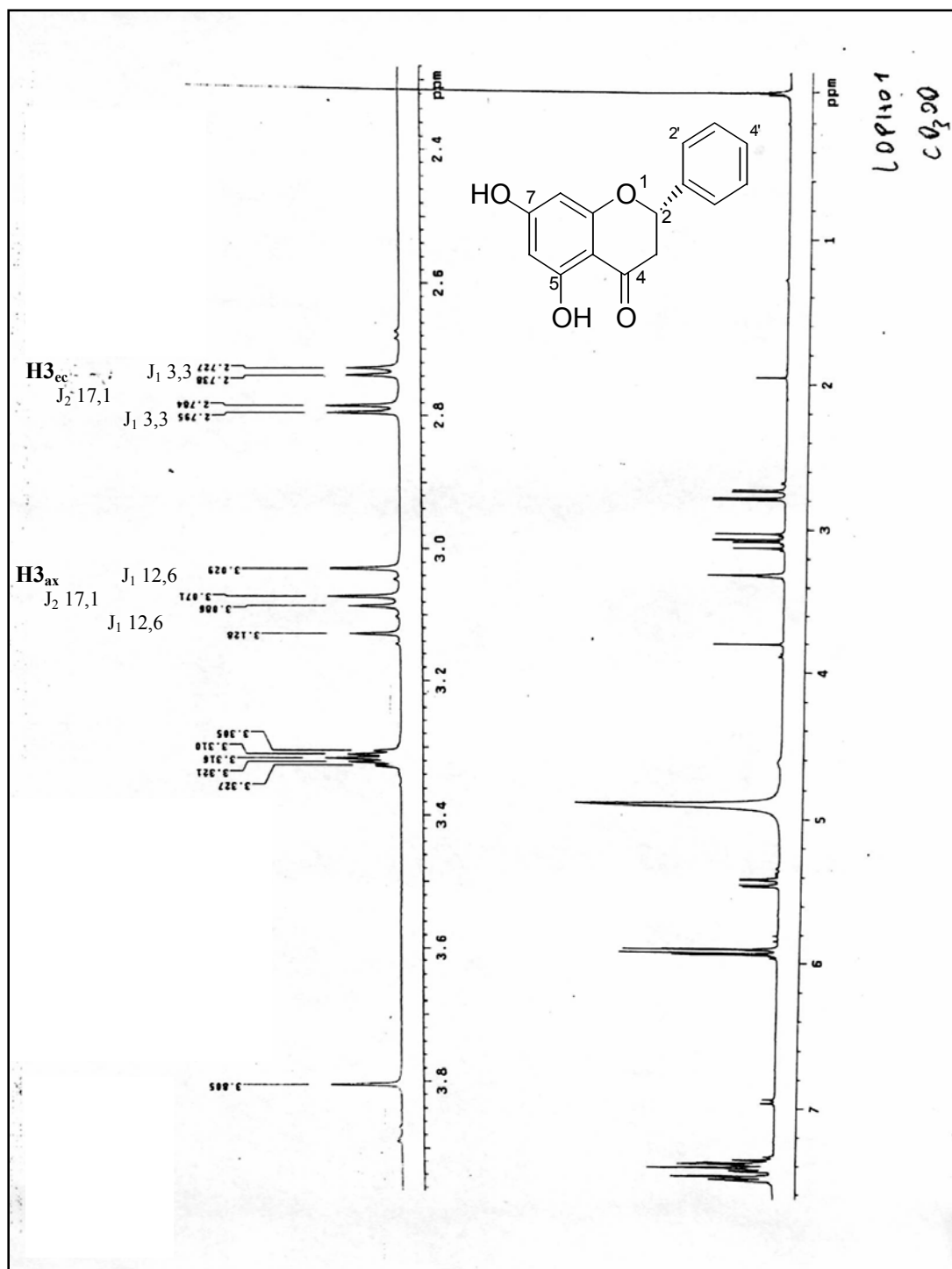


▪ Lopho-2 (galangina): Metóxida de sodio (NaOMe)

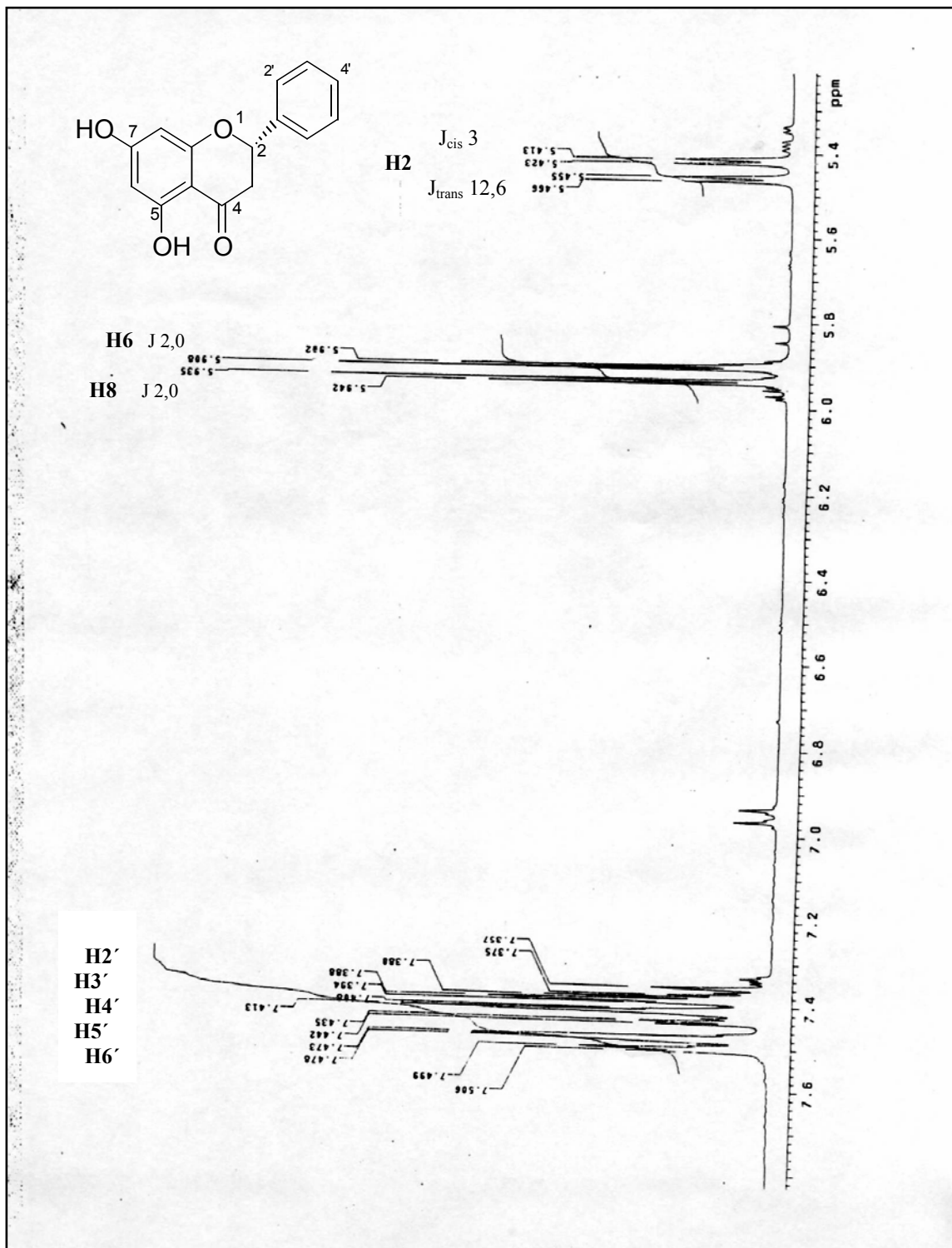


ANEXO 2: Espectros  $^1\text{H}$  RMN

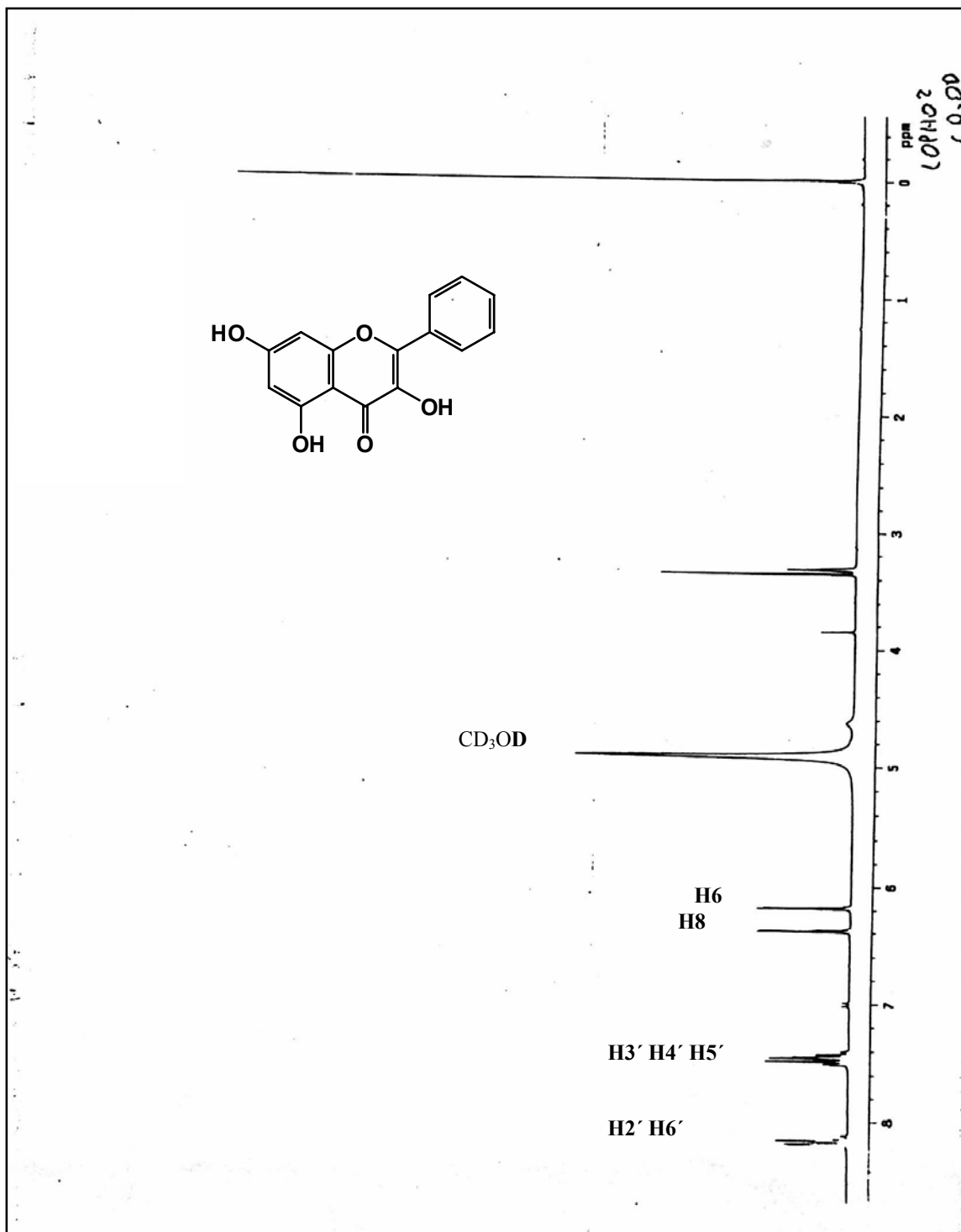
▪ Lopho-1 (pinoembrina)



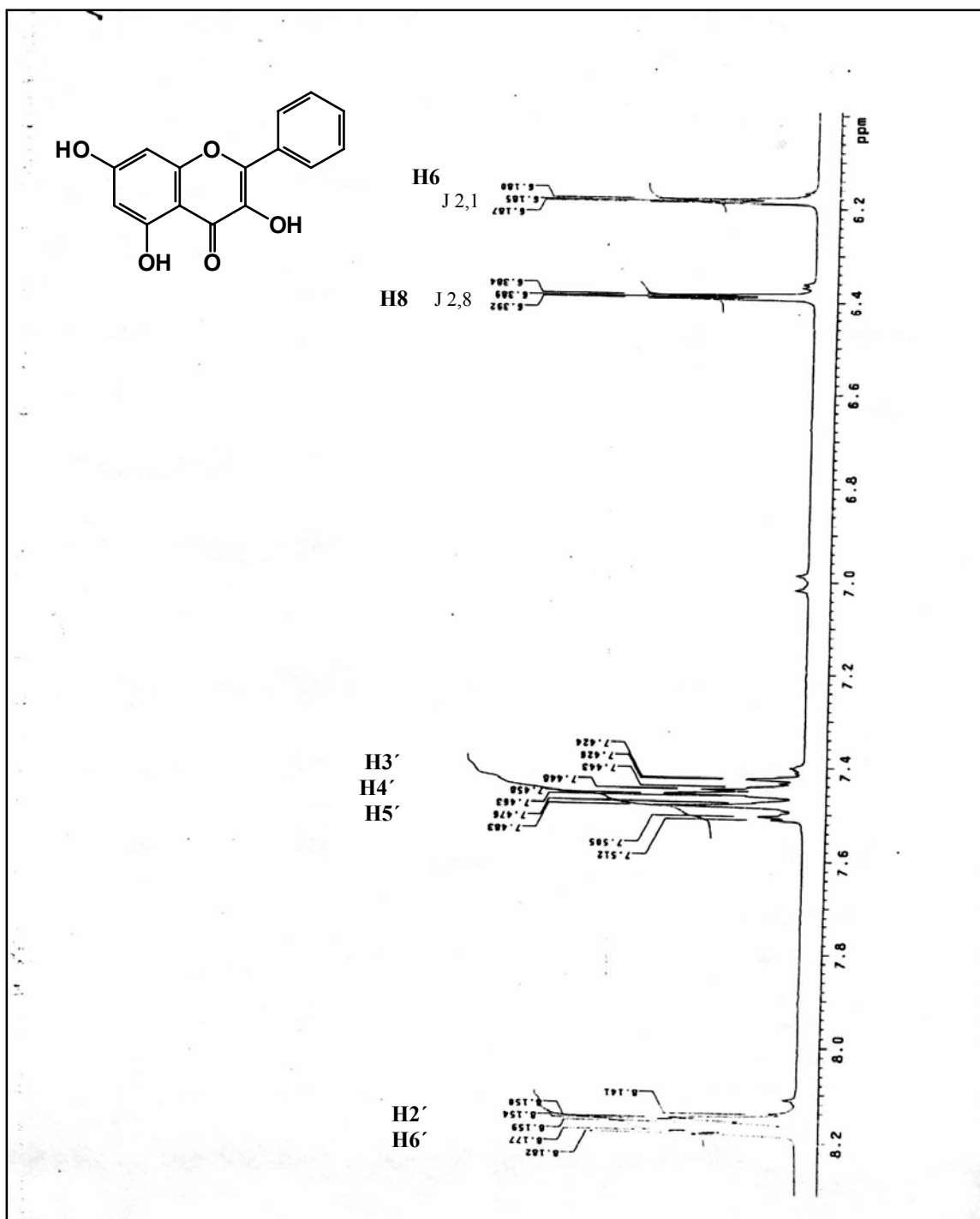
▪ Espectros  $^1\text{H}$  RMN: Lopho-1 (pinocembrina)



- Espectros  $^1\text{H}$  RMN: Lopho-2 (galangina)

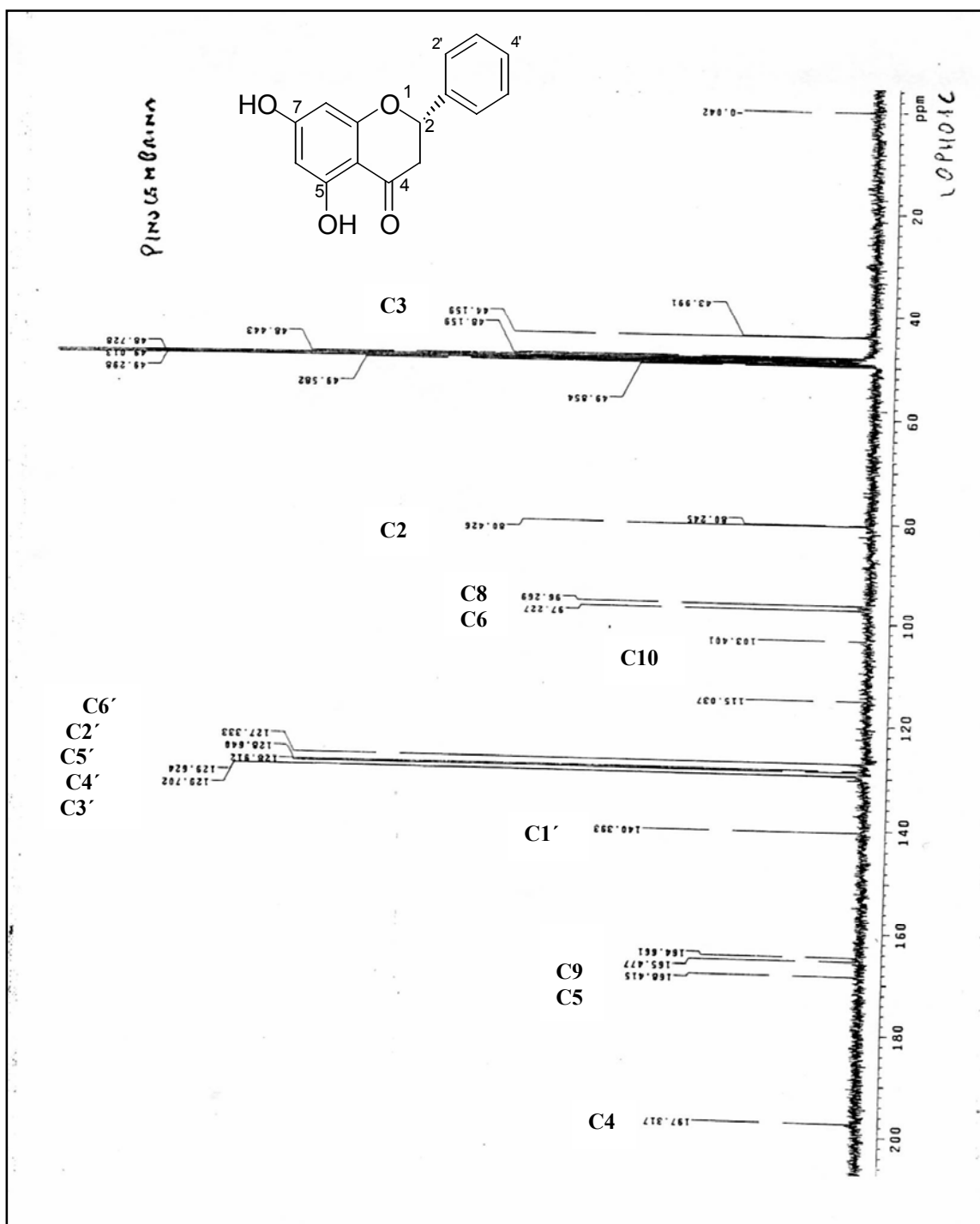


- Espectros  $^1\text{H}$  RMN: Lopho-2 (galangina)



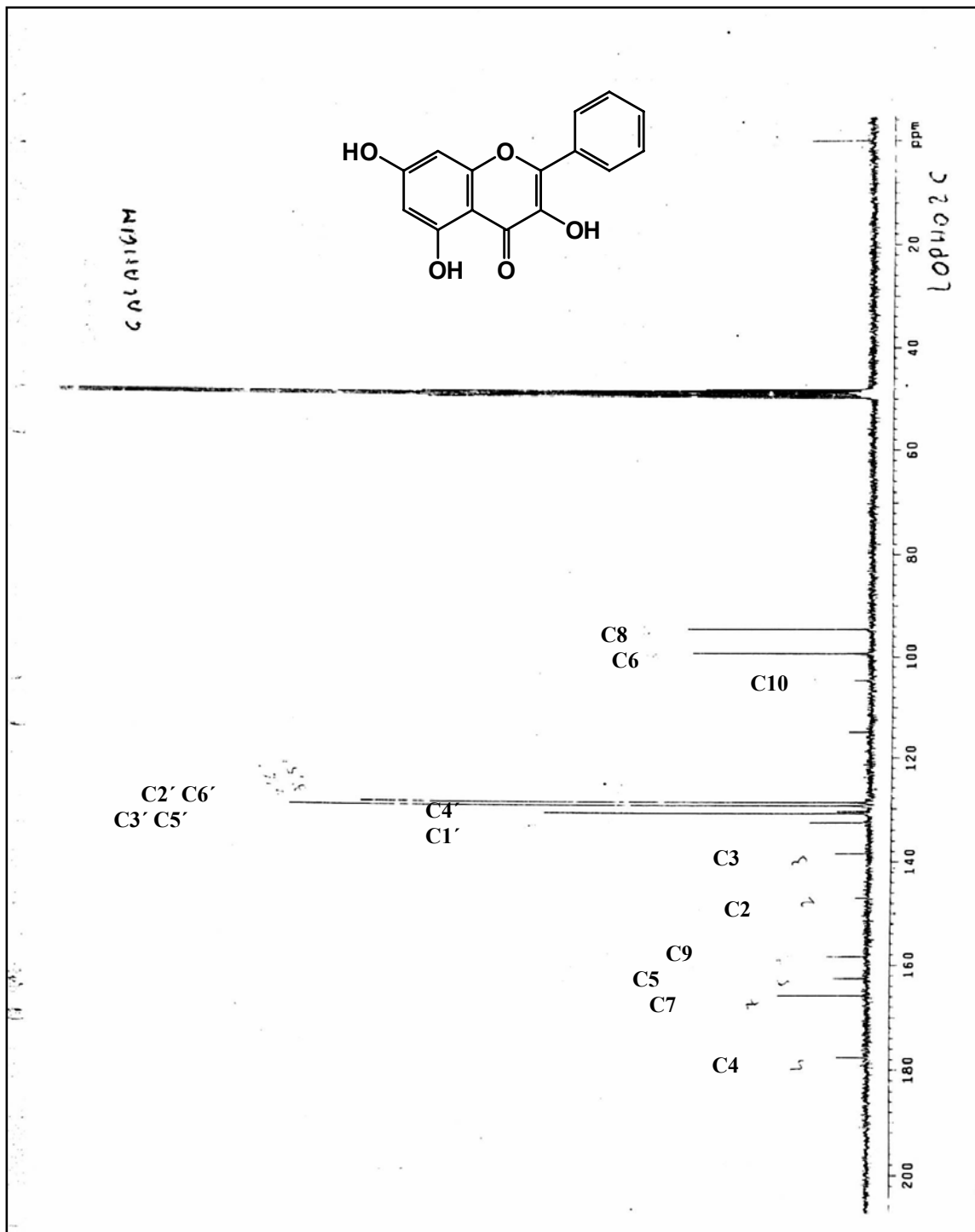
ANEXO 3: Espectros <sup>13</sup>C RMN

▪ Lopho-1 (pinocembrina)

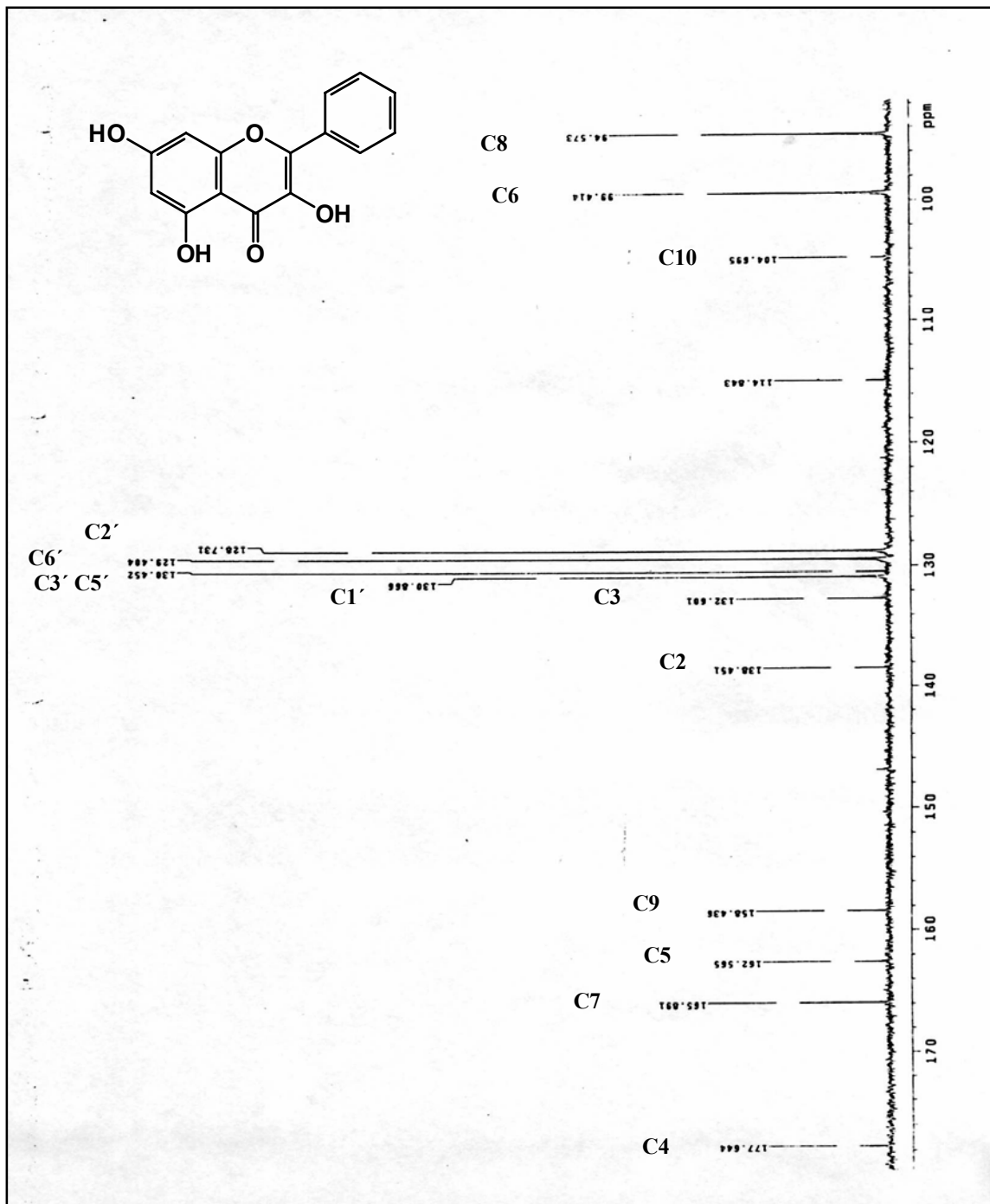




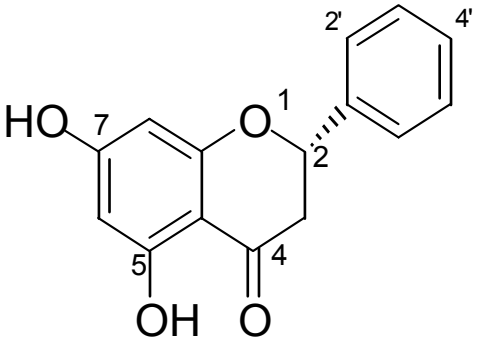
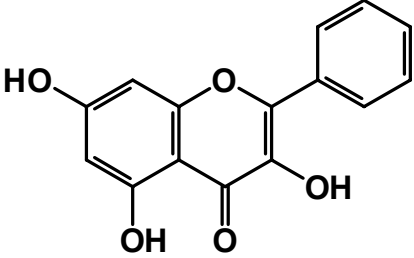
- Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN: Lopho-2 (galangina)



- Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN: Lopho-2 (galangina)

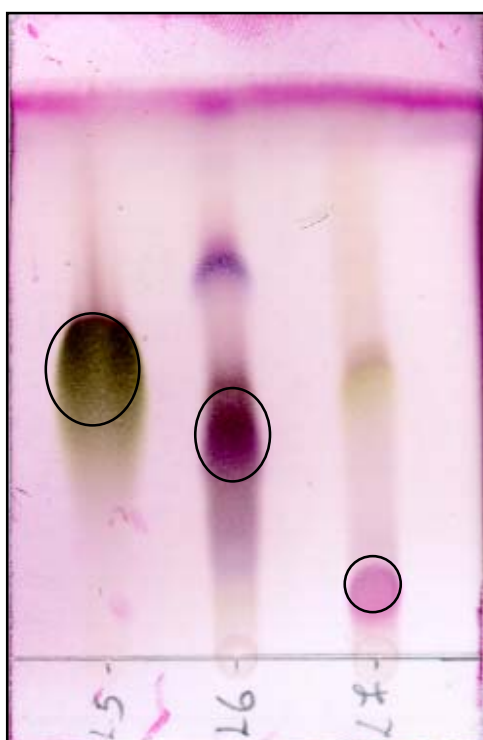
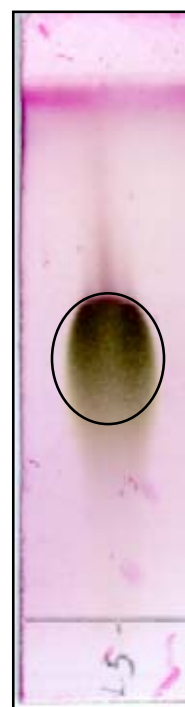


**ANEXO 4:** Estructura molecular, nombre científico y P.M de compuestos aislados.

Nombre Compuesto	Nombre Científico	Estructura Molecular	P.M.
Pinocembrina	5,7-dihidroxi flavanona		255,24
Galangina	3,5,7-trihidroxi flavonol		270,26

**ANEXO 5:** Placas cromatográficas c.c.f..

Compuesto	Color con p-anisaldehído	Rf	Fase Móvil
Lopho-1	Rojo	0,83	DCM:EtAc (9:1)
Lopho-2	Amarillo	0,70	DCM:EtAc (9:1)
Lopho-3	Rojo	0,61	DCM:EtAc (9:1)
Lopho-4	Amarillo	0,18	DCM:EtAc (9:1)
Lopho-5	Verde-pardo	0,5	EtAc 100%
Lopho-6	Morado	0,38	EtAc 100%
Lopho-7	Rosado	0,11	EtAc 100%

**LOPHO-5 LOPHO-6 LOPHO-7****LOPHO-5**



**LOPHO-1**

**LOPHO-2**

**LOPHO-3**

**LOPHO-4**

**ANEXO 6:** Plantillas analgesia y antiinflamación.

ENSAYO ACTIVIDAD ANALGESICA *LOPHOPAPPUS TARAPACANUS*

FECHA: 00/00/00

DOSIS: mg/kg

RATON	MUESTRA		CONTROLES	
	N° CONTORSIONES	% E. analgesicc	RANKING 1	CONTORSION RANKING 2
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
n	0		m	0
Promedio	#iDIV/0!	#iDIV/0!		#iDIV/0!
<b>Mediana</b>	<b># ; NUM!</b>	<b># ; NUM!</b>		<b># ; NUM!</b>
Desv. Std.	#iDIV/0!	#iDIV/0!		#iDIV/0!
Desv. Tip.	#iDIV/0!	#iDIV/0!		#iDIV/0!
W			0	

% E. con promedio	
<b>% E. con mediana</b>	<b># ; NUM!</b>
Mediana Controles	
Mediana Muestra	
<b>% E. final con mediana =</b>	<b>#####</b>

Z = #iDIV/0!

**p = # ; DIV/0!**

$Z = w - [(n*(m+n+1))/2] / \text{RAIZ}[(m*(n*(m+n+1)))/12]$

Plantilla antiinflamación tónica



Inflamación tópica : *Lophopappus tarapacanus*

Dosis: mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 00/00/0000

Ratón	MUESTRA					CONTROLES					Fecha
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	
1			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0000	#iDIV/0!	
2			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0000	#iDIV/0!	
3			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0000	#iDIV/0!	
4			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0000	#iDIV/0!	
5			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0000	#iDIV/0!	
6			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0000	#iDIV/0!	
7			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0,0093	#iDIV/0!	
8			0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!				0	#iDIV/0!	
9									0	#iDIV/0!	
10									0,0000	#iDIV/0!	
11									0,0000	#iDIV/0!	
12									0,0000	#iDIV/0!	
13									0,0000	#iDIV/0!	
14									0,0000	#iDIV/0!	
15									0,0000	#iDIV/0!	
16									0,0000	#iDIV/0!	

n	0	0	0	0	0	0	0	16
promedio	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0,0006
<b>mediana</b>	<b>#iNUM!</b>	<b>#iNUM!</b>	<b>0,0000</b>	<b>#iDIV/0!</b>	<b>#iDIV/0!</b>	<b>#iDIV/0!</b>	<b>#iNUM!</b>	<b>0,0000</b>
Desv. Std	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0,0000	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0,0023
Error Std	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	<b>#iDIV/0!</b>	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0,0006

0,0

% E con promedio	100,0
% E CON MEDIANA	#iDIV/0!
mediana de controles	
mediana de muestra	
<b>% E FINAL CON MEDIANA</b>	<b>#iDIV/0!</b>

z = #iDIV/0!  
p =

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$



**ANEXO 7:** Plantilla xantina oxidasa.

**Ensayo Xantina Oxidasa: *Lophopappus tarapacanus***

conc.: ug/mL

conc.por tubo: ug/mL

MUESTRA									
	C/D	%	ranking	ranking	C"/D"	%	ranking	ranking	
mediciones	Absorb	efecto	parcial	total	Absorb	efecto	parcial	total	mediciones
1									
2									
3									
4									
5									
6									
promedio	#iDIV/0!				#iDIV/0!				promedio

w

w"

Ranking total **0,0**

prom final con **#iDIV/0!**

prom final con **#iDIV/0!**

prom final mu **#iDIV/0!**

prom final mu **#iDIV/0!**

prom final con **#iDIV/0!**

prom final mu **#iDIV/0!**

Desviación Estandar **#iDIV/0!** **#iDIV/0!**

**#iDIV/0!** **#iDIV/0!**

% Inhibición:  $(Aa - Ab) - (Ac - Ad) / (Aa - Ab) * 100$

% Inhibición: **#iDIV/0!**

% Inhibición":  $(Aa - Ab) - (Ac - Ad) / (Aa - Ab) * 100$

% Inhibición": **#iDIV/0!**

promedio

desv std

% Inhibición final:  $(Aa - Ab) - (Ac - Ad) / (Aa - Ab) * 100$

% Inhib final: **#iDIV/0!**

N **6**

n **6**

m **0**

Z **#iDIV/0!**

Z" **#iDIV/0!**

P **#iDIV/0!**

P" **#iDIV/0!**

Z final	
P final	

Fecha: 00/00/0000

**CONTROLES**

A/B	ranking	ranking	A"/B"	ranking	ranking
Absorb	parcial	total	Absorb	parcial	total
#iDIV/0!			#iDIV/0!		

MUESTRA		CONTROLES
A total	%efecto	Absorb total
		#iDIV/0!

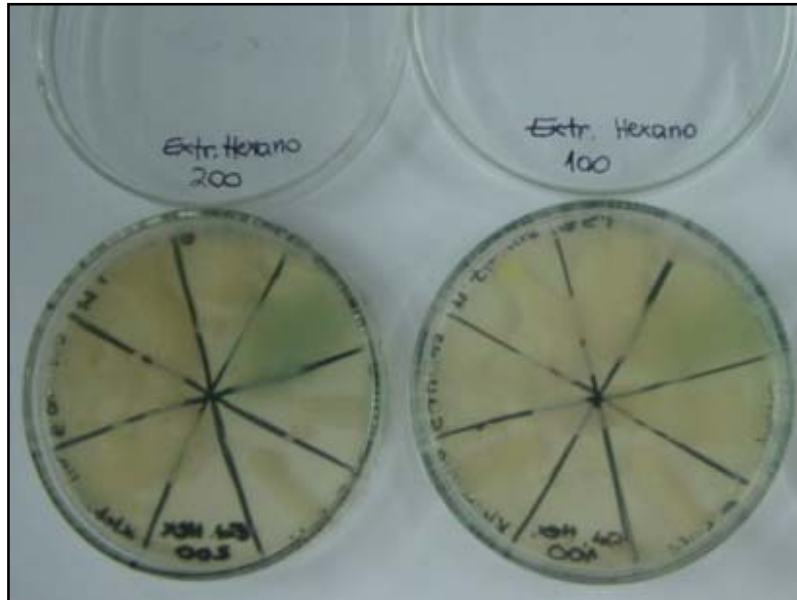
#iDIV/0!

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

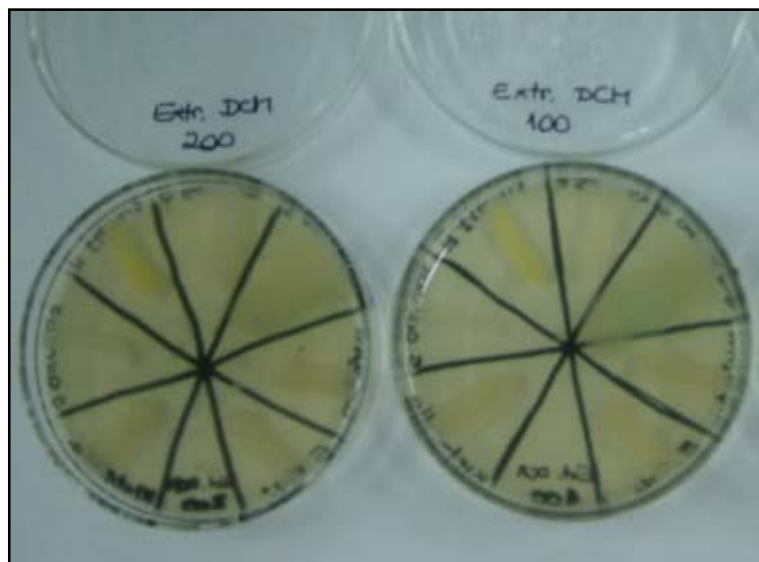
w:sumatoria de los ranking  
n:nº de mediciones muestra  
m:nº mediciones de controles

**ANEXO 8:** Siembra superficial en placas de Petri

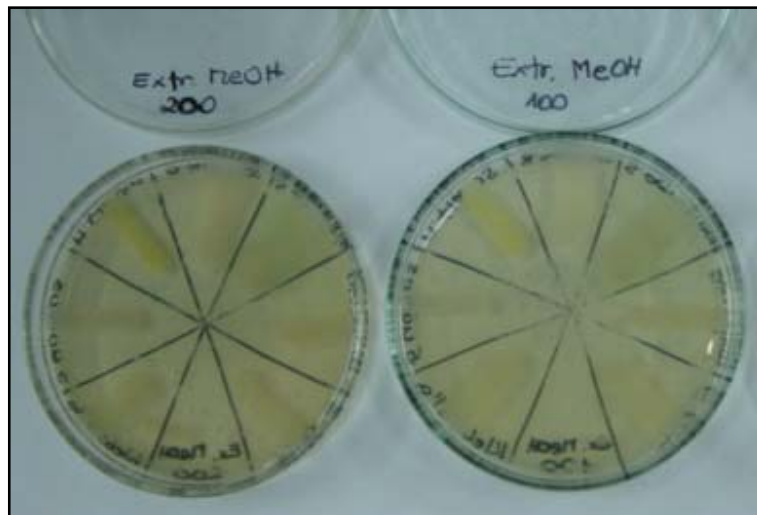
**Extracto Hexánico *L. tarapacanus***



**Extracto Diclorometano *L. tarapacanus***



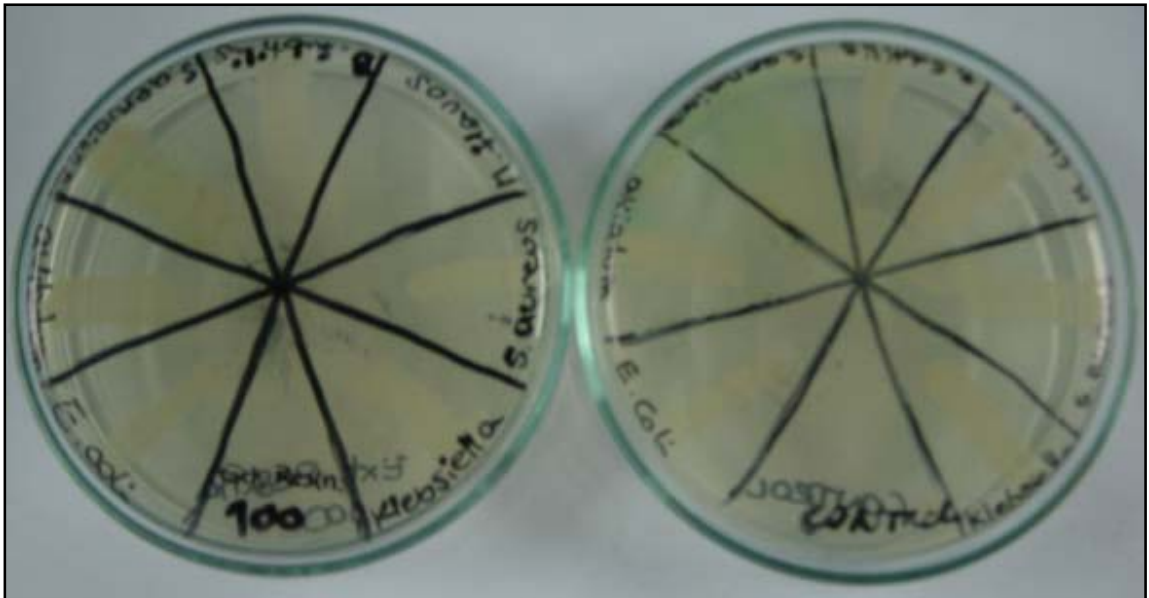
**Extracto Metanólico *L. tarapacanus***



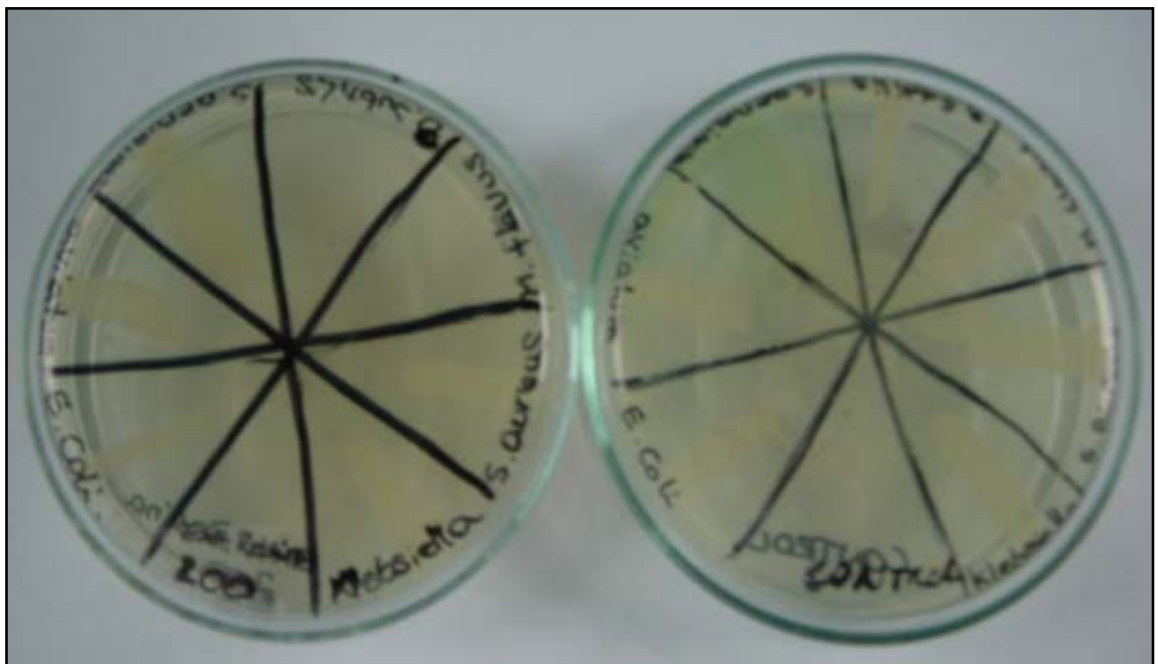
**Exudado Resinoso *L. tarapacanus***



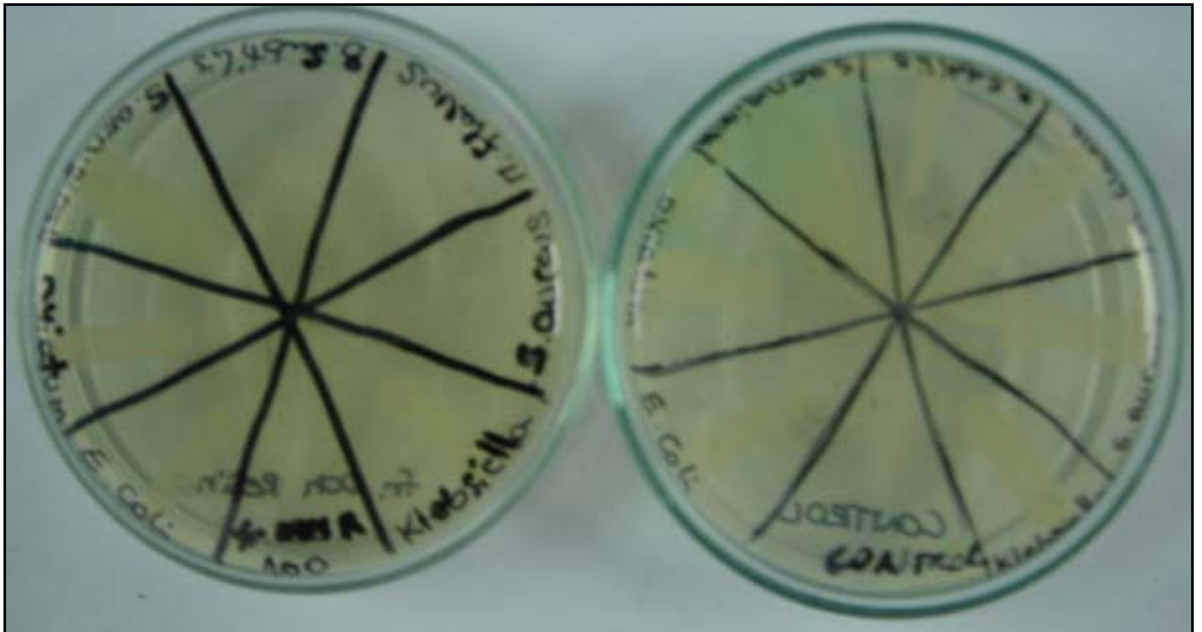
**Exudado Resinoso (100 µg/mL) *L. tarapacanus***



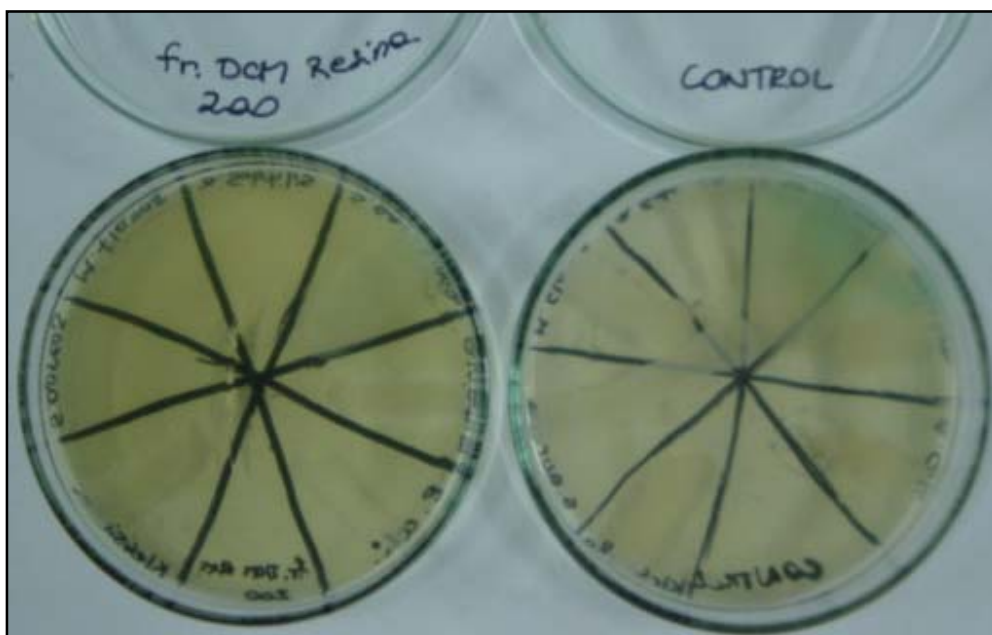
**Exudado Resinoso (200 µg/mL) *L. tarapacanus***



**Fracción DCM del Exudado Resinoso (100 µg/mL) *L. tarapacanus***



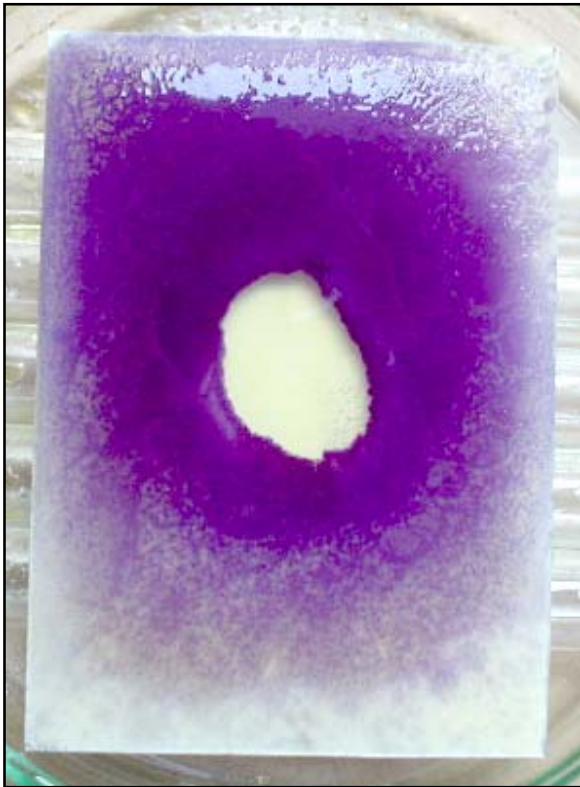
**Fracción DCM del Exudado Resinoso (100 µg/mL) *L. tarapacanus***





**ANEXO 9: Bioensayo bioautografía**

**Lopho-5 (*B. subtilis*)**



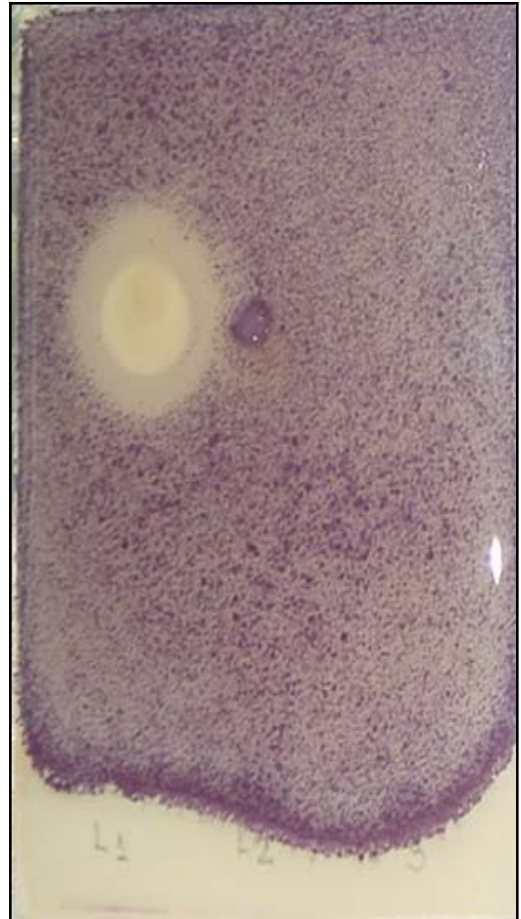
**Lopho-5 (*M. flavus*)**



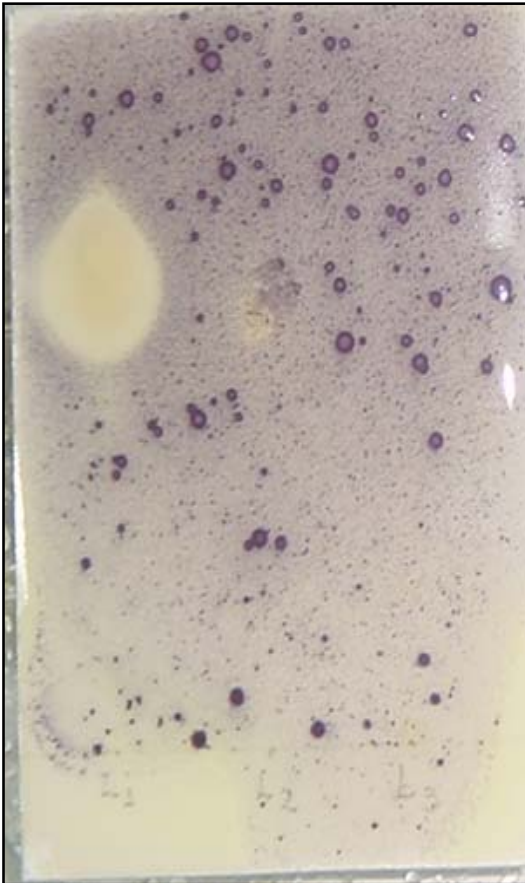
**Lopho-1 y Lopho-2 (*M. flavus*)**



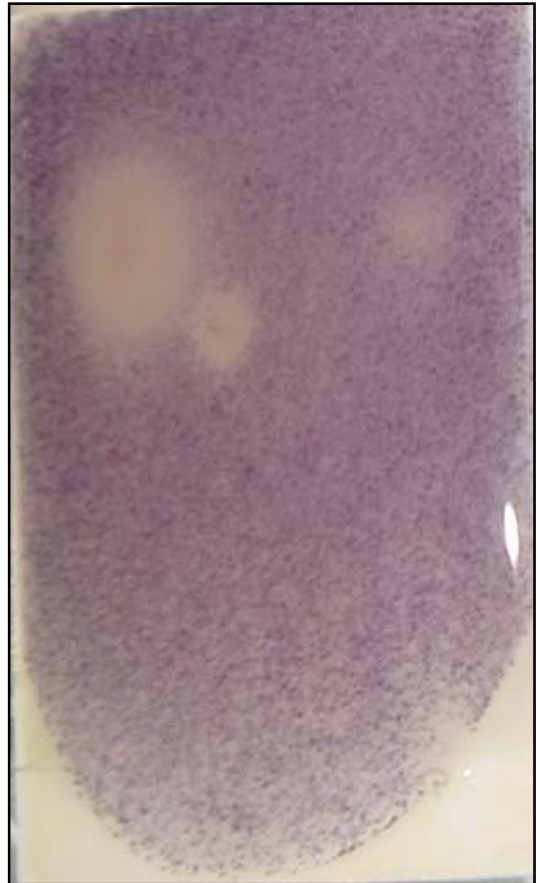
**Lopho-1 y Lopho-2 (*K. neumoniae*)**



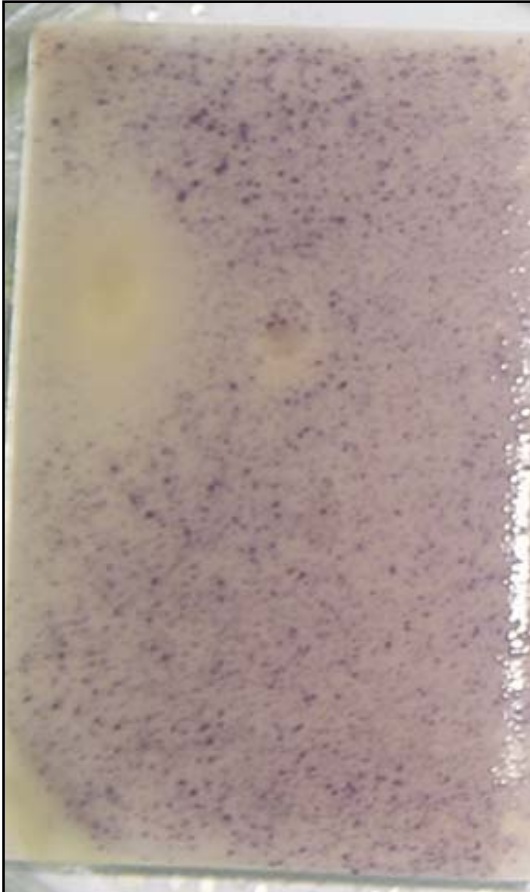
**Lopho-1 y Lopho-2 (*P. aeruginosa*)**



**Lopho-1 y Lopho-2 (*S. aviatum*)**



**Lopho-1 y Lopho-2 (*E. coli*)**



**Lopho-1 y Lopho-2 (*S. aureus*)**



**Lopho-1 y Lopho-2 (*B. subtilis*)**

