

ESCUELA DE POSGRADO-FACULTAD DE CIENCIAS- UNIVERSIDAD DE  
CHILE



**“Uso de la ameba *Dictyostelium discoideum* para  
la búsqueda de moléculas antimicrobianas contra  
cepas virulentas y/o multiresistentes de  
*Klebsiella pneumoniae*”**

**Tesis**  
entregada a la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requerimientos  
para optar al Grado de

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Por

**Marcos Joel Hernández Peña**

Director de Tesis:  
Dr. Francisco P. Chávez Espinosa

Co-Director de Tesis:  
Dr. Carlos Areche Medina  
Dr. Andrés Esteban Marcoleta Caldera

2019

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

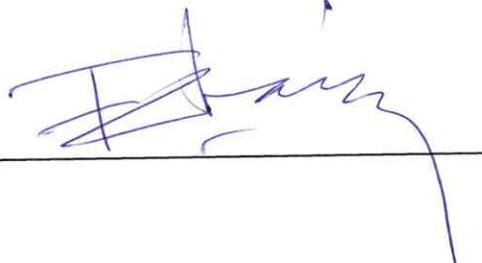
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

**Marcos Joel Hernández Peña**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 06 de Setiembre de 2019.

**Director de Tesis:**

Dr. Francisco P. Chávez Espinosa

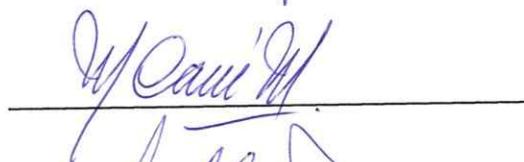


**Co-Director de Tesis**

Dr. Carlos Areche Medina



Dr. Andrés Esteban Marcoleta Caldera



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dra. Margarita Carú Marambio



Dra. Inmaculada Vaca Cerezo



## DEDICATORIA

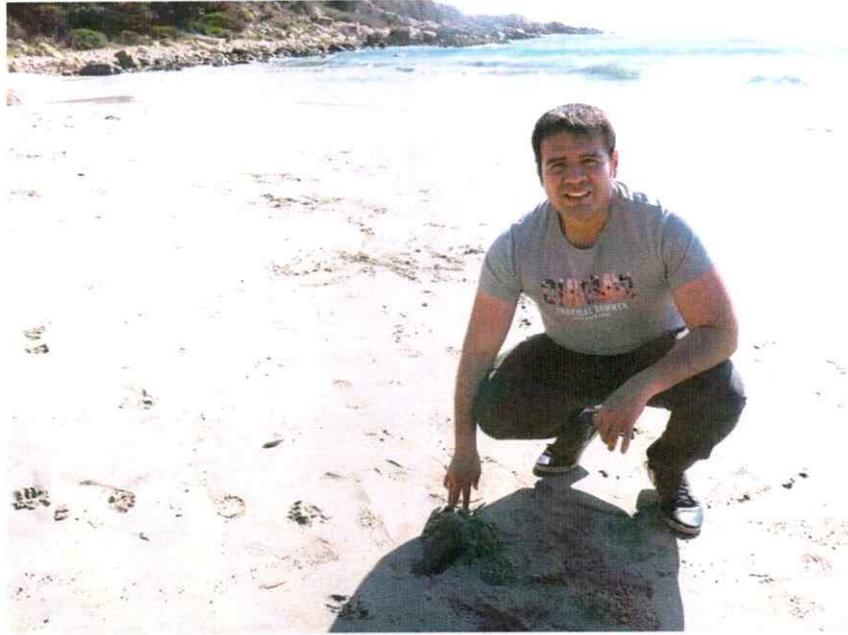
*Dedicado este trabajo a Dios, por haberme dado la vida y darme la oportunidad de alcanzar las metas propuestas en mi formación profesional, guiándome por este camino maravilloso de la ciencia e investigación.*

*A mi familia por el apoyo brindado durante estos años de estudio y por enseñarme que los sueños se logran a base de esfuerzo y dedicación. Por darme una profesión para mi futuro y por creer en mí.*

*Dedico a la memoria a mi estrella, Mariana Alessandra, que siempre está a mi lado guiándome en la vida y agradecerle por hacerme feliz a pesar del corto tiempo en este mundo y ha Sareli por darme el mejor regalo de mi vida.*

*Dedico a la memoria de mi abuelita Andrea y mi tío Armando, que siempre estuvieron conmigo compartiendo bellos momentos en mi vida y enseñarme que la familia siempre está unida apoyándose, venciendo cualquier obstáculo que se presente en el camino.*

## BIOGRAFÍA



*Con el fin de adquirir nuevos conocimientos y crecer profesionalmente como Biólogo y llegar a ser un aporte a mi país; el 2017 decidí postular al programa de becas PRONABEC del estado peruano para poder realizar el Magister en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile; grande fue mi alegría al enterarme que fui seleccionado y que realizaría unos de mis objetivos. Los 2 años de estudio, fueron de gran satisfacción tanto en el ámbito personal y profesional adquiriendo muchas experiencias y conocimientos en el mundo de la biología y fitoquímica; además de conocer la cultura, costumbres, paisajes, etc., del hermano país de Chile.*

*Ahora cierro una etapa importante en mi vida, luego de esfuerzo y dedicación, esto me llena de alegría y orgullo porque sé que será el comienzo de mi historia como científico, porque no hay límites ni barreras que no se puedan romper, solo habrá límites y barreras si dejas de soñar.*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, a mi Director de tesis, Dr. Francisco Chávez Espinosa y Codirectores de tesis, Dr. Andrés Esteban Marcoleta Caldera y Dr. Carlos Areche Medina, por haber confiado en mí, en la elaboración de este proyecto de tesis combinando las áreas de fitoquímica y microbiología, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo. Compartiendo su experiencia profesional han sido mi fuente de motivación y de curiosidad durante estos años.*

*A Liduvina Farfán, por compartir bonitos momentos en esta aventura de realizar el Magíster en Chile, apoyándonos, superando cualquier obstáculo que se presentó en el camino durante estos 2 años de estudio y logrando nuestros objetivos trazados.*

*Mis agradecimientos a la colaboración del equipo del laboratorio de Productos naturales y laboratorio de Microbiología de sistemas, compartiendo experiencias, bellos recuerdos y con los que se ha construido relaciones de amistad, grandes amigos que han sido importante para la elaboración de este proyecto de tesis.*

*Agradecimientos al programa de becas del estado peruano (PRONABEC), por permitirme realizar el Magíster en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile.*

*Muchas gracias a todos.*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> : un problema creciente.....	1
1.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo biológico para el estudio de relación hospedero-patógeno.....	4
1.3 Extractos naturales de la especie vegetal: <i>Helenium aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	7
1.4 Hipótesis .....	9
1.5 Objetivo general .....	9
1.6 Objetivos específicos .....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
2.1 Bacterias utilizadas en el estudio.....	10
2.2 Cepa de <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	10
2.3 Medios de cultivo .....	10
2.3.1 Medios de cultivo para el crecimiento bacteriano .....	10
2.3.2 Medios de cultivo para la ameba <i>Dictyostelium</i> <i>discoideum</i> .....	11
2.4 Ensayo de desarrollo social de la ameba <i>D. discoideum</i> para	

evaluación de la citotoxicidad .....	12
2.5 Ensayo de desarrollo social de la ameba <i>D. discoideum</i> para evaluación de anti-virulencia .....	13
2.6 Evaluación de la actividad antibiótica de los extractos de <i>H. aromaticum</i> contra la cepa virulenta <i>Klebsiella pneumoniae</i> RYC 492. ....	14
2.7 Extractos naturales de la especie <i>H. aromaticum</i> .....	15
2.3.1 Colección del material vegetal .....	15
2.3.1 Preparación de los extractos naturales .....	16
2.8 Identificación de los compuestos mediante UHPLC-ESI-MS/MS de los extractos naturales de <i>H. aromaticum</i> que presentaron actividad antimicrobiana (anti-virulencia) .....	16
2.8.1 Preparación de la muestra .....	17
2.8.2 Instrumento .....	17
2.8.3 Parámetros de CL .....	18
2.8.4 Parámetros de MS .....	18
3. RESULTADOS .....	20
3.1 Preparación de los extractos naturales de la especie <i>H. aromaticum</i> .....	20
3.2 Ensayo de desarrollo social de la ameba <i>D. discoideum</i> para evaluación de la citotoxicidad .....	21
3.3 Ensayo de antibiosis de los extractos de <i>H. aromaticum</i> contra la cepa virulenta de <i>Klebsiella pneumoniae</i> RYC 492 .....	29
3.4 Ensayo de desarrollo social de la ameba <i>D. discoideum</i> para la evaluación de anti-virulencia.....	32
3.5 Identificación de los compuestos mediante UHPLC-ESI-MS/MS de los extractos que presentaron actividad de anti-virulencia.....	41
3.5.1 Compuesto fenólicos .....	41
4. DISCUSIÓN .....	55

4.1	Preparación de extractos naturales para la búsqueda de moléculas anti-virulencia.....	55
4.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo biológico para evaluar citotoxicidad de extractos naturales .....	56
4.3	La estrategia anti-virulencia como reemplazo a la antibiótica para la obtención de nuevos antimicrobianos.....	58
5.	CONCLUSIONES.....	63
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	64
7.	MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	75

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1:</b> Bacterias usadas como modelo .....	10
<b>Tabla 2:</b> Evaluación de antibiosis de los extractos de <i>Helenium aromaticum</i> contra la cepa virulenta <i>K. pneumoniae</i> RYC 492. ....	30
<b>Tabla 3:</b> Identificación de compuestos en el extracto metanólico de raíz por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS. ....	52
<b>Tabla 4:</b> Análisis estadístico del ensayo citotóxico de los extractos diclorometano .....	81
<b>Tabla 5:</b> Análisis estadístico del ensayo citotóxico de los extractos metanólicos .....	82
<b>Tabla 6:</b> Análisis estadístico del ensayo de anti-virulencia de los extractos diclorometano .....	83
<b>Tabla 7:</b> Análisis estadístico del ensayo de anti-virulencia de los extractos metanólicos .....	84

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de la ameba social <i>Dyctiostelium discoideum</i> . ....	5
<b>Figura 2:</b> Ensayo de citotoxicidad mediante el monitoreo del desarrollo social de <i>D. discoideum</i> para la búsqueda de moléculas bioactivas .....	14
<b>Figura 3:</b> Ensayo de antibiosis: A.- Extractos de diclorometano. B.- Extractos de metanol.....	15
<b>Figura 4:</b> Preparación de extractos de las diferentes partes (Flor, tallo-hoja, raíz) de <i>Helenium aromaticum</i> .....	16
<b>Figura 5:</b> Evaluación citotóxica de los extractos diclorometano.....	25
<b>Figura 6:</b> Evaluación citotóxica de los extractos metanólicos.....	28
<b>Figura 7:</b> Ensayo de antibiosis de los extractos de <i>Helenium aromaticum</i> contra la cepa virulenta <i>K. pneumoniae</i> RYC 492.....	31
<b>Figura 8:</b> Protocolo para la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana contra <i>K. pneumoniae</i> que no afecten la viabilidad de la ameba.....	32
<b>Figura 9:</b> Evaluación de anti-virulencia de extractos diclorometano: A) Flor B) Tallo-hojas C) Raíz.....	37
<b>Figura 10:</b> Evaluación de anti-virulencia de extractos de metanol: A) Flor B) Tallo-hojas C) Raíz.....	40
<b>Figura 11:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de ácido cítrico o isocítrico.....	42
<b>Figura 12:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de ácido dihidroxibenzoico pentosido.....	43
<b>Figura 13:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de ácido clorogénico.....	43
<b>Figura 14:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de 6,7- dihidroxicumarina (esculetina).....	44
<b>Figura 15:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de ácido cafeico.....	44

<b>Figura 16:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de ácido cafeico pentósido.....	45
<b>Figura 17:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de vitexina.....	45
<b>Figura 18:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de citisosido.....	46
<b>Figura 19:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de isómero de citisosido.....	47
<b>Figura 20:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de isoramnetina.....	47
<b>Figura 21:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de apigenina.....	48
<b>Figura 22:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de diosmetina (4'-O-metil-luteolina).....	48
<b>Figura 23:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de dimetilquercetina.....	49
<b>Figura 24:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de kaempferol-7-O-glucósido.....	49
<b>Figura 25:</b> Propuesta de ruta de fragmentación de isómero de kaempferol-7-O-glucósido.....	50
<b>Figura 26:</b> Cromatograma de UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS de raíz de <i>H. aromaticum</i> .....	51
<b>Figura 27:</b> Desarrollo gráfico de los ensayos realizados.....	62
<b>Figura 28:</b> Ubicación de la especie <i>H. aromaticum</i> en San Carlos de Apoquindo, Comuna Las Condes, Región metropolitana, Chile.....	75
<b>Figura 29:</b> Espectrometría de masa del extracto metanólico de raíz.....	76
<b>Figura 30:</b> Flujograma de los ensayos en el estudio.....	77
<b>Figura 31:</b> Evaluación de los ensayos de citotoxicidad, antibiosis y anti-virulencia.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

Amp: Ampicilina  
Stp: Estreptomina  
DO 600: Densidad óptica a 600 nanómetros  
g: Gramos  
Gm: Gentamicina  
h: Horas  
Kan: Kanamicina  
L: Litro  
LB: Luria Bertani  
LC: Cromatografía líquida  
Mg: Miligramos  
MS: Espectrometría de masas  
µg: Microgramos  
µL: Microlitros  
rpm: Revoluciones por minuto  
seg: Segundos  
UFC: Unidades formadoras de colonias  
Ka: *Klebsiella aerogenes*  
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia  
DCL: Diclorometano  
MeOH: Metanol  
ESI: Ionización por electropulverización  
m/z: Relación masa/carga  
Hz: Hercio  
T<sub>R</sub>: Tiempo de retención

## RESUMEN

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos es un problema cada vez más relevante en salud pública debido a la aparición de cepas multiresistentes, el desarrollo tardío de los nuevos antimicrobianos efectivos y el aumento de la resistencia de los fenotipos hipervirulentos. Entre estos, el bacilo Gram negativo *Klebsiella pneumoniae* ha sido declarado una amenaza a la salud global, principalmente por el surgimiento y diseminación de cepas multiresistentes e hipervirulentas. El objetivo del presente estudio es la implementación de una plataforma para evaluar la citotoxicidad de extractos naturales y la búsqueda de moléculas que presenten actividad de anti-virulencia. La selección de los extractos debe presentar los siguientes criterios: 1.- No ser citotóxico en ensayos biológicos (*Dyctiostelium discoideum*) 2.- No matar a la bacteria patógena *K. pneumoniae* RYC 492. 3.- Interrumpir la producción de factores de virulencia del patógeno y que no dañen el desarrollo del hospedero.

Los resultados de los extractos de diclorometano de las diferentes partes (flor, tallo-hoja y raíz) de la especie *Helenium aromaticum* fueron citotóxicos contra la ameba, retrasando su desarrollo social comparado con los extractos metanólicos que no resultaron citotóxicos alcanzando la fase de culminación con la formación de cuerpos fructíferos. En la evaluación antimicrobiana de los extractos de diclorometano y metanol no presentaron halos de inhibición contra la cepa patógena *K. pneumoniae* RYC 492, cumpliendo de esta manera uno de los criterios propuesto que el extracto no sea un antibiótico. El extracto metanólico de raíz de la especie *H. aromaticum* fue el que cumplió con los 3 criterios: no ser citotóxico, no ser antibiótico y presentar actividad de anti-virulencia.

A partir del extracto metanólico de raíz se detectaron e identificaron mediante UHPLC-ESI-MS/MS 24 compuestos químicos; siendo en su mayoría 18 compuestos fenólicos (12 flavonoides, 3 ácido hidroxicinámico, 1 ácido fenólico

y 2 ácidos orgánicos), que pueden ser responsables de bloquear algunos factores de virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492.

Estos resultados demuestran la factibilidad del uso de la ameba social *D. discoideum* para la búsqueda de moléculas de anti-virulencia que no posean efectos citotóxicos y el potencial de la planta *H. aromaticum* en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance toward antibiotics is an increasingly relevant problem in public health due to the emergence of multidrug-resistant bacterial strains, the late development of new effective antimicrobials and the increased resistance of hypervirulent phenotypes. Among these, the Gram-negative bacillus *Klebsiella pneumoniae* has been emerged as a threat to global health, mainly due to the emergence and spreading of multiresistant and hypervirulent strains.

The objective of this study is the implementation of a platform to evaluate the cytotoxicity of natural extracts and for the screening of potential molecules with antivirulence activity. The selection of the extracts must meet the following criteria: 1) Innocuous in cytotoxic assays in the biological model (*Dyctiostelium discoideum*) 2) Do not kill the bacterial pathogen *K. pneumoniae* RYC 492. 3) Affect the production of pathogen virulence factors causing no damage the host development.

All dichloromethane extracts of the *Helenium aromaticum* plant (flower, stem-leaf, and root) show cytotoxicity toward the social amoeba, delaying their social development compared to the methanolic extracts that were harmless to the amoeba allowing reach the culmination phase with the formation of fruiting bodies. In the antimicrobial evaluation of dichloromethane and methanol extracts did not show inhibition halos against the pathogenic strain *K. pneumoniae* RYC 492, thus fulfilling one of the proposed criteria that the extract show no antibiotic activity.

In summary, only methanolic root extract of the *H. aromaticum* species met the 3 criteria: innocuous in cytotoxic assays, no antibiotic activity and exhibit antivirulence activity.

From the methanolic root extract, 24 chemical compounds were detected and identified by UHPLC-ESI-MS / MS (12 flavonoids, 3 hydroxycinnamic acids, 1 phenolic acid, and 2 organic acids), which may be responsible for blocking some virulence factors of *K. pneumoniae* RYC 492.

These results demonstrate the feasibility of the use of the social amoeba *D. discoideum* for the search of anti-virulence molecules that do not possess cytotoxic effects and the potential of the *H. aromaticum* plant in the search for new compounds with antimicrobial activity.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Klebsiella pneumoniae*: un problema creciente

Las enterobacterias comprenden universalmente el 50% de las bacterias aisladas encontrados en infecciones adquiridas en los hospitales y 80% de todos las bacterias Gram negativos (Echeverri-Toro *et al.*, 2012). Dentro de esta familia, el segundo género en importancia es *Klebsiella spp.*, siendo *K. pneumoniae* la especie más estudiada y de mayor relevancia clínica (Leal *et al.*, 2006). *K. pneumoniae* es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo inmóvil, oxidasa negativa y catalasa positiva, tiene una cápsula básicamente compuesta por polisacáridos que es un importante determinante de patogenicidad (Cowan, 1999; Sylvain and Grimont, 2006). *K. pneumoniae* desempeña un importante papel como agente causal de enfermedades infecciosas oportunistas. Es la especie de mayor relevancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*, ya que está implicada principalmente en infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas. Los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos y neonatos son especialmente susceptibles (Hoyos *et al.*, 2007; Paterson, 2006; Paterson and Bonomo, 2005; Peña *et al.*, 2001). Adicionalmente, se han producido un número creciente de reportes de infecciones invasivas por *K. pneumoniae*, los cuales derivan en abscesos hepáticos acompañados de infecciones metastáticas en otros tejidos.

La capacidad de *K. pneumoniae* para causar infecciones se debe a una serie de factores implicados en la evasión del sistema inmune y en la invasión tisular. Entre estos factores se encuentran: los antígenos de superficie [polisacárido tisular (CPS) y los liposacáridos (LPS)], las adhesinas (fimbrias o no fimbrias), los sideróforos, la resistencia al suero, la actividad ureasica y la

hipermucoviscosidad (Broberg *et al.*, 2014; Maroncle *et al.*, 2006; Podschun and Ullmann, 1998; Sylvain and Grimont, 2006).

La formación de biopelículas es un factor fundamental para la patogenicidad de *K. pneumoniae* debido a que este desarrollo multicelular les brinda propiedades únicas y les confiere protección contra moléculas bactericidas presentes en tejidos del hospedero, así como mayor protección frente a tratamientos antimicrobianos (Alcántar-Curiel *et al.*, 2013).

Entre los múltiples mecanismos de resistencia a los antibióticos, se destacan en *K. pneumoniae*, la combinación de la presencia de enzimas de la clase  $\beta$ -lactamasa con la pérdida o modificación de porinas, lo que lleva a la disminución y permeabilidad de la membrana externa bacteriana (Hyle *et al.*, 2005; Tafur and Villegas, 2008). Las  $\beta$ -lactamasas son un grupo muy heterogéneo de enzimas de resistencia. Actualmente hay descritas más de 700. Estructuralmente, son proteínas compuestas de hojas  $\beta$  plegadas y  $\alpha$  hélices. Estas enzimas se encuentran en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas (Perez *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción de estas enzimas consiste en hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos, uniéndose a éste mediante un enlace no covalente y adicionando una molécula de agua. Al hidrolizar el anillo, el antibiótico betalactámico pierde sus propiedades y es incapaz de unirse a su sitio blanco, las PBPs (proteínas que unen penicilina). Estas proteínas son esenciales por su actividad de peptidasas en el ensamblaje final del peptidoglicano, componente principal de la pared celular (Perez *et al.*, 2007; Shahraki-Zahedani *et al.*, 2016).

Las cepas de *K. pneumoniae* no capsuladas son significativamente menos virulentas que las cepas encapsuladas isogénicas en modelos de ratón (Paczosa and Meccas, 2016). Por otra parte, las cepas hipervirulentas tienen comúnmente un fenotipo hipermucoviscoso que produce una gruesa cápsula formada por un exopolisacárido mucoviscoso. Notablemente, los tipos de cápsula K1 y K2 son los más asociados con cepas hipervirulentas, y con un

aumento de la resistencia a la fagocitosis y muerte intracelular por los macrófagos y neutrófilos alveolares (Li *et al.*, 2014). Además, aunque *K. pneumoniae* clásicamente se define como un patógeno extracelular, se informó recientemente que un aislado de esta especie podría sobrevivir dentro de los macrófagos en un compartimento vacuolar, mediante la activación de las vías de apoptosis y evitando la degradación de los lisosomas (Cano *et al.*, 2015). Los estudios de la virulencia de *K. pneumoniae* se han realizado clásicamente en modelos de animales tales como ratones, ratas y cerdos (Clegg and Murphy, 2016; Paczosa and Meccas, 2016). Sin embargo, el uso de huéspedes mamíferos está limitado por: (1) la necesidad de instalaciones costosas para su mantenimiento y manipulación, (2) las posibilidades restringidas para el análisis en tiempo real de las infecciones (*in vivo*), (3) la necesidad de adquisición de muestras invasivas, y (4) las restricciones éticas y prácticas. Por tal razón, numerosos investigadores han desarrollado nuevos modelos de hospederos tanto vertebrados como invertebrados. Modelos tales como la polilla de la cera *Galleria mellonella*, el gusano *Caenorhabditis elegans*, la ameba de suelo *Dictyostelium discoideum* y el pez cebra *Danio rerio* han sido exitosamente empleados para el estudio de la patogénesis de especies bacterianas diferentes, así como en la detección de factores de virulencia y ensayo de fármacos antimicrobianos o anti-virulencia (Bozzaro and Eichinger, 2011; Bravotoncio *et al.*, 2016; Glavis-Bloom *et al.*, 2012; Meijer and Spaik, 2011).

Considerando que en el presente trabajo proponemos la utilización de la ameba social *Dictyostelium discoideum* como modelo alternativo nos preguntamos ¿Será posible encontrar moléculas que afecten la virulencia y/o favorezcan la fagocitosis de cepas virulentas de *K. pneumoniae* y que no presente citotoxicidad en la ameba?

## **1.2 *Dictyostelium discoideum*: como modelo biológico para el estudio de la relación hospedero-patógeno**

Los modelos de mamíferos como por ejemplo ratones y conejos, han sido utilizados como hospederos, ya que "imitan" de manera más cercana la situación de un paciente humano infectado. No obstante, estos experimentos son problemáticos en la práctica y acarrear dilemas éticos. En la actualidad, se utilizan nuevos modelos biológicos para el estudio de la virulencia y la fagocitosis. Particularmente por su fácil manipulación y la similitud con los macrófagos humanos, muchos procesos presentes en *Dictyostelium discoideum* como la diferenciación celular, la autofagia, la división celular, la motilidad y la quimiotaxis, la fagocitosis y macropinocitosis, la fototaxis y termotaxis lo hacen un excelente modelo para el estudio celular y molecular de diferentes patologías presentes en humanos. Por ello, en la actualidad, *D. discoideum* es usado por varios grupos de investigación como una herramienta más con la que ampliar el conocimiento sobre diferentes patologías microbianas humanas (Francione *et al.*, 2011).

*Dictyostelium discoideum*, es un organismo unicelular de vida libre, con un pequeño genoma (34Mb), capaz de desarrollarse en una estructura multicelular con el fin de sobrevivir a las condiciones ambientales desfavorables. Su crecimiento óptimo es a 22 °C en condiciones normales en laboratorio. Es una ameba que pasa la mayor parte de su vida en el ciclo vegetativo, dividiéndose periódicamente por mitosis y se alimentan de bacterias y otros microorganismos que habitan en el suelo mediante fagocitosis y se reproduce por fisión binaria de manera rápida en condiciones de laboratorio. Cuando enfrentan una carencia de nutrientes, las células de *D. discoideum* se agregan y sufren un proceso de diferenciación que da origen a un organismo multicelular, que se conoce como ameba social (Chisholm and Firtel, 2004), en el cual las células "hambrientas" producen un químico atrayente: AMPc, que actúa como una señal para inducir el agrupamiento mediante quimiotaxis de aproximadamente  $10^5$  células vecinas formando un agregado multicelular (inicio del ciclo social), luego resulta la

formación de una estructura cada vez más compacta (montículo), la cual origina un montículo con punta que posteriormente se extiende para formar un “dedo”. Este último puede caer para dar origen a una babosa migratoria fototáctica. Cuando el dedo o la babosa y la punta anterior se contraen, se elevan tomando una forma de “sombrero mexicano”, para culminar el ciclo con la formación de un cuerpo fructífero maduro, donde el 20% de las células muere, formando un tallo que eleva la cabeza (soro) que conteniendo el 80% de las células en forma de esporas, para asegurarle un mejor lugar de esporulación y dispersión. Cuando hay nutrientes disponibles nuevamente, las esporas germinan en una ameba vegetativa completando de este modo el ciclo de vida (Chisholm and Firtel, 2004). Todo el proceso, desde la hambruna de las células vegetativas hasta la formación de un cuerpo fructífero maduro, tarda 24 horas en condiciones de laboratorio, se muestran en la **Figura 1**.

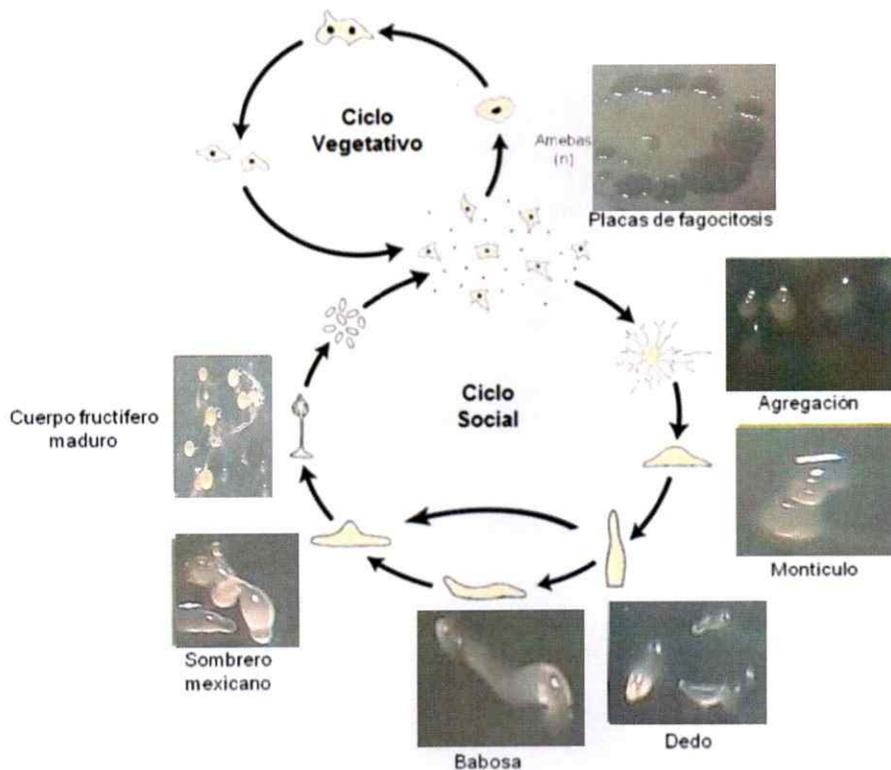


Figura 1: Ciclo de vida de la ameba social *Dyctiostelium discoideum*.

Esta ameba ha sido utilizada durante los últimos años como un hospedero alternativo para estudiar la patogenicidad de diversas bacterias y hongos que causan daño al ser humano (Cosson and Soldati, 2008). Esto se debe a que muchos de los mecanismos moleculares implicados en la fagocitosis protista son altamente conservados en las células fagocíticas de los mamíferos (Escoll *et al.*, 2013). Adicionalmente, los eucariontes unicelulares (como las amebas ambientales) constituyen un reservorio en que diferentes bacterias patógenas pueden desarrollar la infección de hospederos de animales, incluyendo a los seres humanos (Cosson and Soldati, 2008; Riquelme *et al.*, 2016; Varas *et al.*, 2018).

Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la ameba social *D. discoideum* es un modelo robusto y sencillo para evaluar la virulencia de la bacteria patógena *P. aeruginosa* PAO1, lo que permitió la búsqueda de nuevas moléculas que disminuyeron la virulencia bacteriana *in vivo* en este modelo alternativo y que luego pueden ser corroboradas en modelos de mamíferos (Bravo-toncio *et al.*, 2016).

Además, la ameba *D. discoideum* y el pez cebra *D. rerio* han sido utilizados para evaluar diferentes rasgos de la virulencia de *K. pneumoniae* utilizando estos modelos de hospederos donde evaluaron su resistencia a la fagocitosis, la sobrevivencia intracelular, la letalidad, la colonización intestinal. A su vez, la transparencia óptica de estos modelos permitió evaluar la infección *in vivo* y demostró que *K. pneumoniae* RYC 492 es virulenta para ambos modelos (la ameba social y el pez cebra) provocando una respuesta inmune fuerte, también mostró una alta resistencia a la fagocitosis por *D. discoideum* por presentar una mayor capacidad de formar biopelículas y una cápsula más prominente e irregular (Marcoleta *et al.*, 2018). Considerando que el cultivo y manejo de *D. discoideum* en el laboratorio es relativamente sencillo ya que crece a temperatura ambiente y en medios microbiológicos simples y de bajo costo, además que el genoma de esta ameba se encuentra totalmente secuenciado (Eichinger *et al.*, 2005; Sucgang *et al.*, 2011), lo que sumado a su plasticidad

genética ha facilitado la generación de mutantes por delección del hospedero que se asocian al proceso infectivo. Es por estas razones que proponemos en este trabajo evaluar este modelo hospedero para la búsqueda de moléculas que afecten la virulencia y/o favorezcan la fagocitosis de cepas virulentas de *K. pneumoniae* y que no presenten citotoxicidad contra el hospedero.

### **1.3 Extractos naturales de la especie vegetal: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey**

Muchos compuestos derivados de plantas han sido utilizados como medicamentos, ya sea en su forma original o utilizándolos para generar compuestos semisintéticos (Cowan, 1999; Savoia, 2012). Los metabolitos secundarios de las plantas también pueden servir como precursores de drogas, prototipos de medicamentos y sondas farmacológicas (Wallace, 2007). En la actualidad encontramos fármacos a partir de plantas, que ya son medicamentos aprobados por la FDA como por ejemplo taxol, vimblastina, etc. Existen también numerosos extractos de plantas o "fitomedicamentos" en ensayos clínicos para el tratamiento de diversas enfermedades. A lo largo de la historia se han identificado una infinidad de compuestos en las plantas. Particularmente, en la familia Compositae (Asteraceae), representada por 1500 géneros y unas 32000 especies, los compuestos químicos que predominan son fundamentalmente lactonas sesquiterpénicas. Las tribus más ricas en lactonas sesquiterpénicas podemos citar a Heliantheae, Helenieae, Anthemidae y Eupatorieae (Ciccio *et al.*, 1977). La tribu Helenieae pertenece a la familia Asteraceae que está integrada por unos 60 géneros y unas 500 especies de plantas distribuidas principalmente en América (Martínez and Castillo, 2008).

Debido a su rango apreciable de actividades biológicas, incluidas las propiedades antitumorales, es que las lactonas sesquiterpénicas se hacen merecedoras de la atención de la investigación farmacológica.

El género *Helenium* se encuentra distribuido en América del Norte y parte de América del Sur y es sujeto de investigaciones científicas debido a la presencia

de sus lactonas sesquiterpénicas (Joseph-Nathan and Romo, 1963; Sefidkon and Omidbaigi, 2004). La especie *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey se encuentra distribuida en Chile, desde la región de Valparaíso (Aconcagua) hasta Concepción. Es llamada por sus pobladores “manzanilla del campo” y “manzanilla del cerro”. Por su parte, en el Perú, se encuentra distribuida en los departamentos de Ica, Arequipa y Ayacucho, siendo llamada por sus pobladores como “manzanilla macho” (Hernández and C. Mendoza, 2014).

La medicina tradicional, generalmente se refiere a los extractos obtenidos de una fuente natural o al uso directo de una infusión o una planta. Actualmente en la industria farmacéutica moderna no es posible emplear extractos o infusiones debido a que son mezclas complejas. En ellas se encuentra la molécula con actividad biológica deseada pero también un sin número de otros compuestos. Por ello, es que el principio activo, es decir la sustancia química que ataca directamente los síntomas de la enfermedad, debe extraerse del medio natural y purificarse de la mezcla inicial. La extracción de los metabolitos, se realiza generalmente del material vegetal, aislando y purificando los principios activos (empleando generalmente disolventes de tipo orgánico de distinta polaridad como el metanol, etanol, diclorometano, acetato de etilo, etc., donde el metabolito es soluble). Este tipo de disolventes son poco miscibles en el agua por lo que se forman dos fases, una acuosa y otra orgánica (soluble en disolventes orgánicos). El metabolito y algunos otros compuestos al ser más afines al disolvente orgánico pasan de la fase acuosa a ésta, teniendo así una mezcla menos compleja. Sin embargo, esta mezcla se debe separar empleando distintos métodos físicos de separación. Los más recurrentes son la decantación, la centrifugación y distintos tipos de cromatografías (TLC, de columna abierta, de líquidos, etc.). Finalmente, se utilizan técnicas espectroscópicas para elucidar la estructura del principio activo (Hernández and C. Mendoza, 2014).

Considerando que los estudios realizados en la ameba social *D. discoideum* han demostrado que es un buen hospedero en diferentes patógenos,

proponemos evaluar los extractos naturales de *Helenium aromaticum*, que afecten y/o favorezcan la inhibición de los factores de virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492 y que no presenten citotoxicidad contra el hospedero.

#### **1.4 Hipótesis:**

Mediante el uso de *Dictyostelium discoideum* como modelo hospedero planteamos la siguiente hipótesis:

"Extractos naturales de *Helenium aromaticum* poseen actividad antimicrobiana (anti-virulencia) contra cepas virulentas de *K. pneumoniae* sin presentar citotoxicidad contra el hospedero".

#### **1.5 Objetivo general:**

La búsqueda de extractos naturales contra cepas virulentas de *K. pneumoniae* mediante el uso de la ameba *Dictyostelium discoideum*, los cuales no presenten un efecto citotóxico contra este hospedero.

#### **1.6 Objetivo específico:**

- I. Preparación de extractos orgánicos procedentes de diferentes partes de la planta *H. aromaticum*.
- II. Evaluar la citotoxicidad de los extractos de *H. aromaticum* mediante el monitoreo del desarrollo social de *Dictyostelium discoideum*.
- III. Evaluar la actividad antibiótica de los extractos de *H. aromaticum* contra la cepa virulenta *Klebsiella pneumoniae* RYC 492.
- IV. Evaluar la actividad de anti-virulencia de los extractos de *H. aromaticum* mediante el monitoreo del desarrollo social de *D. discoideum*.
- V. Identificación de los compuestos mediante UHPLC-ESI-MS/MS de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana (anti-virulencia) y que no fueron citotóxicos contra el hospedero.

## 2. MATERIALES Y METÓDOS

### 2.1 Bacterias utilizadas en el estudio:

Las cepas que se utilizaron en este estudio se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Bacterias usadas como modelo.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<b>BACTERIANAS O PLÁSMIDOS</b>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RYC492	Produce E492 microcina y sideróforos salmochelin, aislado de heces en España (1976). Resistente a la kanamicina y ampicilina.	Colección de Laboratorio (Asensio <i>et al.</i> , 1976)
<i>Klebsiella aerogenes</i> DBS0305928	Cepa recomendada para apoyar el crecimiento de <i>D. discoideum</i>	Dicty Stock Center(Fey <i>et al.</i> , 2007)

### 2.2 Cepa de *D. discoideum*

La cepa de *D. discoideum* utilizada en este trabajo corresponde a la cepa axénica AX4 (DBS0302402), obtenida por mutagénesis espontánea de la cepa parental AX3 (Basu *et al.*, 2013; Ludwig *et al.*, 2006).

### 2.3 Medios de cultivo

#### 2.3.1 Medios de cultivo para el crecimiento bacteriano

Las bacterias se cultivaron rutinariamente de manera aeróbica en caldo Luria-Bertani (LB) (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) a 37°C con agitación (180 rpm) por 18 horas-cultivo de noche hasta la fase tardía de crecimiento exponencial. El medio fue suplementado con (Kan, 50 µg/mL) para el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* RYC 492.

Para los cultivos en medio sólido, el medio LB se suplementó con agar (15 g/L).

### **2.3.2 Medios de cultivo para la ameba *D. discoideum***

El cultivo de la cepa (AX4) de *D. discoideum* se inició a partir de amebas en estado vegetativo sobre una placa de agar SM (10 g/L de glucosa, 10 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,9 g/L de  $KH_2PO_4$ , 0,6 g/L de  $K_2HPO_4$ , 20 g/L de Bacto agar, pH 6,5) que contenía un césped de *K. aerogenes* (crecida previamente en LB; 37°C, 180 rpm, 18 horas). Las placas se incubaron a 23°C por 2 a 3 días hasta la formación de las placas de fagocitosis (presencia de halos por la fagocitosis de bacterias). Posteriormente se realizó el raspado en la zona clara libre de las bacterias y se depositó en un matraz con medio HL5 (14 g/L de triptona, 7 g/L de extracto de levadura, 0,35 g/L de  $NaHPO_4$ , 1,2 g/L de  $KH_2PO_4$  y 14 g/L de glucosa, pH 6,3) suplementado con ampicilina (Amp) 100 µg/mL y estreptomycin (Stp) 300 µg/mL. Todos los cultivos se realizaron de acuerdo a los procedimientos estándar descritos para *D. discoideum* (Fey *et al.*, 2007). Los cultivos en medio HL5 se mantuvieron con agitación (180 rpm) a 23°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial aproximadamente ( $1-4 \times 10^6$  cél/mL), la cual se calculó mediante tinción con azul de Tripán Gibco® (ThermoFisher Scientific) y posterior conteo en cámara de Neubauer. Luego del primer subcultivo, el medio HL5 fue suplementado sólo con Amp 100 µg/mL y las amebas fueron subcultivadas hasta 6 veces consecutivas (S1-S6), para realizar los experimentos fueron utilizados los subcultivos (S3 al S5).

Para los ensayos de desarrollo social, se utilizaron placas de agar SM que contenían un césped de *K. aerogenes* para la evaluación citotóxica y un césped de *K. pneumoniae* RYC 492 para la evaluación de anti-virulencia de los extractos de *H. aromaticum*.

#### 2.4 Ensayo de desarrollo social de la ameba *D. discoideum* para evaluación de citotoxicidad

Para los ensayos de desarrollo social se utilizaron placas de agar SM que contenían un césped de *K. aerogenes* (incubada previamente a 37°C por 18 horas). Particularmente para la evaluación citotóxica de los diferentes extractos naturales se utilizaron las siguientes cantidades (25 µg, 50 µg y 100 µg), que son las utilizadas para la evaluación citotóxica en líneas celulares (Díaz *et al.*, 2011; Guillen and Hernández, 2016). Para la elaboración de las diluciones se utilizó como disolvente etanol al 20%, que fue utilizado como control negativo.

Brevemente, se utilizó 5 µL de suspensión celular de cultivo axénico de *D. discoideum* en fase exponencial ( $2 \times 10^6$  células/mL) proveniente de subcultivos S3 al S5. El número total de amebas inoculadas fueron 10000 células.

Posteriormente, las placas se incubaron a 23°C y se monitoreó diariamente el desarrollo social de *D. discoideum* durante 6 días (Varas *et al.*, 2018) es decir, en fases del ciclo social como la agregación (1) elevación (2) y culminación (3) alcanzadas en cada punto. Una puntuación de "1" fue asignado cuando amebas agregadas formaron una placa de fagocitosis, "2", cuando a través de todas las estructuras elevadas de superficie así como los gusanos o dedos fueron observados, y '3', cuando se formaron cuerpos fructíferos a través de toda la superficie así las transiciones entre cualquiera de estas tres fases se puntuaron con la mitad del valor correspondiente a la siguiente etapa más cercana (Marcoleta *et al.*, 2018). Los experimentos fueron registrados cada 24 horas durante 6 días. Luego del registro de los datos durante los días mencionados, los resultados obtenidos fueron graficados y analizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA).

## 2.5 Ensayo de desarrollo social de la ameba *D. discoideum* para evaluación de anti-virulencia

Para la evaluación de las propiedades de anti-virulencia de los diferentes extractos naturales se utilizaron las mismas cantidades que fueron utilizadas en la evaluación de citotoxicidad y se utilizó el mismo número de amebas inoculadas, 10 000 células.

A diferencia de los ensayos citotóxicos, para estos ensayos se utilizaron placas de agar SM que contenían un césped de *K. pneumoniae* RYC 492 (incubada previamente a 37°C por 18 horas).

Posteriormente, las placas se incubaron a 23°C y se monitoreó diariamente el desarrollo social de *D. discoideum* durante 6 días (Varas *et al.*, 2018) y las fases alcanzadas siendo clasificados como "agregación", "elevación" y "culminación". Como se observa en la **Figura 2**.

La puntuación asignada durante el desarrollo social de la ameba se basará en los ensayos descritos anteriormente por (Marcoleta *et al.*, 2018). Los experimentos fueron registrados cada 24 horas durante 5 días. Luego del registro de los datos durante los días mencionados, los resultados obtenidos fueron graficados y analizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA).

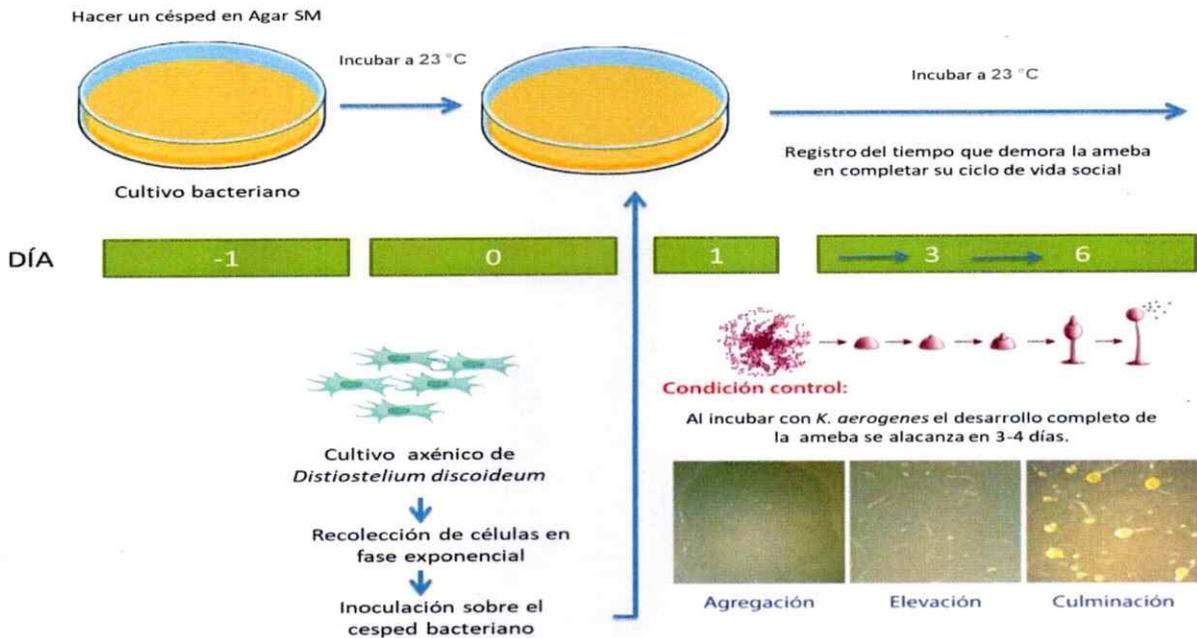


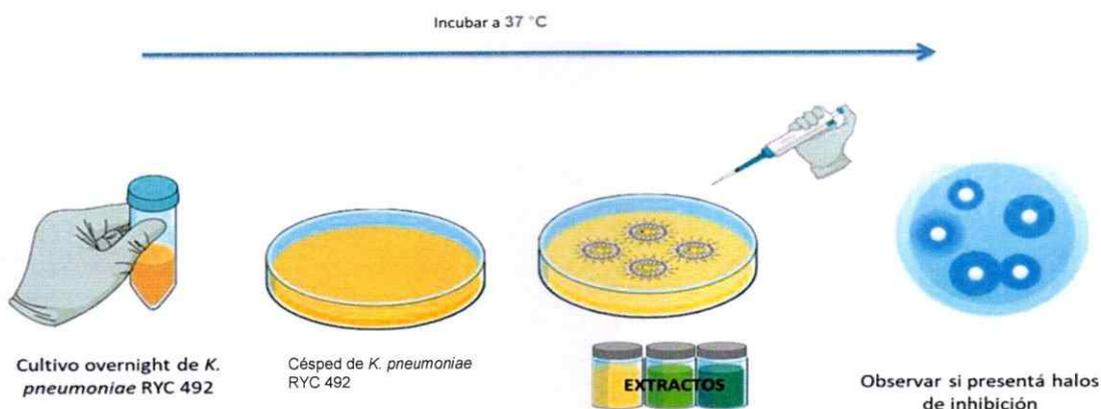
Figura 2: Ensayo de citotoxicidad mediante el monitoreo del desarrollo social de *D. discoideum* para la búsqueda de nuevas moléculas.

## 2.6 Evaluación de la actividad antibiótica de los extractos de *H. aromaticum* contra la cepa virulenta *Klebsiella pneumoniae* RYC 492

La cepa virulenta fue proporcionada por el laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM) de la Universidad de Chile y fue crecida e incubada como se mencionó anteriormente en el punto (5.3.1). Para la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión con discos, donde se agregaron los extractos de las diferentes partes de *H. aromaticum* en diferentes cantidades (25 µg, 50 µg y 100 µg). En la elaboración de las diluciones se utilizó etanol al 20% (disolvente) el mismo que fue utilizado como control negativo y como control positivo se utilizó Gentamicina (GEN 200 µg).

Para la preparación del inóculo se utilizó una turbidez equivalente al tubo N° 5 de Macfarland que tiene aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Finalmente, las placas fueron llevadas a incubar a 37°C por 24 horas.

La evaluación de los resultados se realizó mediante las lecturas del diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm) del crecimiento del microorganismo. El desarrollo de este protocolo se basó en los ensayos descritos por (Hernández and C. Mendoza, 2014), como se muestra en la **Figura 3**.



**Figura 3:** Ensayo de antibiosis de los extractos de *Helenium aromaticum* contra la cepa virulenta *K. pneumoniae* RYC 492.

## 2.7 Extractos naturales de la especie *Helenium aromaticum*

### 2.7.1 Colección del material vegetal

La especie vegetal se recolectó en San Carlos de Apoquindo, Comuna Las Condes, Región metropolitana, Chile; en los meses de Enero – Febrero de 2018 cuyos puntos de georreferencia son: latitud (S): -33,40693, longitud (W): -70,50047. La identificación de esta especie fue realizada por Gloria Rojas Villegas Jefa de Área Botánica y Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de Chile, donde los especímenes fueron procesados y depositados; siendo identificada con el nombre de: *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey con número de voucher 169131.

### 2.7.2 Preparación de los extractos naturales

Inicialmente las muestras fueron secadas en estufa a 37°C, molidas y luego maceradas con diclorometano (DCL) y metanol (MeOH) a temperatura ambiente durante 72 h, (si es requerido el proceso de extracción se completa mediante sonicación directa y centrifugación). Este procedimiento se repitió por 3 veces. El producto de la extracción fue filtrado y concentrado a sequedad mediante rotaevaporador giratorio a 40 °C, para posteriormente ser almacenado a -20°C (Hernández and C. Mendoza, 2014). El protocolo que se utilizó se muestra en la **Figura 4**.

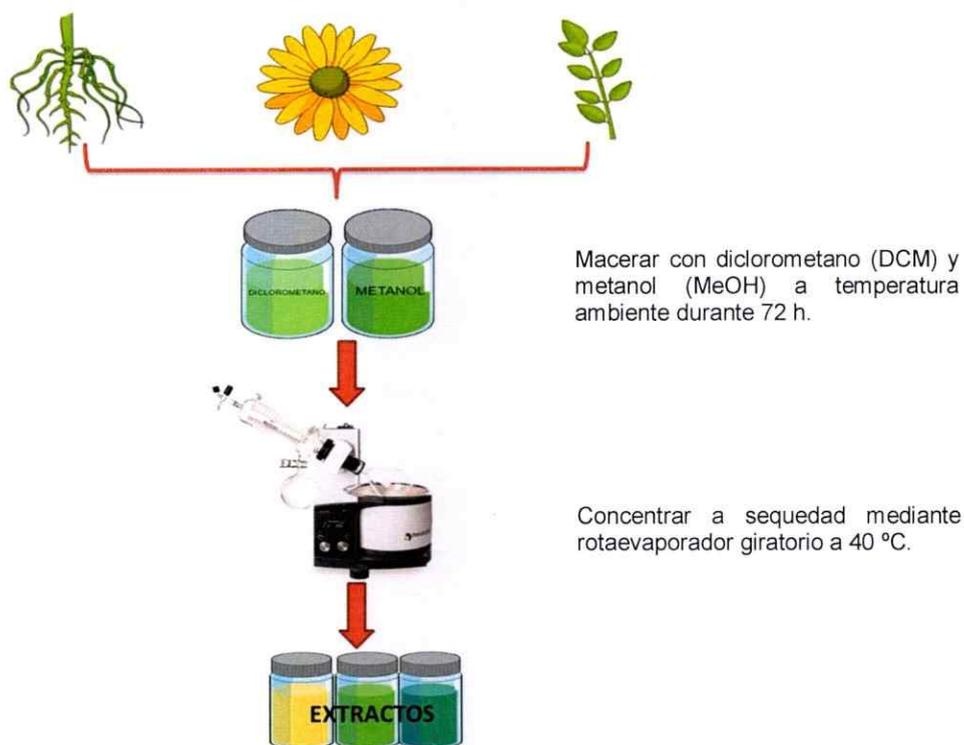


Figura 4: Preparación de extractos de las diferentes partes (flor, tallo-hoja, raíz) de *H. aromaticum*.

### 2.8 Identificación de los compuestos mediante UHPLC-ESI-MS/MS de los extractos naturales de *H. aromaticum* que presentaron actividad antimicrobiana (anti-virulencia)

La identificación de los compuestos de los extractos de *H. aromaticum* que presentaron actividad antimicrobiana (anti-virulencia) se analizaron

mediante UHPLC con un detector de arreglo de diodos acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI-MS/). Estos experimentos se basaron en los ensayos descritos por (Salgado *et al.*, 2018).

### **2.8.1 Preparación de la muestra**

Se tomaron 1mg de los extractos que presentaron actividad de anti-virulencia y que no fueron citotóxicos contra el hospedero.

### **2.8.2 Instrumento**

Un sistema de UHPLC Thion Scientific Dionex Ultimate 3000 equipado con una serie cuaternaria Bomba RS y compartimientos de columna Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS con un inyector automático Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS y una rápida separación Detector de PDA controlado por el software Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y Dionex Softron GmbH, una parte de Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) con guión con un espectrómetro de masas de foco Q Exactive de alta resolución (Thermo, Bremen, Alemania) fueron utilizado para el análisis. El sistema cromatográfico se acopló con la MS con un electrospray calentado Fuente de ionización II (HESI II). Nitrógeno (pureza > 99,999%) obtenido de un nitrógeno Genius NM32LA se empleó un generador (Peak Scientific, Billerica, MA, EE. UU.) como colisión y amortiguación de gas. La calibración de masa para el Orbitrap™ se realizó una vez a la semana, tanto en modo negativo como en positivo, para garantizar una precisión de la masa de trabajo inferior o igual a 5 ppm. Cafeína y n-butilamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) fueron los estándares de calibración para iones positivos y buspirona clorhidrato, dodecil sulfato de sodio y sal sódica del ácido taurocólico (Sigma Aldrich), se utilizaron para calibrar el espectrómetro de masas. Estos compuestos se disolvieron en una mezcla de ácido acético,

acetonitrilo, agua y metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) y se infundieron usando una Bomba Chemyx de jeringa Fusion 100 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania). El software XCalibur 2.3 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) y Trace Finder 3.2 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.), se utilizaron para el control de UHPLC y el procesamiento de datos, respectivamente. Q Exactive 2.0 SP 2 de Thermo Fisher Scientific se utilizó para controlar el espectrómetro de masas.

### 2.8.3 Parámetros CL

Se empleó una columna UHPLC C18 (Acclaim, 150 mm × 4.6 mm ID, 5 m, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) operada a 25 °C. Las longitudes de onda de detección fueron 254, 280, 320 y 440 nm.

El PDA se registró de 200 a 800 nm, y las fases móviles fueron una solución acuosa fórmica al 0,1% (A) y acetonitrilo (B). El programa de gradiente (tiempo (min), % B) fue: (0.00, 5); (5.00, 5); (10.00, 30); (15.00, 30); (20.00, 70); (25.00, 70); (35.00, 5) y 12 min para el equilibrio de la columna antes de cada inyección. El flujo de velocidad fue de 1.00 mL min<sup>-1</sup>, y el volumen de inyección fue de 10 µL.

### 2.8.4 Parámetros MS

Los parámetros de HESI fueron los siguientes: caudal de gas de revestimiento 75 unidades; caudal auxiliar de la unidad de gas 20; temperatura capilar 400 °C; temperatura del calentador de gas auxiliar 500 °C; voltaje de pulverización 2500 V (para ESI<sup>-</sup>); y S como objetivo RF nivel 30. Los datos de escaneo completo en positivo y negativo se adquirieron con el poder de resolución de 70,000 FWHM (ancho máximo medio total) a *m/z* 200. Para los compuestos de interés, fue elegido un rango de escaneo de *m/z* 100–1000; el control automático de ganancia (AGC) establecido en 3 × 10<sup>6</sup> y el tiempo de inyección establecido a 200 ms. La tasa de exploración se estableció en 2 exploraciones s<sup>-1</sup>. La calibración externa se realizó utilizando una solución de calibración en

modos positivos y negativos. A efectos de confirmación, se realizó un análisis MS/MS fue realizado utilizando la lista de inclusión masiva, con una ventana de tiempo de 30 s, con el espectrómetro Orbitrap operando en modo positivo y negativo a 17,500 FWHM ( $m/z$  200). El objetivo AGC se estableció en  $2 \times 10^5$ , con el tiempo máximo de inyección de 20 ms. Los iones precursores son filtrados por el cuádruplo que opera en una ventana de aislamiento de  $m/z$  2. El vacío frontal, alto vacío y ultra alto vacío se mantuvieron a aproximadamente 2 mbar, desde 105 y por debajo de 1010 mbar, respectivamente. La colisión de energía (célula HCD) fue operada a 30 kv. La detección se basó en la masa exacta calculada y en tiempo de retención de los compuestos objetivo, como se muestra en la **Tabla 3**. La ventana de tolerancia de masa se estableció en 5 ppm para los dos modos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Preparación de los extractos naturales de la especie *H. aromaticum*

Los extractos de plantas medicinales han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad para tratar diferentes enfermedades, dolencias, de manera directa o en infusión. La herbolaria medicinal se basa en los hallazgos empíricos de miles de años y ha logrado proporcionar medicamentos valiosos. Entre estos se encuentran los analgésicos ( morfina), antitusígenos (codeína), antihipertensivos (reserpina), cardiotónicos (digoxina), antipalúdicos (quinina y la artemisinina), y antineoplásicos (vinblastina y taxol) (Carolina Martínez-Torres *et al.*, 2016).

La familia Asteraceae es conocida por sus propiedades terapéuticas, cosméticas y aromáticas. Es relatado en la literatura el uso medicinal de esta familia como antihelmíntico, antiinflamatorio, adstringente, colestérico, antihemorrágico, antimicrobiana, diurético, analgésico y antiespasmódico (Fabri *et al.*, 2011). El género *Helenium* se encuentra distribuido en América del Norte y parte de América del Sur y es sujeto de investigaciones científicas debido a la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Hernández and C. Mendoza, 2014).

Siendo unos de los objetivos la preparación de extractos de la especie *H. aromaticum* para la búsqueda de extractos o moléculas que atenúen la virulencia de la cepa *Klebsiella pneumonia* RYC 492, se obtuvieron 6 extractos: 3 de diclorometano y 3 de metanol de las diferentes partes (flor, tallo-hoja y raíz).

### 3.2 Ensayo de desarrollo social de la ameba *D. discoideum* para la evaluación de citotoxicidad

Con el objetivo de utilizar el modelo alternativo *D. discoideum* para evaluar la actividad citotóxica de extractos naturales evaluamos el proceso del ciclo de desarrollo social según los protocolos establecidos anteriormente por nuestro laboratorio (Bravo-toncio *et al.*, 2016; Marcoleta *et al.*, 2018; Varas *et al.*, 2018).

Para esto, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad en placas que permite monitorear el crecimiento vegetativo y la progresión del desarrollo social de la ameba cuando se coincuban con bacterias sobre un medio sólido. Conociendo que la dieta de *D. discoideum* es naturalmente de bacterias y que *Klebsiella aerogenes* es empleada rutinariamente como alimento para la ameba en condiciones de laboratorio (Fey *et al.*, 2007), se usó esta cepa en el ensayo según el protocolo mostrado en la **Figura 2**.

Considerando los estudios previos, propusimos evaluar la citotoxicidad de extractos naturales utilizando como modelo biológico a *D. discoideum*, lo que servirá como plataforma para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad de anti-virulencia.

Para esto se evaluaron los 6 extractos de las diferentes partes (flor, tallo-hoja y raíz) de *H. aromaticum* es decir 3 extractos metanólicos y 3 extractos diclorometano.

Este ensayo se basa en que los metabolitos secundarios de los diferentes extractos de *H. aromaticum* que presenten citotoxicidad contra el hospedero retrasan la finalización del ciclo de desarrollo social de *D. discoideum*, mientras que los compuestos que no son citotóxicos permiten la conclusión normal del ciclo social (normalmente dentro de 3-4 días en nuestras condiciones experimentales) (Varas *et al.*, 2018).

Se evaluaron 3 cantidades (25 µg, 50 µg y 100 µg) de los diferentes extractos durante 6 días. Como se aprecia en la **Figura 5**, la evaluación citotóxica de los extractos diclorometano de las diferentes partes (flor **Fig.**

**5A**, tallo-hoja **Fig. 5B** y raíz **Fig. 5C**) de *H. aromaticum* resultaron citotóxicos porque retrasaron la finalización del ciclo de desarrollo social de la ameba *D. discoideum*.

Los extractos de diclorometano (flor, tallo-hoja y raíz) a mayor concentración (50 µg y 100 µg) retrasan el desarrollo social de la ameba no culminando la fase de agregación, en comparación a 25 µg donde alcanzaron la fase de elevación y culminación en los días de evaluación. Estos resultados se muestran en la **Figura 5**.

Por su parte los extractos metanólicos de las diferentes partes (flor **Fig. 6A**, tallo-hoja **Fig. 6B** y raíz **Fig. 6C**) de *H. aromaticum* no resultaron citotóxicos como se aprecia en la **Figura 6**, en ninguna de las condiciones evaluadas (25 µg, 50 µg y 100 µg).

Como presenta la **Figura 6**, en todas las condiciones se alcanzaron la fase de elevación y culminación al igual que en las condiciones control (3-4 días).

Resumiendo, los resultados indican que los ensayos de desarrollo social de la ameba *D. discoideum* son una forma muy útil y sencilla para evaluar la citotoxicidad de metabolitos secundarios obtenidos de diferentes fuentes.

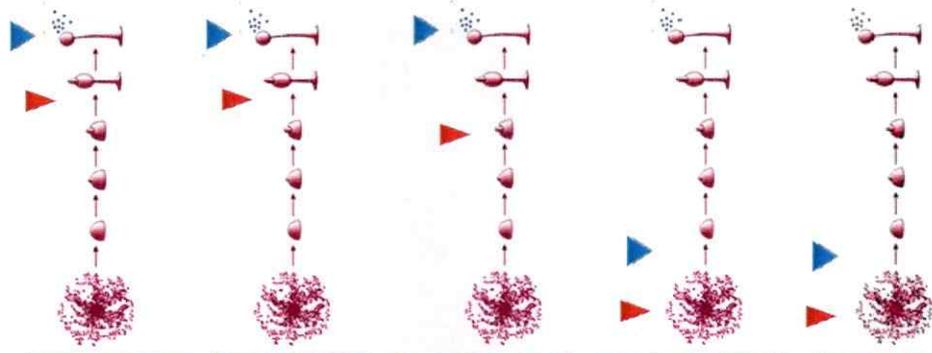
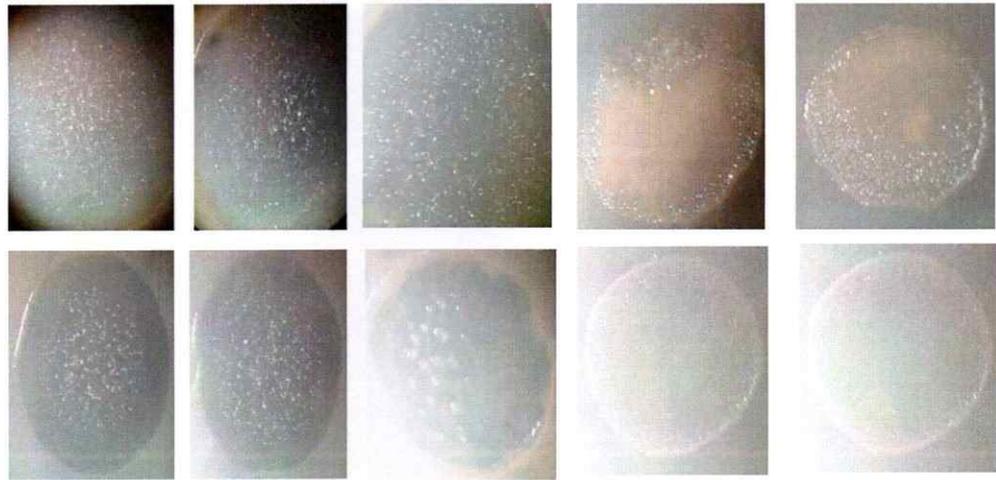
En las condiciones aisladas los extractos metanólicos resultaron ideales para continuar la búsqueda de compuestos bioactivos pues no tuvieron efectos citotóxicos sobre la ameba. A diferencia, de los extractos de diclorometano deberían purificarse para lograr separar las fracciones citotóxicas.

Esta plataforma nos serviría como modelo para la búsqueda de moléculas con diferentes actividades biológicas sin presentar citotoxicidad contra el hospedero.

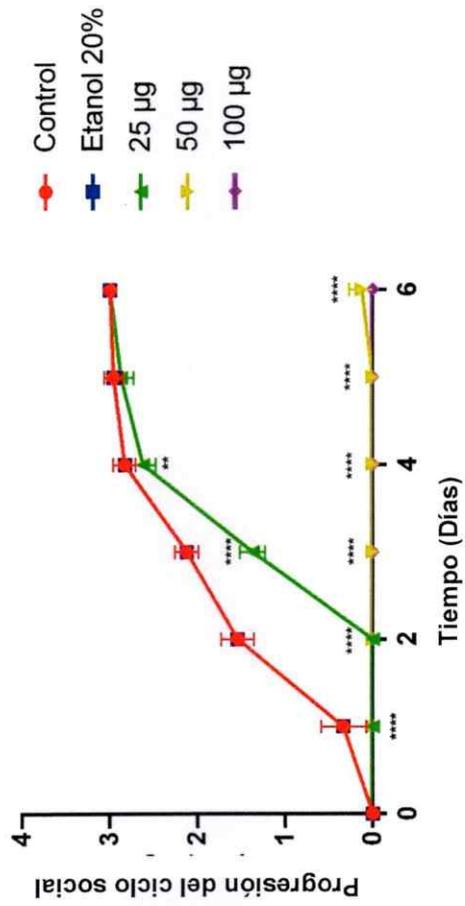
A)

DÍA 3

DÍA 6

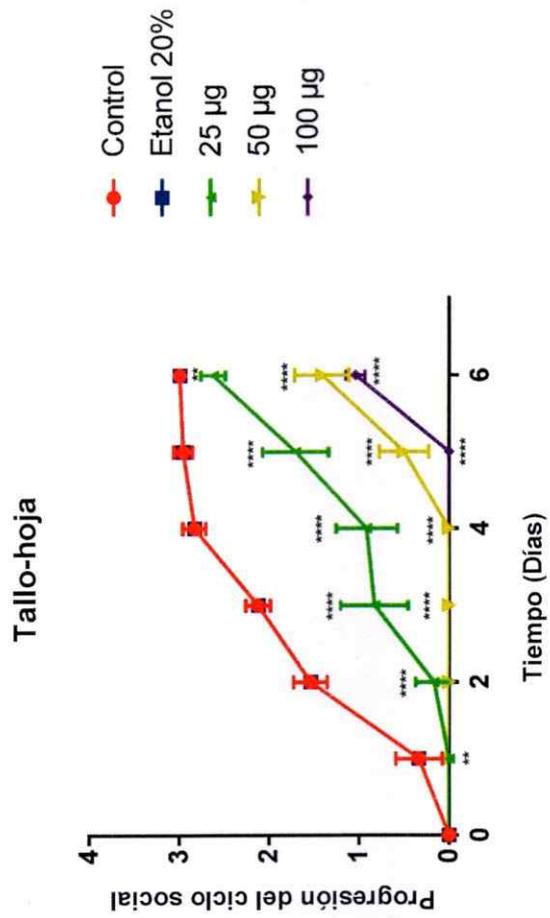
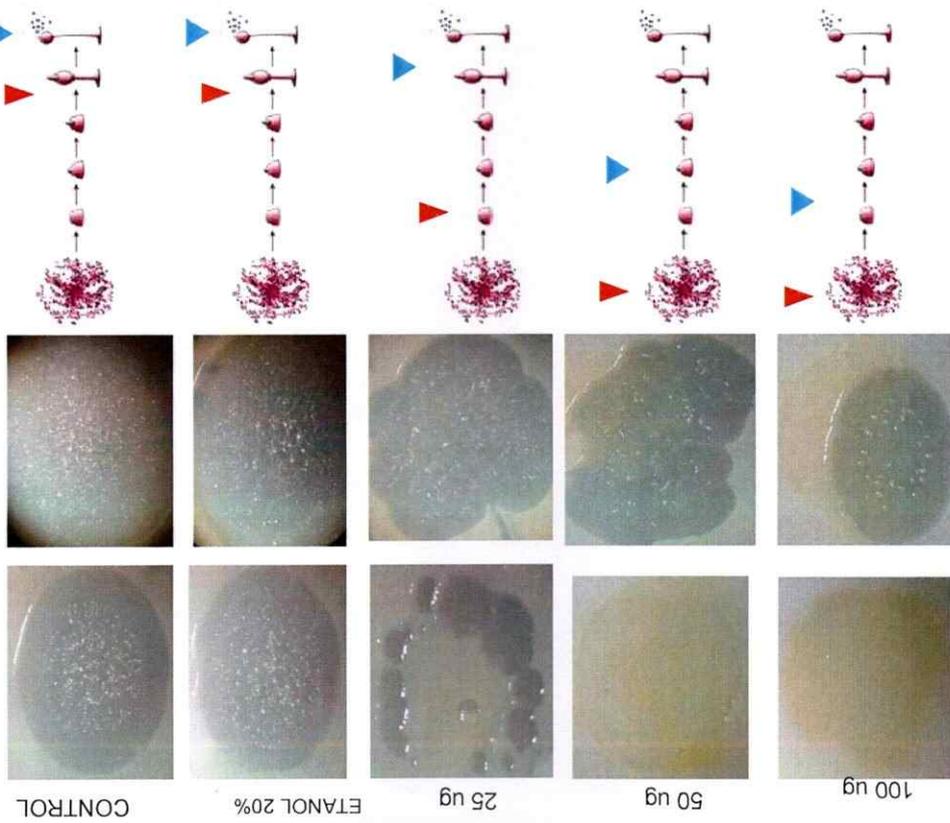


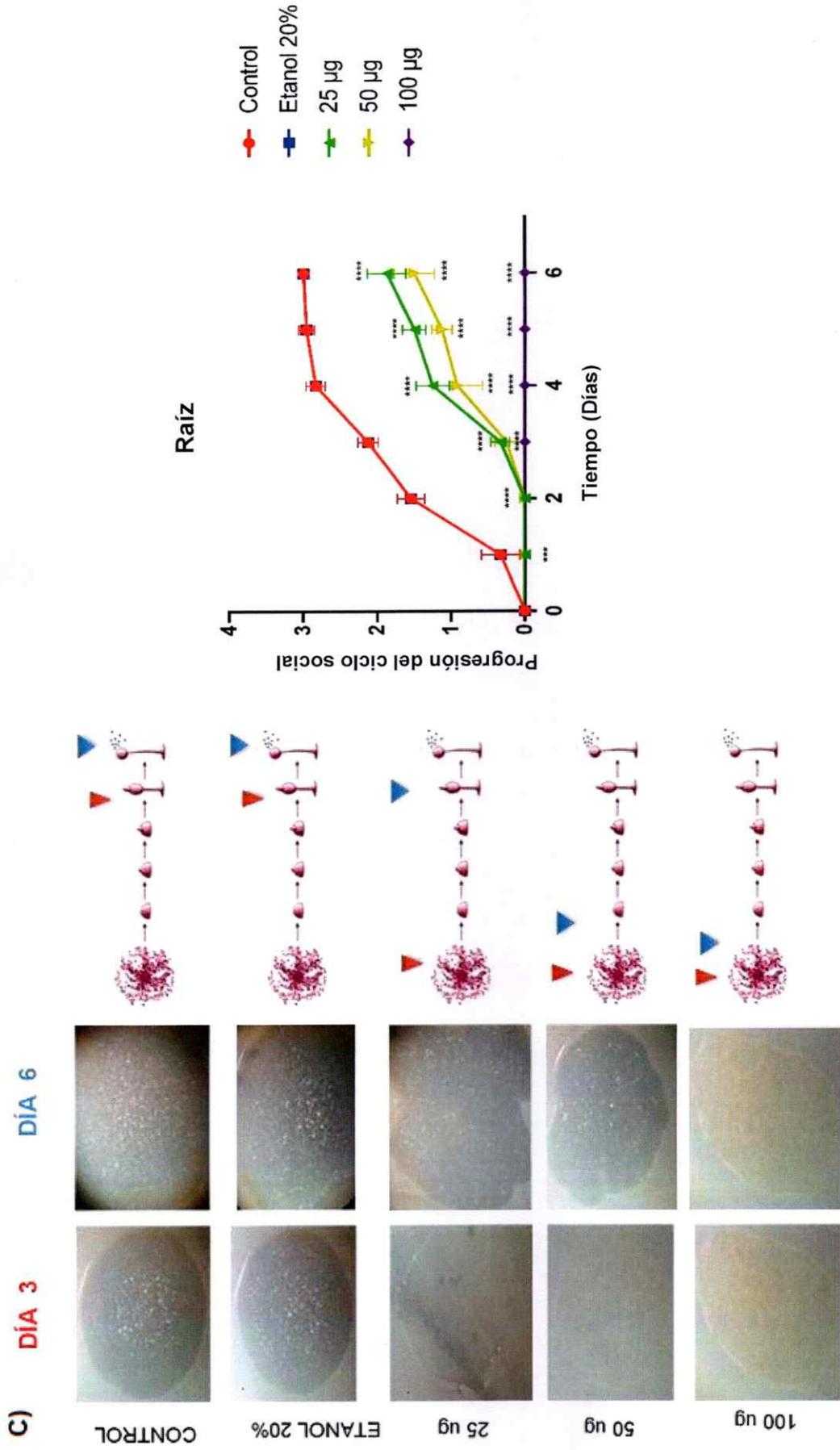
Flor



B)

DÍA 3      DÍA 6





**Figura 5. Evaluación citotóxica de los extractos diclorometano de *H. aromaticum* A) Flor B) Tallo-hoja. C) Raíz.** El análisis estadístico fue realizado utilizando un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

A)

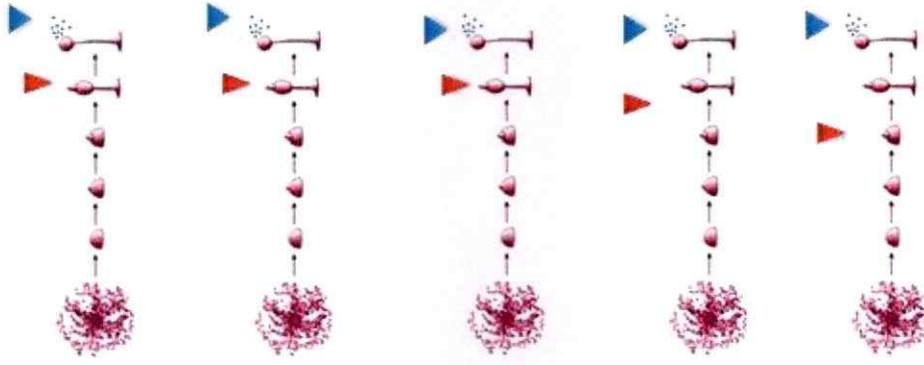
DÍA 6



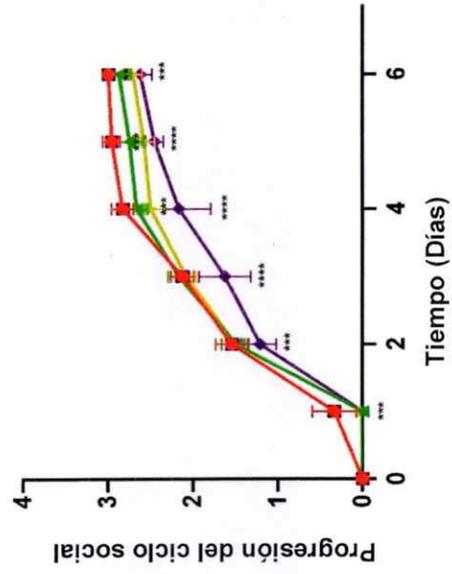
DÍA 3



CONTROL      ETANOL 20%      25 ug      50 ug      100 ug



Flor

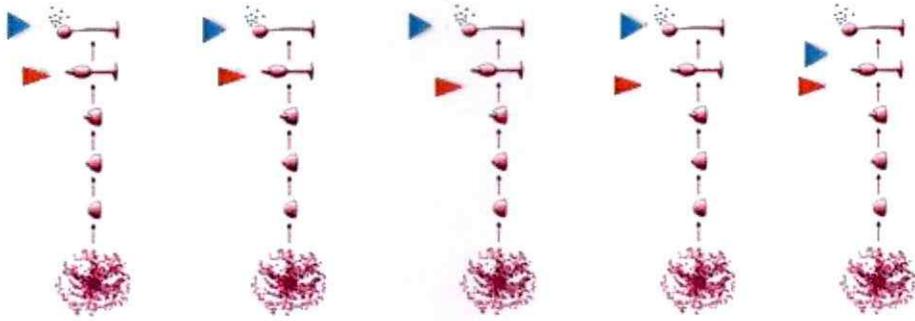
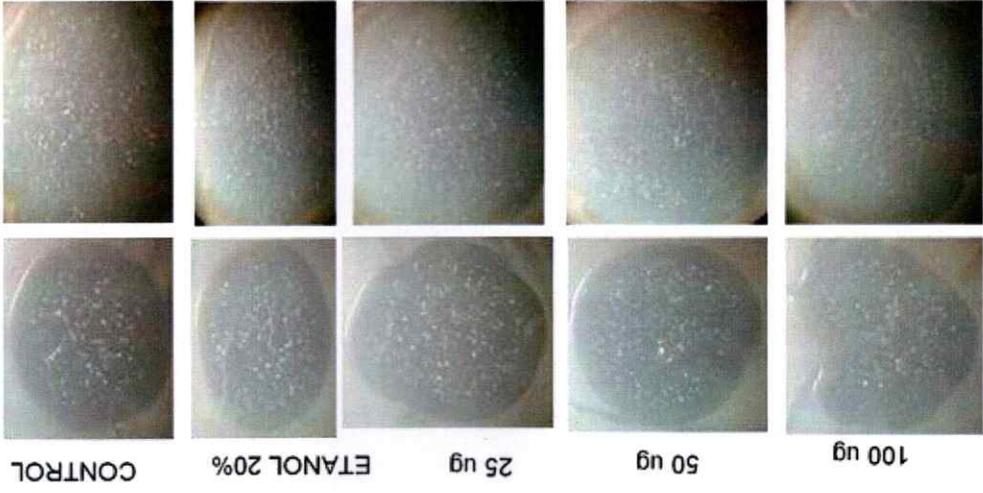


Control  
Etanol 20%  
25 µg  
50 µg  
100 µg

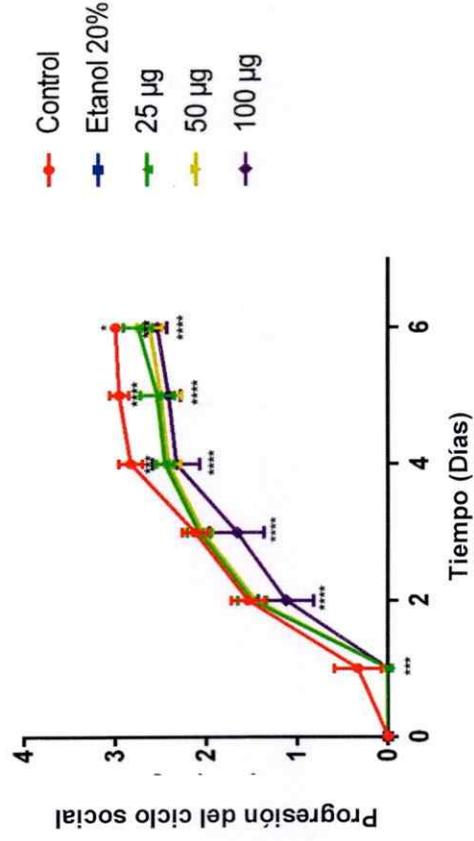
B)

DÍA 6

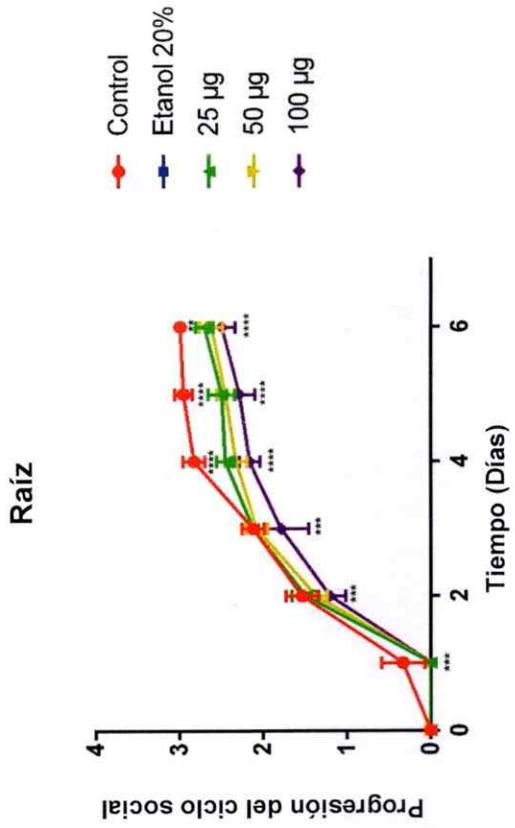
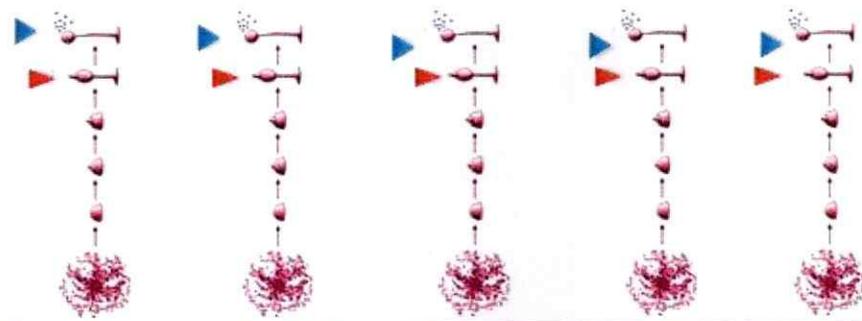
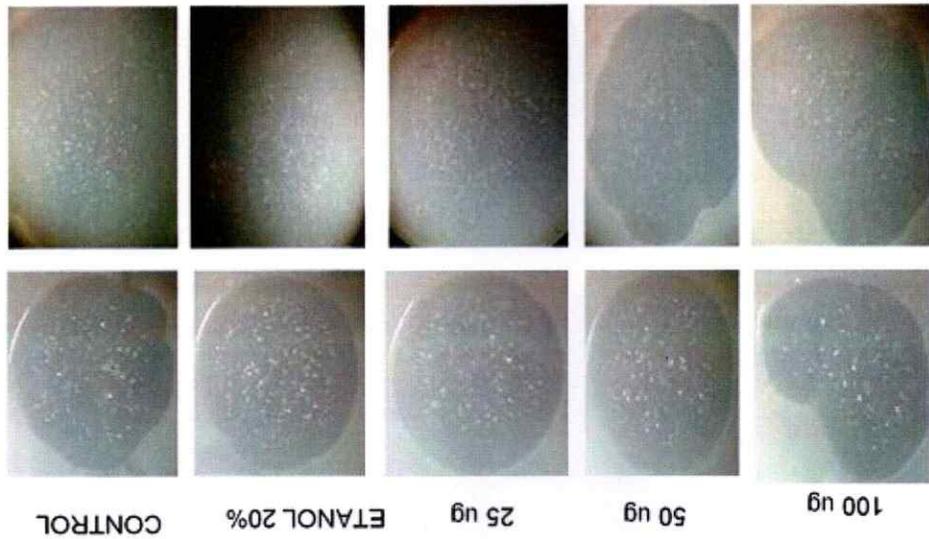
DÍA 3



Tallo-hoja



**C)** **DÍA 3** **DÍA 6**



**Figura 6. Evaluación citotóxica de los extractos metanólicos de *H. aromaticum* A) Flor B) Tallo-hoja C) Raíz. El análisis estadístico fue realizado utilizando un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).**

### 3.3 Ensayo de antibiosis de los extractos de *Helenium aromaticum* contra la cepa virulenta *Klebsiella pneumoniae* RYC 492

En la evaluación del ensayo de antibiosis, las diferentes condiciones ensayadas (25 µg, 50 µg y 100 µg) de los extractos diclorometano y metanol de *H. aromaticum* no presentaron actividad antibacteriana significativa contra *Klebsiella pneumoniae* RYC 492. Como se muestra en la **Figura 7**, no hay diferencias significativas entre las diferentes condiciones, control negativo y el control de resistencia a kanamicina. Esto a diferencia de lo observado para el control positivo con gentamicina, **Figura 7**, **Tabla 2**.

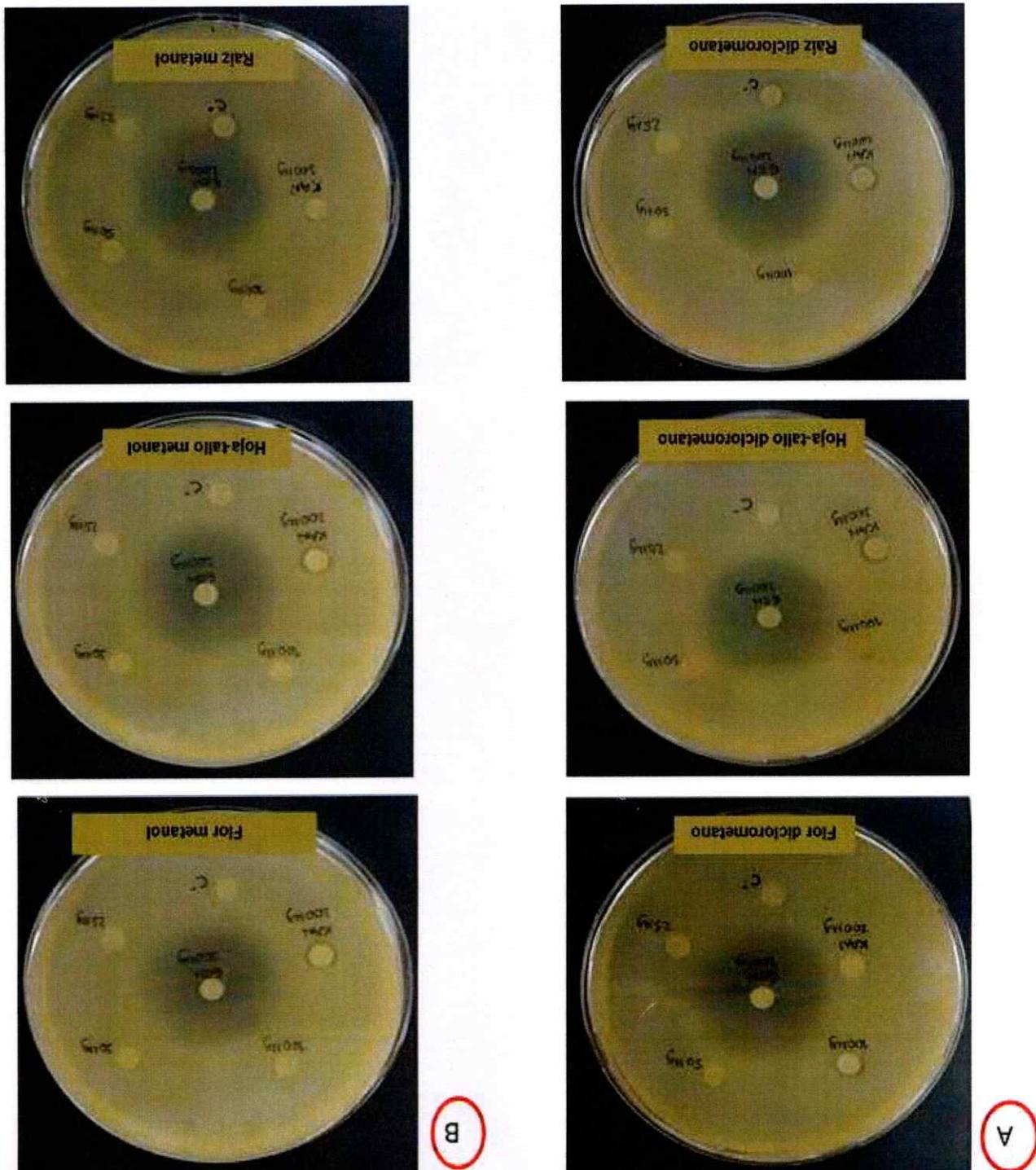
Tabla 2. Evaluación de antibiosis de los extractos de *Helenium aromaticum* contra la cepa virulenta *K. pneumoniae* RYC 492.

EXTRACTOS	ESPECIE BACTERIANA	CONCENTRACIONES			CONTROLES		
		Diámetro del halo de inhibición en (mm) *			De resistencia		
		25 µg	50 µg	100 µg	C + (KAN)	C + (GEN)	C - (ETANOL 20%)
Diclorometano de flor		-	-	+/-	+/-	+++	-
Diclorometano de tallo-hoja		-	-	+/-	+/-	+++	-
Diclorometano de raiz	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RYC 492	-	-	+/-	+/-	+++	-
Metanólico de flor		-	-	+/-	+/-	+++	-
Metanólico de tallo-hoja		-	-	+/-	+/-	+++	-
Metanólico de raiz		-	-	+/-	+/-	+++	-

\* Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del disco (6 mm) valor promedio de repeticiones n=9.

- (++++) ≤ 1,8 cm.
- (++) ≤ 1,3 cm.
- (+) ≤ 0,9 cm.
- (+/-) ≤ 0,5 cm.
- (∧) 0 cm.
- C - (control negativo).
- C + (Kan) control de resistencia.
- C + (GEN) control positivo.

Figura 7: Ensayo de antibiosis de los extractos de *H. aromaticum* contra la cepa virulenta *K. pneumoniae* RYC 492.



### 3.4 Ensayos de desarrollo social en la ameba *D. discoideum* para la evaluación de extractos y compuestos con actividad anti-virulencia

Con en el objetivo de determinar el efecto de anti-virulencia de los extractos de las diferentes partes (flor, tallo-hoja, raíz) de *H. aromaticum*, se realizaron algunas modificaciones del ensayo realizado por (Varas *et al.*, 2018). Dichas modificaciones son resumidas e ilustradas en la **Figura 8**.

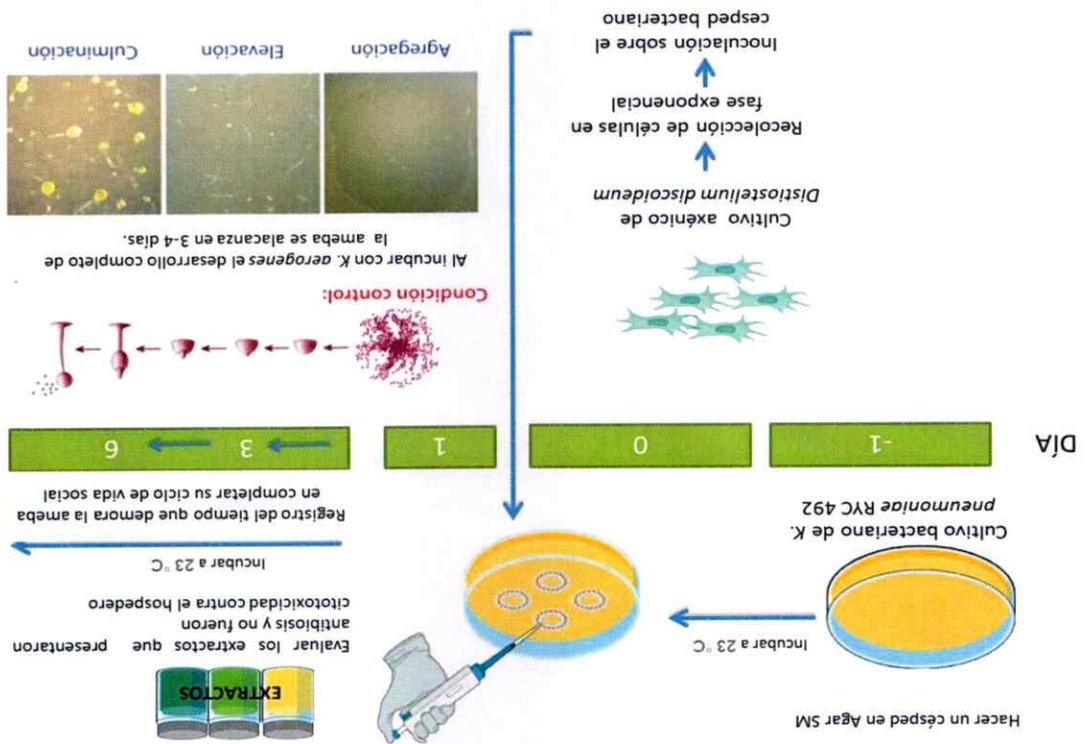


Figura 8: Protocolo para la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana contra *K. pneumoniae* que no afecten la viabilidad de la ameba.

La selección de los compuestos de anti-virulencia se basó en los siguientes criterios:

1) No deben actuar como un antibiótico, es decir, no deben inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* RYC 492 (ensayo antibiótico); 2) no deben tener efectos secundarios (Ensayo citotoxicidad), o sea, no deben interferir con el crecimiento y desarrollo social de *D. discoideum* y 3) deben atenuar la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492, permitiendo que la ameba social crezca y se desarrolle sobre el césped bacteriano.

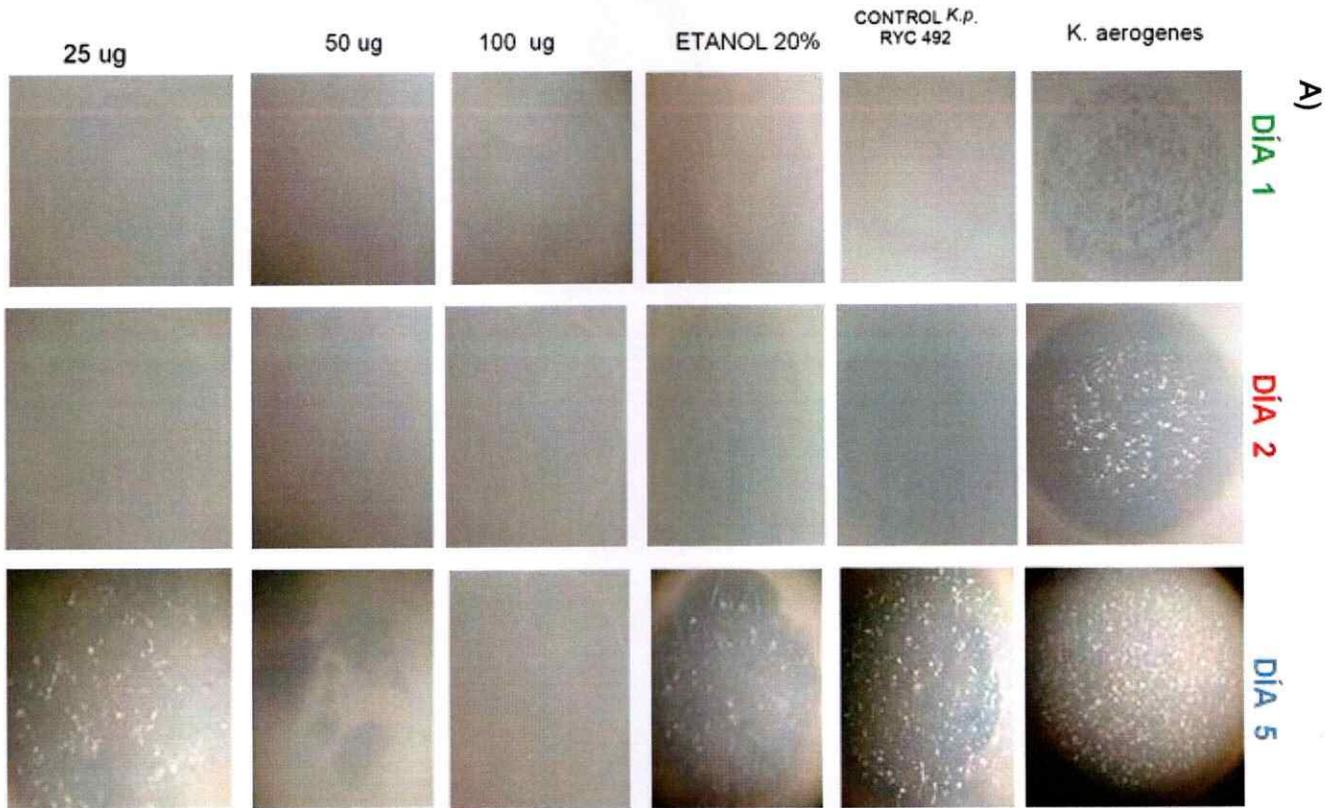
De acuerdo con estos criterios, se evaluaron la efectividad en atenuar la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492 y los efectos secundarios de los 6 extractos de *H. aromaticum*, durante un periodo de 5 días, donde fueron evaluadas las fases alcanzadas en el ciclo de desarrollo social de la ameba. Los resultados son mostrados en la Figura 9 y Figura 10.

Como se presenta los extractos de diclorometano (flor Fig. 9A, tallo-hoja Fig. 9B y raíz Fig. 9C) no atenuaron la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492, y como habíamos mostrado anteriormente, retrasaron la finalización del ciclo de desarrollo social de *D. discoideum*, en los 5 días de evaluación, comparados con el control de virulencia con la cepa patógena (*K. pneumoniae* RYC 492). El control negativo fue el ensayo con *K. aerogenes* en una concentración de etanol al 20% que fue utilizado como disolventes para las condiciones evaluadas de los diferentes extractos de *H. aromaticum* (25 µg, 50 µg y 100 µg).

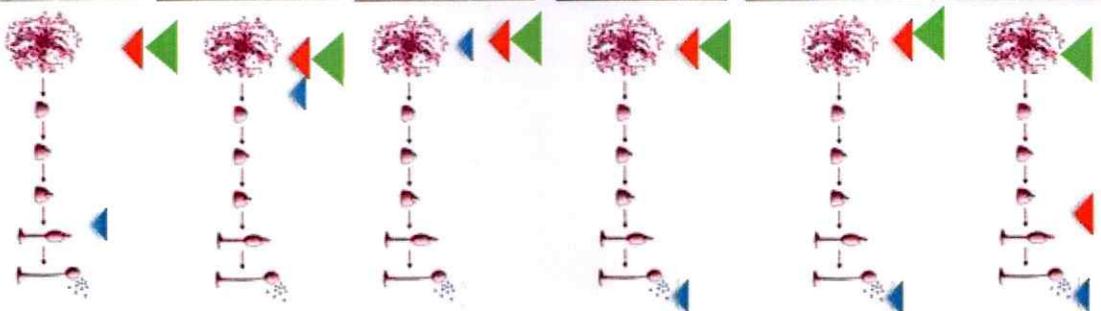
En el día 5 se observó que en la condición de 50 µg solo alcanzó la fase de agregación y 100 µg solo alcanzó la fase de elevación retrasando el ciclo de desarrollo social de la ameba, podemos suponer que este retraso del ciclo se debe a la citotoxicidad que presentaron estos extractos de diclorometano.

En la evaluación de los extractos metanólicos de (flor Fig. 10A y tallo-hoja Fig. 10B) no atenuaron la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492 y no presentaron un retraso del ciclo de desarrollo social de la ameba igualmente a los controles evaluados. Sorpresivamente el extracto metanólico de (raíz Fig. 10C) fue el que

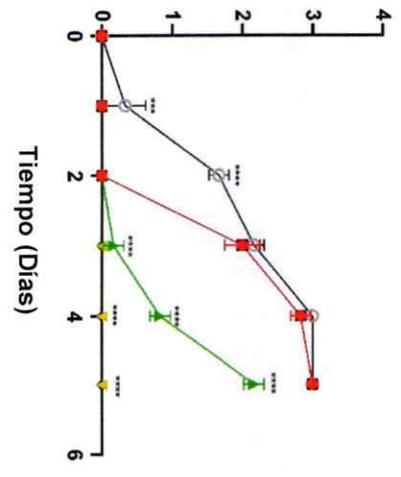
atenuó significativamente la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492 en las condiciones evaluadas (25 µg, 50 µg y 100 µg), observándose el segundo día la fase de agregación a comparación del control de virulencia que no se observó el desarrollo del ciclo de la ameba (formación de la placa fagocítica). En las condiciones evaluadas todas alcanzaron a finalizar el ciclo de desarrollo de social de la ameba (formación de cuerpos fructíferos) al igual que en los controles evaluados. En resumen, sólo el extracto metanólico de raíz cumpliría las tres condiciones sugeridas para un compuesto de anti-virulencia, es decir, no tuvieron actividad antibiótica sobre *K. pneumoniae* ni citotóxica sobre *D. discoideum*, sin embargo, fue capaz de afectar los factores de virulencia de *K. pneumoniae* en los ensayos de anti-virulencia.



DÍA 1  
DÍA 2  
DÍA 5



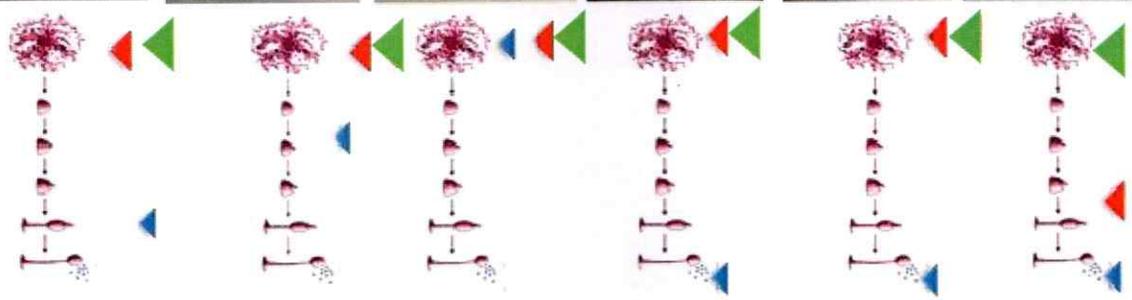
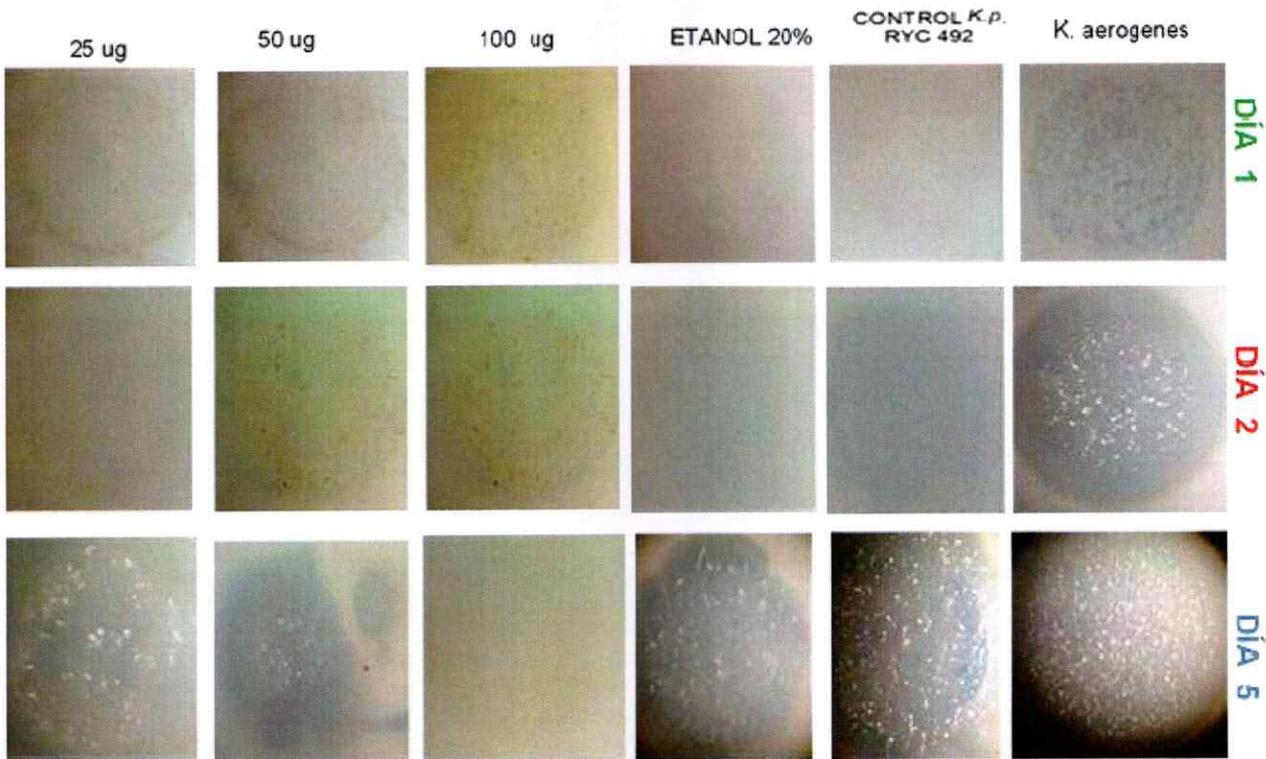
Progresión del ciclo social



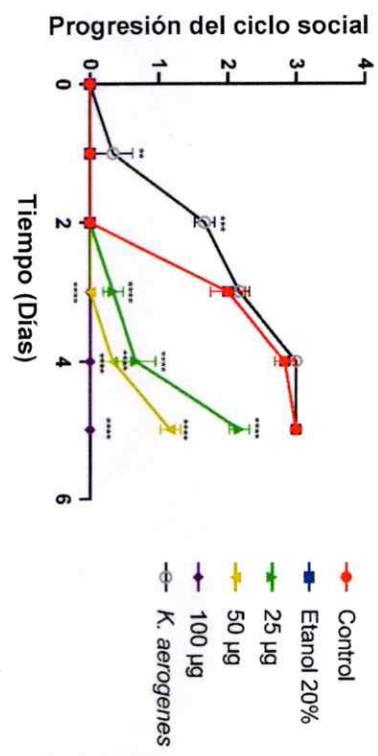
Flor

- Control
- Etanol 20%
- ▲ 25 µg
- ▼ 50 µg
- ◆ 100 µg
- *K. aerogenes*

B)



36



Tallo-hoja

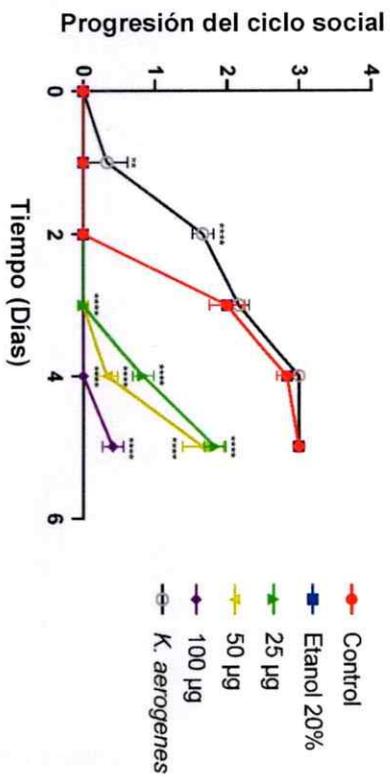
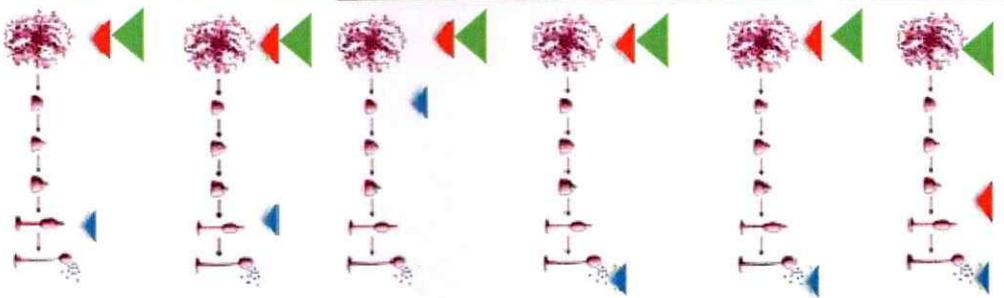
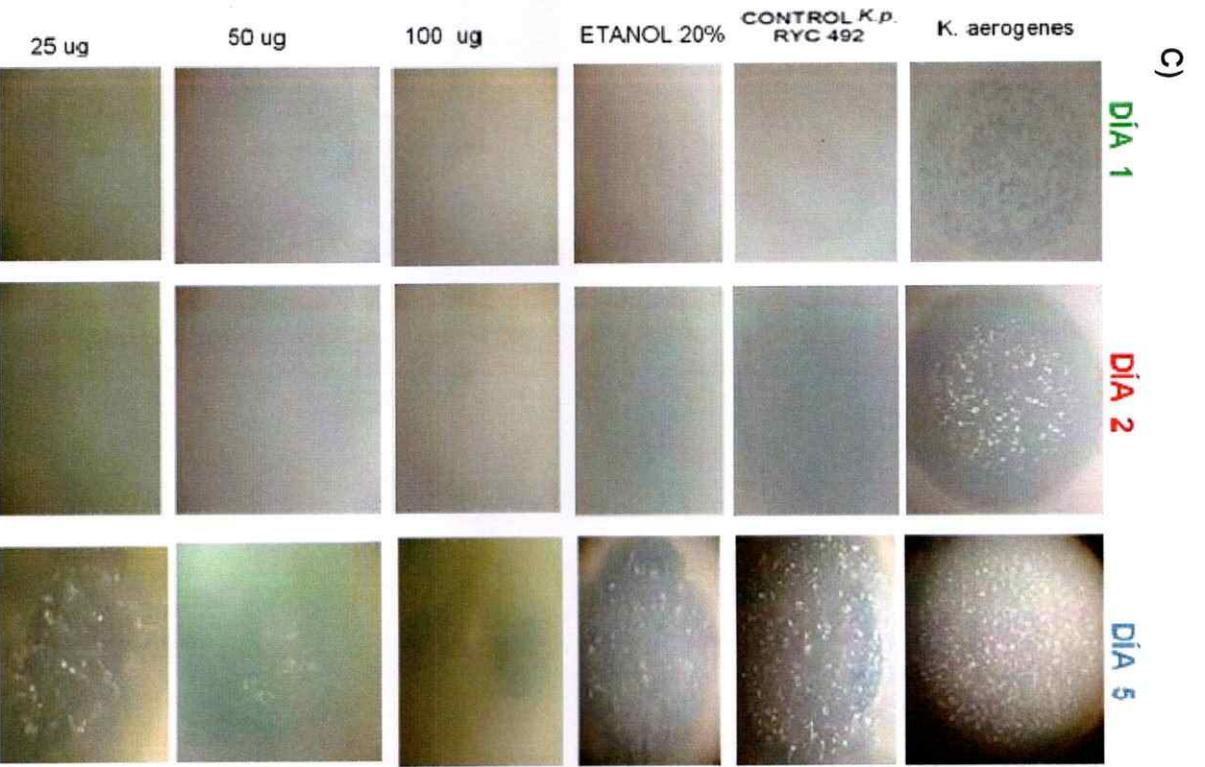
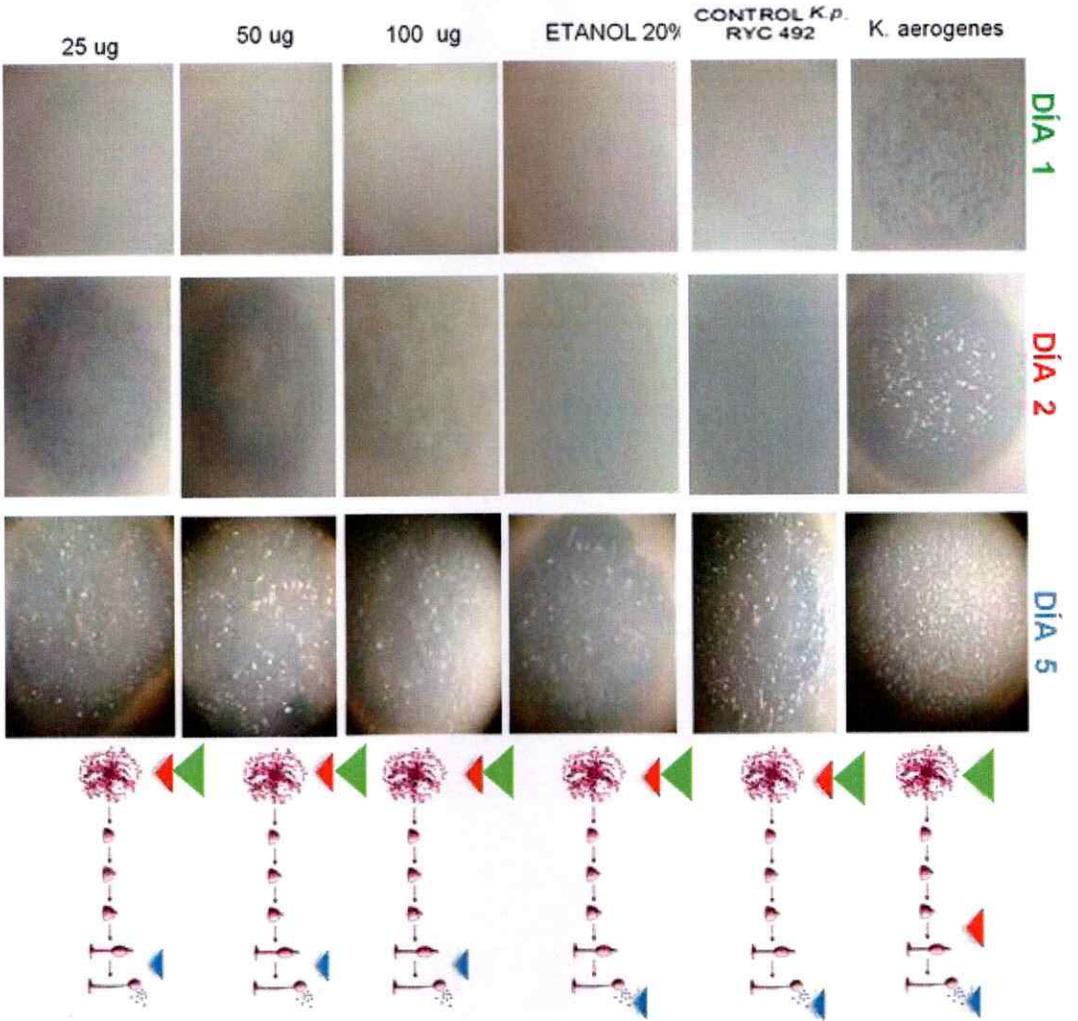
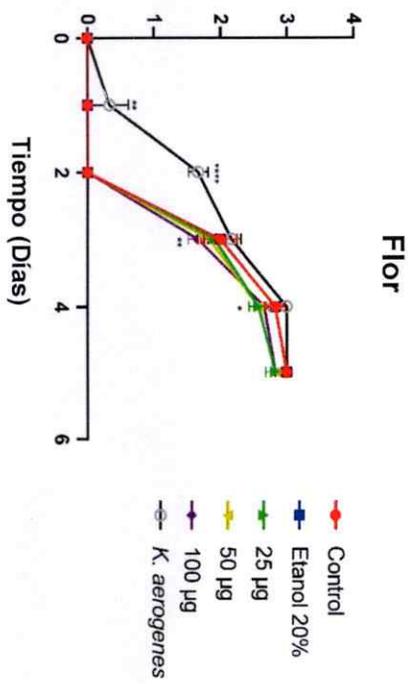


Figura 9. Evaluación de la actividad de anti-virulencia de los extractos diclorometano de *H. aromaticum*: A) Flor B) Tallo-hojas C) Raíz. El análisis estadístico fue realizado utilizando un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0,05, \*\* = p < 0,005, \*\*\* = p < 0,001, \*\*\*\* = p < 0,0001).

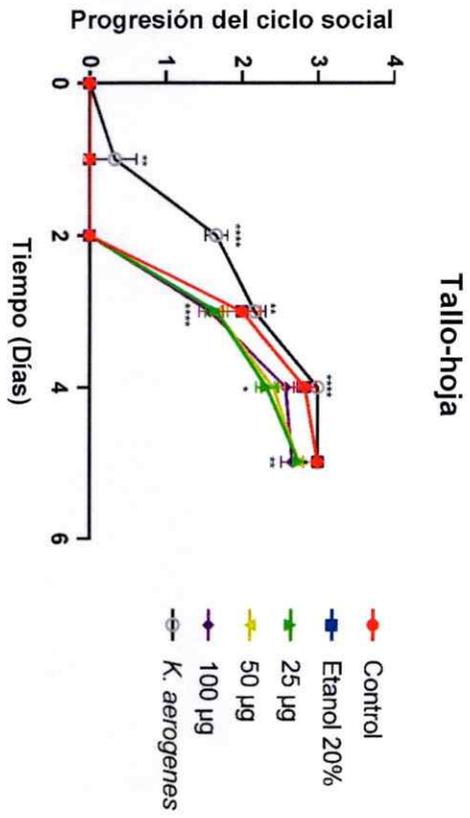
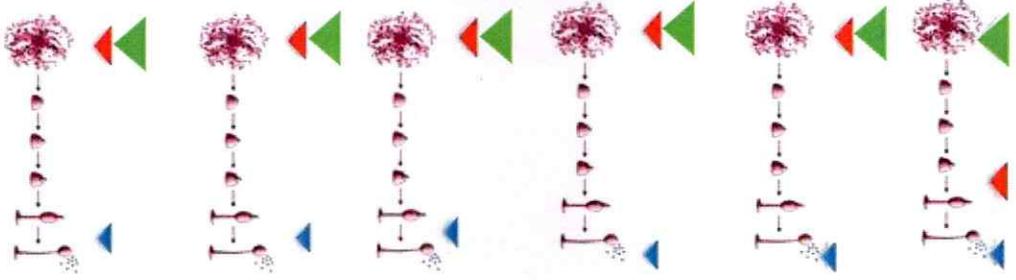
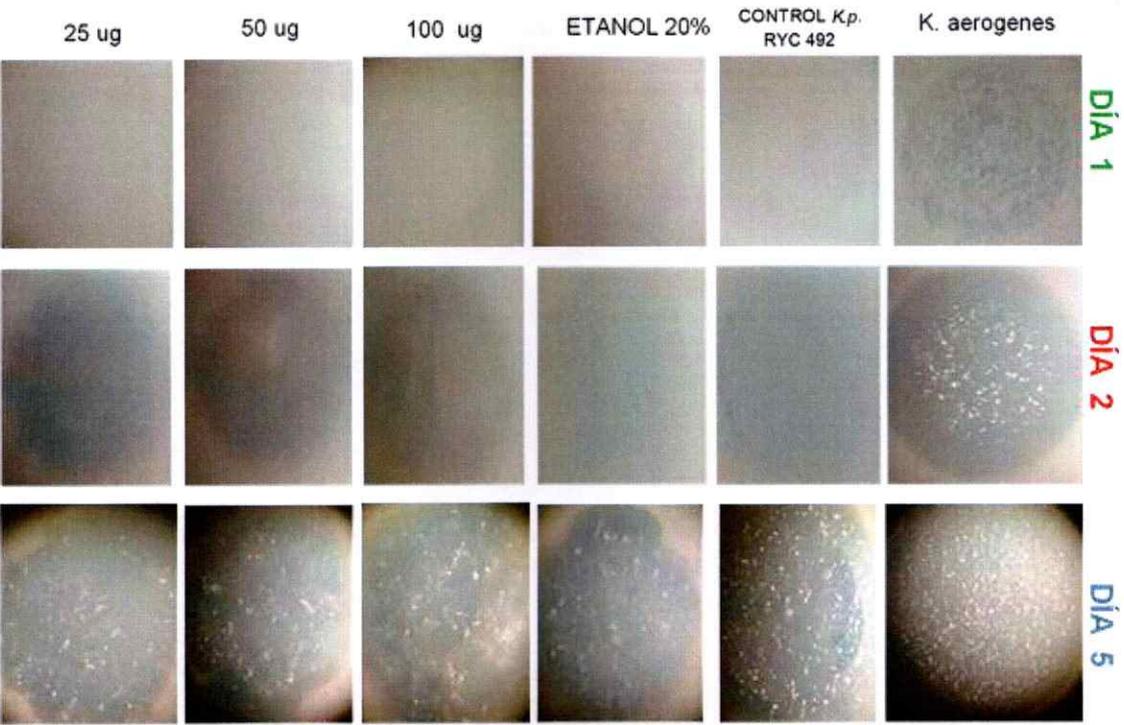
A)



Progresión del ciclo social



B)



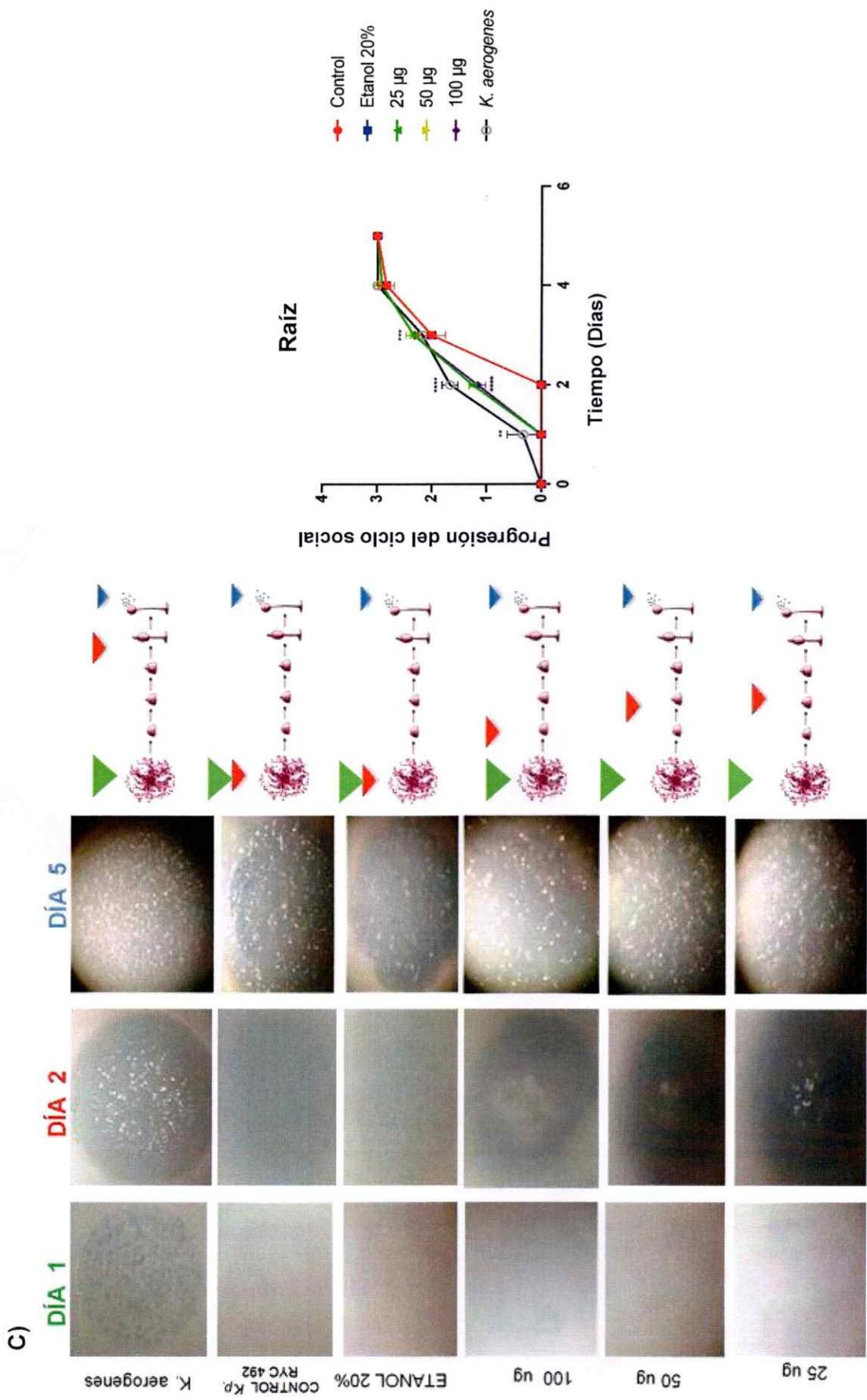


Figura 10. Evaluación de la actividad de anti-virulencia de los extractos de metanol de *H. aromaticum*: A) Flor B) Tallo-hojas C) Raíz. El análisis estadístico fue realizado utilizando un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

### **3.5 Identificación de los compuestos mediante UHPLC-ESI-MS/MS de los extractos que presentaron actividad de anti-virulencia.**

El objetivo principal de este estudio fue implementar una plataforma para la búsqueda de moléculas (metabolitos secundarios) o extractos naturales de plantas que no resulten citotóxicos contra el hospedero *D. discoideum* pero capaces de atenuar la virulencia del patógeno *K. pneumoniae*. Considerando los resultados de los ensayos citotóxicos y los de anti-virulencia de los extractos evaluados de las partes de *H. aromaticum* (flor, tallo-hoja, raíz), donde solamente los extractos metanólicos de raíz atenuaron la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492 sin afectar la viabilidad de *D. discoideum*, estos fueron escogidos para los análisis químicos para la identificación de los compuestos presentes.

Con la ayuda de la técnica de espectrometría de masas in tandem de alta resolución del extracto metanólico se identificaron tentativamente 24 compuestos. Todos los compuestos fueron detectados en modo negativo mediante UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS, como se muestra en la **Tabla 3**.

#### **3.5.1 Compuesto fenólicos**

Los compuestos fenólicos son originados en el metabolismo secundario de las plantas, siendo esenciales para su crecimiento y reproducción, además de formarse en condiciones de estrés tales como infecciones, lesiones, radiación UV, entre otros (Naczki and Shahidi, 2004).

Químicamente los compuestos fenólicos se definen como sustancias que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, incluyendo sus grupos funcionales (Lee *et al.*, 2005). Presentan una estructura variable y por lo tanto son multifuncionales. Hay unos cinco mil fenoles, entre ellos flavonoides, ácidos fenólicos, fenoles simples, cumarinas, taninos, ligninas y tocoferoles (Angelo and Jorge, 2007).

También se han encontrado compuestos fenólicos en la raíz de la especie *Inula helenium*, que pertenece a la familia Asteraceae, mediante la extracción de compuesto orgánicos (Spiridon *et al.*, 2013).

En el género *Heleniun* se han encontrado compuestos fenólicos como flavonoides en 22 taxones (Bierner, 1973). En el extracto metanólico de raíz de *H. aromaticum*, se identificaron 18 compuestos fenólicos entre ellos 11 son del tipo flavonoide, 3 ácidos hidroxicinámicos, 2 ácidos orgánicos, 1 ácido fenólico y 1 cumarina, serán detallados a continuación:

**Ácido cítrico o isocítrico (Peak 5):** Detectado en  $t_R$  1.89 min como un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  191.0197, cuya fragmentación produce un ión diagnóstico característico en  $MS^2$  que corresponde a  $m/z$  111.0080  $[M-H - C_5H_3O_3]^-$  (Ledesma-Escobar *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2013).

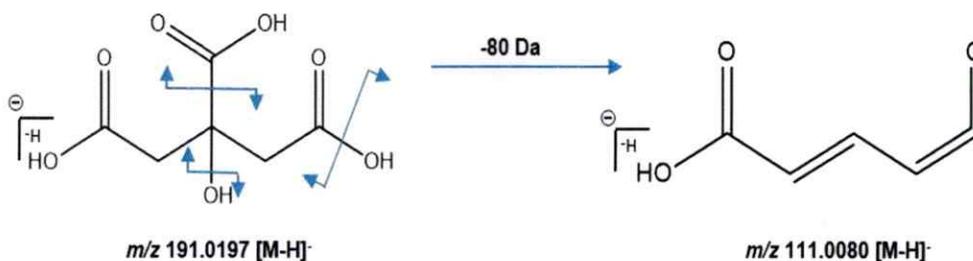


Figura 11. Propuesta de ruta de fragmentación de ácido cítrico o isocítrico.

**Ácido dihidroxibenzoico pentosido (Peak 7):** Identificado en  $t_R$  8.75 con un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  285.0625. Se observaron iones diagnósticos característicos en  $MS^2$  que corresponde a  $m/z$  108.0209  $[M-H-C_6H_4O_2]^-$ ,  $m/z$  153.0189  $[M-H-C_7H_5O_4]^-$  (Belguith-Hadriche *et al.*, 2017).

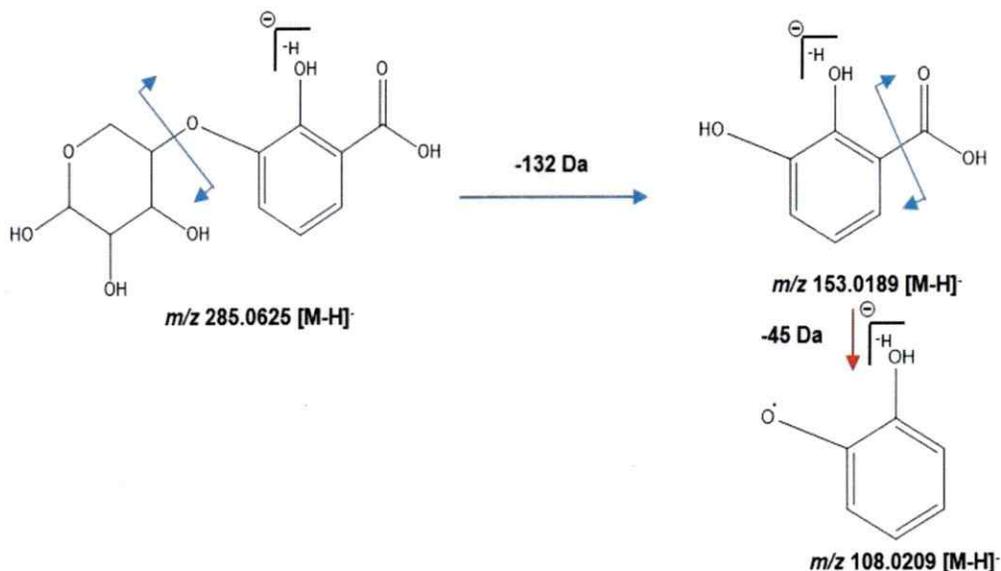


Figura 12. Propuesta de ruta de fragmentación de ácido dihidroxibenzoico pentosido.

**Ácido clorogénico (Peak 8):** Se detectó en el  $t_R$  9.36 min un ión molecular [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  353.0888 identificado por el ión hijo mostrado en el MS<sup>2</sup> correspondiente a  $m/z$  191.0561 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>]<sup>-</sup>, (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2015).

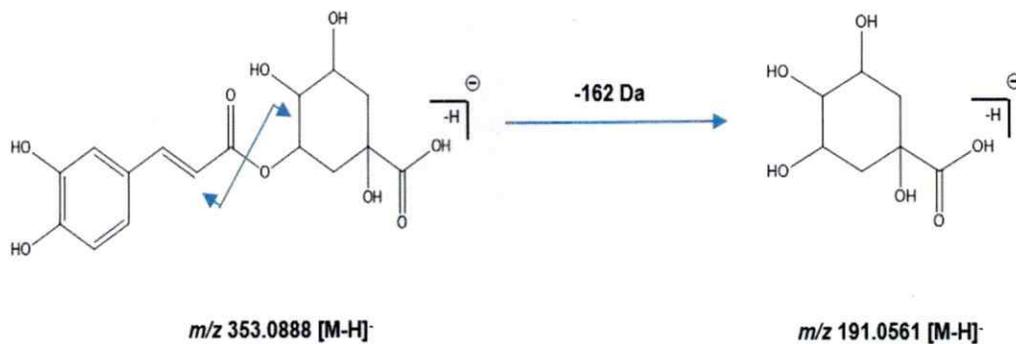


Figura 13. Propuesta de ruta de fragmentación de ácido clorogénico.

**6,7-dihidroxycumarina (esculetina) (Peak 10):** Identificado en el  $t_R$  9.74 min un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  177.0193, su fragmentación presentó en el  $MS^2$  los iones hijos de diagnóstico a  $m/z$  133.0288  $[M-H-C_8H_5O_2]^-$ ,  $m/z$  121.0289  $[M-H-C_7H_5O_2]^-$  (Zou *et al.*, 2014).

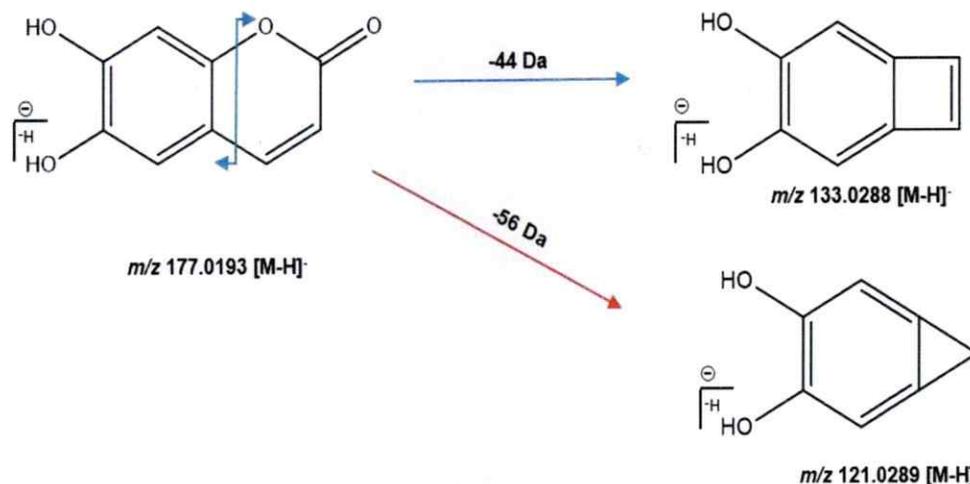


Figura 14. Propuesta de ruta de fragmentación de 6,7- dihidroxycumarina (esculetina).

**Ácido cafeico (Peak 11):** En el  $t_R$  9.85 min se identificó un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  179.0349, detectándose en el  $MS^2$  un ión diagnóstico a  $m/z$  135.0446  $[M-H-C_8H_7O_2]^-$  (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2015).

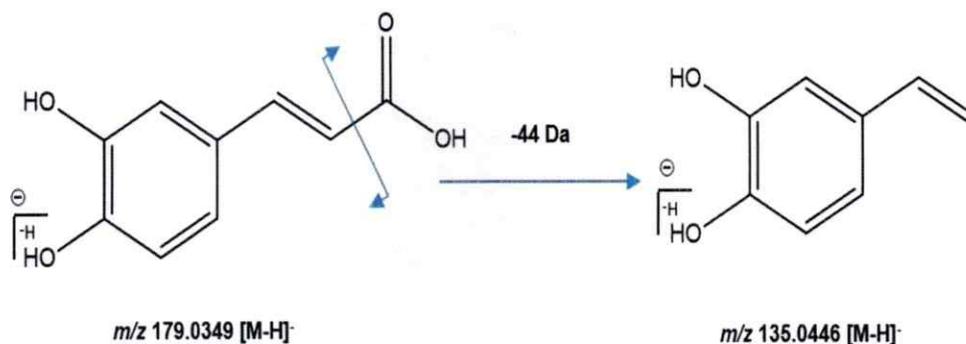


Figura 15. Propuesta de ruta de fragmentación de ácido cafeico.

**Ácido cafeico pentósido (Peak 17):** El Peak 17 mostró en el  $t_R$  10.75 min un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  311.0781, mostrando los iones

diagnósticos en el MS<sup>2</sup> a  $m/z$  179.0347 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>,  $m/z$  149.0449 [M-H-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup> característicos (Granica *et al.*, 2013).

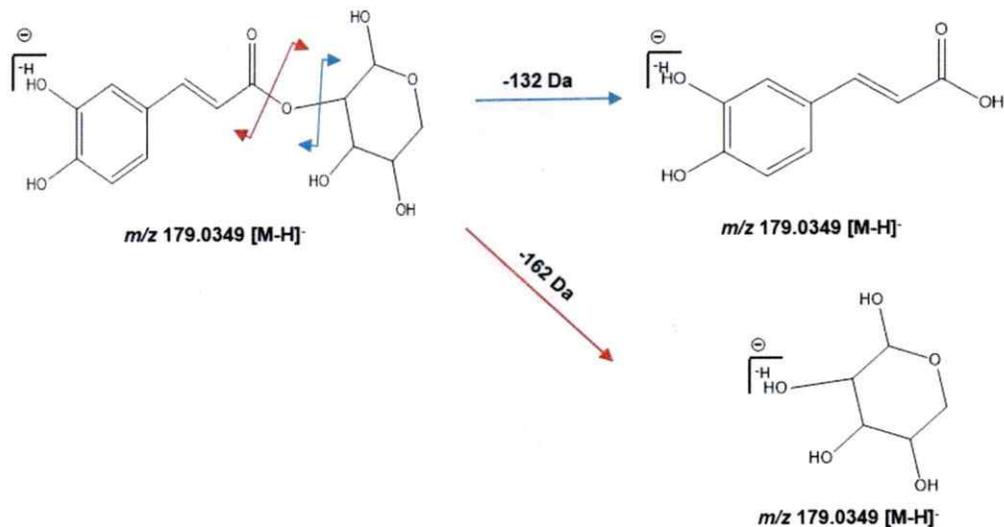


Figura 16. Propuesta de ruta de fragmentación de ácido cafeico pentósido.

**Vitexina (Peak 18):** Se observó en el  $t_R$  11.00 min un ión molecular [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  431.0994 mostrando los iones diagnósticos a  $m/z$  299.0572 [M-H-C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>]<sup>-</sup>,  $m/z$  297.0394 [M-H-C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>]<sup>-</sup>,  $m/z$  283.0612 [M-H-C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup> característico (Brito *et al.*, 2014).

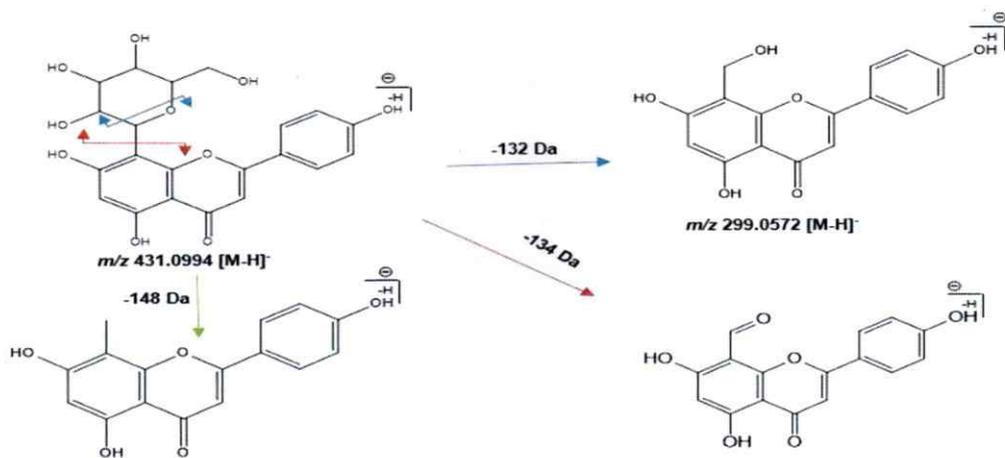


Figura 17. Propuesta de ruta de fragmentación de vitexina.

**Citiosido (Peak 19):** Se identificó en el  $t_R$  11.14 min un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  445.1151, su fragmentación produjo iones en el  $MS^2$  a  $m/z$  313.0739  $[M-H-C_{17}H_{13}O_6]^-$ ,  $m/z$  311.0559  $[M-H-C_{17}H_{11}O_6]^-$ ,  $m/z$  283.0619  $[M-H-C_{16}H_{11}O_5]^-$  característico (Ferrerres *et al.*, 2003; Uribe *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2008).

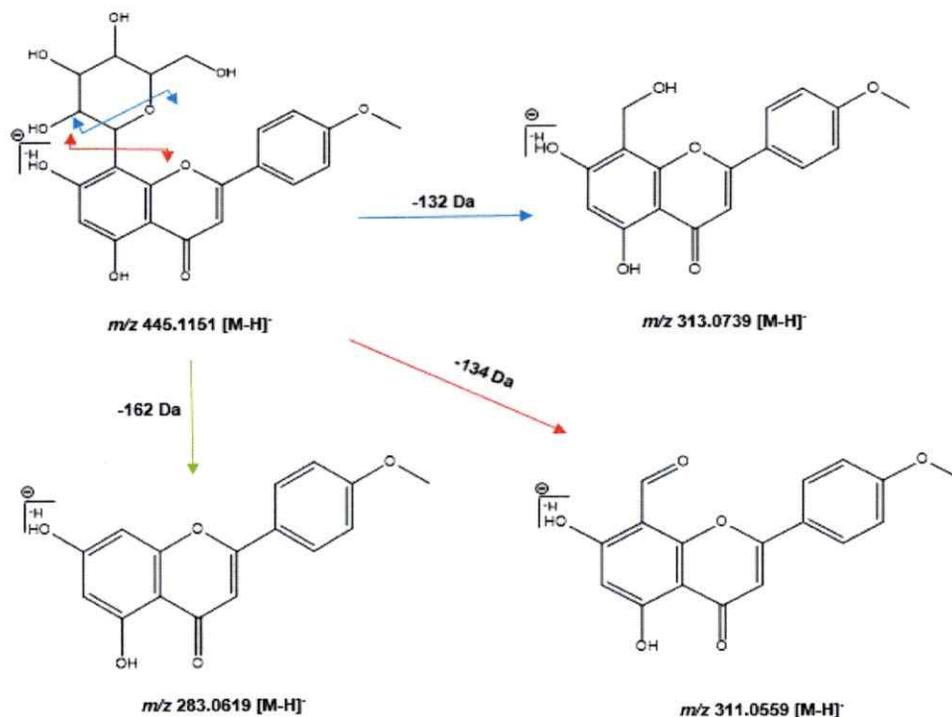


Figura 18. Propuesta de ruta de fragmentación de citiosido.

**Isómero de Citiosido (Peak 20):** Se detectó en el  $t_R$  11.45 min un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  445.1152 identificándose los iones diagnósticos en el  $MS^2$  a  $m/z$  311.0573  $[M-H-C_{17}H_{11}O_6]^-$ ,  $m/z$  283.0612  $[M-H-C_{16}H_{11}O_5]^-$  (Ferrerres *et al.*, 2003; Uribe *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2008).

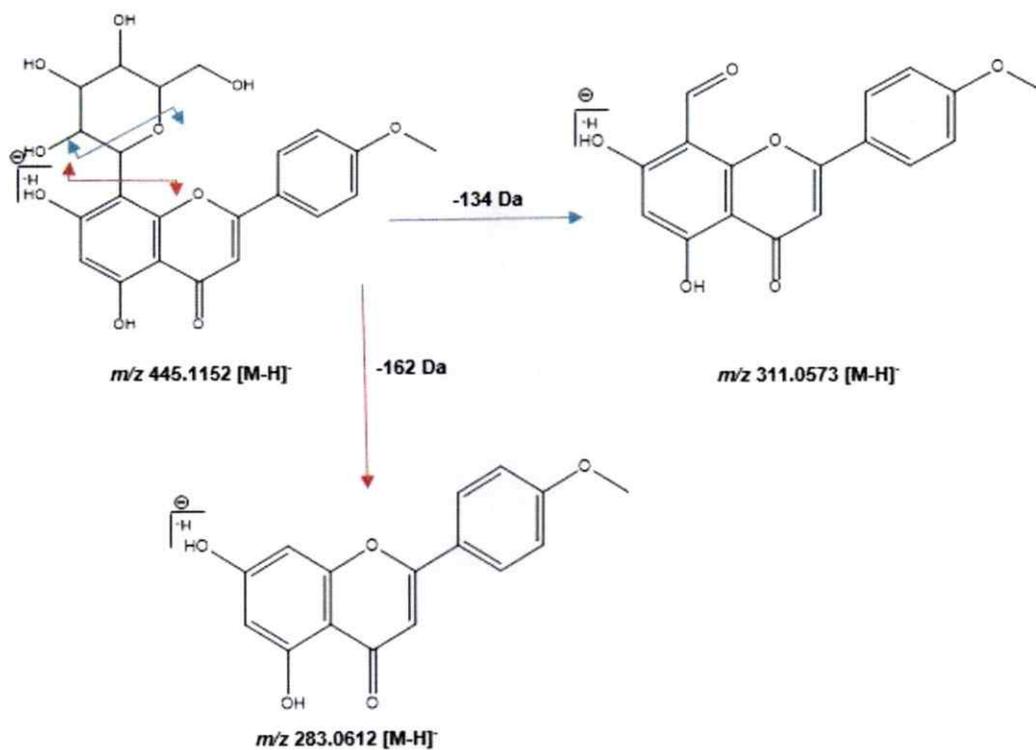


Figura 19. Propuesta de ruta de fragmentación de isómero de citosido.

**Isoramnetina (Peak 21):** En el  $t_R$  13.90 min se detectó un ión pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  315.0520 mostrando un ión diagnóstico a  $m/z$  300.0286 [M-H-C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>]<sup>-</sup> (Hossain *et al.*, 2010).

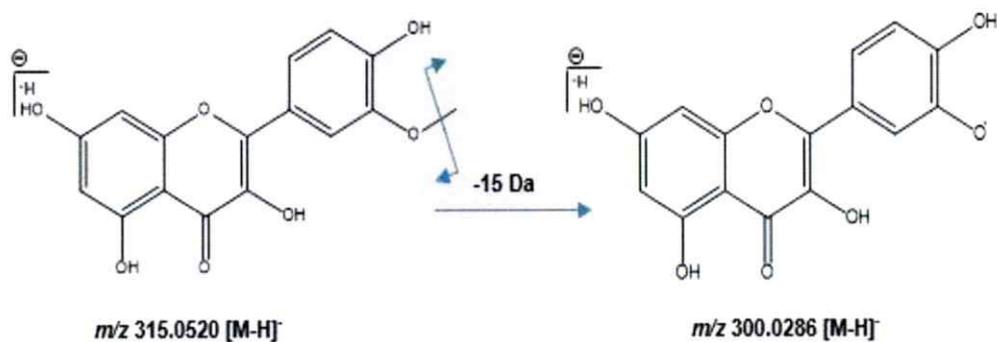


Figura 20. Propuesta de ruta de fragmentación de isoramnetina.

**Apigenina (Peak 22):** En el Peak 22 se identificó en el  $t_R$  16.44 min un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  269.0465, el ión progenitor produjo iones diagnósticos mostrando los iones en el  $MS^2$  a  $m/z$  149.0240  $[M-H-C_8H_5O_3]^-$ ,  $m/z$  133.0296  $[M-H-C_8H_5O_2]^-$ ,  $m/z$  117.0341  $[M-H-C_8H_5O]^-$  característico (Abu-Reidah *et al.*, 2013).

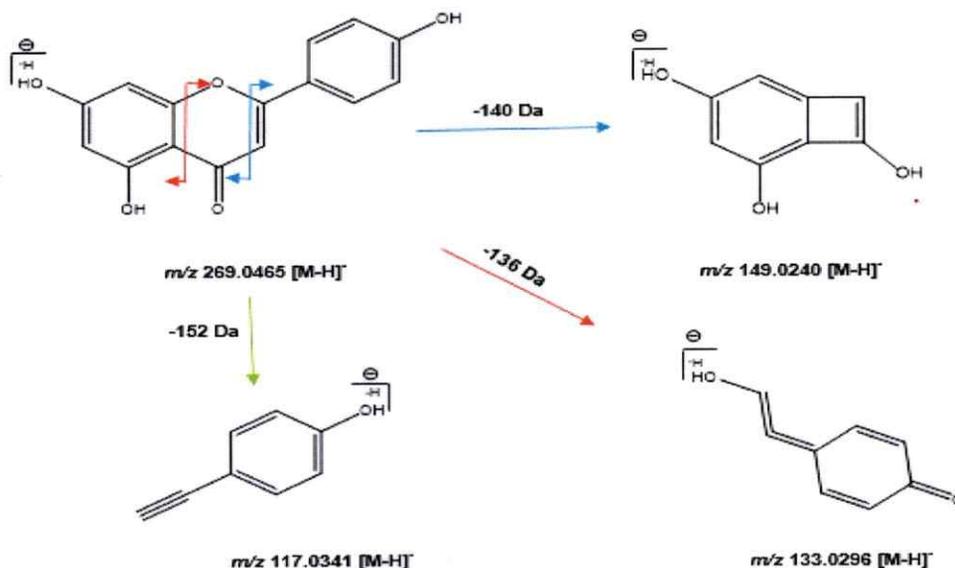


Figura 21. Propuesta de ruta de fragmentación de apigenina.

**Diosmetina (4'-o-metil- luteolina) (Peak 23):** Detectado en el  $t_R$  16.77 min un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  299.0570, presentando un ión diagnóstico a  $m/z$  285.0362  $[M-H-C_{15}H_9O_6]^-$  (Jiménez-González *et al.*, 2018).

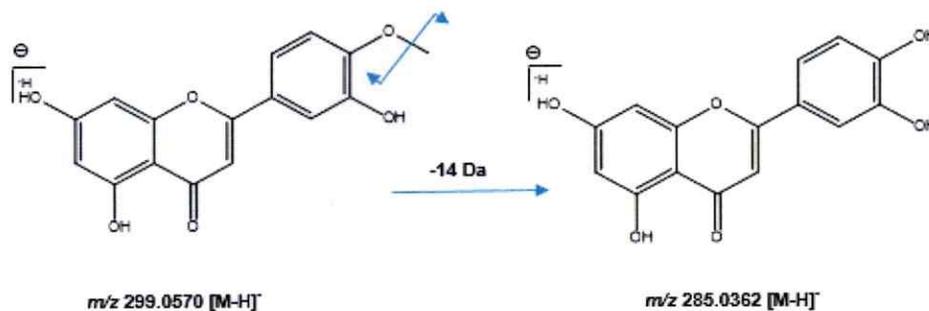


Figura 22. Propuesta de ruta de fragmentación de diosmetina (4'-O-metil-luteolina).

**Dimetilquercetina (Peak 24):** En el  $t_R$  18.24 min un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  329.2343, se detectó un ión diagnóstico a  $m/z$  299.0571  $[M-H-C_{15}H_7O_7]^-$  característico (Simirgiotis *et al.*, 2017).

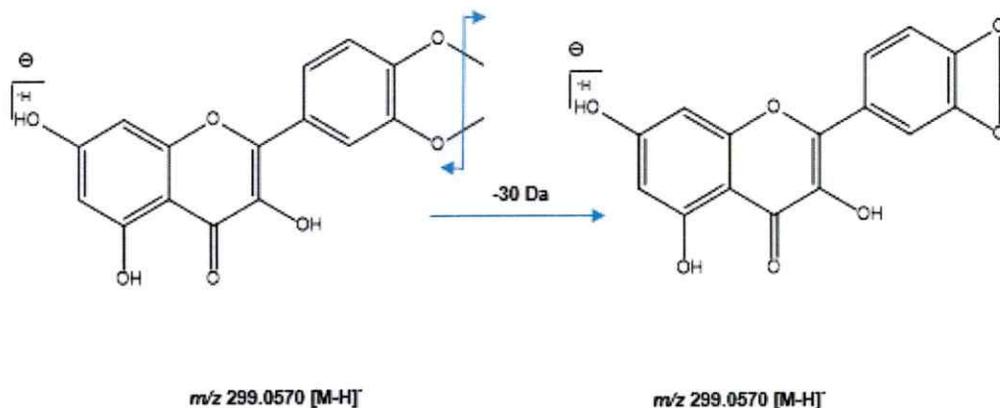


Figura 23. Propuesta de ruta de fragmentación de dimetilquercetina.

**Kaempferol-7-O-glucósido (Peak 15):** Fue detectado en el  $t_R$  10.45 un ión molecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  447.0994 mostrando un ión fragmento característico en el  $MS^2$  a  $m/z$  327.0523  $[M-H-C_{17}H_{11}O_7]^-$  (Ibrahima *et al.*, 2015).

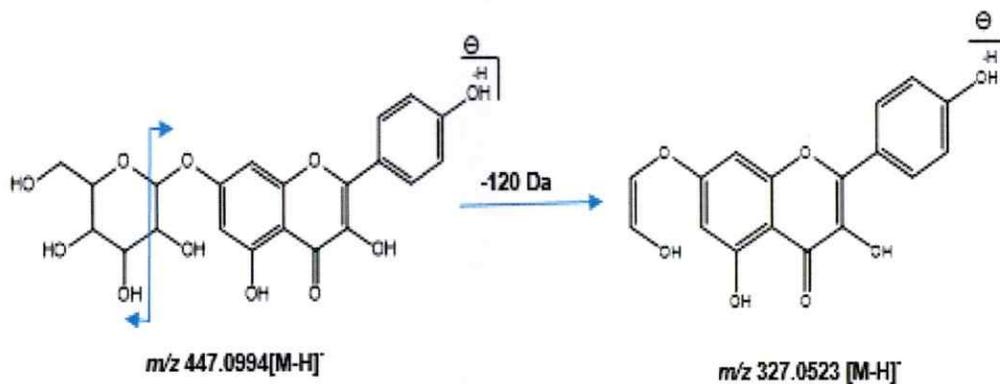


Figura 24. Propuesta de ruta de fragmentación de kaempferol-7-O-glucósido.

**Isómero de Kaempferol-7-O-glucósido (Peak 16):** En el  $t_R$  10.68 se identificó un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  447.0943 detectando un ión diagnóstico en el  $MS^2$  a  $m/z$  327.0519  $[M-H-C_{17}H_{11}O_7]^-$ , (Ibrahima *et al.*, 2015).

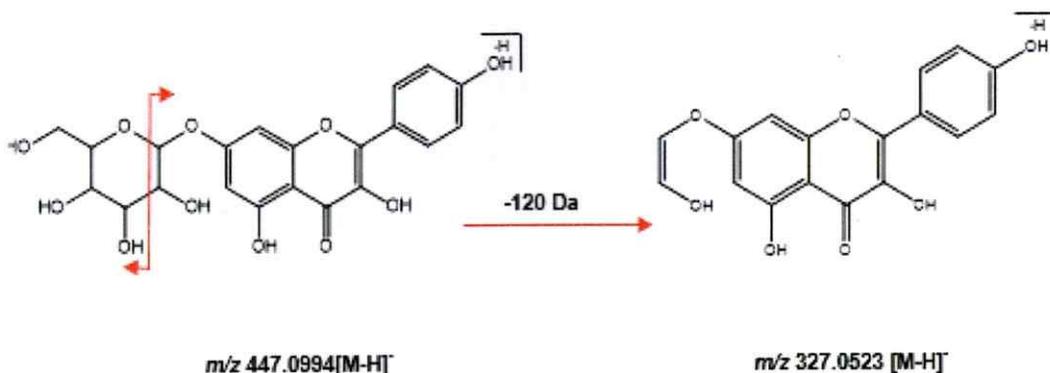


Figura 25. Propuesta de ruta de fragmentación de isómero de kaempferol-7-O-glucósido.

**Otros compuestos:** Fueron identificados otros compuestos como: **aldopentosa** (Peaks 2 y 4) presentaron un ión  $[M-H]^-$  a  $m/z$  149.0451 sin poder detectar iones fragmentos en el  $MS^2$ . **Derivados de prolina** (Peaks 13 y 14) presentando iones  $[M-H]^-$  a  $m/z$  431.1933 y  $m/z$  380.2090 respectivamente, ambos compuestos mostraron un ión diagnóstico en el  $MS^2$  a  $m/z$  114.0554 característico.

**Compuesto desconocido:** Un solo compuesto fue detectado en el extracto metanólico de raíz de *H. aromaticum* pero no identificado en el peak 1 y 3 presentando el mismo ión molecular  $[M-H]^-$  con  $m/z$  377.0865.

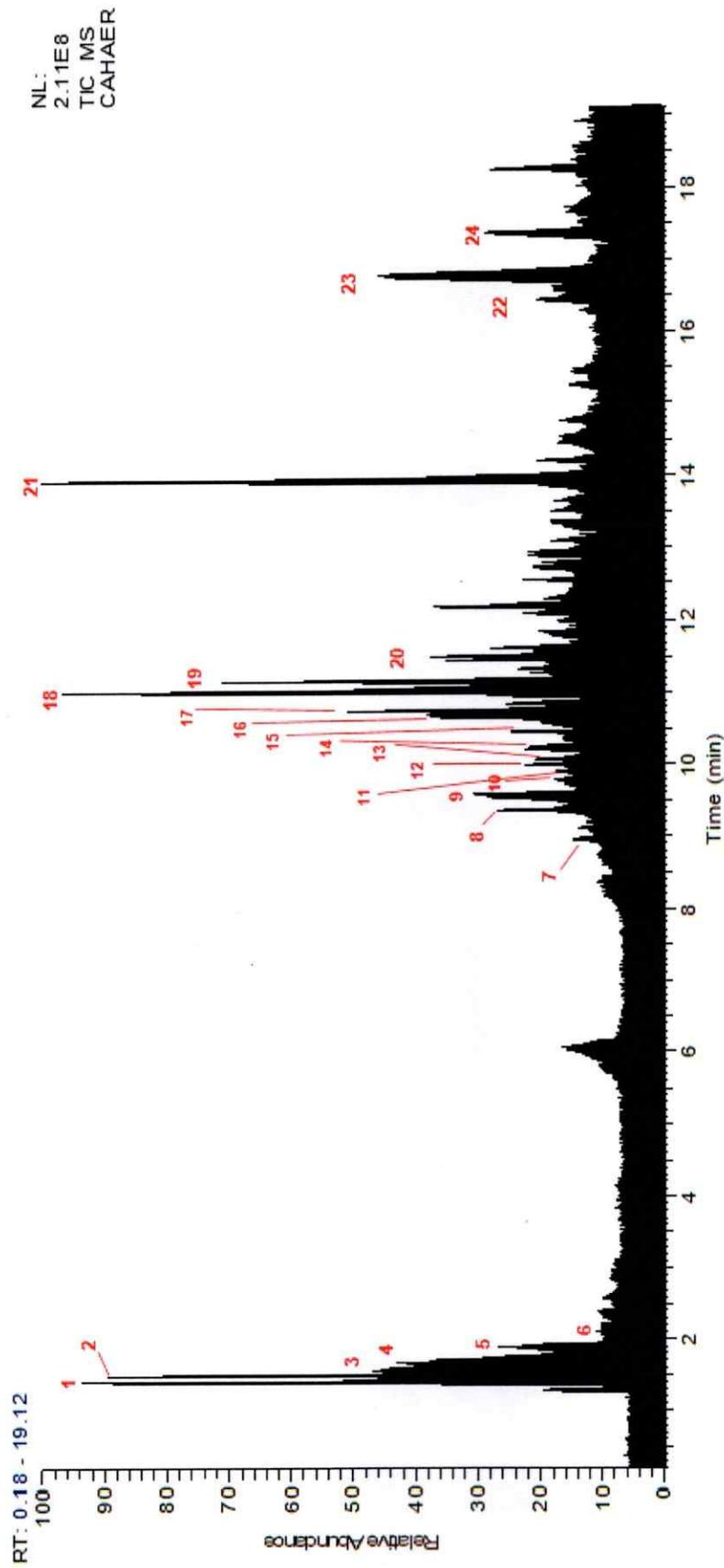


Figura 26. Cromatograma de UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS cromatograma de la raíz de *H. aromaticum*.

Tabla 3. Identificación de compuestos en el extracto metanólico de raíz de *H. aromaticum* por UHPLC Q/Orbitrap/ESI/MS/MS.

Peak #	Identificación tentativa	[M-H] <sup>-</sup>	Tiempo de retención (min.)	Masa teórica (m/z)	Masa experimental (m/z)	Exactitud (ppm)	MS <sup>2</sup> iones (ppm)	Clase de compuesto
1	Desconocido	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	1.38	377.0873	377.0865	2.1	-	-
2	Aldopentosa	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	1.48	149.0450	149.0451	-0.7	-	-
3	Desconocido	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	1.56	377.0873	377.0866	1.9	-	-
4	Aldopentosa	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	1.67	149.0450	149.0452	-1.3	-	-
5	Ácido cítrico o isocítrico	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	1.89	191.0192	191.0197	-2.6	111.0080	AO
6	Ácido succínico	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	2.10	117.0188	117.0188	0.0	-	AO
7	Ácido dihidroxibenzoico pentósido	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	8.75	285.0610	285.0625	-5.3	108.0209 153.0189	AF
8	Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	9.36	353.0873	353.0888	-4.2	191.0561	AH
9	Apigenina-C-hexosido-C-hexosido	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	9.55	593.1506	593.1526	-3.4	431.0988 161.0239	F
10	6,7-dihidroximarina (esculetina)	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	9.74	177.0188	177.0193	-2.8	133.0288 121.0289	C
11	Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	9.85	179.0344	179.0349	-2.8	135.0446	AH

12	Isómero de Apigenina-C-hexosido-C-hexosido	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub>	9.99	593.1506	593.1527	-3.5	161.0242 431.0999	F
13	Derivado de prolina	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	10.08	431.1971	431.1933	8.8	114.0554	A
14	Derivado de prolina	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> N	10.22	380.2073	380.2090	-4.5	114.0553	A
15	Kaempferol-7-O-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	10.45	447.0927	447.0944	-3.8	327.0523	F
16	Isómero Kaempferol-7-O-glucósido	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	10.68	447.0927	447.0943	-3.6	327.0519	F
17	Acido cafeico pentósido	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	10.75	311.0767	311.0781	-4.5	149.0449 179.0347	AH
18	Vifexina	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	11.00	431.0978	431.0994	-3.7	283.0612 297.0394 299.0572	F
19	Citísosido	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	11.14	445.1135	445.1151	-3.6	283.0619 311.0559	F
20	Isómero de Citísosido	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	11.45	445.1135	445.1152	-3.8	283.0612 311.0573	F
21	Isoramnetina	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	13.90	315.0505	315.0520	-4.8	300.0286	F
22	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	16.44	269.0450	269.0465	-5.6	117.0341 149.0240 133.0296	F

23	Diosmetina (4'-o-metil- luteolina)	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	16.77	299.0556	299.0570	-4.7	285.0362	F
24	Dimetilquercetina	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	18.24	329.2328	329.2343	-4.6	299.0571	F

F: Flavonoide

AH: Ácido hidroxicinámico

A: Aminoácido

AF: Ácidos fenólicos

AO: Ácidos orgánicos

C: Cumarina

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Preparación de extractos naturales para la búsqueda de moléculas de anti-virulencia

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de muchas enfermedades está asociado a la medicina popular en diferentes partes del mundo (Araújo and Leon, 2001). El interés de descubrir extractos vegetales con diferentes actividades biológicas ha aumentado en los últimos años. En este contexto, plantas que presentan actividades antioxidantes son de gran interés por la presencia de radicales libres, las cuales están asociados a diversos factores como mutaciones del DNA, oxidación de proteínas y peroxidación lipídica que contribuyen al desarrollo de cáncer, diabetes, arteriosclerosis, procesos antiinflamatorios y envejecimientos (Finkel and Holbrook, 2000). Asimismo, las plantas que presentan actividad antimicrobiana también son de extrema importancia debido al hecho que muchos microorganismos que presentan resistencia, no solo a los antibióticos ya establecidos sino también a los de la última generación, causan graves problemas de salud pública (Fabri *et al.*, 2011). Por lo tanto, en este trabajo de tesis, se propuso la preparación de extractos de la especie *H. aromaticum*, considerando que pertenece a la familia Asteraceae, conocida por sus propiedades terapéuticas, cosméticas y aromáticas. Particularmente, es relatado en la literatura el uso medicinal de esta familia como antihelmíntico, antiinflamatorio, adstringente, colestérico, antihemorrágico, antimicrobiana, diurético, analgésico y antiespasmódico (Fabri *et al.*, 2011).

En este trabajo se obtuvieron 6 extractos totales (3 extractos diclorometanos y 3 extractos metanólicos) de las diferentes partes de la planta (flor, tallo-hoja y raíz), y se evaluó su citotoxicidad mediante el modelo biológico *D. discoideum* y en busca de moléculas que reduzcan los factores de virulencia (anti-virulencia) contra la cepa patógena (*Klebsiella*

*pneumoniae* RYC 492).

La mayoría de las plantas medicinales tienen un margen de seguridad amplio, pero puede ocurrir que si se sobrepasan determinadas concentraciones plasmáticas pueden llegar a ser tóxicas. Aun así tomándolas de forma correcta, pueden interactuar con otros medicamentos que tienen márgenes de seguridad muy estrechos, por lo que se produce un problema de seguridad (González, 2013). Con el objetivo de determinar tanto la eficacia de los extractos de *H. aromaticum* como planta medicinal que tiene un efecto farmacológico, así como su seguridad, sugerimos a la ameba social *D. discoideum* como modelo biológico para estos fines.

#### **4.2 *Dictyostelium discoideum* como modelo biológico para evaluar citotoxicidad de extractos naturales**

En la actualidad, para evaluar a gran escala el potencial de compuestos con actividad antimicrobiana es un inconveniente ético el uso de modelos murinos para los ensayos de infección. Otras de las razones que nos llevó a la utilización de este modelo es la importancia que presenta para la evaluación de drogas para los humanos, ya que comparte con la célula de eucariontes superiores varios procesos celulares y genes homólogos adyacentes (Williams *et al.*, 2005) Además, la membrana plasmática está directamente expuesta al medio extracelular y su composición no es muy diferente a la de éstos, excepto que el colesterol es sustituido por ergosterol y que entre los residuos de carbohidratos de proteínas o glicolípidos el ácido siálico está ausente (West *et al.*, 1978). Por los estudios realizados de la ameba social, se ha usado para ensayos farmacológicos, donde se ha demostrado que drogas que afectan las células de mamíferos, han sido efectivas también en este modelo aunque en algunos casos en concentraciones más altas (Bravo-Toncio *et al.*, 2016).

El uso exitoso de la ameba social *D. discoideum* tanto para ensayos de virulencia como de citotoxicidad nos permitió proponer en esta tesis la búsqueda de extractos naturales de la planta *H. aromaticum* contra cepas virulentas de *K. pneumoniae* mediante el uso de la ameba *D. discoideum*, los cuales no presenten un efecto citotóxico contra este hospedero. Particularmente y relacionado con el uso de esta ameba en ensayos citotóxicos, se ha encontrado que las seaflavinas del té negro (Ilacqua *et al.*, 2017), los monoterpenos (Hwang and Kim, 2002) y naringenin (Waheed *et al.*, 2014) tienen efectos citotóxicos pues inhiben el crecimiento, el desarrollo social o la motilidad de *D. discoideum*.

Los resultados de citotoxicidad positiva de todos los extractos de diclorometano de la planta *H. aromaticum* puede deberse a la presencia de terpenos que son extraídos por este solvente orgánico (Azmir *et al.*, 2013), De hecho hay estudios que demuestran que algunos monoterpenos como pineno, mentona, canfeno, carvona y fenchona, que se encuentran en el suelo de bosques de *Pinus thunbergii* afectan el desarrollo de *Dictyostelium discoideum* Ax2 (Hwang and Kim, 2002).

En contraste, los extractos de metanol de todas las partes (flor, tallo-hoja y raíz) de *H. aromaticum* no presentaron un retraso del ciclo desarrollo social de la ameba alcanzando la fase de culminación (formación de cuerpos fructíferos) en todas las condiciones ensayadas (25 µg, 50 µg y 100 µg). Esto puede ser por los compuestos terpénicos citotóxicos que no son extraídos con este solvente, los que se han reportado presentan compuestos fenólicos que son extraídos por el solvente orgánico metanol (Azmir *et al.*, 2013).

Estos resultados demuestran la eficacia del uso de la ameba social como una plataforma para la búsqueda de compuestos bioactivos que no tengan efectos citotóxicos. Esto permite no solo guiar la búsqueda sino también poder purificar las actividades terapéuticas deseadas de las citotóxicas que pueden tener efectos secundarios.

#### **4.3 La estrategia de anti-virulencia como reemplazo a la antibiótica para la obtención de nuevos antimicrobianos**

La resistencia a los antibióticos es un problema mundial que tiene muchas causas que pasan por el sobreuso de estos, la poca generación de nuevas moléculas por la industria farmacéutica, así como a los múltiples mecanismos de resistencia que tienen los microorganismos para resistir la eficacia de los antibióticos. Los antibióticos tienen en común que afectan a un proceso esencial de la bacteria como pueden ser la transcripción, la replicación, la síntesis de las proteínas y la pared celular entre muchos otros (Rasko *et al.*, 2008). Otro grave problema que tienen los antibióticos es que no solo afectan a los microorganismos patógenos que nos causan daño, sino también a miles y millones de microorganismos comensales beneficiosos que tenemos en nuestro cuerpo (Díaz-Ripoll, 2019). Es por esto que se hace necesario un cambio de la estrategia para combatir los microorganismos patógenos.

Una de las estrategias que se ha propuesto es la de anti-virulencia, es decir combatir a las bacterias mediante la inhibición de los factores de virulencia (Cheng *et al.*, 2014). Esto no afectaría un proceso esencial que cause la muerte del microorganismo. Sin embargo, inhibiría a la bacteria de producir los factores de virulencia que le permiten causar un daño en el huésped.

Un ejemplo de estas es inhibir la adhesión bacteriana a la célula hospedera; inhibir las toxinas o los sistemas especializados de secreción; bloquear receptores bacterianos o interferir con la regulación de los genes relacionados con la virulencia (El-Mowafi *et al.*, 2015; Rasko and Sperandio, 2010; Taussig *et al.*, 2014). Otro de los sistemas más abordados es el sistema de comunicación bacteriana denominado Quorum Sensing (QS) (Rivas, 2017). Esta vía regula la expresión y producción coordinada de un amplio rango de factores de virulencia en diversos patógenos y son indispensables para la supervivencia bacteriana a condiciones adversas (Rasko *et al.*, 2008; Rasko and Sperandio, 2010; Starkey *et al.*, 2014).

Por esta razón el QS ha sido uno de los principales candidatos blancos para el desarrollo de drogas antimicrobianas para tratar infecciones agudas, crónicas o persistentes.

Otro blanco interesante abordado por nuestro laboratorio es la síntesis de los polifosfatos inorgánicos (poliP). Moléculas inhibitorias de la síntesis de este biopolímero importante en la virulencia en *P. aeruginosa*, tuvieron actividad de anti-virulencia contra este patógeno resistente a múltiples antibióticos y drogas (Bravo-Toncio *et al.*, 2016).

Debido al éxito en la utilización de la ameba social para la búsqueda de moléculas de anti-virulencia en *P. aeruginosa* y los ensayos de virulencia para cepas virulentas de *K. pneumoniae* (Marcoleta *et al.*, 2018), es que propusimos el uso de *D. discoideum* para la búsqueda de moléculas de anti-virulencia en los diferentes extractos de la planta *H. aromaticum* contra *K. pneumoniae* RYC 492.

Los resultados de la actividad de anti-virulencia de los diferentes extractos de partes de *H. aromaticum* (flor, tallo-hoja y raíz) mostraron que ninguna de los extractos de diclorometano presentaron actividad de anti-virulencia. En contraste, solo el extracto metanólico de raíz presenta actividad de anti-virulencia contra la cepa de *K. pneumoniae* RYC 492. Estos resultados confirman la hipótesis de que mediante el uso de la ameba *D. discoideum* se pudo encontrar extractos de la planta *H. aromaticum* con actividad de anti-virulencia contra la cepa patógena *K. pneumoniae* RYC 492 y sin efectos citotóxicas.

Una de las ventajas de diseñar este ensayo es la de descartar análisis químicos caros de aquellos extractos que muestren actividad citotóxica, como el extracto metanólico de raíz que fue el único que cumplió con los requerimientos mencionados en el estudio, los análisis de espectrometría de masa para la identificación mediante UHPLC-ESI-MS/MS solo se hizo a ese extracto, como se muestra en la Fig. 27.

Los compuestos tentativos detectados del extracto metanólico de raíz fueron mayoritariamente compuestos fenólicos (12 flavonoides, 3 ácidos hidroxicinámicos, 1 ácido fenólico y 2 ácidos orgánicos). Estos resultados coinciden con los resultados de estudios realizados en la raíz de la especie *Inula helenium* que pertenece a la familia Asteraceae (Spiridon *et al.*, 2013). También en el género Heleniun ha sido reportado compuestos fenólicos como flavonoides en otros 22 taxones (Bierner, 1973).

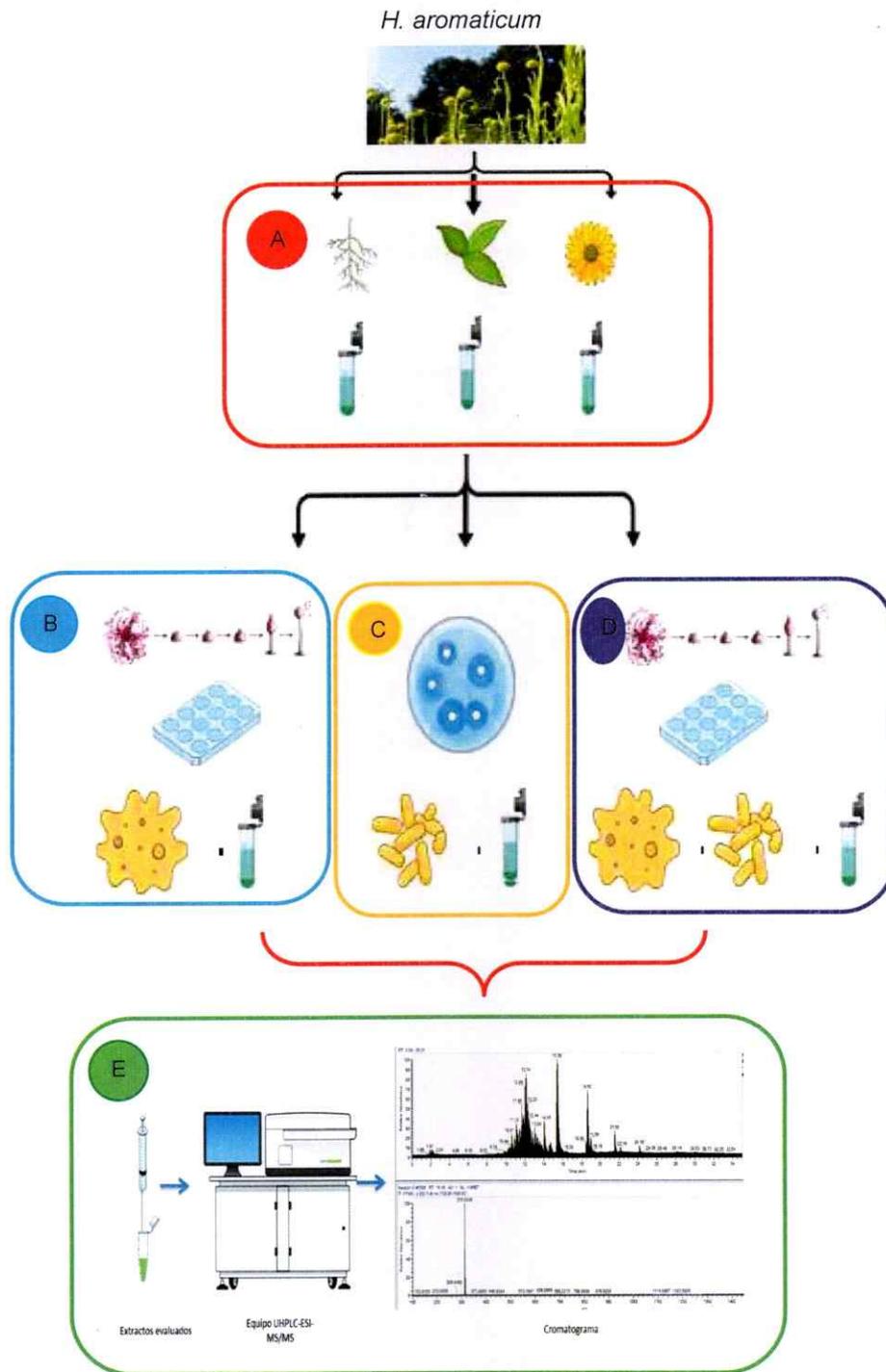
Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en plantas y son importantes en muchos aspectos de su vida, especialmente en las interacciones con el entorno ya que utilizan estos compuestos como en la defensa contra patógenos. Del mismo modo, los compuestos de tipo fenólico son los principales metabolitos secundarios con propiedades de anti-virulencia descritas hasta hora y específicamente los flavonoides son los más representativos (Silva *et al.*, 2016).

Por ello en los últimos años, las propiedades de anti-virulencia de los compuestos fenólicos se están descifrando ya que la mayoría de casos depende de la concentración del compuesto y del sistema bacteriano en que los compuestos fenólicos puedan exhibir efectos bactericidas o anti-virulencia (Silva *et al.*, 2016).

Otros estudios más específicos con los compuestos más purificados para saber exactamente cuáles de los 18 compuestos son los responsables de esta actividad de bloquear la virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492. Otros estudios demuestran que compuestos como la apigenina y kaempferol reducen la formación de biopelículas en *E. coli* y *V. harveyi* (Silva *et al.*, 2016). Además, que la apigenina causa un impacto significativo en la biomasa y polisacáridos contenidos en las biopelículas de *S. mutans*, inhibiendo glucosiltransferasas y fructosiltransferasas sin tener un impacto en la viabilidad bacteriana (Koo *et al.*, 2003). También disminuye la hemólisis sanguínea inducida por *S. aureus* (Naybi *et al.*, 2018). Otro

compuesto con actividad de anti-virulencia es la esculetina que inhibe la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* (Silva *et al.*, 2016). Finalmente el ácido cafeico presenta actividad inhibitoria sobre la formación de biopelículas en *Staphylococcus epidermis* por un mecanismo que no involucra la muerte bacteriana (Zimmer *et al.*, 2014). Estos compuestos se detectaron mediante UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS en el extracto metanólico de raíz que presenta actividad de anti-virulencia contra *K. pneumoniae* RYC 492. Una proyección de este trabajo es probar específicamente la capacidad de estos compuestos individuales para inhibir la virulencia de *K. pneumoniae*.

En resumen, en este trabajo de tesis se implementó una plataforma para la evaluación citotóxica de extractos de plantas mediante la utilización del modelo biológico *D. discoideum* y la búsqueda de moléculas con actividad de anti-virulencia sin efectos secundarios.



- A: Preparación de extractos naturales.
- B: Evaluación de citotóxica.
- C: Ensayo de antibiosis.
- D: Ensayo de anti-virulencia.

Figura 27. Desarrollo gráfico de los ensayos realizados.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo de desarrollo social con la ameba *D. discoideum* para evaluar citotoxicidad de extractos naturales o metabolitos secundarios y en la búsqueda de moléculas con actividad de anti-virulencia.
2. Los extractos de diclorometano de la especie *H. aromaticum* resultaron citotóxicos en las condiciones evaluadas (25 µg, 50 µg y 100 µg) retrasando el desarrollo social de la ameba. En comparación con los extractos metanólicos, no retrasaron el desarrollo social de la ameba es decir no presentaron citotoxicidad.
3. La evaluación de antibiosis de los extractos de diclorometano y metanol no presentaron halos de inhibición contra la cepa *K. pneumoniae* RYC 492.
4. El extracto metanólico de raíz presenta actividad de anti-virulencia contra la cepa de *K. pneumoniae* RYC 492 permitiendo el desarrollo social de ameba en comparación con los controles evaluados.
5. Se detectaron tentativamente 24 compuestos, en su mayoría 18 compuestos fenólicos (11 flavonoides, 3 ácidos hidroxicinámicos, 1 ácido fenólico, 1 cumarina y 2 ácidos orgánicos), mediante UHPLC-ESI-MS/MS del extracto metanólico de raíz de la especie *H. aromaticum*.
6. Mediante este estudio se pudo detectar e identificar moléculas que no afectan el desarrollo social de la ameba (no son citotóxicas) y que bloquean algunos factores de virulencia de *K. pneumoniae* RYC 492 (anti-virulencia).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). *Food Res. Int.* 51, 354–362. doi:10.1016/j.foodres.2012.12.033.
- Alcántar-Curiel, M. D., Blackburn, D., Saldaña, Z., Gayosso-Vázquez, C., Iovine, N., De la Cruz, M. A., *et al.* (2013). Multi-functional analysis of *Klebsiella Pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* 4, 129–138. doi:10.4161/viru.22974.
- Angelo, P. M., and Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 66, 1–9. Available at: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>.
- Araújo, C. A. C., and Leon, L. L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 723–728. doi:10.1590/S0074-02762001000500026.
- Asensio, C., Pérez-Díaz, J. C., Martínez, M. C., and Baquero, F. (1976). A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 7–14. doi:10.1016/S0006-291X(76)80264-1.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., *et al.* (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- Basu, S., Fey, P., Pandit, Y., Dodson, R., Kibbe, W. A., and Chisholm, R. L. (2013). DictyBase 2013: Integrating multiple Dictyostelid species. *Nucleic Acids Res.* 41, 676–683. doi:10.1093/nar/gks1064.
- Belguith-Hadriche, O., Ammar, S., Contreras, M. del M., Fetoui, H., Segura-Carretero, A., El Feki, A., *et al.* (2017). HPLC-DAD-QTOF-MS profiling of phenolics from leaf extracts of two Tunisian fig cultivars: Potential as a

- .functional food. *Biomed. Pharmacother.* 89, 185–193.  
doi:10.1016/j.biopha.2017.02.004.
- Bierner, M. W. (1973). Chemosystematic aspects of flavonoid distribution in twenty-two taxa of Helenium. *Biochem. Syst. Ecol.* 1, 55–57.  
doi:10.1016/0305-1978(73)90036-7.
- Bozzaro, S., and Eichinger, L. (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr. Drug Targets* 12, 942–54. doi:10.2174/138945011795677782.
- Bravo-toncio, C., Álvarez, J. A., Campos, F., Ortíz-severín, J., Varas, M., Cabrera, R., *et al.* (2016). *Dictyostelium discoideum* as a surrogate host-microbe model for antivirulence screening in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1–7.  
doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.02.005.
- Bravo-Toncio, C., Álvarez, J. A., Campos, F., Ortíz-Severín, J., Varas, M., Cabrera, R., *et al.* (2016). *Dictyostelium discoideum* as a surrogate host-microbe model for antivirulence screening in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 403–409.  
doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.02.005.
- Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., and Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules* 19, 17400–17421. doi:10.3390/molecules191117400.
- Broberg, C. A., Palacios, M., and Miller, V. L. (2014). *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 6. doi:10.12703/P6-64.
- Cano, V., March, C., Insua, J. L., Aguiló, N., Llobet, E., Moranta, D., *et al.* (2015). *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell. Microbiol.* 17, 1537–1560.  
doi:10.1111/cmi.12466.
- Carolina Martínez-Torres, A., Concepción Uscanga-Palomeque, A., and

- Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. 269–312. doi:10.3926/oms.318.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., *et al.* (2014). Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2014.00217.
- Chisholm, R. L., and Firtel, R. A. (2004). Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 531–541. doi:10.1038/nrm1427.
- Ciccío, J. F., Calzada, J. G., Montero, W., and Poveda, L. J. (1977). Estudio fitoquímico preliminar de plantas de la familia Compositae de Costa Rica. I. Lactonas sesquiterpénicas.
- Clegg, S., and Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Spectr.* 4. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.
- Cosson, P., and Soldati, T. (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 271–276. doi:10.1016/j.mib.2008.05.005.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–82. doi:0893-8512/99/\$04.00□□.
- Díaz-Ripoll, L. (2019). Microbioma y la alimentación funcional.
- Díaz, A., Rodríguez, H., and Scull, R. (2011). Cytotoxicity of medicinal plant extracts on the human lung carcinoma cell line A549. *Rev. Cuba. Farm.* 45, 101–108. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79955527684&partnerID=40&md5=f9a767335a4d20c40163b4e04e9fb12e>.
- Echeverri-Toro, L. M., Rueda, Z. V., Maya, W., Agudelo, Y., and Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Rev. Chil. infectología* 29, 175–182. doi:10.4067/S0716-10182012000200009.
- Eichinger, I., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R., Berriman, M., *et al.* (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium*

- discoideum. *Nature* 435, 43–57. doi:10.1038/nature03481.
- El-Mowafi, S. A., Sineva, E., Alumasa, J. N., Nicoloff, H., Tomsho, J. W., Ades, S. E., *et al.* (2015). Identification of inhibitors of a bacterial sigma factor using a new high-throughput screening assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 193–205. doi:10.1128/AAC.03979-14.
- Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013). From amoeba to macrophages: Exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 376, 1–34. doi:10.1007/82-2013-351.
- Fabri, R. L., Nogueira, M. S., Dutra, L. B., Bouzada, M. L. M., and Scio, E. (2011). Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família asteraceae. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13, 183–189. doi:10.1590/S1516-05722011000200009.
- Ferreres, F., Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., and Ferreira, M. A. (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.* 14, 352–359. doi:10.1002/pca.727.
- Fey, P., Kowal, A. S., Gaudet, P., Pilcher, K. E., and Chisholm, R. L. (2007). Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nat. Protoc.* 2, 1307–1316. doi:10.1038/nprot.2007.178.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Francione, L. M., Annesley, S. J., Carilla-Latorre, S., Escalante, R., and Fisher, P. R. (2011). The *Dictyostelium* model for mitochondrial disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 120–130. doi:10.1016/j.semcdb.2010.11.004.
- Glavis-Bloom, J., Muhammed, M., and Mylonakis, E. (2012). “Of model hosts and man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research,” in, ed. E. Mylonakis *et al.* (eds.), 11–17. doi:10.1007/978-1-4419-5638-5.
- González, P. (2013). “Evidencias sobre la seguridad y toxicidad de las plantas

medicinales.”

- Granica, S., Czerwińska, M. E., Piwowarski, J. P., Ziaja, M., and Kiss, A. K. (2013). Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *J. Agric. Food Chem.* 61, 801–810. doi:10.1021/jf304002h.
- Guillen, G., and Hernández, E. (2016). Determinación de la toxicidad sub crónica del extracto n-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia* (JUANISLAMA) en ratones NIH.
- Hernández, M., and C. Mendoza (2014). Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “manzanilla macho” y evaluación de la actividad antibacteriana.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., and Barry-Ryan, A. C. (2010). Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10576–10581. doi:10.1021/jf102042g.
- Hoyos, A., Rivera, O., Hoyos, C., Mesa, C., and Alfaro, M. (2007). Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *CES Med.* 21, 31–39.
- Hwang, J. Y., and Kim, J.-H. (2002). Effect of Monoterpenes on Growth of Cellular Slime Mold, *Dictyostelium discoideum* AX-2. *Plant Biol.* 45, 207–211.
- Hyle, E. P., Lipworth, A. D., Zaoutis, T. E., Nachamkin, I., Fishman, N. O., Bilker, W. B., *et al.* (2005). Risk Factors for Increasing Multidrug Resistance among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1317–1324. doi:10.1086/429239.
- Ibrahima, R. M., El-Halawany, A. M., Saleh, D. O., El Naggat, E. M. B., EL-Shabrawy, A. E. R. O., and El-Hawary, S. S. (2015). HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *securigera securidaca* flowers and its anti-

- hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Brazilian J. Pharmacogn.* 25, 134–141. doi:10.1016/j.bjp.2015.02.008.
- Ilacqua, A. N., Shettler, J. A., Wernke, K. M., Skalla, J. K., and McQuade, K. J. (2017). Theaflavins from black tea affect growth, development, and motility in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491, 449–454. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.058.
- Jiménez-González, A., Quispe, C., Bórquez, J., Sepúlveda, B., Riveros, F., Areche, C., *et al.* (2018). UHPLC-ESI-ORBITRAP-MS analysis of the native Mapuche medicinal plant palo negro (*Leptocarpha rivularis* DC.–Asteraceae) and evaluation of its antioxidant and cholinesterase inhibitory properties. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33, 936–944. doi:10.1080/14756366.2018.1466880.
- Joseph-Nathan, P., and Romo, J. (1963). The constituents of *Helenium aromaticum* (HOOK) BAILEY. *Tetrahedron* 20.
- Koo, H., Hayacibara, M. F., Schobel, B. D., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K., *et al.* (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and ft-farnesol. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 782–789. doi:10.1093/jac/dkg449.
- Leal, A. L., Eslava Schmalbach, J., Álvarez, C., Buitrago, G., and Méndez, M. (2006). Canales Endémicos y Marcadores de Resistencia Bacteriana, en Instituciones de Tercer nivel de Bogota, Colombia. *Rev. Salud Pública* 8, 59–70. doi:10.1590/S0124-00642006000400006.
- Ledesma-Escobar, C. A., Priego-Capote, F., and Luque De Castro, M. D. (2015). Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *J. Mass Spectrom.* 50, 1196–1205. doi:10.1002/jms.3637.
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., and Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 91, 131–137. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.056.

- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., and Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 9, 1071–1081. doi:10.2217/fmb.14.48.
- Ludwig, E., Francisco, R.-C., Francisco, R., Fey, P., Gaudet, P., Pilcher, K. E., et al. (2006). dictyBase and the Dicty Stock Center. *Dictyostelium discoideum Protoc.* 346, 51–74. doi:10.1385/1-59745-144-4:51.
- Marcoleta, A. E., Varas, M. A., Ortiz-Severín, J., Vásquez, L., Berríos-Pastén, C., Sabag, A. V., et al. (2018). Evaluating Different Virulence Traits of *Klebsiella pneumoniae* Using *Dictyostelium discoideum* and Zebrafish Larvae as Host Models. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–20. doi:10.3389/fcimb.2018.00030.
- Maroncle, N., Rich, C., and Forestier, C. (2006). The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Res. Microbiol.* 157, 184–193. doi:10.1016/j.resmic.2005.06.006.
- Martínez, J. L., and Castillo, G. (2008). Flora de Veracruz. *Resedaceae* 48, 2–8. doi:ISSN 0187-425X.
- Meijer, A. H., and Spaink, H. P. (2011). Host-Pathogen Interactions Made Transparent with the Zebrafish Model. *Curr. Drug Targets* 12, 1000–1017. doi:10.2174/138945011795677809.
- Naczki, M., and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- Naybi, M., García, R., Pérez, M., and Castillo, I. (2018). Phenolic Compounds with Anti-virulence Properties. *Long-Haul Travel Motiv. by Int. Tour. to Penang* i, 13.
- Paczosa, M. K., and Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 629–661. doi:10.1128/MMBR.00078-15.
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Control* 34, 20–28.

doi:10.1016/j.ajic.2006.05.238.

- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657–686. doi:10.1128/CMR.18.4.657.
- Peña, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallarés, R., Liñares, J., *et al.* (2001). An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J. Hosp. Infect.* 47, 53–59. doi:10.1053/jhin.2000.0862.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M., and Bonomo, R. A. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 459–469. doi:10.1016/j.coph.2007.08.003.
- Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. *J. Clin. Microbiol.* 11, 589–603.
- Rasko, D. A., Moreira, C. G., Li, D. R., Reading, N. C., Ritchie, J. M., Waldor, M. K., *et al.* (2008). Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. *Science (80-. )*, 1078–1080.
- Rasko, D. A., and Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117–128. doi:10.1038/nrd3013.
- Riquelme, S., Varas, M., Valenzuela, C., Velozo, P., Chahin, N., Aguilera, P., *et al.* (2016). Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella typhimurium* to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front. Microbiol.* 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.01305.
- Rivas, C. (2017). Nuevas Estrategias Antimicrobianas: Antagonistas Del Quorum Sensing. *Ribas Villaverde, Carlos*, 1–19.
- Salgado, F., Albornoz, L., Cortéz, C., Stashenko, E., Urrea-Vallejo, K., Nagles, E., *et al.* (2018). Secondary metabolite profiling of species of the genus

- usnea by UHPLC-ESI-OT-MS-MS. *Molecules* 23, 1–16. doi:10.3390/molecules23010054.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 7, 979–990. doi:10.2217/fmb.12.68.
- Sefidkon, F., and Omidbaigi, R. (2004). Essential oil composition of *Cephalophora aromatica* cultivated in Iran. *Flavour Fragr. J.* 19, 153–155. doi:10.1002/ffj.1286.
- Shahraki-Zahedani, S., Moghadampour, M., Bokaeian, M., and Ansari-Moghaddam, A. (2016). Prevalence of CTX-M-8 and CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamases between *Klebsiella pneumoniae* spp. isolated from Zahedan, Southeast Iran. *J. Chemother.* 28, 343–345. doi:10.1179/1973947815Y.0000000008.
- Shi, Y., Wu, C., Chen, Y., Liu, W., Feng, F., and Xie, N. (2013). Comparative analysis of three *Callicarpa* herbs using high performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization-trap mass spectrometry method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75, 239–247. doi:10.1016/j.jpba.2012.11.038.
- Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., and Trentin, D. S. (2016). Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem. Rev.* 116, 9162–9236. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00184.
- Simirgiotis, M. J., Quispe, C., Mocan, A., Villatoro, J. M., Areche, C., Bórquez, J., et al. (2017). UHPLC high resolution orbitrap metabolomic fingerprinting of the unique species *Ophryosporus triangularis meyen* from the atacama desert, Northern Chile. *Brazilian J. Pharmacogn.* 27, 179–187. doi:10.1016/j.bjp.2016.10.002.
- Spiridon, I., Nechita, C. B., Niculaua, M., Silion, M., Armatu, A., Teacă, C. A., et al. (2013). Antioxidant and chemical properties of *Inula helenium* root extracts. *Cent. Eur. J. Chem.* 11, 1699–1709. doi:10.2478/s11532-013-0295-3.
- Starkey, M., Lepine, F., Maura, D., Bandyopadhaya, A., Lesic, B., He, J., et al.

- (2014). Identification of Anti-virulence Compounds That Disrupt Quorum-Sensing Regulated Acute and Persistent Pathogenicity. *PLoS Pathog.* 10. doi:10.1371/journal.ppat.1004321.
- Sucgang, R., Kuo, A., Tian, X., Salerno, W., Parikh, A., Feasley, C. L., *et al.* (2011). Comparative genomics of the social amoebae *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium purpureum*. *Genome Biol.* 12. doi:10.1186/gb-2011-12-2-r20.
- Sylvain, F., and Grimont, P. (2006). The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes* 6, 159–196. doi:10.1007/0-387-30746-x.
- Tafur, D., and Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio* 12, 217–226. doi:http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos\_de\_resistencia\_a\_los\_antibioticos\_en\_bacterias\_gram\_negativas.pdf.
- Taussig, R., Stewart, D., Zimmern, P., Lu, B., Prasad, R. N., Zhu, C., *et al.* (2014). QseC Inhibitors as an Antivirulence Approach for Gram-Negative Pathogens. *MBio* 5, 1–11. doi:10.1128/mBio.02165-14.Editor.
- Uribe, J., Zamora, J., Bañuelos, J., Kachlicki, P., Stobiecki, M., and García, P. (2014). Flavonoid profile of *Lupinus mexicanus* germinated seed extract and evaluation of its neuroprotective effect. *Histol Histopathol* 29, 1415–1421.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Alvarenga, J. F. R., Martínez-Huelamo, M., Leal, L. N., and Lamuela-Raventos, R. M. (2015). Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. *Food Sci. Technol.* 35, 189–195. doi:10.1590/1678-457x.6580.
- Varas, M. A., Riquelme-Barrios, S., Valenzuela, C., Marcoleta, A. E., Berríos-Pastén, C., Santiviago, C. A., *et al.* (2018). Inorganic polyphosphate is essential for *Salmonella Typhimurium* Virulence and survival in *Dictyostelium discoideum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–18.

doi:10.3389/fcimb.2018.00008.

- Waheed, A., Ludtmann, M. H. R., Pakes, N., Robery, S., Kuspa, A., Dinh, C., *et al.* (2014). Naringenin inhibits the growth of Dictyostelium and MDCK-derived cysts in a TRPP2 (polycystin-2)-dependent manner. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2659–2670. doi:10.1111/bph.12443.
- Wallace, R. J. (2007). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 621–629. doi:10.1079/PNS2004393.
- West, C., McMahon, D., and Moldays, R. (1978). Identification of glycoproteins, using lectins as probes, in plasma membranes from Dictyostelium discoideum and human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 253, 1716–1724.
- Williams, J. G., Noegel, A. A., and Eichinger, L. (2005). Manifestations of multicellularity: Dictyostelium reports in. *Trends Genet.* 21, 392–398. doi:10.1016/j.tig.2005.05.002.
- Zheng, M. S., Hwang, N. K., Kim, D. H., Moon, T. C., Son, J. K., and Chang, H. W. (2008). Chemical constituents of Melandrium firmum Rohrbach and their anti-inflammatory activity. *Arch. Pharm. Res.* 31, 318–322. doi:10.1007/s12272-001-1158-9.
- Zimmer, K. R., Blum-Silva, C. H., Souza, A. L. K., WulffSchuch, M., Reginatto, F. H., Pereira, C. M. P., *et al.* (2014). The Antibiofilm Effect of Blueberry Fruit Cultivars Against Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa. *J. Med. Food* 17, 324–331. doi:10.1089/jmf.2013.0037.
- Zou, L., Li, X., Shi, Q., and Feng, F. (2014). An effective integrated method for comprehensive identification of eighty-five compounds in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC-DAD-ESI-MS (TOF) and HPLC-DAD-ESI-MS/MS (QqQ) without the help of reference standards. *Anal. Methods* 6, 4312–4327. doi:10.1039/c4ay00219a.

## 7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

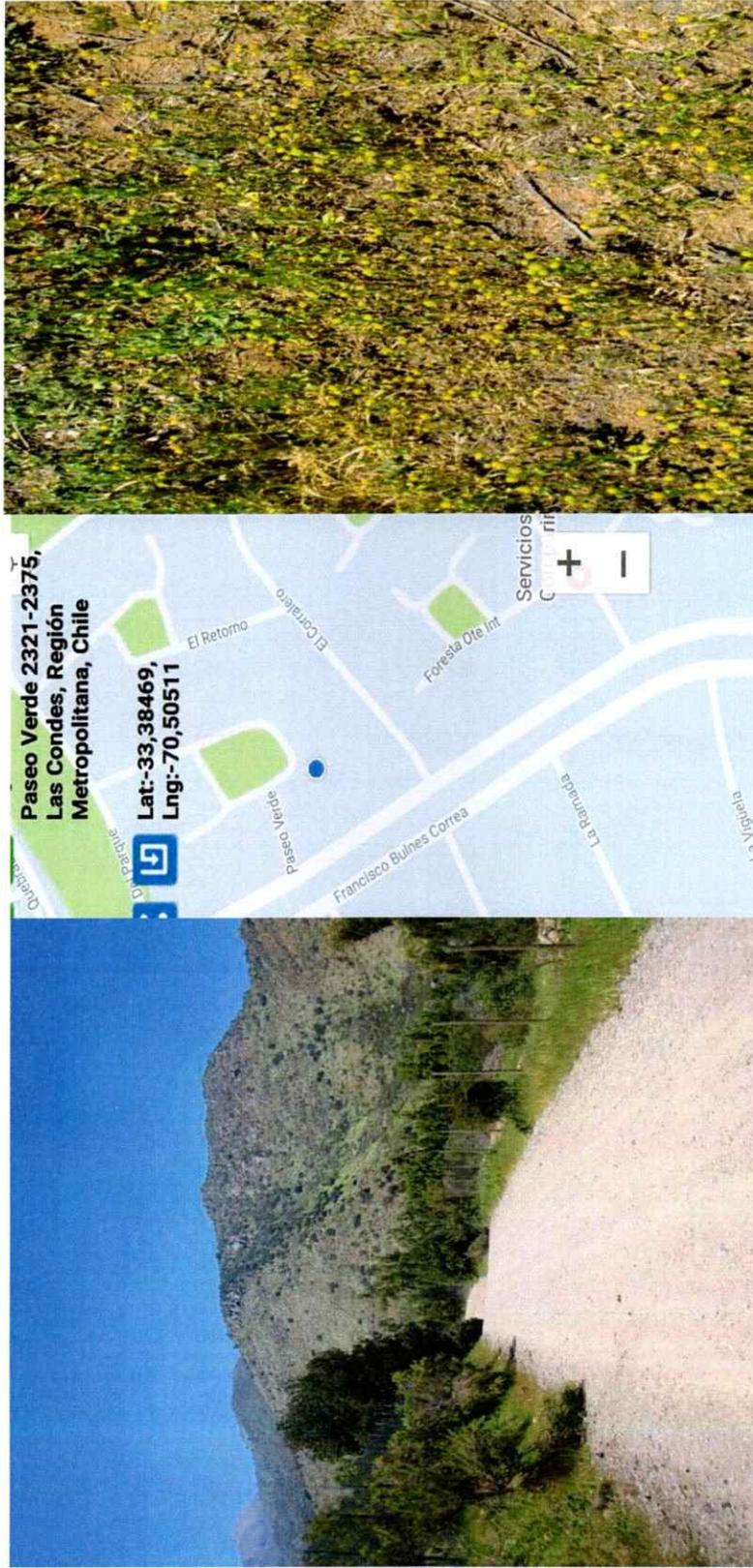
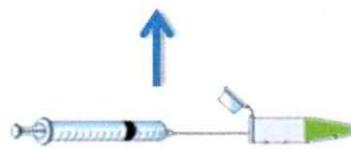
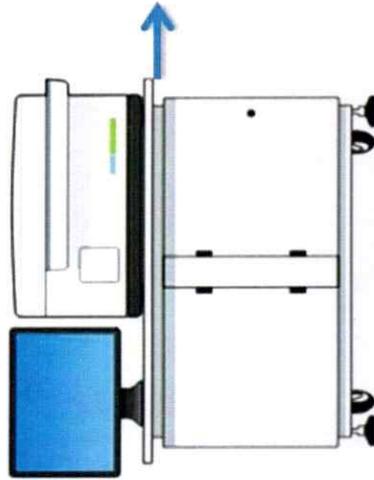


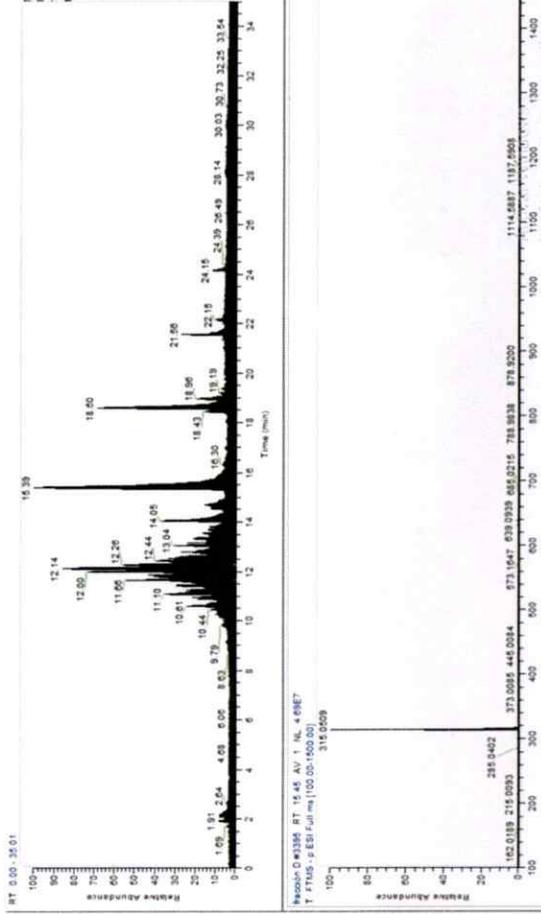
Figura 28. Ubicación de la especie *H. aromaticum* en San Carlos de Apoquindo, Comuna Las Condes, Región metropolitana, Chile.



Extractos evaluados



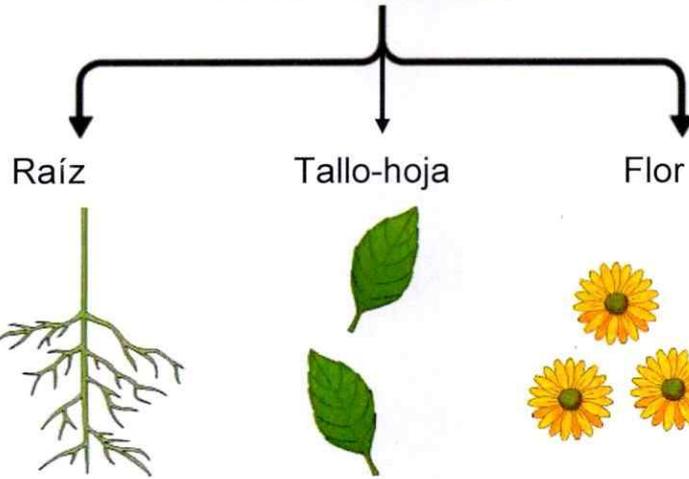
Equipo UHPLC-ESI-MS/MS



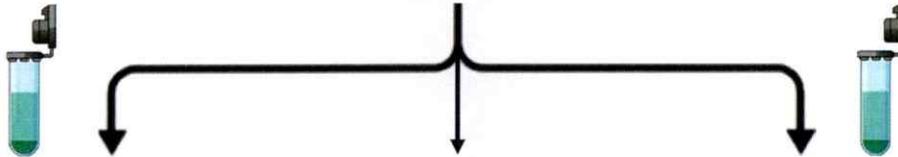
Cromatograma

Figura 29. Espectrometría de masa del extracto metanólico de raíz de *H. aromaticum*.

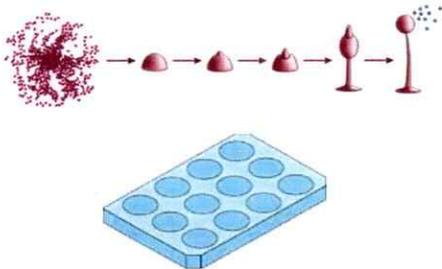
*Helenium aromaticum*



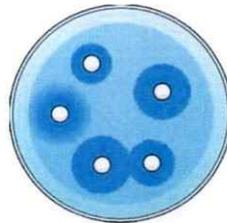
Extracción con solventes orgánicos



Ensayos de citotoxicidad



Ensayos antibiosis



Ensayos de anti-virulencia

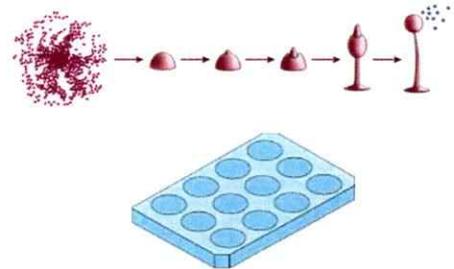


Figura 30. Flujo de los ensayos en el estudio.

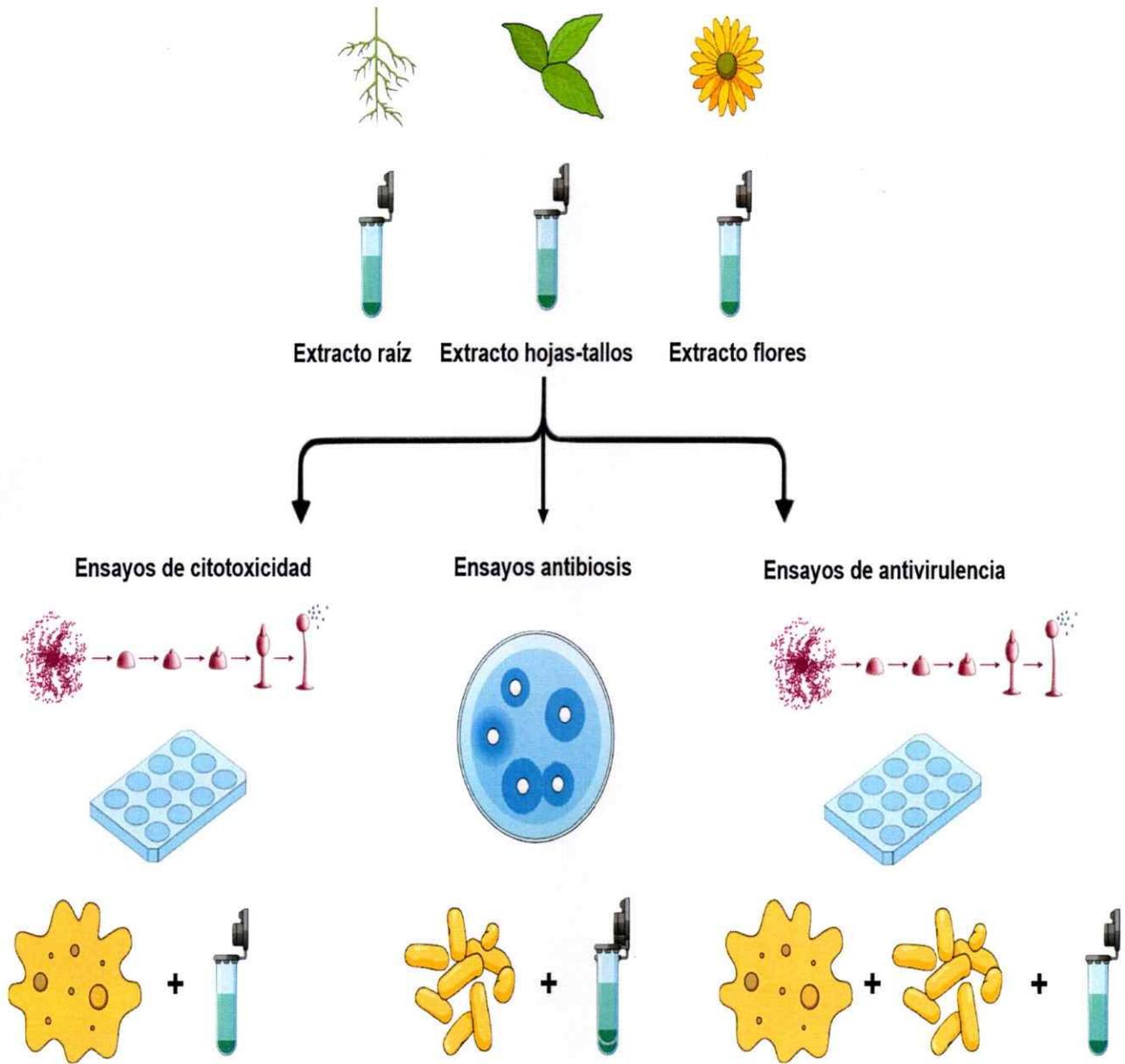


Figura 31. Evaluación de los ensayos de citotoxicidad, antibiosis y anti-virulencia.

## Clasificación botánica

La muestra vegetal completa ha sido estudiada y clasificada como: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey, por la Dra. Gloria Rojas Villegas Jefa de Área Botánica y Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de Chile, con Voucher de colecta 169131 y tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de clasificación de Arthur Cronquist (1981) "In Integrated System of Classification of Flowering Plants".

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUB-CLASE: Asteridae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae (= Compositae)

GÉNERO: *Helenium*

ESPECIE: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey

Nombre vulgar:

"manzanilla macho" (Ica/Perú), "manzanilla de campo" o "manzanilla de cerro" (Valparaíso/Chile)

Sinónimos

*Cephalophora aromatica* (Hook.) Schrad.

*Cephalophora collina* Phil.

*Cephalophora lanceolata* Phil.

*Cephalophora tenera* Cass.

*Gaillardia aromatica* Baill.

*Graemia aromatica* Poepp. ex Hook.

*Grahamia aromatica* Spreng.

**Descripción de la especie:**

Es una hierba hasta de 0,60 m de altura, erecto y poca ramificada basalmente, formando una cobertura de hasta 30 cm. Tallo delgado verde amarillento semi-pubescente. Hojas lanceoladas de borde ligeramente dentado en la parte superior de la planta y hojas basales en mayor número lanceoladas-espátuladas de borde más sinuoso y dentado (a lobulado).

Hojas alternas, sésiles, de color verde claro y con nervadura central notoria en el haz de coloración blanquecina. Flores pequeñas de color amarillo limón de olor característico agradable similar a manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), dispuestas en cabezuelas totalmente esféricas terminales y compactas de aproximadamente 10-14 mm de diámetro. Sus frutos son pequeños, a manera de conos invertidos, con la base negruzca y ápice blanquecino, de 2-3 mm largo. Hábitat en zonas de escorrentía de huaycos y ribereños con humedad esporádica, en suelos arenosos y arcillosos.

**Distribución**

*Helenium* es un género nativo de Norteamérica y Centroamérica.

Comprende 208 especies descritas y de estas solo 39 aceptadas. *H. aromaticum* es una especie que en el Perú se distribuye en Arequipa, Ayacucho, Lima e Ica (Hernández and C. Mendoza, 2014).

**Usos**

Planta de valor medicinal, de nulo valor ornamental. En infusión y extracto se usa como febrífugo.

Tabla 4. Análisis estadístico del ensayo de citotoxicidad de los extractos diclorometano se realizó mediante un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

Extractos diclorometano	Time (Days)	Control vs. etanol 20%	Control vs.		
			25 µg	50 µg	100 µg
	0	ns	ns	ns	ns
FLOR	1	ns	****	****	****
	2	ns	****	****	****
	3	ns	****	****	****
	4	ns	**	****	****
	5	ns	ns	****	****
	6	ns	ns	****	****
	0	ns	ns	ns	ns
TALLO-HOJA	1	ns	**	**	**
	2	ns	****	****	****
	3	ns	****	****	****
	4	ns	****	****	****
	5	ns	****	****	****
	6	ns	**	****	****
	0	ns	ns	ns	ns
RAÍZ	1	ns	***	***	***
	2	ns	****	****	****
	3	ns	****	****	****
	4	ns	****	****	****
	5	ns	****	****	****
	6	ns	****	****	****

Tabla 5. Análisis estadístico del ensayo de citotoxicidad de los extractos metanólicos se realizó mediante un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

EXTRACTOS METANOL	Time (Days)	Control vs. etanol 20%	Control vs. 25 µg	Control vs. 50 µg	Control vs. 100 µg
FLOR	0	ns	ns	ns	ns
	1	ns	***	***	***
	2	ns	ns	ns	***
	3	ns	ns	ns	****
	4	ns	ns	***	****
	5	ns	ns	***	****
	6	ns	ns	**	***
TALLO-HOJA	0	ns	ns	ns	ns
	1	ns	***	***	***
	2	ns	ns	ns	****
	3	ns	ns	ns	****
	4	ns	***	****	****
	5	ns	****	****	****
	6	ns	*	***	****
RAÍZ	0	ns	ns	ns	ns
	1	ns	***	***	***
	2	ns	ns	ns	***
	3	ns	ns	ns	***
	4	ns	****	****	****
	5	ns	****	****	****
	6	ns	**	****	****

Tabla 6. Análisis estadístico del ensayo de anti-virulencia de los extractos diclorometano se realizó mediante un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

Extractos diclorometano	Time (Days)	Control vs. K. aerogenes	Control vs. etanol 20%	Control vs. 25 µg	Control vs. 50 µg	Control vs. 100 µg
FLOR	0	ns	ns	ns	ns	ns
	1	***	ns	ns	ns	ns
	2	****	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	****	****	****
	4	ns	ns	****	****	****
	5	ns	ns	****	****	****
TALLO-HOJA	0	ns	ns	ns	ns	ns
	1	**	ns	ns	ns	ns
	2	***	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	****	****	****
	4	ns	ns	****	****	****
	5	ns	ns	****	****	****
RAÍZ	0	ns	ns	ns	ns	ns
	1	**	ns	ns	ns	ns
	2	****	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	****	****	****
	4	ns	ns	****	****	****
	5	ns	ns	****	****	****

Tabla 7.- Análisis estadístico del ensayo de anti-virulencia de los extractos metanólicos se realizó mediante un test ANOVA de dos vías con comparación múltiple y post-test de Dunnett's (n=9) (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.005, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

Extractos metanol	Time (Days)	Control vs. K. aerogenes	Control vs. etanol 20%	Control vs. 25 µg	Control vs. 50 µg	Control vs. 100 µg
FLOR	0	ns	ns	ns	ns	ns
	1	**	ns	ns	ns	ns
	2	****	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	ns	ns	**
	4	ns	ns	*	*	ns
	5	ns	ns	ns	ns	ns
TALLO-HOJA	0	ns	ns	ns	ns	ns
	1	**	ns	ns	ns	ns
	2	****	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	**	**	****
	4	ns	ns	****	****	*
	5	ns	ns	*	*	**
RAÍZ	0	ns	ns	ns	ns	ns
	1	**	ns	ns	ns	ns
	2	****	ns	****	****	****
	3	ns	ns	**	**	**
	4	ns	ns	ns	ns	ns
	5	ns	ns	ns	ns	ns