

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS



Evaluación de la disrupción endocrina y efectos toxicológicos en *Daphnia magna* de un extracto estandarizado de *Buddleja globosa* Hope y de su componente mayoritario (verbascósido)

MIRTHA PARADA VALDERRAMA

Directores de Tesis

Dra. Carla Delporte V.

Dr. Hernán Lara

*“... nada está perdido si se tiene el valor
de proclamar que todo está perdido
y hay que empezar de nuevo”
Julio Cortázar
Rayuela*

Mis sentimientos y gratitud para:

Mi directora de tesis Dra. Carla Delporte quien me ha apoyado en esta tarea con sus conocimientos y su calidez

El Profesor Dr. Hernán Lara, quien también ha dirigido mi tesis y tuvo la disposición y altura de mira para abordar nuevos desafíos y puso a mi disposición el laboratorio de neurobioquímica y su excelente grupo de trabajo

Las autoridades del Instituto de Salud Pública (ISP), por entender la importancia de la formación de sus profesionales, manifestada a través de la concesión de una comisión de estudios durante un periodo

Mis colegas de ANAMED-ISP, quienes manifestaron interés en mi investigación y me dieron aliento para continuar a pesar de la adversidad

Otros colegas del ISP que estuvieron siempre alertas al proceso y me aconsejaron con su experiencia de doctorantes

Mis compañeras de promoción de doctorado, Silvia Arrau, Victoria Bartch y Tatiana Tobar con quienes formamos un núcleo sólido, entretenido y apoyador en esta tarea

Mi amiga Tatiana Tobar con la que he emprendido diversas aventuras y entre ellas ésta de hacer un doctorado

Todos los alumnos de doctorado que he conocido en este proceso con los que he intercambiado conocimientos e inquietudes

El Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA), que me acogió para hacer los bioensayos y me facilitó los laboratorios para poder realizarlos

Los técnicos del Laboratorio de bioensayos del CENMA (Marcela y Manuel), quienes me prestaron su incondicional ayuda, también a Adriana Aranguiz, Gemelo entre otros que me ayudaron infinitas veces en la solución de problemas con la técnica

Maribel López del CENMA quien me enseñó a montar los bioensayos con *Daphnia magna*

El Dr. Bioquímico Daniel Rojo del laboratorio de toxicología ocupacional, del departamento de salud ocupacional, del Instituto de Salud Pública, por su buena disposición para realizar la determinación de plomo a la muestra de EMATst

La gran familia que forma el laboratorios de productos naturales de la facultad de Cs. químicas y farmacéuticas, donde conocí a Maite Rodriguez ahora doctora y amiga, Gabriel Castro, hombre alga, de quien aprendí de algas y disfruté de su creatividad, Gabriela Valenzuela por su apoyo con nuestro matico, a Consuelo Castro por su simpatía, a David por su buena disposición con los materiales del laboratorio, Leon Goity ahora ya doctor, y la larga lista por nombrar que están igual de presentes.

Rayen Pilquinao, alumna inquieta y creativa, ayudante en mis ensayos, que espero ya se haya titulado

Yuri Carvajal, a quien conocí por una causa y generosamente me ayudó con la estadística, me hizo apreciar la hermosura de los textos y aprendí latex para reproducirlo, además gracias a sus pensamientos pude visualizar otros aspectos de la ciencia, que me han servido para comenzar nuevas y diferentes investigaciones

Las autoridades de la Universidad de Chile que permitieron seguir continuando los estudios a pesar que el gobierno suspendió la beca Valech

Mis compañeros becarios Valech con quienes emprendí una batalla - que aun no ha terminado - por recuperar el derecho ganado a hacer cursos de postgrado con este beneficio y que nos fue suspendido por el gobierno saliente

El Laboratorio de bioensayos de la Universidad Mayor, dirigido en su momento por el profesor Carlos Valdovinos, por facilitarme los implementos para realizar mis ensayos

Alejandro Ordenes de la facultad de Agronomía de la Universidad de Chile por permitirme recolectar el matico en su jardín botánico

A la Dra. Nadine Backhouse quien me estimuló para que hiciera doctorado, estudiara el matico por las nuevas propiedades encontradas al verbascósido

El profesor Humberto Dölz, miembro de mi comisión quien ha sido incondicional, apoyador, tenaz y tremendamente humano

La profesora Nella Gai por el apoyo y preocupación constantes

Mis padres Jorge y Albertina que a pesar de su vejez están siempre presentes y apoyando en la adversidad y la alegría

Mi hermano Héctor que junto a Karin, han estado cerca apoyándome a pesar de la lejanía

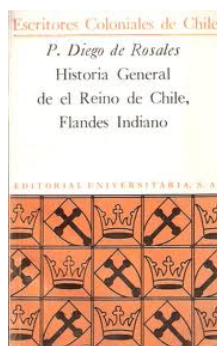
Para mi hermana Viviana que ha estado pendiente de todo este proceso

Mis amigas y amigos que no nombro, pero tengo en el corazón

Todo aquel que se me cruzó en este camino y tuvo un gesto de aliento para mi y este trabajo que asumí sin imaginar la inmensidad de su proceso

Fuera cosa larga el querer referir todas las yerbas medicinales deste Reino de Chile, y sólo quiero acabar con dos casos raros y experiencias que hicieron estos indios con el grande conocimiento que tienen de las propiedades de la yerbas. El uno, que parece increíble, y no hay cosa dificultosa al Autor de la Naturaleza, le trae Monardes en la segunda parte de las yerbas de las Indias, y traslada la carta que le escribió a Lima el capitán Pedro de Osma, que militó en Chile, fecha el año de 1568 en veinte y seis de diciembre, en que dándole cuenta de las propiedades de las yerbas de este Reino, le dice: “El año de 1558, siendo gobernador D. García Hurtado de Mendoza, que después fue marqués de Cañete y virrey del Perú, estaban en la ciudad de Santiago presos ciertos indios rebeldes, y los ministros se descuidaron de alimentarlos, y así la hambre los acosó, de suerte que ellos mismos se cortaron las pantorrillas y las asaron para comérselas. Pusieron luego en la cortadura las hojas de unas yerbas (de que tenían hecha prevención para los acontecimientos de la guerra) y no derramaron gota de sangre ni dieron muestra de dolor, y con sola las yerbas se estañó y creció la carne como antes estaba”. Fue éste caso público y notorio en aquellos tiempos y su memoria permanece en las curiosas obras de este gran médico de Sevilla, el doctor Nicolás Monardes. El otro caso aconteció entre dos indios grandes herbolarios: disputaron de la naturaleza y calidades de las yerbas y redujeron los argumentos a demostraciones. Dio el uno al otro cierta yerba y díjole que la aplicase a las narices. Apenas lo ejecutó cuando le corrió un gran flujo de sangre, como si abrieran dos caños de una fuente. Viéndole afligido de ver la prisa con que se desangraba, le mandó a aplicar al olfato otra yerba y al momento se le restañó la sangre, sin que le saliese gota.

P. Diego de Rosales Historia General de el Reino de Chile, Flandes Indiano.(Rosales, 1969)



Índice general

1. Introducción	5
1.1. Antecedentes generales del uso de las especies vegetales	5
1.2. Estudios previos del matico	6
1.3. Otros estudios del verbascósido	7
1.4. Disrupción Endocrina	8
1.5. Fitoestrógenos	11
1.6. Antecedentes de efectos disruptores endocrinos en animales	12
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo General	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. Materiales y Métodos	19
4.1. Estudio químico	19
4.1.1. Obtención de extracto etanólico seriado de matico (EMAT)	19
4.1.2. Estandarización por CLAE del EMAT en contenido de verbascósi- do expresado en ácido cafeico	20
4.1.3. Aislamiento e identificación de verbascósido en el EMAT	21
4.2. Estudio farmacológico en ratas de laboratorio para determinar la alte- ración del ciclo estral y unión al RE	24
4.2.1. Animales y diseño experimental	24
4.2.2. Grupos experimentales	25
4.2.3. Procedimiento experimental	25
4.3. Estudio toxicológico en <i>D. magna</i>	30
4.3.1. Modelo de experimentación	30

4.3.2.	Medios de cultivo y mantención de <i>D. magna</i>	30
4.3.3.	Diseño experimental	31
4.3.4.	Compuestos ensayados	33
4.3.5.	Procedimiento experimental	36
5.	Resultados	45
5.1.	Estudio químico	45
5.1.1.	Obtención de los diferentes extractos desde las hojas de <i>B. globosa</i>	45
5.1.2.	Estandarización por CLAE-DAD del EMAT en contenido de verbascósido expresado en ácido cafeico	47
5.1.3.	Aislamiento e identificación de verbascósido en EMATst	52
5.2.	Estudio farmacológico	53
5.2.1.	Evaluación del efecto del EMATst sobre el ciclo estral de ratas .	53
5.2.2.	Ensayo de unión competitiva al receptor estrogénico	59
5.2.3.	Evaluación toxicológica <i>in vivo</i> de EMATst y verbascósido. Determinación de la CL_{50}	61
5.2.4.	Evaluación de toxicidad crónica del EMATst y verbascósido sobre <i>D. magna</i>	64
6.	Discusión	78
6.1.	Efecto sobre ciclo estral y unión al receptor estrogénico (efecto estrogénico)	78
6.2.	Toxicidad aguda y efectos endocrinos de EMATst y verbascósido	80
7.	Conclusiones	84
I	Anexos	92
1.	Tablas	93
2.	Tablas	101
3.	Estudio químico	110
4.	Determinación de plomo	118
5.	Preparación de alga	121

6. Protocolos ensayo agudo	124
7. Protocolos ensayo crónico	129

Índice de figuras

1.1. Estructura del verbascósido	7
1.2. Ciclo estral de la rata	10
1.3. Ciclo biológico de <i>Daphnia</i>	14
1.4. Hormonas involucradas en el metabolismo de la <i>D. magna</i>	16
4.1. Mantención de cultivos de <i>D.magna</i> en el laboratorio	32
4.2. Fórmulas estructurales	35
4.3. Esquema de ensayo agudo	39
4.4. Esquema del ensayo crónico	43
5.1. Rendimiento comparativo de los diferentes extractos	46
5.2. Curva de calibración del ácido cafeico	49
5.3. Cromatograma HPLC - DAD para EMAT obtenido en Padre las Casas.	50
5.4. Cromatograma HPLC - DAD del EMAT obtenido en Antumapu.	51
5.5. Ciclicidad estral de ratas tratadas con EMATst durante 14 días comparadas con el grupo control	56
5.6. Porcentaje de ovulación de ratas con EMATst durante 14 días comparadas con el control	57
5.7. Porcentaje de días promedio de permanencia en cada etapa del ciclo estral en ratas tratadas con EMATst durante 14 días	58
5.8. Porcentaje de unión y comparación de CI_{50}	60
5.9. Porcentaje de inmovilidad de <i>D.magna</i> para EMATst y verbascósido	62
5.10. Porcentaje de inmovilidad de <i>D.magna</i> para 17β - estradiol y ac. cafeico	63
5.11. Número de neonatos vs concentración de EMATst para primera y segunda generación de <i>D. magna</i>	67
5.12. Número de neonatos vs concentración de verbascósido para primera y segunda generación de <i>D. magna</i>	69
5.13. Número de neonatos vs concentración de 17β - estradiol para primera y segunda generación de <i>D. magna</i>	71

5.14. Número de mudas vs concentración de EMATst para primera y segunda generación de <i>D. magna</i>	73
5.15. Número de mudas vs concentración de verbascósido para primera y segunda generación de <i>D. magna</i>	75
5.16. Número de mudas vs concentración de 17β estradiol para primera y segunda generación de <i>D. magna</i>	77

Índice de tablas

4.1.	Esquema de fraccionamiento del EMAT mediante CC_3Sil	22
4.2.	Resumen concentrado de fracciones de CC_4Seph y CC_5Seph	24
4.3.	Composición del medio de cultivo Dulce estándar(DS)	31
4.4.	Resumen de concentraciones en mg/L a la que se expusieron los dáfnidos durante todo el proceso	38
4.5.	Concentraciones utilizadas en el ensayo con $K_2Cr_2O_7$	39
4.6.	Estructura de la planilla de registro de ensayos crónicos	42
4.7.	Resumen de concentraciones en mg/L a la que se expusieron los dáfnidos durante todo el proceso	44
5.1.	Concentraciones versus área de ácido cafeico obtenidas por CLAE-DAD	48
5.2.	Pesos en g de cada rata antes del tratamiento y al final del tratamiento con EMATst a los 14 días	54
5.3.	Observación comparativa del aspecto de útero y ovario vs ciclo estral de las ratas de los grupos control, I y II, después de 14 días de tratamiento con EMATst	55
5.4.	Porcentaje de mortalidad de <i>D. magna</i> adulta expuesta a diversas concentraciones de EMATst, verbascósido o 17β -estradiol durante 15 días de exposición en la primera y segunda generación	65
5.5.	Nº de neonatos de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	66
5.6.	Nº de neonatos de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	68
5.7.	Nº de neonatos de <i>D. magna</i> expuesta a diversas concentraciones de 17β -estradiol durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	70
5.8.	Nº de mudas de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	72
5.9.	Nº de mudas de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	74

5.10. N° de mudas de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de 17 β estradiol durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	76
6.1. Parámetros evaluados en <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de EMATst y verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª Generación	82
1.1. Efectos del EMATst en el ciclo estral de ratas (P, E, D): N° de días en cada periodo.	93
1.2. Ciclo estral del grupo control entre el día 0 y el día 14 de la medición	93
1.3. Ciclo estral del grupo I entre el día 0 y el día 14 de la medición	94
1.4. Ciclo estral del grupo II entre el día 0 y el día 14 de la medición	94
1.5. Porcentaje promedio N° de días de cada ciclo de los grupos control, I y II	94
1.6. Porcentaje de ovulación, grupo Control, I y II	94
1.7. Comparación de P, Control, Grupo I, Grupo II	95
1.8. Comparación de D, Control, Grupo I, Grupo II	95
1.9. Comparación de E, Control, Grupo I, Grupo II	95
1.10. Esquema ensayo de unión - ligando	96
1.11. Resultados ensayo de unión - ligando	97
1.12. Porcentaje de unión	98
1.13. valores de IC_{50}	98
1.14. CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$ en <i>D. magna</i>	98
1.15. CL_{50} de toxicidad para 17 β - estradiol	99
1.16. Porcentaje de inmovilidad de <i>D. magna</i> expuesta a diversas concentraciones de 17 β estradiol durante 24 horas de exposición	99
1.17. CL_{50} del EMATst	99
1.18. Porcentaje de inmovilidad de <i>D. magna</i> expuesta a diversas concentraciones de EMATst durante 24 horas de exposición	99
1.19. CL_{50} para verbascósido	100
1.20. Porcentaje de inmovilidad de <i>D. magna</i> expuesta a diversas concentraciones de verbascósido durante 24 horas de exposición	100
1.21. CL_{50} para ácido cafeico	100
1.22. Porcentaje de inmovilidad de <i>D. magna</i> expuesta a diversas concentraciones de ácido cafeico durante 24 horas de exposición	100
2.1. Mortalidad de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación	102

2.2.	Mortalidad de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1 ^a y 2 ^a generación	102
2.3.	Nº de neonatos de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1 ^a y 2 ^a generación	103
2.4.	Nº de neonatos de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1 ^a y 2 ^a generación . .	104
2.5.	Nº de neonatos de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de 17 β -estradiol durante 15 días de exposición, para 1 ^o y 2 ^o Generación . .	105
2.6.	Tamaño de la camada de neonatos de <i>D. magna</i> en primera generación y segunda generación expuestas durante 15 días a diversas muestras y concentraciones	106
2.7.	Nº de mudas de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1 ^a y 2 ^a Generación	107
2.8.	Nº de mudas de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de Verbascosido durante 15 días de exposición, para 1 ^a y 2 ^a generación	108
2.9.	Nº de mudas de <i>D. magna</i> expuestas a diversas concentraciones de 17 β estradiol durante 15 días de exposición, para 1 ^a y 2 ^a generación	109

Índice de abreviaturas

AcOEt: Acetato de etilo

BPA: Bisfenol A

CC: Columna Cromatográfica

CC_x Sil: Columna cromatográfica x con silicagel

CC_x Seph: Columna cromatográfica x con sephadex

CENMA: Centro Nacional del Medio Ambiente

CL_{50} : Concentración letal 50

CI_{50} : Concentración inhibitoria 50

CLAE: Cromatografía líquida de alta eficiencia

CLAE-DAD: Cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos

DE: Disruptor endocrino

DES: Dietilestilbestrol

DCM: Diclorometano

DMSO: Dimetil sulfóxido

DS: medio de cultivo dulce estándar

E2: 17 β -estradiol

EDCM: Extracto diclorometánico

EH: Extracto hexánico

EMAT: Extracto etanólico de matico

EMATst: Extracto etanólico de matico estandarizado

EV: Valerato de estradiol

GnRH: Factor liberador de gonadotrofinas

HAP: Hidroxiapatita

HEX: Hexano

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

INN: Instituto Nacional de Normalización

MEOH: Metanol

NCh: Norma Chilena

4-NP: 4-nonifenol

OECD o OCDE: Organización para la cooperación y el desarrollo económico

RBA: Afinidad de unión relativa al receptor estrogénico

RE: Receptor estrogénico

RIA: Radioinmunoanálisis

Abstract

Matico plant, *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae is a native species in Chile which used their leaves of its multiples therapeutic properties. More recent investigations have demonstrated that the ethanol extract (EMATst) obtained from leaves and with an standardized main component (verbascoside) presented anti-inflammatory, analgesic and scarring effects. This compound has been identified in different plant species and has shown through *in vitro* assays concentration dependent estrogenic and antiestrogenic effects.

In this thesis we studied the estrogenic property and possible endocrine disruptor (ED) effect of EMATst and verbascoside using different experimental models both *in vivo* and *in vitro*. This investigation began with collecting matico leaves in the month of January 2008, in the Antumapu campus of the University of Chile, in order to obtain EMATst which was prepared by the successive extraction of plant material with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane and ethanol). Quantification of the major component (verbascoside) of the ethanol extract was performed by HPLC-DAD and expressed as caffeic acid. Subsequently, verbascoside was isolated from EMATst by successive silica gel 60 and Sephadex LH20 chromatographic columns.

Both EMATst and verbascoside were used to perform experimental work to determine the alteration of the estrous cycle of rats after subcutaneous administration of two different doses of EMATst; verbacoside and EMATst possible competitive binding to the estrogen receptor (ER) though an *in vitro* assay using the cytosolic fraction of a rat uterus as ER source; acute toxicity of *Daphnia magna* by determining the lethal concentration 50 (LC_{50}) after 24 hours of exposure; chronic toxicity and DE effect by determining the survival, molt frequency and reproduction of two generations at 14 days of exposure.

Our results show that the EMATst at a high-dose (10^{-5} M) caused an alteration in

the rat estrous cycle, which could be attributed to an anti-estrogenic effect. They also showed EMATst and verbascoside's slight competitive binding to RE compared with estradiol. Both had low relative acute toxicity in respect to the reference toxicant (potassium dichromate) and 17 β -estradiol in *D. magna*. The results of chronic toxicity in *D. magna*, show that there is a concentration dependent decrease in reproduction in both generations, this is more pronounced in the second generation and the ED effect of both samples was expressed because of the altered reproduction.

Resumen

La planta Matico, *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae es una especie nativa en Chile de la cual se usan sus hojas por sus múltiples propiedades terapéuticas. Las investigaciones más recientes han permitido demostrar que el extracto etanólico (EMATst) obtenido a partir de sus hojas y estandarizado en su principal componente (verbascósido) presentó efectos antiinflamatorio, analgésico y cicatrizante. Este compuesto ha sido identificado en distintas especies vegetales y se le ha demostrado mediante ensayos *in vitro* efecto estrogénico y antiestrogénico dependiente de la concentración.

En esta tesis se estudió la propiedad estrogénica y el posible efecto disruptor endocrino (DE) del EMATst y del verbascósido usando distintos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta investigación se inició con la recolección de las hojas de matico en el mes de enero de 2008, en el campus Antumapu de la Universidad de Chile, con el objetivo de obtener el EMATst que fue elaborado por extracción sucesiva del material vegetal con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y etanol). La cuantificación del componente mayoritario (verbascósido) del extracto etanólico se realizó por CLAE-DAD y se expresó en ácido cafeico. Posteriormente a partir del EMATst por sucesivas columnas cromatográficas de silicagel 60 y Sephadex LH20, se aisló el verbascósido.

Tanto EMATst como verbascósido fueron utilizados para realizar los trabajos experimentales con el fin de determinar la alteración del ciclo estral de ratas de laboratorio después de la administración subcutánea de dos diferentes dosis de EMATst; posible unión competitiva de EMATst y verbacósido al receptor estrogénico (RE) mediante un ensayo *in vitro* usando citosol de útero de rata como fuente de RE; toxicidad aguda de *Daphnia magna* mediante la determinación de la concentración letal 50 (CL_{50}) a las 24 h de exposición; toxicidad crónica y efecto DE mediante la determinación de la sobrevivencia, frecuencia de muda y reproducción de dos generaciones a los 14 días de exposición.

Nuestros resultados permitieron demostrar que el EMATst en dosis alta (10^{-5} M) provocó una alteración en el ciclo estral de ratas, lo que podría atribuirse a un efecto antiestrogénico. Tanto EMATst como verbascósido se unieron levemente de modo competitivo al RE comparado con estradiol. Ambos presentaron una baja toxicidad aguda relativa respecto del tóxico de referencia (dicromato de potasio) y 17β -estradiol en *D. magna*. Los resultados de toxicidad crónica en *D. magna*, muestran que se produce una disminución de la reproducción en ambas generaciones dependiente de la concentración y más marcada aún en la segunda generación y el efecto DE de ambas muestras se manifestó porque se alteró la reproducción.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes generales del uso de las especies vegetales

En América los primeros indicios del uso de plantas medicinales se localizan en Monteverde, sitio arqueológico ubicado a 36 Km de Puerto Montt, donde se encontraron vestigios de material vegetal correspondiente a hojas de boldo, una especie no endémica del lugar, lo que indica que ya en esa época había una transmisión del conocimiento de las propiedades medicinales del boldo (Dillehay, 2004).

En Chile antes de la llegada de los españoles, los mapuches dentro de sus elementos terapéuticos usaban las hierbas medicinales, y tenían conocimiento de más de 200 plantas con propiedades terapéuticas (Farga and Lastra, 1988).

En la época de la colonia la "botica" de los jesuitas, inaugurada en el año 1647, referida por los historiadores de la época como una de las más completas de ese entonces en Santiago, fabricaba un gran número de preparados con plantas medicinales, de éstos un porcentaje considerable eran desarrollados con plantas autóctonas chilenas, lo que consta en el catastro elaborado en el año 1772 por el hermano José Zeitler (Espinosa and Lobos, 1937).

En la actualidad, las plantas medicinales de uso más común en Chile tanto son nativas como introducidas especialmente de origen europeo (Farga and Lastra, 1988).

Tanto en los países desarrollados como los que están en vías de desarrollo el uso de

medicamentos elaborados con plantas medicinales muestra un crecimiento acelerado en estos últimos años. Estas especies son empleadas como materia prima para el desarrollo de suplementos dietéticos, alimentos funcionales, fitofármacos, cosméticos, productos de uso industrial y de aplicación en la agricultura, tal como lo señala el Fondo de innovación Agraria (FIA), en su documento del año 2006, Agenda para la Innovación Agraria.

En relación a los fitofármacos el Ministerio de Salud ha promovido los cambios reglamentarios para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de éstos, definidos de acuerdo a lo establecido en el actual D.S.N°3/10, art.10 letra d) como:” *Aquellas especialidades farmacéuticas cuyos ingredientes activos provienen de las partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal y están debidamente estandarizados*” ,.

Chile posee una diversidad de plantas con propiedades medicinales y en estos últimos años varias entidades están haciendo esfuerzos para estudiar sus componentes activos y determinar las propiedades terapéuticas, con el objetivo de poder contribuir al conocimiento de nuestra flora autóctona y elaborar fitofármacos con extractos estandarizados con propiedades farmacológicas cuantitativamente demostradas.

Es en este contexto que en esta tesis se estudió el matico, con el fin de contribuir al conocimiento de sus efectos farmacológicos.

1.2. Estudios previos del matico

El matico *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae es una especie nativa y en Chile, habita desde Santiago hasta la Patagonia, generalmente en sitios húmedos, a la vera de los caminos y en matorrales cordilleranos. Se usan las hojas y se encuentra en Chile, Perú y Argentina (Montes, 2001). Las investigaciones más recientes han permitido obtener extractos seriados a partir de las hojas de matico como son los extractos hexánico (EH), diclorometánico (EDCM) y etanólico (EMAT) desde los cuales se han aislado diferentes componentes (Rosales, 2003; Backhouse et al., 2008a; Goity, 2007), y mediante evaluaciones farmacológicas *in vivo* de dichos extractos, se han demostrado sus actividades antiinflamatorias via oral y tópica, analgésica por vía oral y tópica y efecto antioxidante (Backhouse et al., 2008a,b). El extracto etanólico seriado obtenido desde las hojas de matico estandarizado en sus componentes mayoritarios (EMATst) presenta principalmente fenilpropanoides como verbascósido y los flavonoides, 7-O-glucósido de luteolina, quercetina, 7-O-glucósido de apigenina, siendo el verbascósido y 7-O-glucósi-

do de luteolina los que están en mayor cantidad (Goity, 2007; Backhouse et al., 2008b).

A partir de las investigaciones anteriormente referidas, se demostró que el EMATst obtenido desde las hojas de *B. globosa* posee el principio activo verbascósido o acteósido responsable en parte de la actividad antiinflamatoria de este extracto (Backhouse et al., 2008b).

El verbascósido es un glucósido fenilpropanoide aislado e identificado en una gran variedad de plantas cuya fórmula estructural se describe en la figura 1.1; este compuesto se encuentra presente en diferentes especies vegetales; su estructura química básica está definida por la existencia de un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos que corresponde al ácido cafeico, el cual a su vez está unido a dos azúcares y éstos a un difeniletanoide.

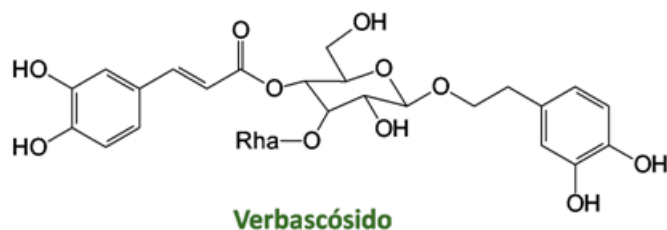


Figura 1.1: Estructura del verbascósido

1.3. Otros estudios del verbascósido

El verbascósido ha sido también aislado de las partes aéreas de la planta *Verbascum macrurum* Ten. y se le demostró actividad estrogénica, sobre osteoblastos, antiestrogénico en células del cáncer de mama MCF-7, antiproliferativo sobre el endometrio, usando la línea celular Ishikawa y efecto antagonista vía receptor *alfa* estrogénico en células Hela (Papoutsi et al., 2006).

1.4. Disrupción Endocrina

La exposición a ciertos compuestos químicos, introducidos en el medio ambiente por la actividad humana o presentes en la naturaleza, conocidos como disruptores endocrinos (DE), pueden producir efectos de alteración endocrina, los cuales se pueden manifestar sobre la salud humana y animal a través de la aparición de nuevos síndromes y el desarrollo de enfermedades específicas de causa no bien conocida, como el incremento de determinados tipos de neoplasias, malformaciones y disfunciones del aparato reproductor, distintas formas de neurotoxicidad o alteraciones de la respuesta inmune (Colborn and Clement, 1993). La exposición a estos compuestos puede provocar enfermedades hormono-dependientes como disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, desmasculinización, feminización, entre otras (Colborn et al., 1993).

De acuerdo a lo señalado anteriormente los mecanismos moleculares por los que se puede generar un efecto disruptor endocrino son diversos, dependiendo del órgano afectado y en específico el receptor molecular sobre el cual estas sustancias se unen y desencadenan su acción, siendo la estructura química del DE un factor importante, por ejemplo, estos compuestos pueden ejercer su acción sobre los receptores estrogénicos y provocar una acción estrogénica o antiestrogénica alterando como consecuencia la salud reproductiva y los sistemas endocrinos de los seres humanos. Estrógenos ambientales sintéticos y productos químicos de origen natural pueden imitar o interferir con la unión y la acción de las hormonas, produciendo transformaciones en los procesos fisiológicos. Se han identificado diferentes sustancias químicas de estructura diversa que han demostrado ser capaces de unirse a los receptores de estrógeno y provocar una respuesta estrogénica.

El DE es definido como: "grupo de sustancias químicas naturales o sintéticas, exógenas al organismo de diferente origen, estructura y uso, las cuales interfieren con el mecanismo de las hormonas responsables de mantener la homeostasis y regulación del desarrollo" (Olea et al., 2002). La lista de estas sustancias estrogénicas es extensa e incluye hormonas naturales y sintéticas, pesticidas, productos farmacéuticos y productos químicos utilizados en la fabricación de pinturas y plásticos. Las plantas no son la excepción porque en ellas existen compuestos con actividad estrogénica o antiestrogénica denominados fitoestrógenos. Se han identificado numerosos productos naturales con actividad estrogénica con estructuras muy diversas, tales como: isoflavonas, lignanos, coumestranos, flavonoides y estilbenos (Papoutsis et al., 2006). Diferentes estudios con

isoflavonas han demostrado propiedades estrogénicas y antiestrogénicas al competir con el receptor estrogénico demostrando una actividad bifásica; por un lado una actividad estrogénica en bajas concentraciones ($< 10^{-6}M$), y una actividad antiestrogénica en altas concentraciones ($> 10^{-6} M$) (Papoutsi et al., 2006).

Los efectos de los DE se pueden determinar utilizando diferentes modelos experimentales como estudios en condiciones controladas de laboratorio utilizando diversos organismos como bioindicadores o midiendo diferentes procesos biológicos con la ayuda de biomarcadores, también mediante ensayos de toxicidad aguda, subcrónica o crónica o ensayos de funcionalidad reproductiva usando modelos animales (Argemi et al., 2005). Por su parte el NIH - USA recomienda que para hacer estudios de disrupción endocrina es adecuado hacer ensayos *in vitro* de unión al receptor, ensayos *in vivo* del tipo farmacológico y ensayos *in vivo* del tipo toxicológico (Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2002).

Tomando en cuenta los antecedentes planteados la rata sería un buen modelo animal para determinar los efectos potenciales de alguna sustancia sobre la alteración del ciclo reproductivo de la rata hembra, llamado ciclo estral. Este ciclo dura 4 días aproximadamente y está formado por cuatro fases (Proestro, Estro, Metaestro y Diestro): en la etapa de **proestro** bajo la influencia de la hormona folículo estimulante (FSH), una serie de folículos ováricos crecen y aumenta la secreción de estrógeno, el útero se va engrosando progresivamente, y la mucosa vaginal sufre numerosas mitosis, a continuación en la etapa de **estro** la secreción de estrógenos alcanza el nivel máximo inhibiendo la liberación de FSH y aumentando la hormona luteinizante (LH), lo cual produce la ovulación, el útero permanece ensanchado tras las numerosas mitosis que sufre la mucosa vaginal, apareciendo células cornificadas sin núcleo en el frotis, en el **metaestro** o diestro temprano la acción está localizada a nivel local en el ovario donde el cuerpo lúteo secreta progesterona, por lo que la mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos y aparecen en el frotis leucocitos y células queratinizadas de la etapa anterior, en el **diestro** si no ha habido fecundación, durante esta fase se produce la regresión del cuerpo luteo y disminuyen los niveles de estrógeno y progesterona, como consecuencia el útero se hace pequeño y poco contractil, la mucosa vaginal es muy delgada y se observan una gran cantidad de leucocitos en el frotis vaginal (Freeman, 1988). Las etapas descritas se pueden visualizar en la figura 1.2. La corta duración del ciclo estral en las ratas permite que esta sea una especie ideal para la investigación de los cambios que se producen durante el ciclo reproductivo.

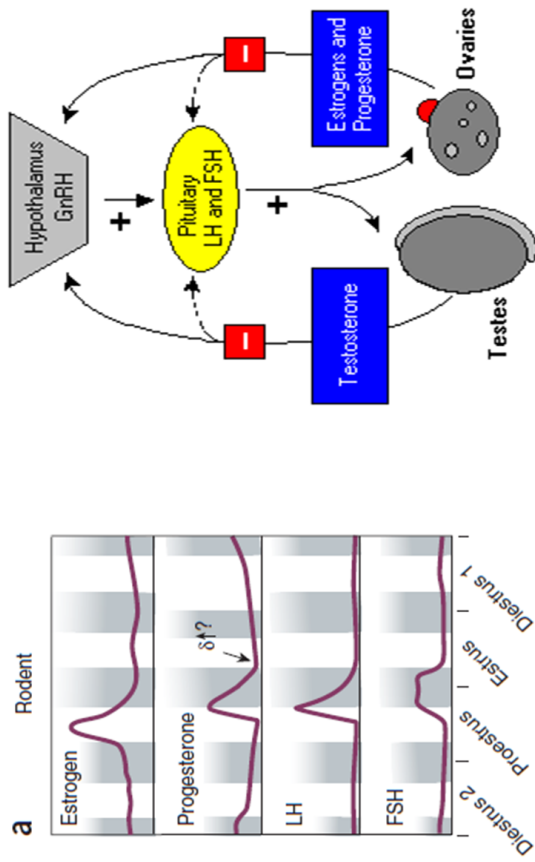


Figura 1.2: Ciclo estral de la rata

En la figura se visualiza las hormonas que interfieren en el ciclo estral de la rata

1.5. Fitoestrógenos

Actualmente los fitoestrógenos son indicados en la etapa de la menopausia para contrarrestar los efectos producidos por la disminución de estrógenos y se ha confirmado su eficacia como coadyuvante en la prevención y tratamiento de la osteoporosis asociada al climaterio femenino y otros trastornos relacionados con la declinación de los estrógenos (Bai et al., 2007; Han et al., 2002), pero sin embargo el uso de fitoestrógenos puede o no ser beneficioso dependiendo de la edad y el sexo. Hay periodos en la vida de la mujer más sensible a estas sustancias como por ejemplo durante el embarazo en que el feto puede verse expuesto a la acción de algunos fitoestrógenos que atraviesan la barrera placentaria. Durante la lactancia el lactante puede verse afectado por los fitoestrógenos o sus metabolitos que se eliminan a través de la leche materna (Olea et al., 2002). Estudios en animales de laboratorio, granja y fauna silvestre que han consumido altas cantidades de plantas ricas en fitoestrógenos demostraron problemas reproductivos y de fertilidad (Leopold et al., 1976; Berger et al., 1977). Hallazgos que también se pesquisaron en ovejas australianas por el consumo de fitoestrógenos presentes en una especie de trébol (*Trifolium subterraneum*), identificándose equol y coumestrol como responsables de este efecto (Bennetts and Underwood, 1951). Otro ejemplo también explica como felinos Cheetah en cautiverio sufrieron infertilidad por el consumo de alimentos ricos en soja (Setchell et al., 1987). Por otro lado a nivel fetal e infantil se ha visto que ratones y ratas expuestos antes o en el momento del nacimiento a coumestrol y genisteína, desarrollaron alteraciones del aparato reproductor tales como cambios en el desarrollo ovárico, subfertilidad, infertilidad, alteraciones en el ciclo estral y problemas con la ovulación (Delclos et al., 2001; Jefferson et al., 2002, 2005, 2006). Otros estudios mostraron que después de la exposición con genisteína hubo modificaciones en la respuesta de la hipófisis, alterando la ovulación en ratas (Faber and Hughes, 1993), y diferenciación celular de la glándula mamaria lo que puede incrementar el riesgo de cáncer (Heckmann et al., 2008). Ratas tratadas inmediatamente después del nacimiento con genisteína, tuvieron un incremento de la incidencia del cáncer uterino (Newbold et al., 2001). Por otra parte al administrar un extracto de *Aspilia africana* a ratas, se observó que los ciclos estrales se redujeron y la histología uterina reveló una toxicidad dosis dependiente (Kayode et al., 2007).

Estudios epidemiológicos en seres humanos documentaron los efectos adversos de genisteína en mujeres embarazadas que consumieron dietas vegetarianas teniendo descendientes masculinos con un incremento de hipospadias, posiblemente por los altos niveles de isoflavonas de soja (North and Golding, 2000). Adultos jóvenes -hombres y mujeres- que consumieron soja, tuvieron un incremento de alergias, y además las muje-

res presentaron alteraciones en el ciclo menstrual comparado con los que consumieron leche de vaca (Goldman et al., 2001; BL Strom, 2001).

Respecto de la actividad estrogénica de verbascósido, se ha demostrado su unión al receptor de estrógeno, al parecer por su conformación espacial y especialmente por la presencia del anillo fenólico que posee, estructura importante en la unión selectiva al receptor estrogénico (Goodman and Gilman, 2006). También se ha determinado que en el EMATst se encuentran otros compuestos como 7-O-glucósido de luteolina, que corresponde a una flavona, compuesto que no contribuiría al efecto estrogénico del EMATst, ya que no cumple con los requerimientos de tener grupos OH en posición 3 y 6 del anillo fenólico, de acuerdo al estudio de estructura-actividad, de ensayos *in vitro* de afinidad de unión relativa al receptor estrogénico (RBA), donde se demostró que las flavonas que tienen grupos OH en la posición 3 y 6 se unen al RE (Fang et al., 2001).

1.6. Antecedentes de efectos disruptores endocrinos en animales

El fenómeno de la alteración endocrina no es nuevo, está bien documentada la evidencia de la interrupción de los sistemas endocrinos de la fauna silvestre, como es el caso de los moluscos (Minchin et al., 1995), caimanes (Guillette et al., 1994) y peces (Purdom et al., 1994; Sumpter, 1995) son sólo algunos ejemplos de la vida silvestre que se han visto perjudicados. Los estudios de estas alteraciones endocrinas se han centrado principalmente en evaluaciones *in vivo* en mamíferos, reptiles y peces, no así en invertebrados a pesar de que estos últimos constituyen alrededor del 95 % de todas las especies animales y cumplen un rol importantísimo en el ecosistema. Al parecer, la clave de la alteración en la reproducción en insectos y crustáceos son las hormonas no peptídicas (ecdisona y hormona juvenil) y los procesos en los que estas hormonas posiblemente actúan sobre el receptor relacionado (Pinder et al., 1999). Es probable que los efectos perturbadores abarquen la reproducción, muda, alimentación y comportamiento. Existen antecedentes de un estudio en que se evaluaron los efectos de 17 β -estradiol (E2), dietilestilbestrol (DES), bisfenol A (BPA) y 4- nonifenol (4-NP) en el crustáceo *Daphnia magna* para determinar el efecto estrogénico y/o DE, demostrando que *D. magna* expuesta a concentraciones de mg/L de estas sustancias manifiesta alteraciones tanto en el crecimiento como en la frecuencia de muda y la reproducción (Brennan et al., 2006).

La mayor parte de los estudios de toxicidad en organismos acuáticos se centran en estudios de mortalidad (toxicidad aguda), aunque es de mayor importancia conocer el efecto de concentraciones subletales que el contaminante tiene sobre el crecimiento la reproducción y la supervivencia de los organismos expuestos. Muchos invertebrados acuáticos pertenecientes al zooplancton, como *Daphnia magna*, son organismos filtradores que se alimentan de partículas tan pequeñas como son las algas del fitoplancton. Cuando el organismo se expone a sustancias tóxicas, éstos afectan al sistema nervioso y por consiguiente al aparato locomotor y filtrador del animal. La consecuencia inmediata es que la tasa de filtración disminuye y, por ello, también la incorporación del alimento; entonces el animal se debilita y esto afecta a su supervivencia y reproducción (Day, 1991). Los dáfnidos son hembras partenogenéticas; producen huevos diploides los cuales eclosionan dando hembras partenogenéticas durante muchas generaciones. El desarrollo es directo y cuando los juveniles abandonan la cámara de incubación, situada bajo el caparazón, el exoesqueleto se desprende, se produce la muda y una nueva puesta es expulsada dentro de la cámara incubadora. Ciertos factores como la temperatura del agua o un descenso en la disponibilidad de alimento (generalmente debida a un aumento de la población), inducen la aparición de machos y así se producen huevos fecundados. Las paredes de la cámara incubadora, ahora, se transforman en una cápsula protectora en forma de estribo llamada ephipium o efípia. Este ciclo biológico se representa en la figura 1.3. Estas efípias flotan, se hunden hasta el fondo o se adhieren a objetos y pueden soportar la desecación y la congelación e incluso resistir el paso por el tubo digestivo de peces, aves y mamíferos. Por medio del viento o de animales, estos huevos pueden ser dispersados a través de grandes distancias así pueden pasar el invierno y sobrevivir a las sequías estivales. Cuando reaparecen las condiciones favorables, las efípias eclosionan dando lugar a hembras partenogenéticas que inician de nuevo el ciclo asexual (Ruppert, 1996).

Como ya se señaló anteriormente en el mecanismo de la reproducción de los crustáceos y de la *Daphnia* en particular la clave al parecer está en las hormonas no peptídicas como ecdisona y hormona juvenil, se sabe que en crustáceos la ecdisona es una prohormona, que se sintetiza a partir de esteroides dietéticos, que se libera a la hemolinfa y posteriormente es hidroxilada a 20 - hidroxiecdisona (20E), esta 20E en primer lugar fue aislada y determinada en la langosta, la 20E parece ser la hormona de la muda predominante en los crustáceos, entre otros ecdisteroides con sus conjugados polares y no polares, los ecdisteroides alcanzan nivel máximo justo antes de la muda y la caída del nivel es muy abrupta después de la muda (Quackenbush, 1992). Se han determinado niveles de ecdisteroides relacionados con la muda en *D. magna* joven, informando que

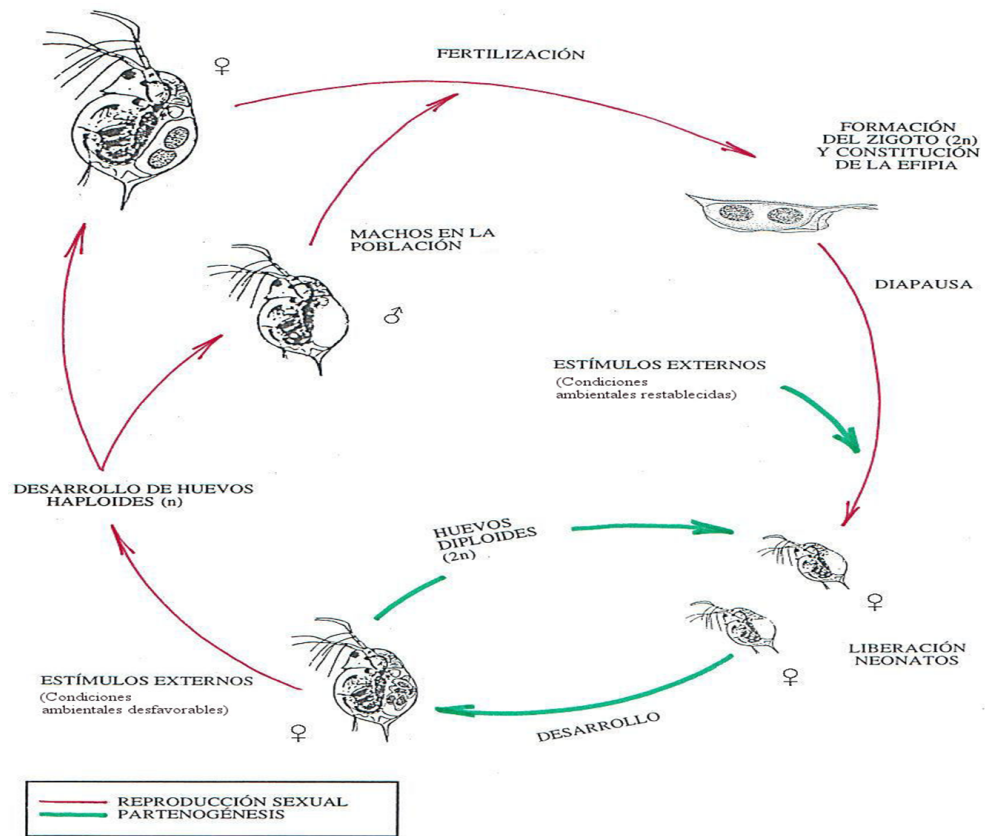


Figura 1.3: Ciclo biológico de *Daphnia*
 En el esquema se observa en verde la reproducción partenogénética y en rojo la reproducción sexuada de *Daphnia*

los niveles de ecdisteroides se mantuvieron bajos a través de la mayor parte del ciclo de muda pero aumentó considerablemente justo antes de la muda, sin embargo, se ha señalado que las vías que conducen a ecdisteroides conjugados son de menor importancia en *D.magna* y no sólo en adultos, sino también en los huevos recién depositados, 20E es la hormona de la muda predominante en la *D.magna*. Hormonas ecdisteroides también funcionan en el control de la embriogénesis, por acción al parecer en el ovario (Subramoniam, 2000). Un cambio en los niveles de ecdisteroides provocados por sustancias químicas ambientales se ha encontrado y relacionado con anormalidades del desarrollo en embriones de *D. magna*, por otro lado la testosterona, como antagonista del receptor de ecdisteroide ha interferido en el desarrollo temprano y tardío de los embriones, por su capacidad para inhibir la ecdisona (Mu and LeBlanc, 2002). En la figura 1.4, se puede visualizar el ciclo hormonal en *D.magna* que hasta ahora se conoce.

De acuerdo a lo señalado anteriormente y debido a que el EMATst obtenido desde las hojas de matico, contiene como componente mayoritario verbascósido, cuyo efecto estrogénico y antiestrogénico fue demostrado en diferentes modelos *in vitro*, en esta tesis se evaluarán los potenciales cambios en el ciclo estral y unión al receptor estrogénico en ratas de laboratorio, además de un estudio toxicológico en *Daphnia magna* para evaluar cambios en la reproducción, sobrevivencia y frecuencia de muda.

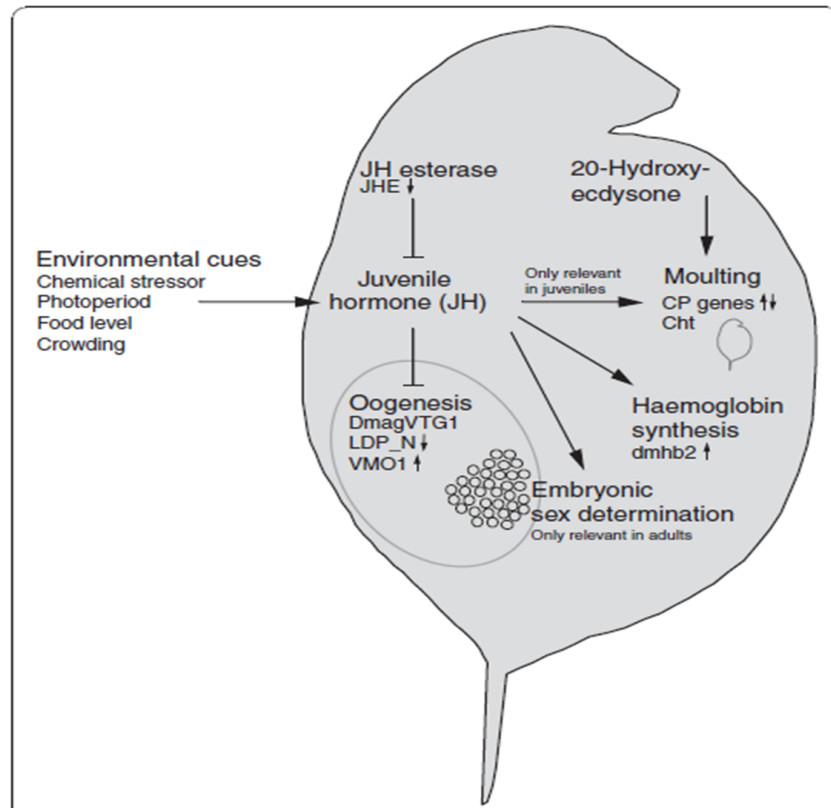


Figura 1.4: Hormonas involucradas en el metabolismo de la *D. magna*
 En el esquema se observan las vías metabólicas y las hormonas que hasta ahora se conocen en el metabolismo de la *Daphnia*

Capítulo 2

Hipótesis

El extracto etanólico de matico estandarizado (EMATst) en su componente mayoritario (verbascósido) posee como efecto tóxico un efecto DE.

Esta hipótesis se sustenta en:

- La actividad estrogénica y antiestrogénica del verbascósido demostrada en estudios previos en cultivos celulares, en ensayos *in vitro* (Papoutsi et al., 2006).
- Los resultados preliminares obtenidos en esta tesis que demostraron la alteración del ciclo estral en ratas al administrar EMATst.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo General

- Demostrar la actividad DE y tóxica del EMATst y de su componente mayoritario verbascósido.

3.2. Objetivos específicos

- Obtener el EMAT y su estandarización en el compuesto mayoritario.
- Aislar e identificar el verbascósido
- Evaluación de las alteraciones que se pudieren producir en el ciclo estral de ratas de laboratorio al administrarles el EMATst
- Determinación de la unión al receptor estrogénico (RE) *in vitro* (RE-binding) del EMATst y verbascósido y evaluar las alteraciones que se pudieran producir en el RE de citosol de útero de rata frente al EMATst y verbascósido
- Evaluación toxicológica aguda de EMATst y verbascósido en *Daphnia magna* mediante la determinación de la CL_{50} a las 24 horas de exposición
- Evaluación de la toxicidad crónica y posible efecto DE del EMATst y verbascósido en *Daphnia magna* mediante la medición de la sobrevivencia, frecuencia de muda y reproducción de varias generaciones a los 14 días de exposición.

Capítulo 4

Materiales y Métodos

4.1. Estudio químico

4.1.1. Obtención de extracto etanólico seriado de matico (EMAT)

El material vegetal utilizado en el estudio se obtuvo del Campus Antumapu de la Universidad de Chile, Santiago, RM, Chile, recolectado durante el mes de enero del 2008, conservando un testigo herbario (SQF: 22349) en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Las hojas de *Buddleja globosa* secas y molidas (1,94 kg) se sometieron a extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente hexano, diclorometano y finalmente etanol. En cada etapa fue eliminado completamente el disolvente para obtener los extractos secos de hexano, diclorometano y etanol. Este último denominado EMAT y fue el extracto estudiado en esta tesis. Los estudios previos realizados en el laboratorio de productos naturales señalan que el tiempo óptimo de maceración debe ser como mínimo 5 horas con el disolvente correspondiente. Cada extracción se realizó hasta total agotamiento del material vegetal, entre cada extracción se dejó secar el material vegetal a temperatura ambiente antes de adicionar el nuevo disolvente. Los solventes utilizados para la preparación de cada uno de los extractos fueron eliminados en un rotavapor a presión reducida y a continuación fueron secados a temperatura ambiente de tal forma de obtener extractos secos.

El extracto etanólico (EMAT) fue estandarizado por CLAE y sometido a un estudio

químico, con el objetivo de aislar el verbascósido.

4.1.2. Estandarización por CLAE del EMAT en contenido de verbascósido expresado en ácido cafeico

La cuantificación del verbascósido se realizó por CLAE-DAD en un equipo Waters 486 acoplado a un detector UV/Visible Waters con arreglo de diodos, basándose en la metodología usada por (Backhouse et al., 2008a). En esta tesis se determinó que las mejores condiciones fueron:

- Columna : C₁₈, LiChroCART®250-4 Purospher®STAR RP-18 (5 μ). Merck (HX675529)
- Flujo : 0,5 mL/min
- Fase móvil : ácido fórmico 0,1 %: acetonitrilo = 70: 30
- Volumen de inyección : 20 μ L
- Longitud de onda : 365 nm

Tal como fue señalado en la introducción, el verbascósido es un fenilpropanoide cuya estructura incluye al ácido cafeico, es por esto que su cuantificación fue expresada en este compuesto.

Con el propósito de obtener la curva de calibración se preparó una solución stock de 1850 ppm de ácido cafeico en metanol LiChrosolv para CLAE. Luego fue sonificada durante 5 minutos y filtrada por membrana GV (Durapore) 0,22 μ m de poro (GVWP01300) en un dispositivo Swinnex (SX0001300) adquiridos de Millipore Corp., Billerica, MA, USA y acoplado a una jeringa de vidrio. El EMATst fue disuelto en metanol grado HPLC.

4.1.3. Aislamiento e identificación de verbascósido en el EMAT

Previamente al fraccionamiento y debido a la alta cantidad de clorofila y taninos presentes en el EMAT, se efectuó un proceso de clarificación con acetato de Pb, ya que estos compuestos interfieren en la visualización del verbascósido en las cromatografías en capa fina (c.c.f.) (Sanabria-Galindo et al., 1999), realizando el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 9,0 g del EMAT y se disolvieron en 2,5 mL de etanol caliente (a punto de ebullición) a esta solución se agregó 2,5 mL de una solución B compuesta de acetato de Pb al 4% y ácido acético al 0,5%. Al momento de adicionar la solución B se observó la formación inmediata de un precipitado de color verde. La solución resultante se centrifugó en reiteradas ocasiones conservando siempre el sobrenadante, que se llevó a sequedad y reconstituyó con etanol.
- Como el Pb es tóxico e interfiere en los análisis, fue necesario corroborar la ausencia de este elemento en el EMAT clarificado, para ello se tomaron 2 tubos de ensayo, en uno se adicionó una pequeña alícuota de la muestra (1 mL) y en el otro (tubo control) una solución de $PbSO_4$ al 1% p/v, a ambos tubos se les ajustó el pH a 9 con amoníaco. Luego se adicionó a cada tubo un volumen de 1 mL de Na_2CO_3 1% p/v. Se observó la presencia de un precipitado blanco y consistente en el tubo control, pero no en el EMAT sometido a clarificación, lo que confirmó la ausencia de Pb por esta metodología.
- También se determinó la presencia de Pb mediante el análisis de espectrometría de absorción atómica, a la solución madre de verbascósido utilizada en los ensayos, preparada con el verbascósido obtenido del fraccionamiento del EMAT con sucesivas columnas cromatográficas.

Fraccionamiento del EMAT

En esta tesis se aisló el verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina, siguiendo la metodología desarrollada por Backhouse et al. (2008). El EMAT fue fraccionado por sucesivas columnas cromatográficas (CC) con silicagel 60 (Merck) y Sephadex LH-20 (Sephadex™ LH-20, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala). La composición química de cada una de las fracciones fue monitoreada mediante c.c.f. realizadas en cromatofolios de gel de sílice 60 F_{254} de Merck. Como fase móvil se empleó la Fase 4A, compuesta por: acetato de etilo / ácido fórmico / ácido acético / agua (10 / 1,1 / 1,1 / 2,6). Las c.c.f. fueron observadas bajo la luz UV a las longitudes de onda 254 y 366 nm y se revelaron con 2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol (NP) (D9754-5G, Sigma

Aldrich). Los flavonoides presentaron fluorescencia anaranjada-rojiza y los fenilpropa-
noides, amarillo o amarillo verdoso a 365 nm.

Antes de la clarificación detallada anteriormente, se hicieron dos CC con silicagel 60, denominadas $CC_1\text{Sil}$ y $CC_2\text{Sil}$. La primera CC se hizo con un fin exploratorio para estimar las polaridades en las cuales eluye el verbascósido, teniendo en cuenta los antecedentes previos (Goity, 2007; Backhouse et al., 2008b). La segunda CC se hizo usando cambios de polaridad más finos de los solventes con que se eluyó esta nueva columna. Tanto en la $CC_1\text{Sil}$ como la $CC_2\text{Sil}$, el principal interferente fue la clorofila, por esta razón es que se decidió pre-tratar el EMAT antes de fraccionarlo sometiénolo a un proceso de clarificación, de acuerdo a método detallado precedentemente. A continuación se procedió a realizar una tercera CC denominada $CC_3\text{Sil}$ con el EMAT previamente clarificado cuyas condiciones son las siguientes:

- Diámetro de la columna: 4 cm
- Cuerpo columna: 2 cm de altura de silicagel
- Cabeza: 22,5 cm de altura (4,3 g de muestra más 4,5 g de silicagel)
- Volumen eluyente: 500 mL

Los resultados del proceso de fraccionamiento de $CC_3\text{Sil}$ se muestran en tabla 4.1.

Tabla 4.1: Esquema de fraccionamiento del EMAT mediante $CC_3\text{Sil}$

Fracción	Solvente	Proporción	Volumen	Compuesto
1-5	DCM	100	500 mL	
6-9	DCM:AcOEt	75:25	500 mL	
10-12	DCM:AcOEt	50:50	500 mL	
13-17	DCM:AcOEt	25:75	500 mL	
18-74	AcOEt	100	500 mL	verbascósido
75-89	AcOEt:MeOH	95:5	500 mL	verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina
90-91	MeOH	100	500 mL	

En las fracciones 18 a la 74 se observó el verbascósido y en las fracciones 75 a la 89 se detectó junto al verbascósido el 7-O-glucósido de luteolina. Las fracciones 18 a 74

de la CC_3 Sil, fueron reunidas en una, dando origen al concentrado VI, (305,2 mg) fue sometido a una purificación mediante una cuarta CC de Sephadex LH-20, denominada CC_4 Seph, detallado en la tabla 4.2, de la página 24, en las siguientes condiciones:

- Diámetro de la columna: 5 cm
- Cuerpo columna: 44 cm de altura (en metanol)
- Volumen de muestra: 10 mL saturado con la muestra sin sólido remanente
- Volumen eluyente: 40 mL
- Fase móvil: HEX/DCM/MEOH = 2/4/4

El Sephadex LH-20 permite la separación de los compuestos principalmente por su peso molecular. Previamente se preparó la CC suspendiendo 30 minutos en metanol el Sephadex LH-20 y una vez incorporado a la columna se ambientó agregando tres veces la fase móvil (HEX: DCM: MEOH = 2: 4: 4). Posteriormente se incorporó el concentrado VI disuelto en la misma mezcla de solvente y se eluyó con la mezcla mencionada. Cabe mencionar que una vez que eluye completamente la muestra y antes de agregar a la CC otro volumen de muestra, la columna se lava cuidadosamente hasta que no quede rastro de la muestra anterior.

Con el objetivo de purificar el verbascósido, las fracciones correspondientes fueron sometidas a una segunda columna de Sephadex denominada CC_5 Seph cuyas condiciones se detallan a continuación

- Diámetro de la columna: 5 cm
- Cuerpo columna: 44 cm de altura (en metanol)
- Volumen de muestra: 8 mL saturado con la muestra sin sólido remanente
- Volumen eluyente: 40 mL
- Fase móvil: HEX/DCM/MEOH = 2/4/4

De la columna CC_5 Seph se recolectaron 80 fracciones, que se describen en la tabla 4.2, de la página 24. Desde la fracción 40 hasta la 55 se obtuvo al verbascósido puro (72,4 mg). Este proceso fue repetido aproximadamente 35 veces hasta obtener 2,5 g de verbascósido, con el fin de realizar los ensayos farmacológicos. El verbascósido fue

identificado de acuerdo a la metodología señalada en el anexo 3.

Las soluciones de verbascósido que fueron preparadas para realizar los ensayos farmacológicos se sometieron a un análisis de determinación de plomo por espectrometría de absorción atómica en el Laboratorio de Toxicología Ocupacional del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) (anexo 4).

Tabla 4.2: Resumen concentrado de fracciones de CC_4 Seph y CC_5 Seph

Columna	Fracciones	Compuesto
CC_4 Seph	1-9	
	10-14	
	15-21	
	22-33	
	31-36	
	37-40	7-O-glucósido de luteolina (75,6 mg)
	41-48	verbascósido (106,7 mg)
	49-54	
	55-80	
	CC_5 Seph	1-39
40-55		verbascósido (72,4 mg)
56-57		
58-80		

4.2. Estudio farmacológico en ratas de laboratorio para determinar la alteración del ciclo estral y unión al RE

4.2.1. Animales y diseño experimental

Para el desarrollo de esta tesis se usaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley provenientes del bioterio de animales de experimentación de la Facultad de Ciencias

Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El protocolo de experimentación realizado en esta tesis fue aprobado por el comité de bioética de esta Facultad.

4.2.2. Grupos experimentales

Ensayo farmacológico *in vivo*

Se analizaron 14 ratas hembras, vírgenes de una edad de 3 meses, con un peso promedio de 280 g, las que se mantuvieron bajo condiciones de luz y T° controlada. Estas ratas fueron separadas en tres grupos: un grupo control y los grupos experimentales I y II a los que se les administró una dosis de EMATst equivalente en moles respecto a verbascósido a la dosis de estradiol valerato (EV) (1x), que produce importantes cambios en la actividad del ciclo estral (Sotomayor-Zarate et al., 2008) y una dosis de 10 veces la dosis de EV (10x), respectivamente.

Ensayo farmacológico *in vitro*

Se usó citosol de útero de rata de cinco ratas hembras las que fueron ovariectomizadas diez días antes de ser sacrificadas de acuerdo al procedimiento establecido. Los úteros de cada hembra fueron extraídos y tratados de acuerdo a una metodología estándar como lo recomienda (Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2002). Las fracciones citosólicas obtenidas (11 mL) fueron almacenadas en volúmenes de 1 mL a -70°C.

4.2.3. Procedimiento experimental

Ensayo farmacológico *in vivo*

Tratamiento con EMATst La administración del EMATst se realizó por vía subcutánea, en los días 0, 2 y 7 del ensayo. El grupo I(1x) recibió 3 dosis de extracto de 0,5 mg/50 μ L de etanol, equivalente en total a una concentración equimolar a estradiol valerato de 10 mg/Kg; el grupo II(10x) recibió una dosis 10 veces mayor, administrada en 3 dosis de 5,1 mg/50 μ L de etanol; el grupo control no recibió extracto.

Registro de la etapa del ciclo estral El ciclo estral fue monitorizado 5 días antes de comenzar la administración del EMATst (día 0) usando la muestra del frotis vaginal. Considerando las etapas del ciclo estral como Proestro (P) (día antes de la ovulación) presenta una alta densidad de células epiteliales a la observación microscópica, que está asociado a un útero hinchado y altamente vascularizado, Estro (E) (día después

de la ovulación) observación microscópica caracterizada por una densa acumulación de células escamosas y un útero que tiene una rápida disminución del tamaño, pero mantiene la vascularización, y Diestro (D) caracterizado por la presencia de leucocitos a la observación microscópica y un útero delgado no vascularizado. La medición del ciclo estral se siguió durante 14 días.

Tratamiento de los animales Los animales fueron muertos por decapitación, recolectando la sangre troncal para la obtención de suero y análisis posteriores; los ovarios, glándula adrenal y ganglio celíaco fueron removidos y congelados inmediatamente, almacenándolos a -80°C para futuros análisis, los úteros fueron también removidos, observados y pesados.

Análisis estadístico Los resultados fueron expresados como media \pm SEM. Las figuras que muestran curso temporal fueron analizadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por un post test Tukey's Multiple Comparison Test de comparación de medias. La diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p fue menor que 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Ensayo farmacológico *in vitro*

Metodología Se usó una metodología adaptada de la técnica que determina la unión competitiva *in vitro* al receptor estrogénico, usando la fracción citosólica de útero de rata como fuente de receptor estrogénico, y 17β -estradiol tritiado ($^3\text{H-E}_2$), (Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2002). Como resultado de este ensayo se determinó la inhibición del 50% de la unión al receptor estrogénico (CI_{50}) y el porcentaje de unión para cada competidor.

Preparación de una fracción citosólica de útero de rata El citosol uterino se preparó usando útero de ratas hembras ovariectomizadas 10 días antes del sacrificio. Se extrajo el útero y se separó del mesenterio y tejido graso. Se pesó cada útero y luego se homogeneizó con tampón TEDG (10 mM de Tris, 1,5 mM de EDTA, 1,0 mM de ditio-treitol y 10% de glicerol ajustado a pH 7,4) en una relación de 0,1g de tejido por 1 ml de tampón TEDG. Para homogeneizar el tejido se usó un homogenizador Ultraturrax (2000g x 12 min). Se transfirió el homogenizado a tubos de centrifuga pre-enfriados y se centrifugó por 12 minutos a 2000 rpm a 4°C . El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrifuga pre-enfriados, y se centrifugó a 40000 rpm a 4°C , durante 60

min. Este sobrenadante se guardó congelado a -80°C para utilizarlo posteriormente. Se determinó el contenido de proteína de cada lote de citosol usando el kit de ensayo con Coomassie blue. Considerando valores normales de proteína entre 4 - 7 mg/mL. Se preparó una curva usando 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL de proteína por tubo, determinando una concentración final de $5.7\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En una primera instancia se utilizó el ensayo RIA, como un ensayo preliminar para corroborar la unión al receptor de proteína con que se contaba, lo que permitió determinar una concentración óptima de fracción citosólica entre 50 y 100 μL por tubo. Posteriormente se continuó con la técnica de unión - ligando.

Ensayo de unión competitiva al receptor estrogénico Primero se preparó el tampón TEDG con 10 mM de Tris, 1,5 mM de EDTA, 1,0 mM de ditiotreitól y 10% de glicerol a pH 7,4. Se agregó el ditiotreitól justo antes de hacer el ensayo. Luego se preparó el trazador: estradiol ($^3\text{H}-E_2$), (New England Nuclear (Dupont) N°NET-517). El ensayo de unión - ligando se realizó con 0,5 y 1 nM de concentración final de $^3\text{H}-E_2$. Se preparó una curva estándar usando E_2 frío por cada ensayo de unión competitiva y se usaron 3 concentraciones de la curva preparada. La concentración final de estradiol frío en los tubos de ensayo varió entre 1.0×10^{-7} a 1.0×10^{-11} M. Las diluciones seriadas se hicieron en etanol absoluto para alcanzar la concentración final deseada.

Preparación de las muestras Se preparó una solución madre, para ello se diluyeron las muestras en etanol absoluto. Se usaron tubos de vidrio siliconizado para preparar las diluciones seriadas adicionando la cantidad necesaria de cada dilución serial de la sustancia a analizar en un volumen final de 500 μL , tomando la precaución de no usar más de 0,25 μL de etanol.

Preparación de los tubos con RE Se usaron tubos eppendorf de 1.7 mL fondo redondo, en duplicado. Se colocaron en baño de hielo agregando lo siguiente por tubo:

- 50 μL de citosol uterino (50 - 100 μg de proteína por ensayo).
- X-Y μL de buffer TEDG csp 500 μL
- 10 μL de $^3\text{H}-E_2$ para obtener una concentración de 0,5 - 1,0 nM
- Y μL de estradiol frío (E_2), control negativo, o sustancia test.
- c.s.p 500 μL volumen total de cada tubo.

Se colocaron los tubos en un agitador vortex asegurándose que todos los componentes quedaran en el fondo del tubo. Se incubaron los tubos a 4°C por 18-20 horas (los tubos se pusieron en un rotator durante la incubación).

Preparación de la mezcla de Hidroxiapatita al 60 % (HAP) El día antes de comenzar la etapa de separación de estradiol tritiado y unido, se preparó la siguiente mezcla: 10g de HAP (BioRad) por cada 100 mL de tampón TEDG, se mezcló suavemente, y se dejó la mezcla de HAP en el refrigerador durante toda la noche. A la mañana siguiente se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el HAP en tampón TEDG fresco. Se dejó que el HAP decantara y se repitió el lavado. Después del último lavado, se resuspendió el HAP en un volumen final de 60 % de HAP y 40 % de tampón. La mezcla se dejó en hielo mientras se hizo el proceso de separación.

Separación de $^3\text{H-E}_2$ unido a RE y $^3\text{H-E}_2$ libre Para minimizar la disociación de la unión del $^3\text{H-E}_2$ al RE durante este proceso se tomó la precaución de dejar el tampón y los tubos de ensayo en hielo y cada etapa se hizo rápidamente. Se sacaron los tubos con las diluciones del rotator, y se pusieron en baño con hielo, se agregó rápidamente 250 μL de la mezcla HAP a cada tubo. Se pusieron los tubos en un agitador vortex y se agitó a intervalos de 5 minutos durante 15 minutos. Se incubaron los tubos y agregó 1,0 mL de tampón TEDG, se agitó rápidamente, luego se centrifugó a 4°C por 10 min y 3000 rpm. Al final de la centrifugación se desechó el sobrenadante y se decantó poniendo los tubos en un rack en un baño frío. Se agregó 1,0 ml de tampón TEDG frío y agitó brevemente para resuspender el pellet de HAP. Se centrifugó a 4 °C por 10 min a 3000 rpm. Se decantó otra vez y desechó rápidamente el sobrenadante, durante dos veces adicionales. Después del lavado final, se decantó el sobrenadante, dejando que los tubos de ensayo drenaran (sobre papel toalla boca abajo y botando la gota que quedaba en la superficie de las paredes del tubo), brevemente por 1-5 minutos.

Extracción y cuantificación del $^3\text{H} - \text{E}_2$ unido al RE ($^3\text{H} - \text{E}_2$ -ER) Se agregó 1,5 mL de etanol (100 %) en cada tubo, permitiendo que los tubos se ambientaran a T° ambiente por 15 - 20 min., se agitó a intervalos de 5 min. Se centrifugaron los tubos por 10 min a 3000 rpm. Se pipetió en alícuotas de 1,0 mL en viales de contador de centelleo. Agregando 4 mL de mezcla para contador de centelleo, se tapó y agitó el vial. Se Colocaron los viales en contador de centelleo (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-carb 2100TR, Packar) para determinación de la desintegración radioactiva medida en cuentas por minuto por vial (CPMs/vial).

Cálculo de CI_{50} Los datos para la curva del E_2 frío standard y cada sustancia química a analizar, se trazaron graficando el porcentaje de $^3H - E_2$ unido vs. el log de la concentración molar del competidor. Usando el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis estadístico de los datos se hizo mediante un método no paramétrico por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por un post test Tukey's Multiple Comparison Test de comparación de medias. La diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p fue menor que 0,05, utilizando el mismo software usado para graficar.

4.3. Estudio toxicológico en *D. magna*

4.3.1. Modelo de experimentación

Los organismos que se utilizaron para desarrollar este trabajo pertenecen a la especie *Daphnia magna* Straus, Kit de ehipias TK33, DAPHTOXKIT F magna with *Daphnia magna*, fabricante MicroBiotests Inc., Bélgica, cuyo cultivo se inició el año 2009 a partir de estos individuos. En nuestro laboratorio se mantuvo un cultivo permanente de acuerdo a lo descrito en la Norma Chilena (1999) en acuarios de cuatro litros de capacidad, figura 4.1, de la página 32. La densidad del cultivo no excedió los 50 animales por litro de agua. Se utilizó una pipeta graduada con un succionador de goma para separar los adultos de los neonatos y contabilizar los neonatos de cada acuario que nacían a diario. Para evitar el envejecimiento de la colonia, periódicamente se sustituyó un acuario de adultos por otro de neonatos. Los acuarios se mantuvieron a una temperatura de 21 ± 2 °C, y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, controlado por un temporizador. Los dáfnidos del cultivo se alimentaron *ad libitum* día por medio con 1000 μL de una solución concentrada de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* ex *Selenastrum capricornatum*, proveniente del cultivo preparado por el laboratorio de bioensayo, además a cada acuario se le proporcionaron 500 μL de un alimento denominado YCT, compuesto de levadura y pescado, cada vez que se renovaba el agua del acuario.

El cultivo del acuario comenzó con la elaboración de un clon partiendo de una hembra grávida la que se separó y dejó en un recipiente pequeño con el medio de cultivo y alimento (madre = F_0), se tomaron de esta hembra los neonatos nacidos vivos y se pusieron en un acuario (primera generación = F_1), se mantuvo este acuario en las condiciones antes mencionadas hasta obtener una nueva generación de neonatos de la segunda camada (segunda generación = F_2) los que nuevamente fueron puestos en un acuario repitiendo el procedimiento anterior hasta la obtención de un F_3 , que corresponde a la tercera generación; a partir de esta generación se utilizaron los neonatos menores de 24 horas de nacidos para realizar los ensayos.

4.3.2. Medios de cultivo y mantención de *D. magna*

El medio de cultivo de los dáfnidos fue renovado una vez por semana, utilizando una solución denominada dulce estándar (DS), compuesto por agua destilada aireada hasta alcanzar el nivel de saturación en oxígeno y sales para darle la dureza adecuada, la composición del DS se describe en la tabla 4.3, de la página 31.

Las condiciones físico-químicas del DS deben ser las siguientes:

- dureza total: 160- 180 mg de CaCO_3/L
- pH: 7,6 - 7,8
- alcalinidad: 110 - 120 ppm CaCO_3
- O_2 disuelto: 8,0 ppm, 99 % de saturación
- conductividad: $505\mu\text{s}/\text{cm}$

Tabla 4.3: Composición del medio de cultivo Dulce estándar(DS)

Sal	Cantidad (g) para 20 L	Molaridad
NaHCO_3	3,84g	$2,5 \times 10^{-3}\text{M}$
KCl	0,16g	$1,1 \times 10^{-4}\text{M}$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	4,92g	$1,0 \times 10^{-3}\text{M}$
$\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2,4g	$7,0 \times 10^{-4}\text{M}$

4.3.3. Diseño experimental

Los ensayos *in vivo* se realizaron inicialmente en el laboratorio de Bioensayos del Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA) quien proporcionó la cepa adecuada y estandarizada de *Daphnia magna* con la que se trabajó, posteriormente se continuó con el trabajo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, sede Vicuña Mackenna, donde se implementó un laboratorio de bioensayos, manteniendo las condiciones de temperatura, ciclo de luz/oscuridad y oxigenación similares a las del laboratorio de bioensayos del CENMA.

Se utilizó dicromáto de potasio como tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de los organismos (de acuerdo a lo establecido en la Norma Chilena N° NCh 2083, of. 1999) y se utilizó 17 β -estradiol como fármaco de referencia del efecto estrogénico tanto para el ensayo agudo como para el ensayo crónico (Brennan et al., 2006). Como ya se dijo anteriormente los cultivos de la especie en estudio fueron alimentados con

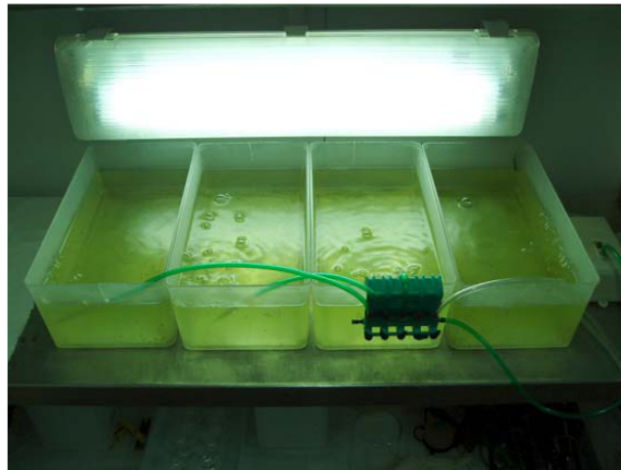


Figura 4.1: Mantenimiento de cultivos de *D. magna* en el laboratorio
Acuario con el cultivo de *D. magna*, luz, temperatura y oxigenación adecuada

Pseudokirchneriella subcapitata proporcionado por los laboratorios de biotecnología de microalgas tanto del CENMA como del laboratorio de productos naturales de nuestra facultad. El procedimiento de producción de *P. subcapitata* se describe en el anexo 5.

Es conveniente mantener condiciones de cultivo idóneas para que la población de *D. magna* encuentre su crecimiento óptimo, evitando en la medida de lo posible, que parámetros como la temperatura, el alimento, la concentración de oxígeno, o la densidad poblacional, dificulten un correcto desarrollo del cultivo, lo cual podría afectar a la obtención de neonatos en buenas condiciones para desarrollar los estudios de toxicidad (Castillo, 2004).

Ensayos con $K_2Cr_2O_7$ Durante el curso de los experimentos y en forma paralela a los ensayos con las muestras se realizaron las pruebas con $K_2Cr_2O_7$ como tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de la cepa de *D. magna*, determinando la CL_{50} (concentración letal cincuenta) que se define como aquella que produce la inmovilidad o muerte del 50 % de la población objeto de estudio por efecto del tóxico empleado en el ensayo (OCDE, 2000). Estas pruebas se hicieron utilizando 4 réplicas con 5 concentraciones de $K_2Cr_2O_7$, reconocido estándar en este tipo de ensayos toxicológicos, y 4 controles, de acuerdo a la metodología descrita en la Norma Chilena (I.N.N., 1999), la cual propone como límites para CL_{50} valores que fluctúan entre 0,6 y 2,1 mg/L. Las concentraciones utilizadas se detallan en la tabla 4.5, de la página 39.

4.3.4. Compuestos ensayados

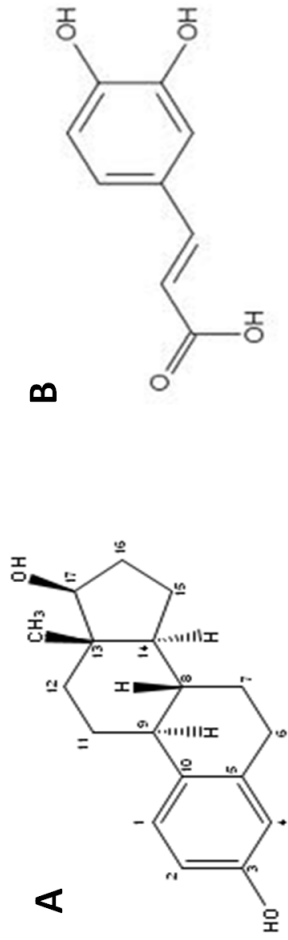
17 β -estradiol Figura 4.2 A (99 % pureza, SIGMA), polvo blanco, fórmula molecular: $C_{18}H_{24}O_2$, pm 272.4, punto de fusión de 173-179 °C. Sensible a la luz y al aire, prácticamente insoluble en agua, poco soluble en aceites vegetales, soluble en alcohol, acetona, dioxano y dimetil sulfoxido (DMSO), solvente utilizado en este estudio.

Ácido cafeico Figura 4.2 B (SIGMA), polvo blanco - amarillo de fórmula molecular: $C_9H_8O_4$, peso molecular 180.16 y punto de fusión de 173-179 °C. Poco soluble en agua, soluble en alcohol y DMSO. Dosis letal intraperitoneal en ratas es de 1500 mg/kg, posible cancerígeno, por inhalación y por contacto ocular puede provocar irritaciones leves. Debe evitarse el contacto de esta sustancia con agentes oxidantes fuertes, ácidos fuertes, bases fuertes, monóxido de carbono y dióxido de carbono.

EMATst Fue obtenido de acuerdo a la técnica descrita en el punto 5.1.1. El producto es una pasta de color café oscuro, de olor característico soluble en agua y altamente soluble en solventes como etanol y DMSO utilizados en este estudio. Se conserva protegido de la luz y la humedad.

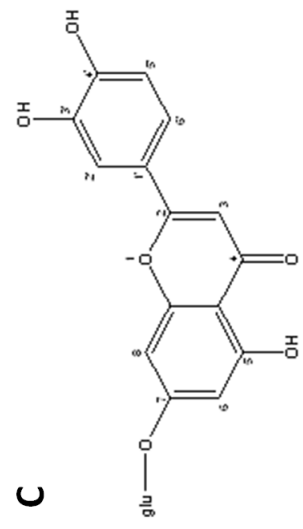
Verbascósido Corresponde a un fenilpropanoide de fórmula molecular $C_{29}H_{36}O_{15}$, peso molecular 624.594 obtenido a partir del EMATst mediante el procedimiento descrito en el punto 5.1.2., color café - amarillo. La estructura del verbascósido se muestra en la figura 1.1, de la página 7.

7-O-glucósido de luteolina Es una flavona (O- eterósido) figura 4.2 C de peso molecular 594, obtenido a partir del EMAT mediante el procedimiento descrito en el punto 5.1.2. Residuo pastoso de color amarillo oro.



ácido cafeico

17 β- estradiol



17-O-glucósido de luteolina

Figura 4.2: Fórmulas estructurales

4.3.5. Procedimiento experimental

Evaluación de toxicidad aguda

Se realizó mediante la determinación de la Concentración letal 50 (CL_{50}) de las muestras en estudio sobre *D. magna*. Las condiciones para desarrollar este tipo de ensayo de toxicidad aguda, así como los de tipo crónico que se llevaron a cabo posteriormente, aparecen publicados en el protocolo de la Norma Chilena (1999) y de la OECD *Guidelines for testing of chemicals* (2000), respectivamente. Estos ensayos se realizaron utilizando neonatos (menor de 24 horas de nacidos), para ello se separaron a diario los neonatos que nacían en cada acuario, de esta manera se aseguró que el día de inicio del ensayo los neonatos empleados no excedieron la edad recomendada. Se efectuaron, una serie de ensayos preliminares para determinar el rango de concentraciones de las sustancias ensayadas en el test de toxicidad definitivo. De esta manera, se eligió un intervalo entre la concentración más alta de la muestra que no produjo efecto letal en los organismos expuestos y la primera concentración que causó el 100 % de mortalidad en el ensayo preliminar. El ensayo definitivo condujo a la determinación del valor de la CL_{50} a las 24 horas de exposición. Tanto en los ensayos preliminares, como en los definitivos, se utilizaron recipientes de vidrio de 50 mL de capacidad, conteniendo 10 mL de la dilución del tóxico correspondiente de cada una de las concentraciones a ensayar. Se usó en el ensayo un control (+) que contiene el disolvente usado en el ensayo (DMSO) en la concentración máxima y un control (-) el cual contiene solamente el medio de dilución DS, con ambos controles la mortalidad no debió exceder el 10 % de los individuos ensayados para que el cálculo de la CL_{50} fuera aceptado como válido. El solvente de dilución (control (+)) debe contener la máxima cantidad de disolvente utilizado para las muestras en estudio (en nuestro trabajo fue DMSO). Para resolver este problema se hizo una prueba que determinó la concentración máxima de DMSO posible de utilizar en los ensayos, cuyos resultados nos indicaron que el uso de este disolvente en una concentración máxima de 15 mL/L no produce efectos sobre los dáfidos. La preparación de las soluciones de cada muestra de prueba (disolviendo la solución madre inicial en DS) se hizo inmediatamente antes de la transferencia de los dáfidos a los recipientes con el medio preparado, de acuerdo a lo descrito en el protocolo de la OECD del año 2000 (OCDE, 2000). El DS utilizado en estos ensayos cumplió con las condiciones físico-químicas antes detalladas.

Procedimiento En cada recipiente se colocaron, escogidos al azar del cultivo original (previamente sacados del acuario y dejados en DS), 5 neonatos, efectuándose para cada concentración ensayada, cuatro réplicas, 20 individuos en total por cada concen-

tración (figura 4.3 de la página 39). Tras sumergir a los neonatos en el medio de cada concentración ensayada, se añadió una pequeña cantidad de alcohol cetílico en cada recipiente de vidrio de 50 mL para evitar que los neonatos quedaran atrapados en la superficie del agua. Si no se toma esta precaución, los neonatos podrían quedar retenidos por la fuerza de la tensión superficial, dificultando su total inmersión en el medio, hecho que interferiría en los resultados al tiempo que podría, incluso, ocasionarles la muerte. Se han realizados estudios para comprobar que el alcohol cetílico no produce efecto negativo alguno en los dáfnidos (Cotou, 1993).

Condiciones del ensayo y criterios de aceptación Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron a una temperatura de $22 \pm 1^\circ C$; resguardados de la luz; sin alimentación durante el ensayo, condiciones estáticas (ausencia de cambio del medio durante la duración del mismo) y sin aireación del medio. A las 24 horas de iniciado el ensayo se registró la inmovilidad o muerte de los dáfnidos en cada concentración de la muestra en estudio. Considerando criterio de muerte la carencia de movilidad o la ausencia de actividad cardíaca al observar los individuos por 10 segundos exponiendo los recipientes a la luz o al hacerlos girar (NCh2083; OECD 2000).

Registro del protocolo de ensayo Se describen en la planilla especialmente diseñada para cada muestra (anexo 6).

Cálculos de la CL_{50} y Registro de los resultados Se procedió al cálculo de la CL_{50} de cada sustancia de prueba ensayada sobre *D. magna* utilizando el *PROBIT* (Stephan, 1977). Los resultados se registraron en una planilla diseñada para ello.

Concentraciones utilizadas En esta tesis, los dáfnidos fueron expuestos a concentraciones del rango en mg/L tanto de EMATst, como de verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina y ácido cafeico, estas concentraciones se detallan en la tabla 4.4, de la página 38, utilizando 17β -estradiol como tóxico de referencia (Brennan et al., 2006) considerando un CL_{50} de 3,67 mg/L a las 24 horas de exposición. Una vez realizadas las pruebas preliminares se definieron las concentraciones definitivas para EMATst, verbascósido y ácido cafeico para determinar la CL_{50} de cada una de estas muestras sobre *D. magna*, tabla 4.4.

Ensayos con $K_2Cr_2O_7$ En forma paralela se realizaron los ensayos descritos en diseño experimental, cuyas concentraciones utilizadas se detallan en la tabla 4.5.

Tabla 4.4: Resumen de concentraciones en mg/L a la que se expusieron los dáfidos durante todo el proceso

	17 β -estradiol	EMATst	Verbascósido	7-O-glucósido de luteolina	ác.cafeico
Conc. preliminar mg/L	n.d.	13	0.92	320	39
		27	1.84	640	78
		55	3.67	1280	156
		100	7.34	2560	313
		140	14.7	5120	376
		200	29.4		451
		320	58.8		471
		625	117.6		491
		980	235.2		511
		1400	320		541
		1700	640		619
		5000	1280		625
		9800	2560		750-*
Conc. definitiva mg/L	0.92	320	625	n.d.	451
	1.84	625	875		472
	3.68	1250	1225		491
	7.36	2500	1715		511
	14.7	5000	2401		541

n.d.: no determinado, *: 900, 1080, 1250, 1296, 2500, 5000, 10000

Tabla 4.5: Concentraciones utilizadas en el ensayo con $K_2Cr_2O_7$

Sustancia de prueba	C_1 mg/L	C_2 mg/L	C_3 mg/L	C_4 mg/L	C_5 mg/L
$K_2Cr_2O_7$	0.15	0.3	0.6	1.2	2.4

Control (-): DS, Control (+): DMSO

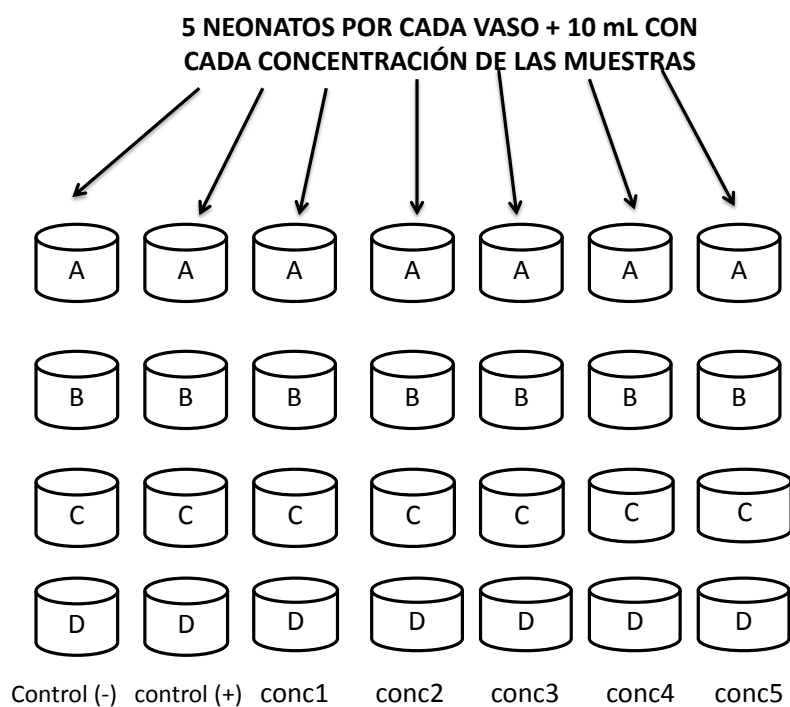


Figura 4.3: Esquema de ensayo agudo

Recipientes (vasos de 50 mL) usados en el ensayo agudo tanto para los controles como para las cinco concentraciones de muestra, cada vaso contiene cinco neonatos

Evaluación de toxicidad crónica

La metodología usada se hizo de acuerdo a lo establecido en la OCDE 2000 para las muestras en estudio sobre *D. magna*, en la cual se describen las condiciones óptimas en cuanto a densidad de organismos, concentración de alimento (alga), tiempo de exposición al tóxico, condiciones fisicoquímicas del medio, parámetros de luz y oscuridad, entre otros. Se determinó la sobrevivencia, frecuencia de muda y reproducción de *Daphnia magna* expuesta a distintas sustancias de prueba durante 21 días de exposición.

Preparación de las diluciones y concentraciones utilizadas en cada ensayo

Se preparó cada sustancia de prueba pesando en balanza analítica EMATst y verbascósido, los que se disolvieron en DMSO para asegurar una disolución total de la muestra antes de disolver en DS; a continuación se preparó una solución madre para cada sustancia de prueba, el 17β -estradiol utilizado como tóxico de referencia (Brennan et al., 2006) se disolvió en DMSO solamente, de estas soluciones madres se tomó la cantidad necesaria para obtener las diferentes concentraciones a ensayar. La solución madre empleada fue al 10 % para el EMATst y 17β -estradiol y de 9,8 % para verbascósido. La preparación de cada solución madre de las muestras utilizadas se describen en las planillas especialmente diseñadas para ello (anexo 7). Se hicieron las diluciones tomando la alícuota necesaria mediante micropipeta y depositándola en probeta de vidrio con el volumen requerido para obtener la concentración deseada. Se utilizó además un control exento de la sustancia de prueba sólo con DS. A cada probeta se le incorporó la cantidad de alga *P. subcapitata* necesaria para la alimentación de los dáfnidos, en una concentración de 250.000 cél/ml las que fueron calculadas a partir del número de células totales de cada pellet utilizado.

Procedimiento Cada experimento constó de diez réplicas por concentración con una cantidad máxima de un individuo, dispuestos en vasos individuales de 50 mL de capacidad, con 40 mL de la dilución. A continuación cada neonato de menos de 24 horas de nacido se introdujo en uno de los vasos mediante el uso de una pipeta adecuada. Durante los primeros días del ensayo se añadió alcohol cetílico al medio (en forma de lentejas pulverizadas), que como se ha comentado rompe la tensión superficial del agua e impide que los neonatos queden retenidos facilitando que se sumerjan completamente en el medio. Con una frecuencia de día por medio se renovó el medio del ensayo permitiendo así mantener la concentración de sustancia de prueba, el alimento, y oxigenación constantes. Los animales fueron transferidos a este medio fresco y cada día se anotó en una planilla la aparición de mudas, aparición de huevos y posteriormente número de neonatos por camada, además de cualquier otra observación, de acuerdo al esquema de

la planilla descrita en la tabla 4.6 de la página 42. En todo momento se evitó perturbar a los animales en el proceso de la transferencia de un medio a otro. Cada vez que se efectuó cambio de medio se midieron los parámetros de O_2 disuelto, pH y temperatura tanto del medio nuevo como del medio antiguo. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 16/8 h a 800 lux y a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Para cada uno de los tratamientos se realizó un ensayo crónico de 21 días de duración, al igual que en una primera y segunda generación. El procedimiento del ensayo se esquematiza en la figura 4.4 de la página 43.

Parámetros determinados La aparición de mudas se evaluó diariamente observando el depósito de la muda en el fondo de cada recipiente. La aparición de huevos se determinó al observar la aparición de huevos en la cámara de crías ubicada en la sección posterior del cuerpo de cada individuo. Como parámetros reproductivos se estudiaron: El tiempo de la primera puesta de huevos, o tiempo transcurrido desde el inicio del experimento hasta la primera reproducción de los animales (primera camada), tamaño de la camada, que corresponde al número de neonatos que cada hembra tiene en cada camada, número de neonatos por hembra, que corresponde al número promedio de neonatos totales nacidos por cada hembra, durante los días del ensayo, número de camadas, que es el número promedio de camadas producidas por cada hembra durante el ensayo, también se mide el parámetro de sobrevivencia.

Tabla 4.6: Estructura de la planilla de registro de ensayos crónicos

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
conc	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A																						
B																						
C																						
D																						
E																						
F																						
G																						
H																						
I																						
J																						

*: Aparición de muda/ aparición de huevos/Nº de neonatos/Nº de la camada

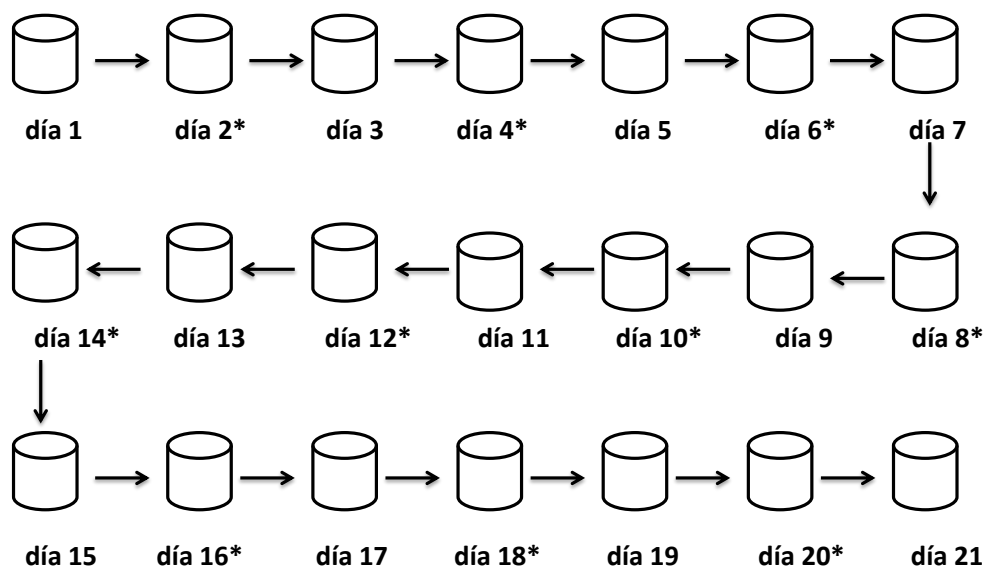


Figura 4.4: Esquema del ensayo crónico

Secuencia de cada recipiente en el curso del ensayo crónico, en el día 0 se introduce un neonato en cada recipiente que se encuentra con 40 mL de dilución, día por medio se hace cambio de medio *, en total se usan 40 vasos por muestra.

Concentraciones utilizadas Basándose en los resultados de los ensayos de toxicidad aguda previamente realizados en que se calculó la CL_{50} para el EMATst, de forma preliminar se eligieron las siguientes concentraciones subletales: 194, 158, 117, 59, 29, 12, 6 y 3 mg/L. Del mismo modo con los datos obtenidos del ensayo de toxicidad aguda del verbascósido se trabajó de forma preliminar con las siguientes concentraciones subletales: 250, 125, 63, 12, 6 y 3 mg/L. Para el caso del estradiol usado como fármaco de referencia se utilizaron las concentraciones usadas en el estudio de Brennan *et al.*:

0,6; 0,8 y 1 mg/L. Las concentraciones mencionadas en mg/L se detallan en la tabla 4.7. Estos ensayos, se realizaron para cada una de las sustancias de prueba seleccionadas y declaradas anteriormente tanto para el EMATst y el verbascósido, además del 17β -estradiol como fármaco de referencia. Se utilizaron neonatos de menos de 24 horas de vida que procedieron directamente del cultivo que se mantiene en el laboratorio. Una vez realizadas las pruebas preliminares se determinaron valores inferiores para realizar los ensayos definitivos, debido a que con las concentraciones más altas se produjo muerte de la población, fenómeno que no se buscaba observar en esta oportunidad, por lo tanto, se definieron las concentraciones para EMATst, y verbascósido orientadas a la determinación de parámetros de reproducción como número de neonatos y frecuencia de muda de cada uno de los individuos estudiados, también estas concentraciones se detallan en la tabla 4.7, de la página 44.

Tabla 4.7: Resumen de concentraciones en mg/L a la que se expusieron los dáfnidos durante todo el proceso

	17 β - estradiol	EMATst	verbascósido
Conc. preliminar	n.d.	194	250
mg/L		158	125
		117	63
		59	
		29	
Conc. definitiva	0,6	3	3
mg/L	0,8	6	6
	1	12	12

n.d.: no determinado

Ensayo con $K_2Cr_2O_7$ Para montar el ensayo crónico respectivo se realizó la misma prueba con $K_2Cr_2O_7$ como tóxico de referencia usada en el ensayo agudo y descrito en el diseño experimental.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Estudio químico

5.1.1. Obtención de los diferentes extractos desde las hojas de *B. globosa*

De la extracción con solventes de polaridad creciente de las hojas secas y molidas de *B. globosa* recolectada en el Campus Antumapu de la Universidad de Chile, RM, Santiago, en la época de verano, se obtuvo 40,2 g de extracto hexánico (EH) seco, rendimiento equivalente a 2,1 %; 26,3 g de extracto diclorometano EDCM seco, rendimiento de 1,4 % y 163,0 g de EMAT con un 8,4 % de rendimiento. Si se comparan estos resultados con los reportados por Goity (2007) que trabajó con hojas recolectadas en el sector de Padre las Casas, Temuco, IX Región, los rendimientos en este trabajo fueron (EMAT) 9,0 %, además los EH y EDCM fueron obtenidos con rendimientos de 2,7 % y 1,8 %, respectivamente, figura 5.1, de la página 46. Estos resultados revelan que no existen grandes variaciones en el contenido total de metabolitos secundarios entre el material recolectado en la RM en comparación al obtenido en la IX Región.

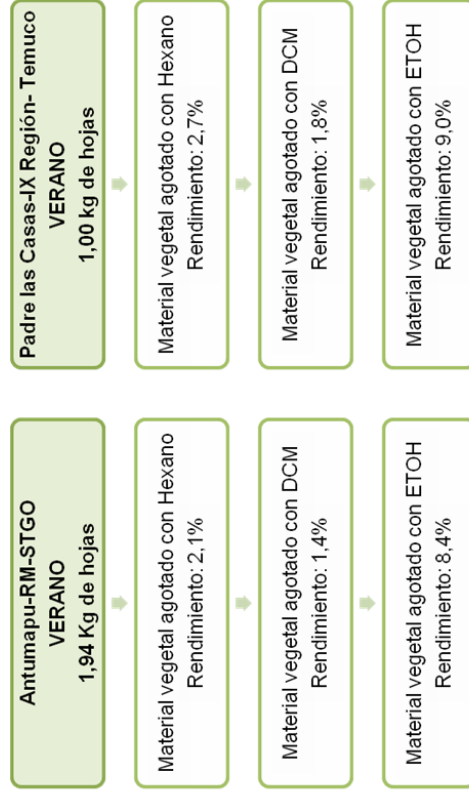


Figura 5.1: Rendimiento comparativo de los diferentes extractos

Extractos elaborados con hojas de matico recolectado en Antumapu versus los extractos elaborados con hojas de matico recolectado en Padre Las Casas

5.1.2. Estandarización por CLAE-DAD del EMAT en contenido de verbascósido expresado en ácido cafeico

De la solución madre de ácido cafeico disuelto en etanol grado HPLC se obtuvo por dilución las concentraciones necesarias para obtener la curva de calibración cuyos valores se detallan en la tabla 5.1, de la página 48 y se representan en la figura 5.2, de la página 49. El análisis cuantitativo se realizó a una longitud de onda de 365 nm.

Para evaluar la cantidad del verbascósido presente en EMAT se inyectaron 20 μL del extracto disuelto en etanol grado HPLC a una concentración de 1,58 mg/mL en triplicado y se obtuvo un promedio de integración de las áreas de los cromatogramas de 9329386, posteriormente interpolando este valor en la curva de calibración del ácido cafeico, de la figura 5.2 se obtuvo una concentración de 0,61 mg/mL de verbascósido expresado en ácido cafeico.

Tabla 5.1: Concentraciones versus área de ácido cafeico obtenidas por CLAE-DAD

Concentración ppm	Área	Promedio área +/-DS
115,625	1523533	
	1985404	1862819,7 +/-297575,4
	2079522	
321,25	4152639	
	3990560	4033562,7 +/-1044010,4
	3957489	
462,5	6839473	
	7081817	6983903,7 +/-127693,2
	7030421	
925	15630371	
	13920577	14636158,3 +/-888299,2
	14357527	
1850	28318420	
	28769850	29064993,0 +/-929960,0
	30106708	

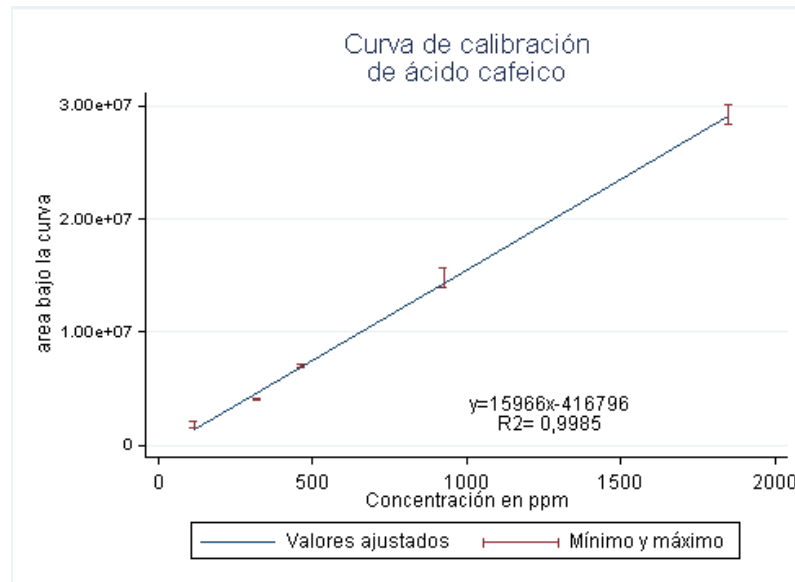


Figura 5.2: Curva de calibración del ácido cafeico

En este estudio se lograron establecer las condiciones óptimas para determinar cuantitativamente el verbascósido en el EMAT por CLAE-DAD, probando diferentes fases móviles y flujos. Constatando que la fase móvil y el solvente utilizado para disolver el EMAT adquirieron notable importancia en la resolución de los peaks, mejorando la resolución de éstos. Los cromatogramas obtenidos por CLAE permitieron visualizar los compuestos mayoritarios presentes en el EMAT (verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina). Los perfiles cromatográficos del EMAT de la IX Región, figura 5.3 de la página 50 comparado con el del EMAT recolectado en el campus Antumapu, figura 5.4 de la página 51 son similares. Las señales fueron asignadas según su espectro UV obtenidos anteriormente por Backhouse et al.(2008b), y utilizando las sustancias aisladas para confirmar su Tr.

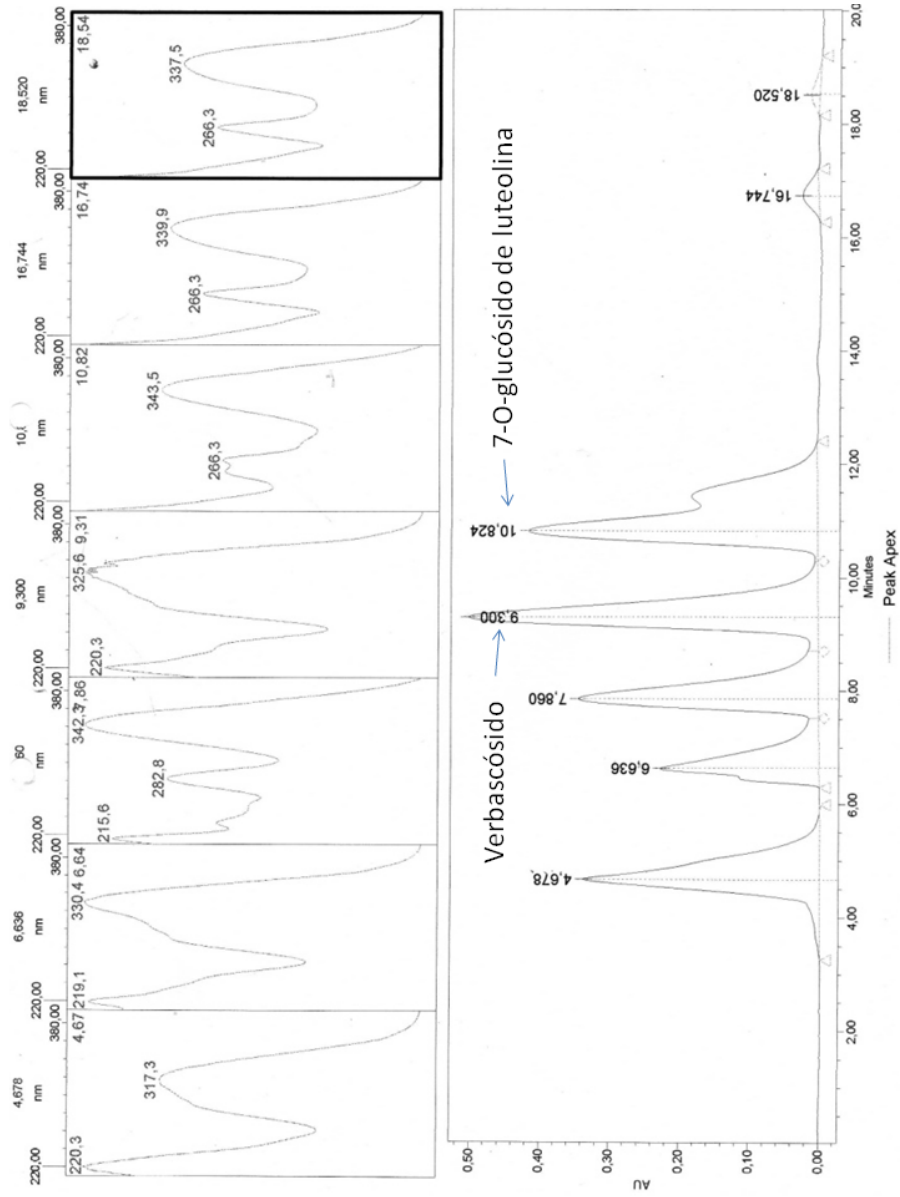


Figura 5.3: Cromatograma HPLC - DAD para EMAT obtenido en Padre las Casas. Tiempos de retención de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina para EMAT obtenido de las hojas de matico recolectado en Padre las Casas. En la parte superior del cromatograma se muestra el espectro UV-visible para ambos compuestos (EMAT 1,58 mg/L en EtOH 100 % a 365 nm)

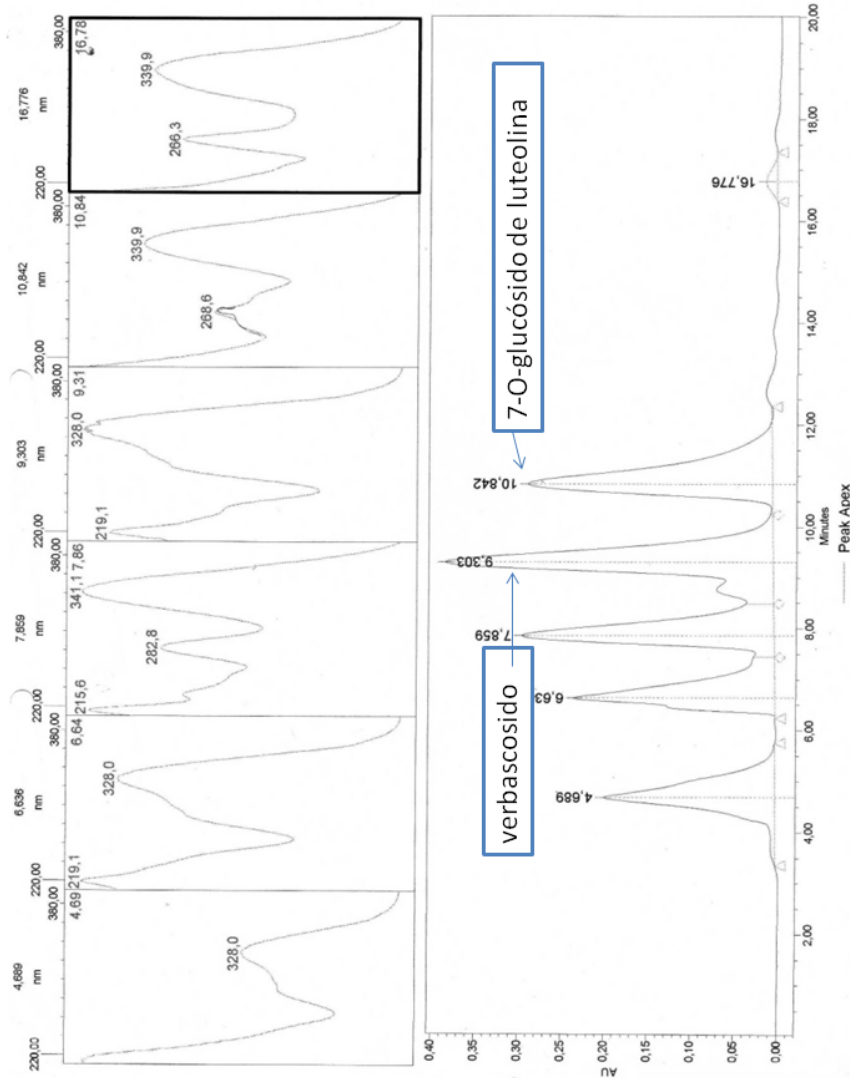


Figura 5.4: Cromatograma HPLC - DAD del EMAT obtenido en Antumapu. Tiempos de retención de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina para EMAT obtenido de las hojas de matico recolectado en Antumapu. En la parte superior del cromatograma se muestra el espectro UV-visible para ambos compuestos (EMAT 1.87 mg/L en EtOH 100 % a 365 nm)

5.1.3. Aislamiento e identificación de verbascósido en EMATst

El proceso previo de clarificación resultó bastante efectivo en relación a la disminución del contenido de clorofila y taninos, lo cual permitió facilitar la purificación del verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina, se obtuvieron fracciones con ausencia total de clorofila que se purificaron con mayor facilidad por las CC.

El análisis de la determinación de plomo de la solución madre de verbascósido por espectrometría de absorción atómica en el Laboratorio de Toxicología Ocupacional del ISP (anexo 4), permite concluir que las soluciones preparadas a partir de esta solución madre para ser evaluadas en el ensayo de toxicidad aguda, contienen Pb dentro de límites aceptables.

Con el fin de aislar ambos compuestos, el fraccionamiento del EMATst en CC de gel de sílice 60 llevó a la obtención de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina a partir de las fracciones eluidas con AcOEt 100 % hasta AcOEt: MeOH 95:5 descrito en la tabla 4.1, de la página 22. De la columna *CC₃Sil* se obtuvieron 305,2 mg de fracciones ricas en verbascósido, las cuales fueron sometidas a un nuevo fraccionamiento en la *CC₄Seph* consiguiendo 106,7 mg de verbascósido y 75,6 mg de 7-O-glucósido de luteolina. Los 106,7 mg de verbascósido se purificaron en una nueva columna de Sephadex LH-20 (*CC₅Seph*), obteniéndose 72,4 mg de verbascósido puro, tal como se describe en la tabla 4.2, de la página 24. Este proceso fue repetido aproximadamente 35 veces hasta obtener 2,5 g de verbascósido, para ser utilizado en los ensayos farmacológicos. En el anexo 3 se describe el procedimiento de identificación del verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina.

5.2. Estudio farmacológico

5.2.1. Evaluación del efecto del EMATst sobre el ciclo estral de ratas

El peso de los animales no cambió significativamente entre los animales tratados con EMATst (grupo I y II) y el grupo control, durante el curso de los experimentos, tabla 5.2, de la página 54. Tampoco se observó cambio en el peso corregido de los úteros (peso útero/peso rata), de los animales controles y los tratados. En el grupo control la etapa del ciclo estral determinada por el frotis vaginal coincidió con la morfología uterina tabla 5.3, de la página 55, sin embargo, no ocurrió lo mismo con los animales tratados. En el grupo de los tratados con una alta dosis de EMATst (grupo II) el frotis vaginal mostró diferencias con la morfología uterina.

Tabla 5.2: Pesos en g de cada rata antes del tratamiento y al final del tratamiento con EMATst a los 14 días

GRUPO	Peso en g										$\bar{\Delta}$	σ					
	RATA1	RATA 2	RATA 3	RATA 4	RATA 5	RATA 6	RATA 7	RATA 8	RATA 9	RATA 10							
dia	0	14	Δ	0	14	Δ	0	14	Δ	0	14	Δ					
Control	337	354	17	307	308	1	308	319	11	315	327	12	-	-	8,2	7,4	
Grupo I	234	237	3	310	313	3	310	320	10	320	320	0	295	296	1	3,4	3,9
Grupo II	300	316	16	280	285	5	282	292	10	249	265	16	312	337	25	14,4	7,5

σ :Desviación estándar 0: Antes del tratamiento 14: Después del tratamiento

Tabla 5.3: Observación comparativa del aspecto de útero y ovario vs ciclo estral de las ratas de los grupos control, I y II, después de 14 días de tratamiento con EMATst

Grupo	Características observadas en útero y ovario	Corr.	Ciclo
R1 G.C.	Largo poco hinchado, apariencia diestro	.001g	P
R2 G.C.	Ovar.rojo,útero oscuro,implica E pasando a D	.001g	D
R3 G.C.	Ovar.rosado,útero inflado,implica P	.003g	P
R4 G.C.	Ovar.rojo,quistes,útero enrojado no hinchado E	.001g	E
R1 G.I.	Ova.rojo,útero rojizo,no hinchado E pasando a D	.002g	D
R2 G.I.	Útero hinchado, implica P temprano	.002g	E
R3 G.I.	útero muy hinchado, implica P evidente	.002g	P
R4 G.I.	Útero hinchado, implica P	.002g	E
R5 G.I.	Útero levemente hinchado, implica P	.002g	E
R1 G.II.	Útero muy hinchado,implica P,con manchas, parecen implantantes de crías	.003g	P
R2 G.II.	Útero con manchas (zonas puntiformes rojas)	.002g	D
R3 G.II.	Útero muy hinchado, implica P evidente	.002g	P
R4 G.II.	Útero bien hinchado,implica P,pero ovar. en D	.002g	D
R5 G.II.	Útero claramente muestra P	.002g	D

Corr.: peso útero corregido por el peso del individuo: peso útero/peso rata G.C.: Grupo Control, G.I.:Grupo I, G.II.:Grupo II, R:rata

En cuanto a la actividad del ciclo estral representada en la figura 5.5 de la página 56 cuyos resultados se detallan en las tablas 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4 del anexo 1, el grupo control muestra un ciclo estral normal de 4 días, P y E de un día y D dos días, en la secuencia normal de P-E-D-D. El grupo I muestra aciclicidad estral caracterizada por una alteración en la secuencia cíclica. Estas diferencias se demostraron claramente cuando se usó la dosis 10x del EMATst en el grupo II, que se observa en la misma figura. Porque después de administrar la dosis 10x, muchas ratas detuvieron su actividad cíclica durante el período en estudio.

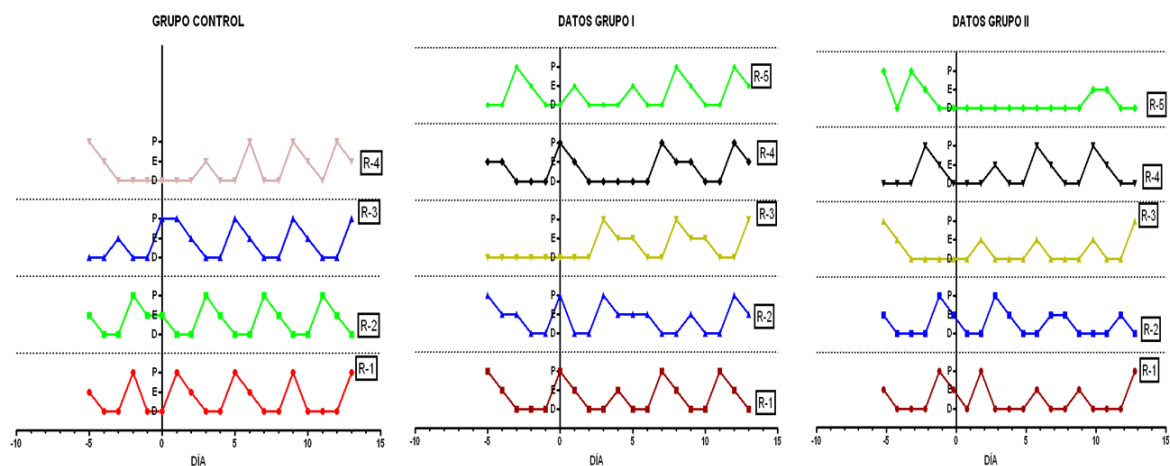


Figura 5.5: Ciclicidad estral de ratas tratadas con EMATst durante 14 días comparadas con el grupo control

Efecto sobre el ciclo estral de ratas tratadas con EMATst para los grupos I y II comparadas con el grupo control. Cada etapa del ciclo estral se clasificó según las características del frotis vaginal en Proestro (P), Estro (E), o Diestro (D) de forma que un ciclo estral normal se considera como la secuencia PEDD. En el eje de las abscisas se encuentra el día del ensayo y en las ordenadas el ciclo estral de cada una de las ratas del grupo experimental, el comportamiento es acíclico en el Grupo I, y en el Grupo II la aciclicidad es mayor, ambos comparados con el control

La figura 5.6 de la página 57 cuyos datos están expresados en la tabla 1.6 de la página 94 compara la frecuencia de ovulación, considerado como el número de veces que después de un día en P le siguió un día de E, que fisiológicamente es considerado como la capacidad ovulatoria. El grupo I mostró una leve disminución de la capacidad ovulato-

ria comparada con el control, mientras que en el grupo II disminuyó considerablemente $p < 0,001$, lo que sugiere un efecto antiestrogénico. El análisis estadístico dio estadísticamente significativo con un p de 0,0022 (**), para la diferencia en el % de ovulación entre los grupos I y II y el grupo II con el grupo control.

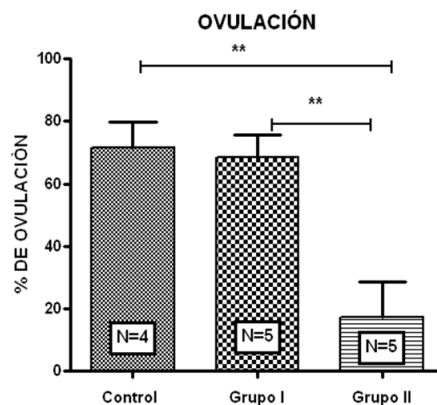


Figura 5.6: Porcentaje de ovulación de ratas con EMATst durante 14 días comparadas con el control

Las barras representan el porcentaje de ovulación de ratas tratadas con EMATst para los grupos I y II comparadas con el grupo control. Para el cálculo de este porcentaje de ovulación se consideró el número de veces que después de una día de Proestro lo siguió un día de Estro. Las barras representan el porcentaje promedio. Los resultados son expresados como media \pm SEM ** = $p < 0,001$ vs control

El número de días que un animal se encuentra en los diferentes estados del ciclo estrol se muestra en la figura 5.7 de la página 58 y los resultados de la tabla anexo 1.5 de la página 94. Los ciclos fueron alterados en el grupo I comparados al control, porque el porcentaje de E fue mayor mientras que P fue menor que el grupo control. Una gran alteración se observó en el grupo II, ya que el porcentaje de D aumentó comparado con el control, mientras que el porcentaje de P disminuyó considerablemente. El análisis estadístico es significativo con un p menor a 0,0001, cuando se comparan el grupo control con los grupos I y II.

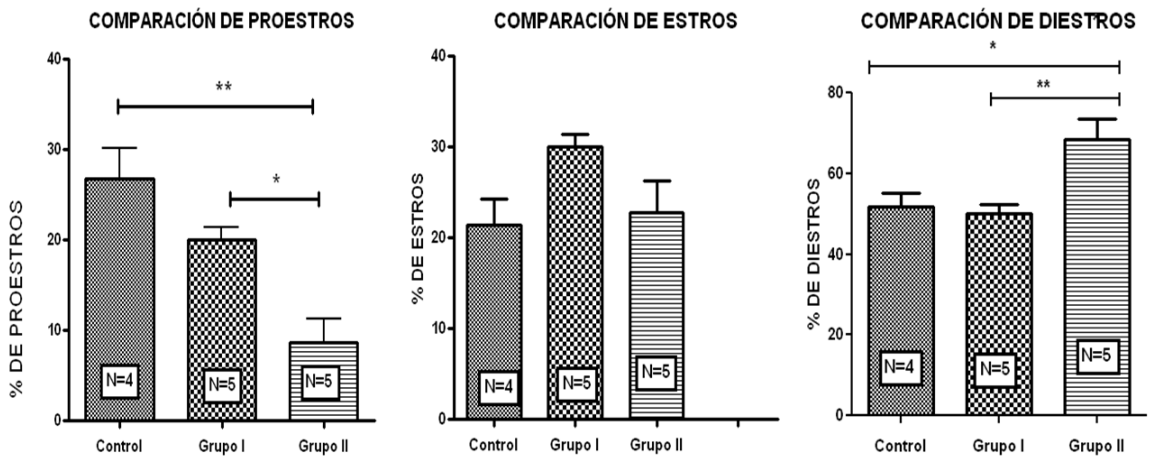


Figura 5.7: Porcentaje de días promedio de permanencia en cada etapa del ciclo estral en ratas tratadas con EMATst durante 14 días

Las barras representan el porcentaje de días promedio de permanencia en cada etapa del ciclo para los grupos I y II comparadas con el grupo control. Los resultados corresponden a los animales en cada grupo y son expresados como media +/- SEM * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ vs control

5.2.2. Ensayo de unión competitiva al receptor estrogénico

Con el fin de determinar la concentración de estradiol frío que compite con $^3H - E_2$ unido a la fracción citosólica del receptor estrogénico se evaluó un rango de concentraciones de 10^{-11} a 10^{-7} M. La concentración que produjo competencia por $^3H - E_2$ fue la de 10^{-7} M. A esta concentración el EMATst y verbascósido no fueron capaces de competir con el $^3H - E_2$, sin embargo, al utilizar una concentración más alta de EMATst (equivalente a 10^{-4} M de verbascósido) y verbascósido 10^{-4} M, ambos fueron capaces de competir con el $^3H - E_2$, valor 1000 veces mayor que las necesarias de estradiol frío. Las concentraciones utilizadas se describen en la tabla 1.10, del anexo de tablas 1. Los valores de desintegración por minuto (DPM), se calcularon a partir de los resultados de CMPs/vial utilizando un factor de conversión, los valores de DPM por ensayo, se describen en la tabla 1.11, del mismo anexo.

A partir de estos resultados se calculó el porcentaje de unión al receptor expresado en pmoles de estradiol unido/mg de proteína (lo cual representa la cantidad de estradiol unido al receptor que no ha sido desplazado por el competidor), tal como se muestra en la figura 5.8. Hubo una concentración máxima de verbascósido y EMATst con la cual se produce el desplazamiento del $^3H - E_2$. Curiosamente a altas concentraciones 10^{-3} M el fenómeno se revierte, los valores obtenidos se muestran en la tabla 1.12, del anexo de tablas 1.

Los datos del porcentaje de unión que se muestran también en la figura 5.8 se usaron para estimar los valores de CI_{50} de desplazamiento por cada competidor en cada experimento realizado. El gráfico de la CI_{50} por cada competidor mostró un incremento significativo de la concentración inhibitoria 50 para verbascósido y EMATst comparado con estradiol frío, lo cual demostró que se produjo desplazamiento de estradiol tritiado, y por lo tanto, la unión de EMATst y verbascósido al receptor de estrógeno, pero en concentraciones mucho mayores que para estradiol frío. Estos datos quedan registrados en la tabla 1.13, del anexo tablas 1.

ANÁLISIS DE COMPETENCIA POR ESTRADIOL EN RECEPTOR CITOSÓLICO

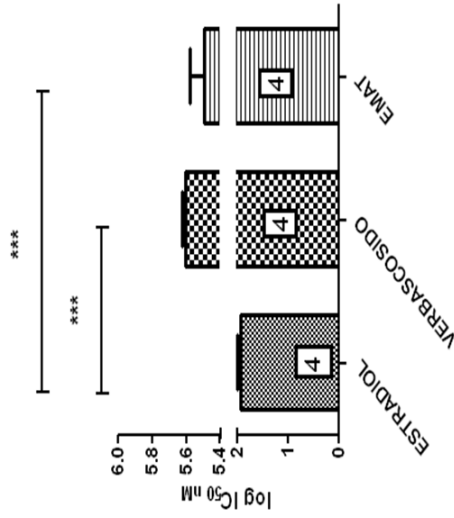
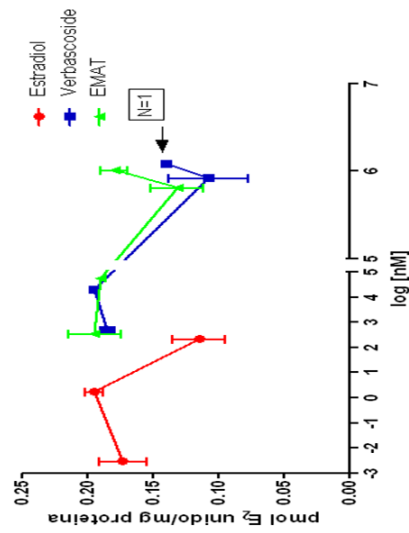


Figura 5.8: Porcentaje de unión y comparación de CI₅₀ Izquierda competencia de ³H – E₂ por la acción de los competidores estradiol frío, verbascósido y EMATst. Los valores para CI₅₀ se muestran a la derecha. Los resultados son expresados como la media +/- SEM ***=p<0.05 vs control

5.2.3. Evaluación toxicológica *in vivo* de EMATst y verbascósido. Determinación de la CL_{50}

Se calculó el valor de la CL_{50} para *D. magna* a las 24 horas de exposición $K_2Cr_2O_7$ y 17 β - estradiol (tóxicos de referencia), y EMATst, verbascósido, ac. cafeico.

CL_{50} del dicromato de potasio Con 12 de un total de 20 ensayos realizados con $K_2Cr_2O_7$ se contruyó una carta control a partir de los valores de la CL_{50} , de acuerdo a la Norma Chilena para aguas. En la tabla 1.14, del anexo 1, se detalla la CL_{50} promedio de 1,25 mg/L valor dentro del intervalo de sensibilidad establecido para este tipo de ensayos (0,6 y 2,1 mg/L de $K_2Cr_2O_7$) (I.N.N., 1999).

CL_{50} del 17 β - estradiol Los ensayos con 17 β - estradiol registrados en la tabla 1.15, del anexo 1, CL_{50} de *D. magna* a las 24 horas de exposición de 12,03 mg/L, para esta cepa ensayada. En la tabla 1.16, del anexo 1, se muestran los porcentajes de inmovilidad observados en *D. magna* para cada una de las concentraciones usadas de 17 β - estradiol en los diferentes ensayos realizados. Con los datos obtenidos se procedió a la elaboración de un gráfico de porcentaje de inmovilidad versus concentración, lo que revela que la mortalidad aumentó en la medida que aumentó la concentración del tóxico figura 5.10, de la página 63.

CL_{50} del EMATst Los ensayos con EMATst cuyos resultados se registran en la tabla 1.17, del anexo 1, valor promedio de la CL_{50} a las 24 horas de exposición fue de 1641.8 mg/L de EMATst, para esta cepa utilizada. En la tabla 1.18 del mismo anexo, se muestran los porcentajes de inmovilidad observados en *D. magna* para cada una de las concentraciones de EMATst a las 24 horas de exposición. El gráfico 5.9 de la página 62 muestra los porcentajes de inmovilidad en relación a la concentración.

CL_{50} del verbascósido Para el verbascósido los resultados se registran en la tabla 1.19 del anexo 1, CL_{50} promedio a las 24 horas de exposición de *D. magna* a verbascósido de 1770 mg/L, para esta cepa ensayada. En la tabla 1.20 del mismo anexo se muestran los porcentajes de inmovilidad de *D. magna* observados para cada concentración de verbascósido, el porcentaje de inmovilidad vs la concentración de verbascósido se ve reflejado en la figura 5.9, que a continuación se muestra.

Ácido cafeico La CL_{50} del ácido cafeico fue 481 mg/L frente a *D. magna* (tabla 1.21 del anexo 1).

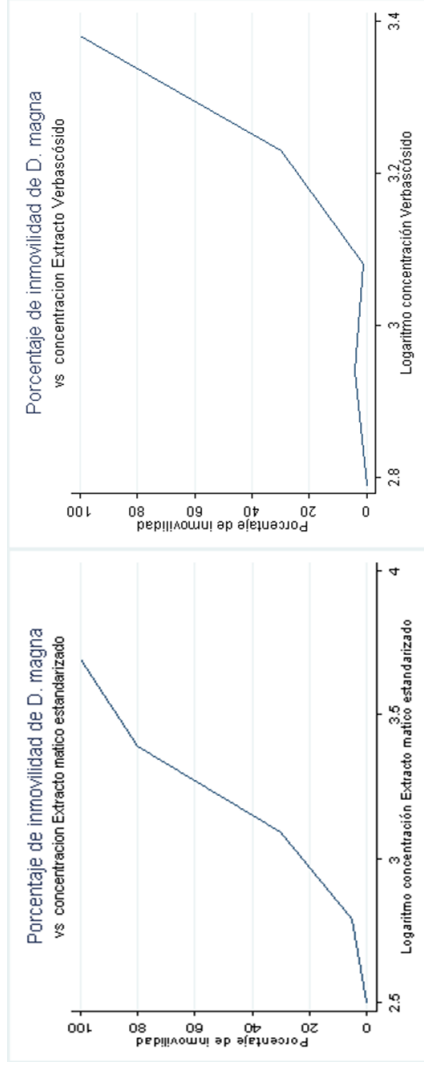


Figura 5.9: Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* para EMATst y verbascósido
 Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* vs el log de la concentración de EMATst (izquierda) y verbascósido (derecha)

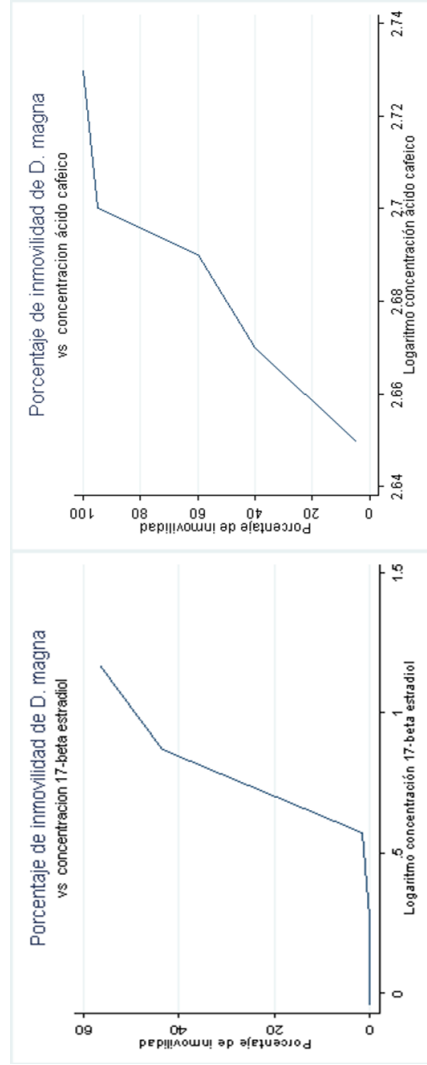


Figura 5.10: Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* para 17 β - estradiol y ac. cafeico
 Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* vs el log de la concentración de 17 β - estradiol (izquierda), ácido cafeico
 (derecha)

5.2.4. Evaluación de toxicidad crónica del EMATst y verbascósido sobre *D. magna*

Para este estudio se utilizó como tóxico de referencia el 17β -estradiol. Para ello, tal como se señaló en el capítulo de metodología se determinaron los siguientes parámetros: % de mortalidad, número de neonatos, número de mudas y tamaño de la camada de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de las muestras en estudio, durante los 15 días de exposición tanto en la primera como en la segunda generación. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando un test no paramétrico, como lo es la prueba de Kruskal-Wallis (KW), seguido de un modelaje mediante el test de Poisson truncado o no truncado dependiendo de los resultados, los datos fueron analizados mediante el software STATA versión 11.0. La prueba de significancia se llevó a cabo con todos los datos, considerando un $p < 0,05$ como indicativo de significancia.

Tal como se señaló anteriormente las concentraciones subletales utilizadas para el estudio de toxicidad crónica usadas fueron 3, 6 y 12 mg/L para EMATst y verbascósido. Las concentraciones de 17β -estradiol usadas fueron de 0,6; 0,8 y 1 mg/L, de acuerdo a lo descrito en el ensayo de Brennan et al.,(2006).

Mortalidad En la tabla 5.4 que se muestra a continuación, se registran los datos de mortalidad de los individuos al ser sometidos a distintas concentraciones de las muestras evaluadas, tanto en la primera como en la segunda generación.

Respecto del EMATst, podemos observar en dicha tabla que hubo mortalidad de 100 % en la segunda generación con la concentración de 12 mg/L y 70 y 80 % en las concentraciones de 3 y 6 mg/L, respectivamente, lo que se verá reflejado en el número de neonatos durante el período que dura el ensayo. En relación al verbascósido, los resultados presentados en la misma tabla muestran que en la segunda generación hubo mortalidad a las concentraciones de 3, 6 y 12 mg/L, y el % de mortalidad fue dependiente de la concentración (10 % para 3 mg/L, 50 % para 6 mg/L y 100 % para 12 mg/L), vemos que el EMATst es levemente más tóxico que el verbascósido, lo que es congruente con los valores del ensayo agudo. Finalmente el fármaco de referencia (17β -estradiol), no produjo la muerte de estos crustáceos en ninguna de las concentraciones estudiadas.

Tabla 5.4: Porcentaje de mortalidad de *D. magna* adulta expuesta a diversas concentraciones de EMATst, verbascósido o 17β -estradiol durante 15 días de exposición en la primera y segunda generación

Conc. (mg/L)	EMATst		Verbascósido		17β -estradiol	
	%mortalidad 1ªGen.	2ªGen.	%mortalidad 1ªGen.	2ªGen.	%mortalidad 1ªGen.	2ªGen.
0	0	0	0	0	0	0
0.6	–	–	–	–	0	0
0.8	–	–	–	–	0	0
1.0	–	–	–	–	0	0
3	0	70	0	10	–	–
6	0	80	0	50	–	–
12	0	100	0	100	–	–

–:no determinado con esta concentración , Gen: generación

Efectos sobre el número de neonatos En las tablas y figuras que se detallan a continuación se registran los efectos sobre el número de neonatos de *D. magna* al ser sometidos a distintas concentraciones de las muestras evaluadas, tanto en la primera como en la segunda generación. Los gráficos de caja presentados en dichas figuras muestran los valores del número de neonatos incluidos en los percentiles 75, 50 y 25.

Observando el gráfico de caja, del total de neonatos en relación a concentraciones crecientes de EMATst, en la figura 5.11 de la página 67, apreciamos una reducción conforme las concentraciones se incrementan. En la segunda generación no hay neonatos, lo que es atribuible a la toxicidad crónica por exposición prolongada a EMATst. Los resultados por cada ensayo detallados en tabla 5.5, que se encuentra en la página 66 evaluadas mediante una prueba no paramétrica de KW demostró que las diferencias, son significativas en ambas generaciones.

Finalmente, modelado el efecto predictor de la concentración sobre la variable respuesta total de neonatos, usando un modelo poisson truncado, descarta un efecto nulo de la dosis, por lo tanto, la disminución del número de neonatos fue debido al tratamiento y no se manifestó esta toxicidad en los controles en la primera generación.

El número de neonatos por cada réplica tanto en la primera como en la segunda generación, se pueden apreciar en la tabla 2.3, del anexo tablas 2, al igual que el tamaño de cada camada descritos en la tabla 2.6, del mismo anexo.

Tabla 5.5: N° de neonatos de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

	1ªGen				2ªGen			
	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L
TOT	369,0	364,0	208,0	148,0	365,0	0	0	0
PROM	36,9	36,4	20,8	14,8	36,5	0	0	0
MED	39,5	38,5	18,5	15,0	38,5	0	0	0

C:Control, GEN:generación, TOT:número total de neonatos nacidos vivos de los 10 dáfidos utilizados en cada grupo, PROM:promedio, MED:mediana (diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ en ambas generaciones de los grupos tratados con el grupo control)

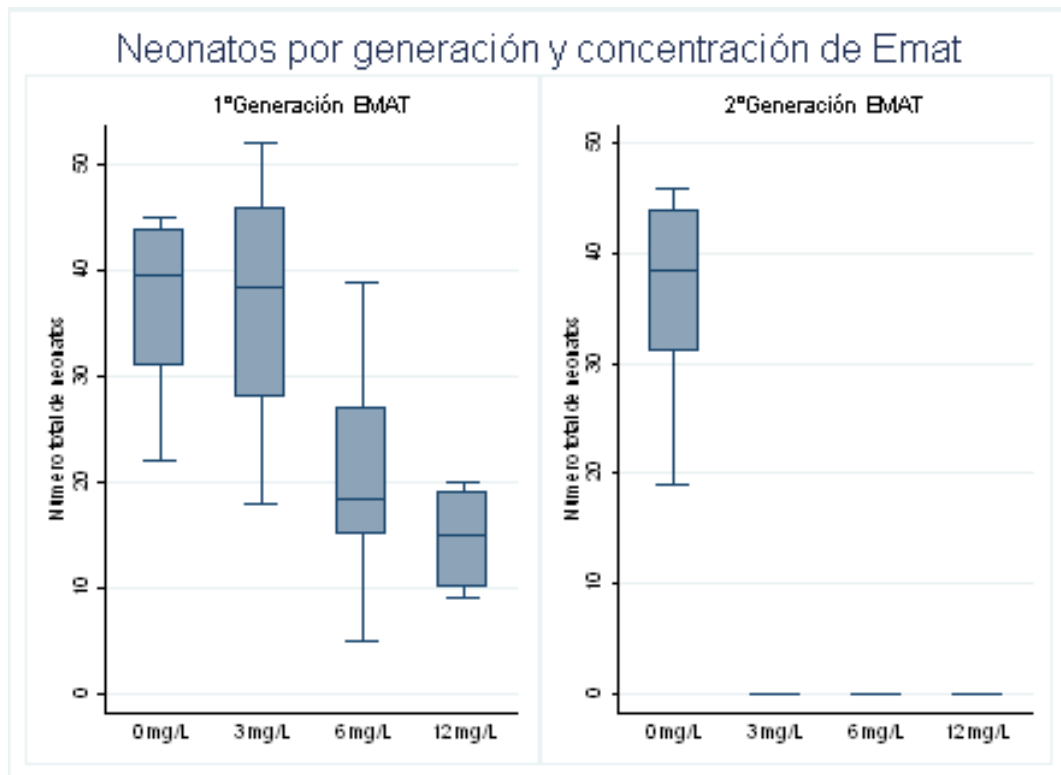


Figura 5.11: Número de neonatos vs concentración de EMATst para primera y segunda generación de *D. magna*
 Mediana e intervalos intercuartílicos del número de neonatos a diferentes concentraciones de EMATst en la primera y segunda generación de *D. magna*, comparadas con el grupo control

Tabla 5.6: N° de neonatos de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

	1ªGen				2ªGen			
	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L
TOT	327,0	323,0	294,0	285,0	301,0	84,0	42,0	0
PROM	32,7	32,3	29,4	28,5	*30,1	*8,4	*4,2	0
MED	35,5	34,5	31,0	28,0	40,5	4,0	1,5	0

C:Control, GEN:generación, TOT:número total de neonatos nacidos vivos de los 10 dafnidos utilizados en cada grupo, PROM:promedio, MED:mediana (diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ segunda generación de los grupos tratados con el grupo control)*

Al observar el gráfico de caja, de la figura 5.12 de la página 69 del total de neonatos en relación a concentraciones crecientes de verbascósido, apreciamos una reducción conforme las concentraciones se incrementan, tanto en la primera como en la segunda generación. En la concentración más alta de la segunda generación no se observaron neonatos, pues hay un 100% de mortalidad, atribuible a la toxicidad crónica por exposición prolongada a verbascósido.

Los resultados detallados en tabla 5.6 fueron analizados por la prueba no paramétrica de KW resultando ser significativas las diferencias entre la primera y segunda generación. Finalmente, modelado el efecto predictor de la dosis sobre la variable respuesta total de neonatos, usando un modelo poisson truncado, descarta un efecto nulo de la dosis. Hay una disminución del número de neonatos por hembra comparado con el control en la primera generación y segunda generación producto del tratamiento con verbascósido. El número de neonatos por cada réplica tanto en la primera como en la segunda generación, se pueden apreciar en la tabla 2.4, del anexo tablas 2, al igual que el tamaño de cada camada descritos en la tabla 2.6, del mismo anexo.

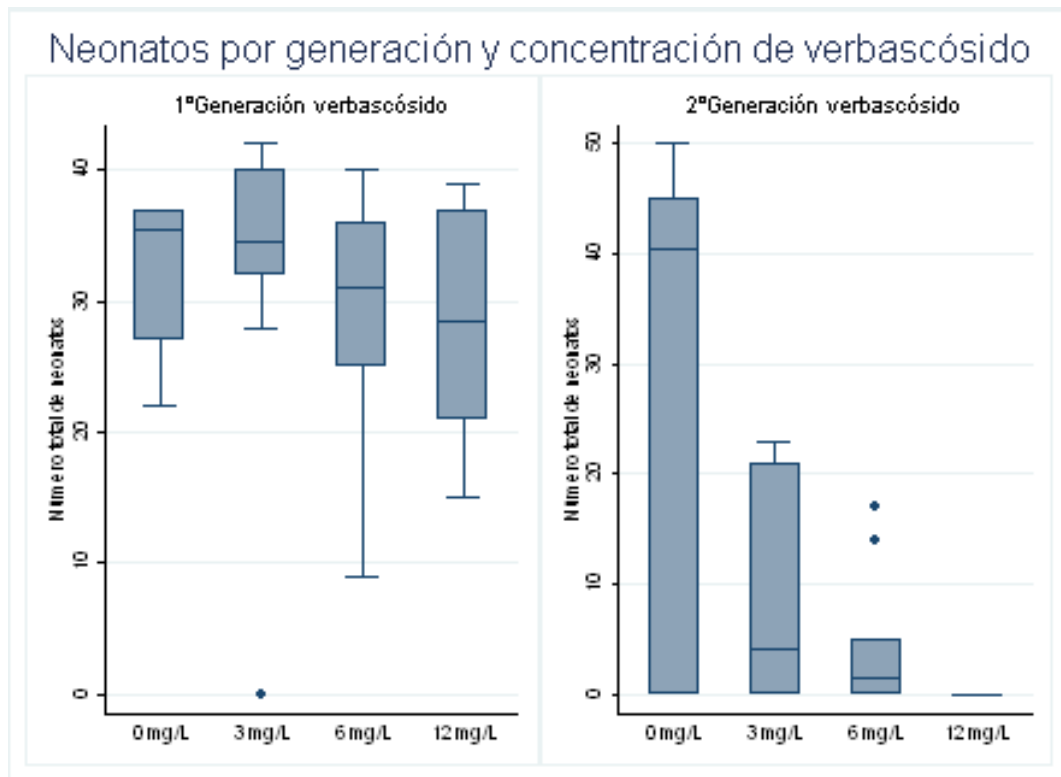


Figura 5.12: Número de neonatos vs concentración de verbascósido para primera y segunda generación de *D. magna*
 Mediana e intervalos intercuartílicos del número de neonatos a diferentes concentraciones de verbascósido en la primera y segunda generación de *D. magna*, comparadas con el grupo control

Tabla 5.7: N° de neonatos de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de 17β -estradiol durante 15 días de exposición, para 1^a y 2^a generación

	1°Gen				2°Gen			
	C	0,6mg/L	0,8mg/L	1mg/L	C	0,6mg/L	0,8mg/L	1mg/L
TOT	48,0	19,0	5,0	8,0	103,0	96,0	150,0	184,0
PROM	4,8	1,9	0,5	0,8	10,3	9,6	15,0	18,4
MED	5,0	0	0	0	10,5	14,0	20,0	17,0

C:Control, GEN:generación, TOT:número total de neonatos nacidos vivos de los 10 dafnidos utilizados en cada grupo, PROM:promedio, MED:mediana (diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ ambas generaciones de los grupos tratados con el grupo control)

Si observamos el gráfico de caja de la figura 5.13 de la página 71, del total de neonatos en relación a concentraciones crecientes de 17β - estradiol, apreciamos una reducción conforme las dosis se incrementan en la primera generación. En la segunda generación este efecto se revierte, pues hay un notable aumento del número de neonatos en la medida que se incrementa la concentración, atribuible a un posible efecto de este compuesto a nivel celular causando un daño en el DNA tal como se plantea en el estudio de Brennan et al. (2006)

Los resultados por cada ensayo detallados en tabla 5.7, fueron analizados por la prueba no paramétrica de KW resultando ser significativas en ambas generaciones.

Finalmente, modelado el efecto predictor de la concentración sobre la variable número total de neonatos, usando un modelo poisson no truncado, descarta un efecto nulo de la dosis. Hay una disminución y un aumento del número de neonatos por hembra comparado con el control en la primera y segunda generación, respectivamente.

El número de neonatos por cada réplica tanto en la primera como en la segunda generación, se pueden apreciar en la tabla 2.5, del anexo tablas 2, al igual que el tamaño de cada camada descritos en la tabla 2.6, del mismo anexo.

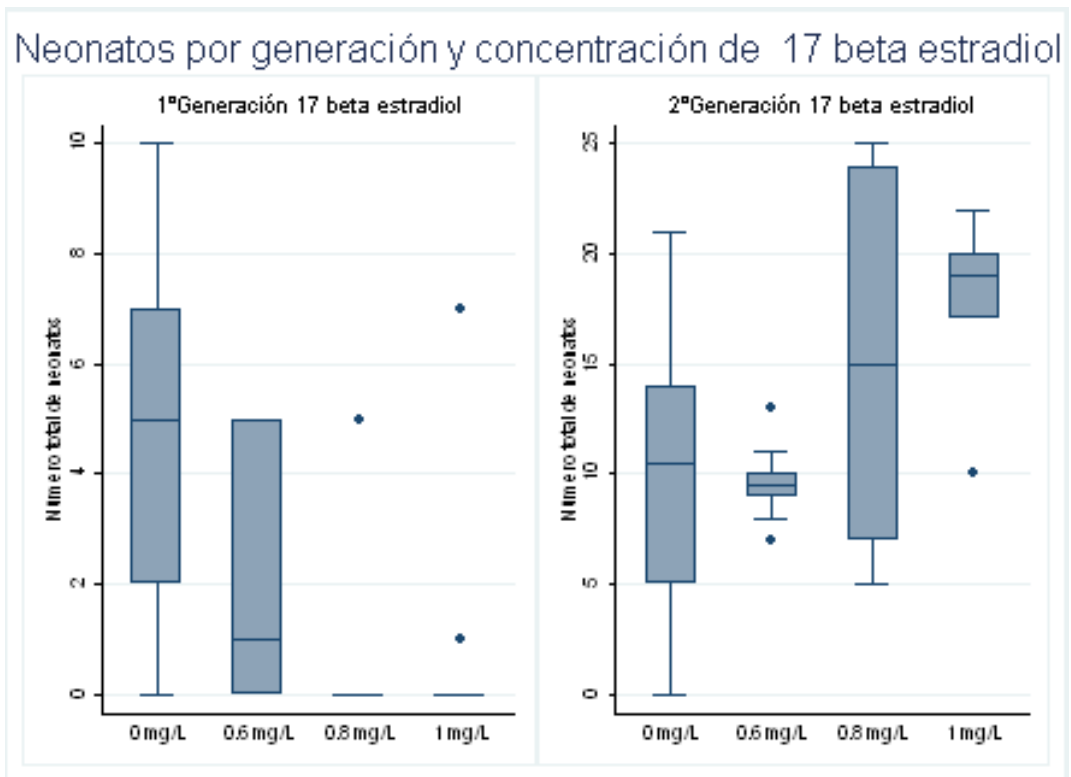


Figura 5.13: Número de neonatos vs concentración de 17β - estradiol para primera y segunda generación de *D. magna*
 Mediana e intervalos intercuartílicos del número de neonatos a diferentes concentraciones de 17β - estradiol en la primera y segunda generación de *D. magna*, comparadas con el grupo control

Efectos sobre la frecuencia de muda En las tablas y figuras que se detallan a continuación se registran los datos del efecto sobre el la frecuencia de muda de *D. magna* al ser sometidos a distintas concentraciones de las sustancias probadas, tanto en la primera como en la segunda generación.

Observando la figura 5.14, de la página 73 que muestra un gráfico de cajas del total de mudas en relación a concentración creciente de EMATst, apreciamos una disminución del número de mudas respecto del control para las concentraciones de 3 y 6 mg/L en la primera generación.

En la segunda generación este efecto se acrecienta, todos los valores son dependientes de la concentración, lo que confirma que la muda en una primera etapa del desarrollo está relacionada con el crecimiento, pero en una segunda etapa cuando ya aparecen los huevos en la *D. magna*, la muda está involucrada en la reproducción, es por esta razón que disminuye el número total de mudas en los hijos de las madres sometidas a la sustancia de prueba, porque como vimos anteriormente disminuyó el número de neonatos en la segunda generación para el EMATst. Las cifras por cada réplica ensayada detalladas en la tabla 5.8, testeadas mediante una prueba no paramétrica de KW son significativas para la segunda generación. El número de mudas por cada réplica tanto en la primera como en la segunda generación, se pueden apreciar en la tabla 2.7, del anexo 2.

Tabla 5.8: N° de mudas de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

	1ªGen				2ªGen			
	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L
TOT	59,0	55,0	49,0	51,0	44,0	23,0	10,0	1,0
PROM	5,9	5,5	4,9	5,1	4,4	2,3	1,0	0,1
MED	6,0	6,0	5,0	5,0	5,0	2,5	0,5	0

C:Control, GEN:generación, TOT:número total de mudas de los 10 dáfidos utilizados en cada grupo, PROM:promedio, MED:mediana (diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ segunda generación de los grupos tratados con el grupo control)

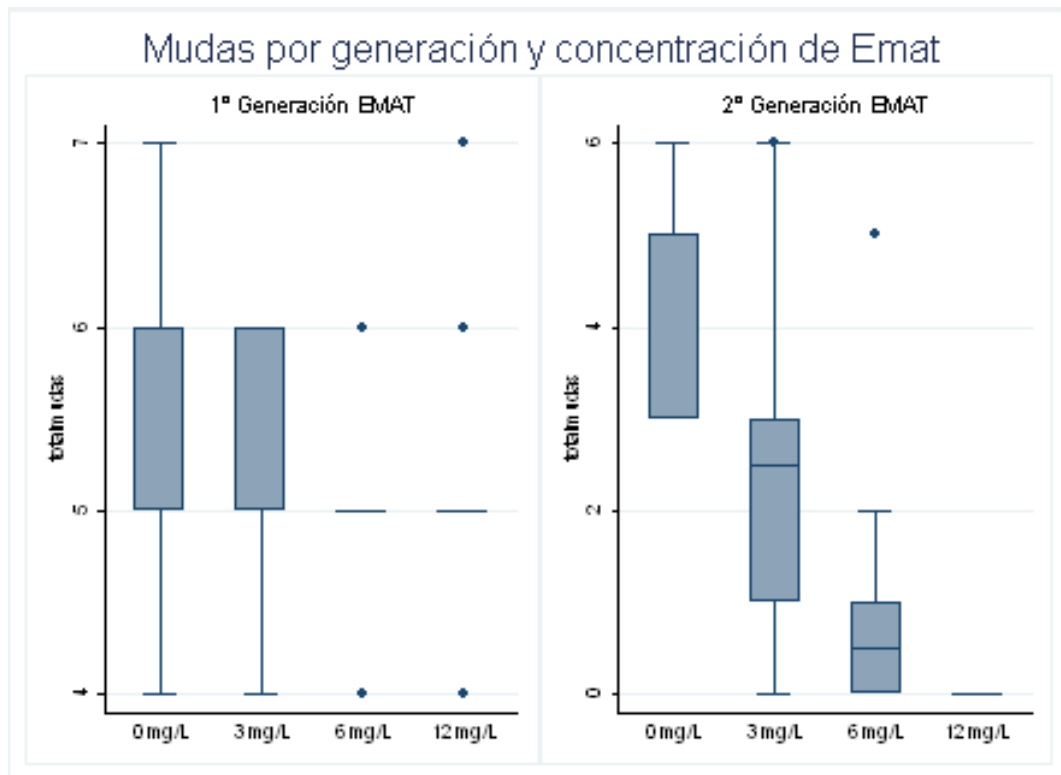


Figura 5.14: Número de mudas vs concentración de EMATst para primera y segunda generación de *D. magna*
 Mediana e intervalos intercuartílicos del número de mudas a diferentes concentraciones de EMATst en la primera y segunda generación de *D. magna*, comparadas con el grupo control

Tabla 5.9: N° de mudas de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

GEN.	1ªGen				2ªGen			
	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L	C	3mg/L	6mg/L	12mg/L
TOT	70,0	69,0	67,0	64,0	46,0	38,0	22,0	1,0
PROM	7,0	6,9	6,7	6,8	4,6	3,8	2,2	0,1
MED	7,0	7,0	7,0	6,0	5,0	4,0	2,5	0

C:Control, GEN:generación, TOT:número total de mudas de los 10 dafnidos utilizados en cada grupo, PROM:promedio, MED:mediana (diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ segunda generación de los grupos tratados con el grupo control)

Observando la figura 5.15, de la página 75 que muestra el gráfico de cajas del total de mudas en relación a la concentración creciente de verbascósido apreciamos una disminución del número de mudas respecto del control, en la medida que aumenta la concentración. En el caso de la segunda generación se observó una disminución del número de mudas con respecto al control lo que se relaciona con el parámetro del número de neonatos, descrito anteriormente. Las cifras por cada réplica ensayada detalladas en la tabla 5.9, testeadas mediante una prueba no paramétrica de KW son significativas para la segunda generación. El número de mudas por cada réplica tanto en la primera como en la segunda generación, se pueden apreciar en la tabla 2.8, del anexo 2.

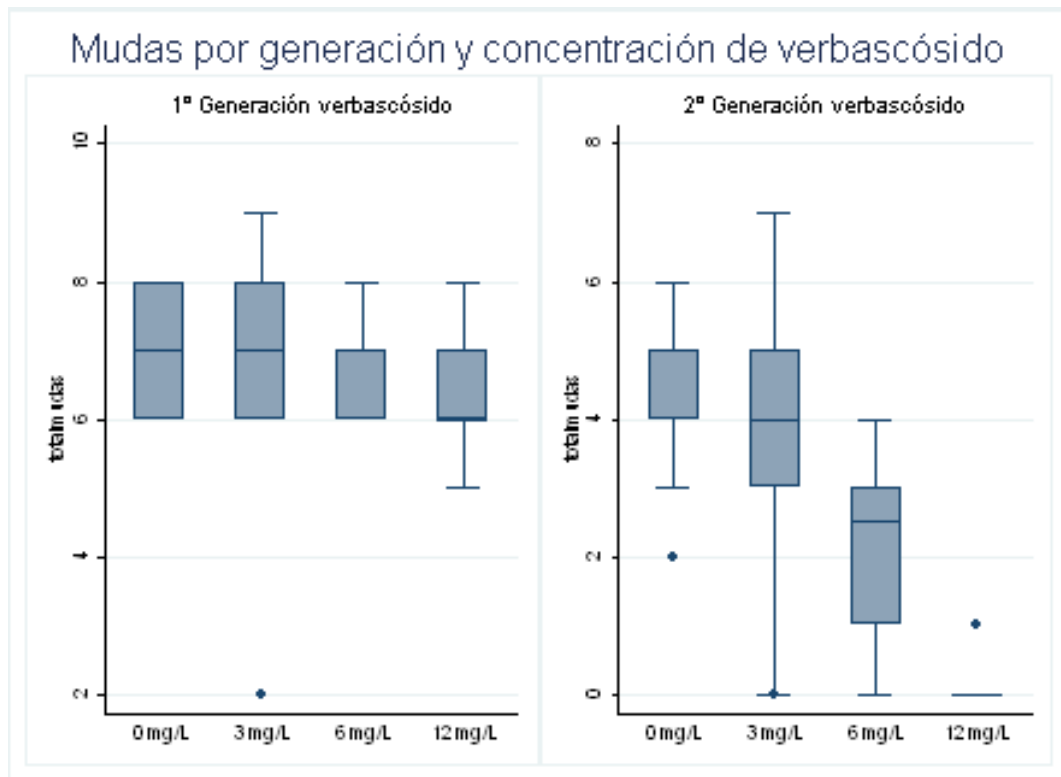


Figura 5.15: Número de mudas vs concentración de verbascósido para primera y segunda generación de *D. magna*

Mediana e intervalos intercuartílicos del número de mudas a diferentes concentraciones de verbascósido en la primera y segunda generación de *D. magna*, comparadas con el grupo control

Tabla 5.10: N° de mudas de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de 17 β estradiol durante 15 días de exposición, para 1^a y 2^a generación

GEN.	1 ^a Gen				2 ^a Gen			
	C	0,6mg/L	0,8mg/L	1mg/L	C	0,6mg/L	0,8mg/L	1mg/L
TOT	37,0	33,0	36,0	33,0	37,0	51,0	42,0	43,0
PROM	3,7	3,3	3,6	3,3	3,7	5,1	4,2	4,3
MED	4,0	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	4,0

C:Control, GEN:generación, TOT:número total de mudas de los 10 dafnidos utilizados en cada grupo, PROM:promedio, MED:mediana (diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ segunda generación de los grupos tratados con el grupo control)

Observando la figura que muestra el gráfico 5.16 de la página 77 del gráfico de cajas del total de mudas en relación a la concentración creciente de 17- β estradiol apreciamos una disminución pequeña de la muda respecto del control, pero no dependiente de la dosis en la primera generación. En la segunda generación este efecto se revierte ya que aumenta el número de mudas respecto del control, pero tampoco dependiente de la dosis. Las cifras por cada réplica ensayada detalladas en la tabla 5.10, testeadas mediante una prueba no paramétrica de KW son significativas para la segunda generación. El número de mudas por cada réplica tanto en la primera como en la segunda generación, se pueden apreciar en la tabla 2.9, del anexo tablas 2.

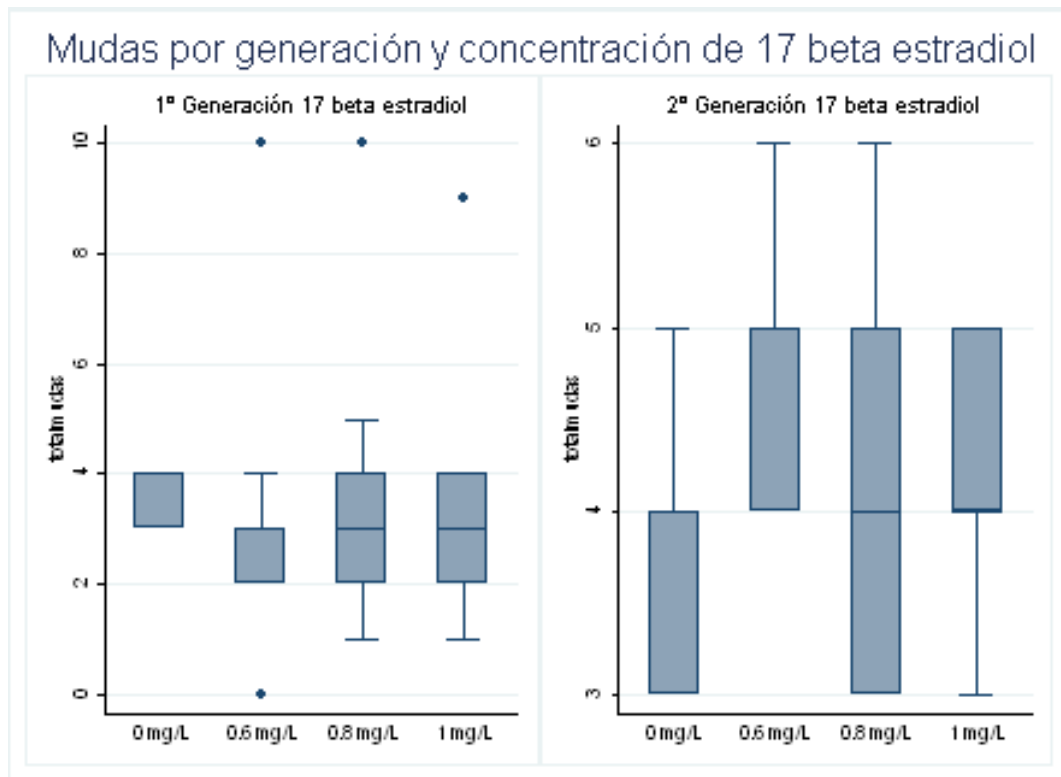


Figura 5.16: Número de mudas vs concentración de 17 β estradiol para primera y segunda generación de *D. magna*
 Mediana e intervalos intercuartílicos del número de mudas a diferentes concentraciones de 17 β estradiol en la primera y segunda generación de *D. magna*, comparadas con el grupo control

Capítulo 6

Discusión

6.1. Efecto sobre ciclo estral y unión al receptor estrogénico (efecto estrogénico)

En este trabajo se evidenció que la exposición de ratas adultas a un extracto etanólico estandarizado de hojas de *B. globosa* (EMATst) disrumpe la actividad del ciclo estral, de manera dosis dependiente y a través de la unión al receptor de estrógeno (RE). Aunque la dosis más baja de EMATst utilizada (equimolar a la dosis de estradiol, respecto del contenido de verbascósido en el EMATst) no fue capaz de competir con el estradiol en un estudio de unión al RE, sin embargo, sí modificó ligeramente la actividad del ciclo estral de las ratas después de la exposición crónica durante 14 días, aunque no fue significativo. El único efecto que pudo ser evidenciado de la exposición a dicha dosis fue un aumento en el número de estros en las ratas, lo que sugiere que a esta dosis el EMATst provoca una rápida transición de proestro a estro similar a lo que sucede con un estrógeno endógeno, característica que fue visualizada a nivel de la observación de la citología vaginal, al cambiar la apariencia histológica de células epiteliales a células cornificadas.

Por otra parte, el hecho de que una concentración 10 veces mayor del EMATst (con una concentración en verbascósido de 10^{-5} M) produzca un cambio significativo en la actividad del ciclo estral y en el porcentaje de ovulación, demuestra que EMATst actúa como un estrógeno de origen vegetal.

Se sabe también, que las altas dosis de estradiol producen anovulación en ratas, y que la exposición crónica no sólo actúa a nivel de ovario, sino también en la función

reproductiva a nivel del hipotálamo para bloquear la hormona gonadotrofina coriónica (GnRH) inducida que a su vez aumenta la secreción de gonadotropinas (Herbison, 1998; Schuiling et al., 1999; Petersen et al., 2003; Kasturi et al., 2009; Tsai and Legan, 2002; Barria et al., 1993; Weiland et al., 1997). En este caso podemos entender porque el tratamiento crónico con una dosis 10x de EMATst no sólo afectó la actividad del ciclo estral (mediante el aumento del tiempo de permanencia de las ratas en diestro, bloqueando así la oleada preovulatoria de las gonadotropinas), sino que también este efecto fue suficiente para bloquear el rendimiento ovulatorio de la rata. Se sabe que el estradiol actuaría localmente en el ovario y centralmente en el hipotálamo y probablemente podrían manifestarse estos mismos efectos por la exposición crónica a EMATst.

La interrupción de la ovulación observada en las ratas tratadas con EMATst 10x parece similar a lo observado en el estudio de (Sotomayor-Zarate et al., 2008), estos autores demostraron que después de dos meses de exposición a una sola dosis de estradiol valorado a ratas adultas, estas desarrollaron una condición acíclica, aumento de la actividad simpática nerviosa y morfología de ovario poliquístico.

Los resultados obtenidos con la dosis más alta de EMATst muestran un posible efecto antiestrogénico de este extracto en los ensayos *in vivo*.

Con el fin de complementar los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* se determinó la unión al RE del EMATst y verbascósido. En nuestro estudio se usó citosol de útero de rata que ha sido ampliamente utilizado para los estudios de unión-ligando a los receptores de estradiol (Fang et al., 2001; Blair et al., 2000; Bakera et al., 1999). El RE de útero de rata es principalmente del subtipo alfa estando up-regulado para estradiol (Wang et al., 1999). Esta es una posibilidad interesante que podría explicar porque la dosis más baja de EMATst aumentó el porcentaje de estros, que aunque no fue significativo, explica el aumento de células cornificadas en el frotis vaginal, lo que indica el efecto local de EMATst en la vagina a través de receptores del tipo alfa (Wang et al., 2000). Nuestros resultados demostraron que la unión a los receptores alfa tanto de EMATst como del verbascósido fue débil a pesar de una buena competencia, ya que se requirieron concentraciones de 10^{-4} M para competir comparadas con las de estradiol frío de 10^{-7} M.

Tal como fue señalado anteriormente el aumento de la dosis tiene un efecto más pronunciado en la actividad del ciclo estral y una potencial alteración de la función reproductiva probablemente a nivel del hipotálamo como se encontró claramente en el presente estudio. Es interesante analizar el comportamiento fundamental de la dosis

más alta de EMATst y verbascósido en la concentración de 10^{-3} M en la unión a la fracción citosólica de útero de rata. Con esta concentración no hay competencia con el estradiol, pero si aumenta la unión al RE, lo que sugiere una up-regulación de los receptores de estrógenos alfa como se ha determinado anteriormente, cuando las ratas ovariectomizadas (que tienen niveles bajos de estradiol) se tratan con 17β estradiol (Nephew et al., 2000; Wanda et al., 2007).

En relación a los estudios *in vivo* del EMATst es importante señalar que su componente mayoritario verbascósido presenta una buena absorción a través del tracto gastro intestinal, tal como señala Funes et al.,(2009). La disponibilidad de verbascósido en el plasma después de la administración oral a ratas de laboratorio alcanza una concentración máxima en los primeros 20 minutos, y aunque la disponibilidad de verbascósido por vía oral es muy baja, es probable que otros metabolitos presentes en el extracto, como flavonas y otros derivados de biodegradación intestinal de verbascósido, como ácido cafeico y otros compuestos indeterminados, puedan contribuir a la actividad biológica *in vivo*(Funes et al., 2009). La concentración de verbascósido biodisponible está en el intervalo de micromolar, lo que nos permite sugerir que la dosis administrada por vía subcutánea a ratas de laboratorio en el estudio de la alteración del ciclo estral es equivalente a las concentraciones utilizadas en el ensayo de unión competitiva al RE.

6.2. Toxicidad aguda y efectos endocrinos de EMATst y verbascósido

Los resultados presentados demuestran que todos los efectos fueron dependientes de la concentración.

El EMATst (CL_{50} 1641,8 mg/L) y verbascósido (CL_{50} 1770 mg/L ó 283×10^{-6} M) presentaron una baja toxicidad aguda respecto del 17β -estradiol (12,03 mg/L ó $44,2 \times 10^{-6}$ M) y dicromato de potasio (1,25 mg/L ó $4,25 \times 10^{-6}$ M). Para el 7-O-glucósido de luteolina solamente se realizaron ensayos preliminares debido a que las concentraciones establecidas mediante estos ensayos fueron entre 1200 y 5000 mg/L, valores muy altos que no permitieron hacer ensayos agudos ya que no se disponía de muestra suficiente de este compuesto.

Para el ácido cafeico probable metabolito *in vivo* del verbascósido se logró determinar una CL_{50} preliminar de 481 mg/L (= 267×10^{-6} M) según se detalla en la tabla 1.21,

del anexo tablas.

Estas concentraciones de toxicidad aguda determinadas para EMATst y verbascósido permitieron determinar la dosis subletal para realizar los ensayos crónicos correspondientes.

Los ensayos de toxicidad aguda tienen como objetivo evaluar el potencial tóxico a corto plazo de un compuesto o sustancia sobre un determinado organismo, generalmente sobre su supervivencia y son muy importantes y necesarios para definir el rango de dosis con el que se quiere trabajar. Sin embargo, los ensayos crónicos orientados a examinar los efectos en el comportamiento, crecimiento y reproducción de sustancias sobre poblaciones de organismos, son mucho más útiles para establecer las concentraciones de seguridad de un extracto o de un compuesto frente a una población expuesta a sus efectos, razón por la cual en esta tesis se realizó este diseño experimental con el fin de evaluar el impacto de concentraciones subletales del EMATst y verbascósido en poblaciones de organismos expuestos durante un período de tiempo suficientemente largo para lograr determinar los efectos en la capacidad reproductiva.

Los resultados del estudio crónico resumidos en la tabla 6.1 indican que la exposición de dos generaciones produjo cambios en el tamaño de la población ya que se ve una disminución de ésta dependiente de la concentración, más marcado aún en la segunda generación, debido, a que hay un retraso en la reproducción y una disminución de la fecundidad, porque el número de neonatos disminuyó y se retrasó la aparición de los huevos, influenciado en parte por un aumento de la mortalidad juvenil tal como se observa en las tablas 2.1 y 2.2 del anexo 2.

Podemos suponer que las concentraciones reales a las que estos individuos están expuestos en el medioambiente, son menores a las evaluadas en este estudio (ng/L a $\mu\text{g/L}$). No obstante, se ha observado que el riesgo se manifiesta por el tiempo de exposición. Por lo tanto, es esperable un efecto más notorio en la población que ha permanecido más tiempo expuesta al tóxico, tal como se ha reportado en numerosos estudios (Heckmann et al., 2008; Brennan et al., 2006; Walthall and Stark, 1997; Cotou, 1993)

Por otra parte tanto el EMATst como el verbacósido han demostrado actividad antiinflamatoria (Backhouse et al., 2008a). El mecanismo de acción de dicha actividad farmacológica podría ser a través de la inhibición de la síntesis de eicosanoides, principalmente por la vía de la ciclooxigenasa (COX). Se sabe que en mamíferos los eicosanoides operan como un importante regulador de la inflamación, regulan el flujo

Tabla 6.1: Parámetros evaluados en *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de EMATst y verbascósido durante 15 días de exposición, para 1^a y 2^a Generación

TTO mg/L	Mort 1 ^a G	Mort 2 ^a G	Muda 1 ^a G	Muda 2 ^a G	N ^o neon 1 ^a G	N ^o neon 2 ^a G	Ap H 1 ^a G	Ap H 2 ^a G
CONTROL	0	0	59	44	369	365	dia6	dia 7
EMATst 3mg/L	0	7	55	23	364	0	dia 7	dia 13
EMATst 6mg/L	0	8	49	10	208	0	dia 7	dia 13
EMATst 12mg/L	0	10	51	1	148	0	dia 7	nd
CONTROL	0	0	70	46	327	301	dia 5	dia 6
Verb 3mg/L	0	1	69	38	323	84	dia 5	dia 7
Verb 6mg/L	0	5	67	22	294	42	dia 5	dia 9
Verb 12mg/L	0	10	64	1	285	0	dia 8	nd
CONTROL	0	0	37	37	48	103	dia 7	dia 7
Estr 0.6mg/L	0	0	33	31	19	96	dia 6	dia 8
Estr 0.8mg/L	0	0	36	42	5	150	dia 7	dia 7
Estr 1mg/L	0	0	33	43	8	184	dia 6	dia 8

G: Generación, Verb: Verbascósido, EMATst: Extracto etanólico estandarizado, Estr:17- β estradiol, TTO: tratamiento, Mort: mortalidad, Ap H: aparición de huevos, nd: no determinado.

de iones y la función reproductiva. Varios estudios han revelado que también juegan un rol importante en insectos, en la reproducción, respuesta inmune y regulación de la temperatura (Rowley et al., 2005). También se ha demostrado que el mecanismo de biosíntesis de eicosanoides en un modelo del invertebrado *Pleuraea homomalla* es similar al de los mamíferos (Valmens et al., 2001). Existen además otros estudios con datos de expresión génica, que sugieren una inducción de la expresión de leucotrienos B4 12 - hidroxidehidrogenasa en *D. magna* (Heckmann et al., 2006). En otro estudio se sometió a *D. magna* a distintas concentraciones de ibuprofeno (IB) durante 14 días y se observó que el crecimiento de la población fue significativamente reducido con todas las concentraciones de IB. La sobrevivencia se vio afectada con la concentración más alta de IB, en cambio la reproducción se vió alterada a bajas concentraciones y completamente inhibida a altas concentraciones similar a lo sucedido con EMATst y verbascósido, sugiriendo ese estudio que existe un mecanismo de acción de IB sobre los eicosanoides similar al existente en los mamíferos (Heckmann et al., 2008), podríamos decir que el mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos en inverte-

brados, podría ser similar al de los mamíferos.

Entonces esta aparente relación entre eicosanoides y reproducción podría explicar los efectos de EMATst y verbascósido en la reproducción de *D. magna*, observada y descrita en este estudio.

Capítulo 7

Conclusiones

- No se apreciaron cambios significativos en los perfiles cromatográficos por CLAE-DAD del EMAT obtenido de las hojas recolectadas en el campus Antumapu en comparación al EMAT obtenido anteriormente desde las hojas recolectadas en la IX Región. Siendo en ambos extractos dos de los compuestos mayoritarios verbascósido y 7-O-glucósido de luteolína.
- El resultado del ensayo farmacológico sobre el ciclo estral de ratas de laboratorio demuestra que el EMATst provoca una alteración en el ciclo estral de ratas, lo que podría atribuirse a un efecto antiestrogénico a dosis altas.
- Los resultados del ensayo de unión competitiva de EMATst y verbascósido al receptor estrogénico demuestran que ambos compuestos se unen levemente a RE comparado con 17- β estradiol.
- Se demostró que EMATst y verbascósido presentan una baja toxicidad aguda relativa respecto de los tóxicos de referencia dicromato de potasio y 17- β estradiol en *Daphnia magna*.
- La toxicidad crónica (debida a un efecto disruptor endocrino) en *D. magna* del EMATst y verbascósido, fue demostrada por a) la alteración en la reproducción ya que disminuyó el número de neonatos en la primera generación y b) por disminución del tiempo de sobrevivencia en la segunda generación. Ambos efectos fueron concentración-dependiente.

Bibliografía

- Argemi, F., Cianni, N., and Porta, A. (2005). Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(3):291–300.
- Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farías, C., Goity, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C., and Miranda, H. (2008a). Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *J.Ethnopharmacol*, 119(1):160–165.
- Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodriguez, J., and Delporte, C. (2008b). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, buddlejaceae. *J.Ethnopharmacol*, 116(2):263–269.
- Bai, W., von Zepelin, H. H., Wang, S., Zheng, S., Liu, J., Zhang, Z., Geng, L., Hu, L., Jiao, C., and Liske, E. (2007). Efficacy and tolerability of a medicinal product containing an isopropanolic black cohosh extract in chinese women with menopausal symptoms: a randomized, double blind, parallel-controlled study versus tibolone. *Maturitas*, 58 (1):31–41.
- Bakera, V., Hepburna, P., Kennedy, S., Jonesa, P., Leaa, L., Sumpterb, J., and Ashbyc, J. (1999). Safety evaluation of phytosterol esters. part 1. assessment of oestrogenicity using a combination of *in vivo* and *in vitro* assays. *Food Chem Toxicol*, 37(1):13–22.
- Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S., and Lara, H. (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133 (6):2696–2703.
- Bennetts, H. and Underwood, E. (1951). The oestrogenic effects of subterranean clover *Trifolium subterraneum*; uterine maintenance in the ovariectomised ewe grazing on clover. *Aust J Exp Biol Med Sci.*, 29:249–253.

- Berger, P., Sanders, E., Gardner, P., and Negus, N. (1977). Phenolic plant compounds functioning as reproductive inhibitors in *Microtus montanus*. *Science*, 195 (4278):575–577.
- BL Strom, R. S. (2001). Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA*, 286(7):807–814.
- Blair, R., Fang, H., Branhan, W., Hass, B., Dial, S., Moland, C., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., and Sheehan, D. (2000). The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci*, 54 (1):138–153.
- Brennan, S., Brougham, C., Roche, J., and Fogarty, A. (2006). Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 64(1):49–55.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, D.F.
- Colborn, T. and Clement, C. (1993). *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. *Advances in Modern Environmental Toxicology*. Princeton Scientific Pub. Co., Princeton, NJ., XXI edition.
- Colborn, T., vom Saal, F., and Soto, A. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. 101(5):378–384.
- Cotou, E. (1993). The controlled production of dormant eggs of *Daphnia pulex* (Leydig) as biological starting material for toxicity testing. Technical report, University of Ghent, Belgium.
- Day, K. (1991). *Pesticide transformation products in surface waters: effects on aquatic biota*. *Pesticides transformation products. Fate and significance in the environment*. L. Somasundaram; Jr. Coats. Eds. ACS Symposium Series., 459 edition.
- Delclos, K., Bucci, T., Lomax, L., Latendresse, J., Warbritton, A., Weis, C., and Newbold, R. (2001). Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol*, 15(6):647–663.
- Dillehay, T. (2004). *Monte Verde un asentamiento Humano del Pleistoceno Tardío en el Sur de Chile*. LOM Ediciones.

- Espinosa, I. and Lobos, T. (1937). *Historia Secreta de Santiago de Chile*.
- Faber, K. and Hughes, J. (1993). Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area SDN-POA in postpubertal castrated female rats. *Reprod Toxicol*, 7(1):35–39.
- Fang, H., Tong, W., Shi, L., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B., Xie, Q., Dial, S., Moland, C., and Sheehan, D. (2001). Structure-activity relationship for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol.*, 14(3):280–294.
- Farga, C. and Lastra, J. (1988). *Plantas Medicinales de uso común en Chile*. PAESMI.
- Freeman, M. (1988). *The ovarian cycle of the rat*. In: Knobil E and Neil J., Physiology of reproduction New York: Raven Press.
- Funes, L., Fernandez-Arrollo, S., Laporta, O., Pons, A., Rocha, E., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., and Micol, V. (2009). Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of *Lemon verbena* extract. *Food Chem*, 117 (4):589–598.
- Goity, L. (2007). Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* hope, buddlejaceae, matico y diseño de la metodología analítica. memoria para optar al título de químico farmacéutico. Technical report, Universidad de Chile, Santiago Chile.
- Goldman, L., Newbold, R., and Swan, S. (2001). Exposure to soy-based formula in infancy. *JAMA*, 286(19):2402–2403.
- Goodman, L. and Gilman, A. (2006). *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. Mc Graw Gill, México D.F., undécima edition.
- Guillette, L., Gross, T., Masson, G., Marrer, J., Percival, H., and Woodward, A. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect.*, 102(8):680–688.
- Han, K., Soares, J. J., Haidar, M., de Lima, G., and Baracat, E. (2002). Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*, 99(3):389–394.

- Heckmann, L., Connon, R., Hutchinson, T., Maund, S., Sibly, R., and Callaghan, A. (2006). Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics*, 7:175.
- Heckmann, L. R., Sibly, M., Connon, R., Hooper, H., Hutchinson, T., Maund, S., Hill, C., Bouetard, A., and Callaghan, A. (2008). Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome Biol.*, 9 (2):402–4014.
- Herbison, A. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev.*, 19(3):302–330.
- I.N.N. (1999). Aguas y bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Technical report, Instituto Nacional de Normalización (INN), Santiago.
- Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (2002). Background review document, current status of test methods for detecting endocrine disruptors: In vitro estrogen receptors: Binding assay. Technical report, National Toxicology Program, NTP.
- Jefferson, W., Newbold, R., Padilla-Banks, E., and Pepling, M. (2006). Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: Inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod.*, 74(1):161–168.
- Jefferson, W., Padilla-Banks, E., and Newbold, R. (2005). Adverse effects on female development and reproduction in cd-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biol Reprod.*, 73(4):798–806.
- Jefferson, W. N., Couse, J. F., Padilla-Banks, E., Korach, K. S., and Newbold, R. R. (2002). Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor ERalpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: Evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biology of Reproduction*, 67(4):1285–1296.
- Kasturi, B., MohanKumar, S., Sirivelu, M., and MohanKumar, P. (2009). Chronic exposure to low levels of oestradiol-17 beta affect oestrous cyclicity, hypothalamic norepinephrine and serum luteinising hormone in young intact rats. *J Neuroendocrinol.*, 21 (6):568–577.

- Kayode, O., Uche, O., Grillo, B., and Tolulope, O. (2007). Toxic effect of methanolic extract of *Aspilia africana* leaf on the estrous cycle and uterine tissue of Wistar Rats. *International J Morphol*, 25(3):609–614.
- Leopold, A., Erwin, M., Oh, J., and Browning, B. (1976). Phytoestrogens: Adverse effects on reproduction in California quail. *Science*, 191 (4222):98–100.
- Minchin, D., Oehlmann, J., Duggan, C., Stroben, E., and Keatinge, M. (1995). Marine TBT anti-fouling contamination in Ireland, following legislation in 1987. *Mar. Pollut.*, 30:633–639.
- Montes, M. (2001). *Plantas medicinales de uso en Chile*. Chile.
- Mu, X. and LeBlanc, G. A. (2002). Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity. *General and comparative endocrinology*, 129(2):127–133.
- Nephew, K., Long, X., Osborne, E., Burke, K., Ahluwalia, A., and Bigsby, R. (2000). Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biol Reprod*, 62 (3):168–177.
- Newbold, R., Banks, E., Bullock, B., and Jefferson, W. (2001). Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res*, 61(11):4325–4328.
- North, K. and Golding, J. (2000). A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. *BJU*, 85(1):107–113.
- OCDE (2000). Section 2. guideline 202. daphnia sp. acute immobilisation test and reproduction test. Technical report, Organization for Economic Co-operation and Development (OCDE), Guidelines for testing chemicals, Paris.
- Olea, N., Fernández, M., Araque, P., and Olea-Serrano, F. (2002). Perspectivas en disrupcion endocrina. *Gac Sanit*, 16(3):250–256.
- Papoutsi, Z., Kass, E., Mitaku, S., Aliaganis, N., Tsiapara, A., Chrousos, G., and Moutsatsou, P. (2006). Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 98 (1):63–71.
- Petersen, S., Ottem, E., and Carpenter, C. (2003). Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod*, 69 (6):1771–1778.

- Pinder, L., Pottinger, T., Billingham, Z., and Depledge, M. (1999). Endocrine function in aquatic invertebrates and evidence for disruption by environmental pollution. *Ry D Technical Report, Swindson, England*.
- Purdom, C., Hardiman, P., Bye, V., Eno, N., Tyler, C., and Sumpter, J. (1994). Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, 8:275–285.
- Quackenbush, S. (1992). Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vanname*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 103 (4):711–714.
- Rosales, D. (1969). *Historia General de el Reino de Chile, Flandes Indiano*. Editorial Universitaria, Santiago.
- Rosales, L. (2003). Estudio químico, evaluación de las actividades analgésica y antiinflamatoria de un extracto farmacológicamente activo de *Buddleja globosa* hope, buddlejaceae diseño de un preparado dérmico. Technical report, Universidad de Chile, Santiago-Chile.
- Rowley, A., Vogan, C., Taylor, C., and Clare, A. (2005). Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insight and unsolved problems. *J. Exp. Biol.*, 208 (Pt1):3–14.
- Ruppert, E.E.; Barnes, R. (1996). *Crustáceos*. En: *Zoología de los invertebrados*. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., México, 6^ª edición edition.
- Sanabria-Galindo, A., Arciniega, N., and Suarez, I. (1999). Timol y carbacrol sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibaguensis*. *Rev. Colombiana de ciencias Químico-Farmacéuticas*, 28:83–88.
- Schuling, G., Valkhof, N., and Koiter, T. (1999). Fsh inhibits the augmentation by oestradiol of the pituitary responsiveness to gnRH in the female rat. *Human Reprod.*, 14(1):21–26.
- Setchell, K., Gosselin, S., Welsh, M., Johnston, J., Balistreri, W., Kramer, L., Dresser, B., and Tarr, M. (1987). A probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*, 93(2):225–233.
- Sotomayor-Zarate, R., Dorfman, M., Paredes, A., and Lara, H. (2008). Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod.*, 78 (4):673–680.
- Stephan, E. (1977). Aquatic toxicology and hazard evaluation. Methods for calculating an LC_{50} . *Philadelphia, Pennsylvania. Library of Congress*, 77-075532.

- Subramoniam, T. (2000). Crustacean ecdysteriods in reproduction and embryogenesis. *Toxicology and Endocrinology*, 125(2):135–156.
- Sumpter, J. (1995). Feminised responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol. Lett.*, 82/83:737–742.
- Tsai, H. and Legan, S. (2002). Loss of luteinizing hormone surges induced by chronic estradiol is associated with decreased activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod*, 66 (4):1104–1110.
- Valmens, K., Jarving, I., Boeglin, W., Varvas, K., Koljak, R., Pehk, T., Brash, A., and Samel, N. (2001). The origin of 15R-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (14):7700–7705.
- Walthall, W. and Stark, J. (1997). A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect. *Ecotox. Environ. Saf*, 37 (1):45–52.
- Wanda, G., Starcke, S., Zierau, O., Njamen, D., Richter, T., and Vollmer, G. (2007). Estrogenic activity of griffonianone c, an isoflavone from the root bark of *Milletia griffoniana*: regulation of the expression of estrogen responsive genes in uterus and liver of ovariectomized rats. *Planta Med*, 73(6):512–518.
- Wang, H., Eriksson, H., and Sahlin, L. (2000). Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod*, 63(5):1331–1340.
- Wang, H., Masironi, B., Eriksson, H., and Sahlin, L. (1999). A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus. *Biol Reprod*, 61(4):955–964.
- Weiland, N., Orikasa, C., Hayashi, S., and McEwen, B. (1997). Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol*, 388 (4):603–612.

Parte I

Anexos

Anexo 1

Tablas

Tabla 1.1: Efectos del EMATst en el ciclo estral de ratas (P, E, D): N° de días en cada periodo.

GRUPO	DOSIS	P	DS	E	DS	D	DS
Control		3,75 d	0,96	3,75 d	0,96	7,25 d	0,96
GrupoI	EVx1	2,80 d	0,45	2,80 d	0,45	7,00 d	0,71
GrupoII	EVx10	1,20 d	0,84	1,20 d	0,84	9,60 d	1,52

DS:Desviación estándar; P:proestro; D:diestro; d:días

Tabla 1.2: Ciclo estral del grupo control entre el día 0 y el día 14 de la medición

DIA	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
R-1	E	D	D	P	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	D	D	D	P
R-2	E	D	D	P	E	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D
R-3	D	D	E	D	D	P	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P
R-4	P	E	D	D	D	D	D	D	E	D	D	P	D	D	P	E	D	P	E

P:Proestro; D:Diestro; E:Estro

Tabla 1.3: Ciclo estral del grupo I entre el día 0 y el día 14 de la medición

DIA	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
R-1	P	E	D	D	D	P	E	D	D	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D
R-2	P	E	E	D	D	P	D	D	P	E	E	E	D	D	E	D	D	P	E
R-3	D	D	D	D	D	D	D	D	P	E	E	D	D	P	E	E	D	D	P
R-4	E	E	D	D	D	P	E	D	D	D	D	D	P	E	E	D	D	P	E
R-5	D	D	P	E	D	D	E	D	D	D	E	D	D	P	E	D	D	P	E

P:Proestro; D:Diestro; E:Estro

Tabla 1.4: Ciclo estral del grupo II entre el día 0 y el día 14 de la medición

DIA	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
R-1	E	D	D	D	P	E	D	P	D	D	D	E	D	D	E	D	D	D	P
R-2	E	D	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	E	E	D	D	D	E	D
R-3	P	E	D	D	D	D	D	E	D	D	D	E	D	D	D	E	D	D	P
R-4	D	D	D	P	E	D	D	D	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D
R-5	P	D	P	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	E	E	D	D

P:Proestro; D:Diestro; E:Estro

Tabla 1.5: Porcentaje promedio N° de días de cada ciclo de los grupos control, I y II

	Promedio % P	DS	Promedio % E	DS	Promedio % D	DS
Control	26,79	6,84	21,43	5,83	51,79	6,84
Grupo I	20,00	3,19	30,00	3,19	50,00	5,05
Grupo II	8,57	5,98	22,86	7,83	68,57	10,83

P:Proestro; D:Diestro; E:Estro

Tabla 1.6: Porcentaje de ovulación, grupo Control, I y II

	Promedio de ovulación
GRUPO CONTROL	71,4
GRUPO I	68,6
Grupo II	17,1

Tabla 1.7: Comparación de P, Control, Grupo I, Grupo II

	Promedio % P	DS
GRUPO CONTROL	26,8	6,8
GRUPO I	20,0	3,2
Grupo II	8,6	5,9

P:Proestro; DS:desviación estándar

Tabla 1.8: Comparación de D, Control, Grupo I, Grupo II

	Promedio % D	DS
GRUPO CONTROL	51,79	6,80
GRUPO I	50,00	5,00
Grupo II	68,57	10,80

D:Diestro; DS:desviación estándar

Tabla 1.9: Comparación de E, Control, Grupo I, Grupo II

	Promedio % E	DS
GRUPO CONTROL	21,4	5,8
GRUPO I	30,0	3,2
Grupo II	22,9	7,8

E:Estro; DS:desviación estándar

Tabla 1.10: Esquema ensayo de unión - ligando

Tipo tubo	Buffer	receptor	$^3H - E_2$	E_2 frio	verbascosido	EMAT	Conc
TC	-	-	10 μ L	-	-	-	0,91 nM
Bkg	440 μ L	50 μ L	10 μ L	-	-	-	0,0182 nM
E_2	430 μ L	50 μ L	10 μ L	10 μ L	-	-	211 nM
E_2	430 μ L	50 μ L	10 μ L	10 μ L	-	-	1,7 nM
E_2	430 μ L	50 μ L	10 μ L	10 μ L	-	-	0,00286 nM
V	290 μ L	50 μ L	10 μ L	-	150 μ L	-	1200000 nM
V	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	300 μ L	-	822000 nM
V	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	300 μ L	-	792000 nM
V	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	300 μ L	-	19200 nM
V	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	300 μ L	-	450 nM
Ex	430 μ L	50 μ L	10 μ L	-	-	10 μ L	20000000 nM
Ex	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	-	300 μ L	1000000 nM
Ex	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	-	300 μ L	630000 nM
Ex	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	-	300 μ L	52000 nM
Ex	140 μ L	50 μ L	10 μ L	-	-	300 μ L	343 nM

TC: tubo con cuenta total de $^3H - E_2$; Bkg:tubo con unión total de $^3H - E_2$ al receptor; E_2 : tubo con estradiol frio; V:tubo con verbascósido; Ex:tubo con EMAT

Tabla 1.11: Resultados ensayo de unión - ligando

Tubo	Conc.	DPM Ensayo 1	DPM Ensayo 2	DPM Ensayo 3	DPM Ensayo 4
TC	0,91 nM	171254,0	141585,5	132566,5	62884,0
Bkg	0,0182 nM	1145,0	1092,0	840,0	247,0
E_2	0,00286 nM	1072,5	1059,4	961,3	267,3
E_2	1,7 nM	-	-	837,0	239,0
E_2	211 nM	792,3	508,0	413,0	158,0
V	450 nM	960,8	1011,6	762,0	239,0
V	19200 nM	-	-	744,0	261,3
V	792000 nM	-	330,5	-	-
V	822000 nM	687,6	382,0	346,0	163,0
V	1200000 nM	-	-	-	172,3
Ex	343 nM	901,0	1009,8	842,0	272,4
Ex	52000 nM	-	-	798,0	238,3
Ex	630000 nM	878,0	539,3	554,0	186,3
Ex	1000000 nM	-	-	720,0	231,0
Ex	2000000 nM	1704,3	1134,3	967,0	-

TC: tubo con cuenta total de $^3H - E_2$; Bkg:tubo con unión total de $^3H - E_2$ al receptor; E_2 : tubo con estradiol frio; V:tubo con verbascósido; Ex:tubo con EMAT

Tabla 1.12: Porcentaje de unión

Tubo	Conc.	% unión Ensayo 1	% unión Ensayo 2	% unión Ensayo 3	% unión Ensayo 4
Bkg	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
E_2	0,00286 nM	0,19	0,19	0,23	0,22
E_2	1,7 nM	-	-	0,20	0,19
E_2	211 nM	0,14	0,09	0,10	0,13
V	450 nM	0,18	0,19	0,18	0,19
V	19200 nM	-	-	0,18	0,21
V	792000 nM	-	0,06	-	-
V	822000 nM	0,12	0,07	0,08	0,13
V	1200000 nM	-	-	-	0,14
Ex	343 nM	0,16	0,20	0,20	0,22
Ex	52000 nM	-	-	0,19	0,19
Ex	630000 nM	0,15	0,10	0,13	0,15
Ex	1000000 nM	-	-	0,17	0,19
Ex	20000000 nM	0,30	0,24	0,23	-

Bkg:tubo con unión total de $^3H - E_2$ al receptor; E_2 : tubo con estradiol frio; V:tubo con verbascósido; Ex:tubo con EMAT

Tabla 1.13: valores de IC_{50}

	Estradiol	Verbascósido	EMAT
EC_{50} nM, exp.1	113,0	356667,0	480000,0
EC_{50} nM, exp.2	100,0	393333,0	320000,0
EC_{50} nM, exp.3	78,3	423333,0	305000,0
EC_{50} nM, exp.4	47,5	435000,0	150000,0

Tabla 1.14: CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$ en *D. magna*

Especie	CL_{50} promedio mg/L \pm DS	CL_{50} promedio M
<i>Daphnia magna</i>	1,25 \pm 0,39	4,25 $\times 10^{-6}$ M

DS:desviación estándar; M:molaridad

Tabla 1.15: CL_{50} de toxicidad para 17 β - estradiol

Especie	CL_{50} promedio mg/L \pm DS	CL_{50} promedio M
<i>Daphnia magna</i>	12,03 \pm 4,84	44,2 $\times 10^{-6}$ M

DS:desviación estándar; M:molaridad

Tabla 1.16: Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de 17 β estradiol durante 24 horas de exposición

log concentración	Porcentaje promedio de inmovilidad
0,04	0,00
0,27	0,00
0,57	1,70
0,87	43,30
1,17	56,70

Tabla 1.17: CL_{50} del EMATst

Especie	CL_{50} promedio mg/L \pm DS
<i>Daphnia magna</i>	1641,8 \pm 331,9

DS:desviación estándar

Tabla 1.18: Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de EMATst durante 24 horas de exposición

log concentración	Porcentaje promedio de inmovilidad
2,50	0
2,79	5
3,09	30
3,39	80
3,69	100

Tabla 1.19: CL_{50} para verbascósido

Especie	CL_{50} promedio mg/L	CL_{50} promedio M
<i>Daphnia magna</i>	1770	283×10^{-6}

DS:desviación estándar

Tabla 1.20: Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de verbascósido durante 24 horas de exposición

log concentración	Porcentaje promedio de inmovilidad
2,79	0
2,94	0
3,08	1
3,23	30
3,38	100

Tabla 1.21: CL_{50} para ácido cafeico

Especie	CL_{50} promedio mg/L	CL_{50} promedio M
<i>Daphnia magna</i>	481	267×10^{-6}

DS:desviación estándar

Tabla 1.22: Porcentaje de inmovilidad de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de ácido cafeico durante 24 horas de exposición

log concentración	Porcentaje promedio de inmovilidad
2,65	5
2,67	40
2,69	60
2,70	95
2,73	100

Anexo 2

Tablas

Tabla 2.1: Mortalidad de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

DÍA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CONTROL 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROL 2ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMAT 3mg/L 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMAT 3mg/L 2ª gen	0	0	1	1	1	1	2	4	4	5	5	5	7	7	7	7
EMAT 6mg/L 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMAT 6mg/L 2ª gen	0	0	1	1	3	3	3	3	3	3	5	6	7	7	8	8
EMAT 12mg/L 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMAT 12mg/L 2ª gen	0	0	2	4	5	5	5	5	5	6	7	7	10	10	10	10

Tabla 2.2: Mortalidad de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

DÍA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CONTROL 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROL 2ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VERB 3mg/L 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VERB 3mg/L 2ª gen	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VERB 6mg/L 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VERB 6mg/L 2ª gen	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	5
VERB 12mg/L 1ª gen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VERB 12mg/L 2ª gen	0	5	6	7	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 2.3: N° de neonatos de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

GEN. mg/L	1ª GEN				2ª GEN			
	C	3	6	12	C	3	6	12
A	31	52	22	9	41	0	0	0
B	45	47	15	19	38	0	0	0
C	26	28	14	15	46	0	0	0
D	36	36	15	10	44	0	0	0
E	22	41	20	15	32	0	0	0
F	34	22	34	14	31	0	0	0
G	45	41	27	20	39	0	0	0
H	44	18	15	9	19	0	0	0
I	43	46	39	18	44	0	0	0
J	43	33	17	19	31	0	0	0
TOT	369	364	208	148	365	0	0	0
PROM	36,9	36,4	20,8	14,8	36,5	0	0	0
	p = 0,0001				p = 0,0001			

C: Control

Tabla 2.4: N° de neonatos de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de verbascósido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

GEN. mg/L	1ª GEN				2ª GEN			
	C	3	6	12	C	3	6	12
A	37	40	28	20	33	0	17	0
B	34	41	36	15	39	23	0	0
C	25	34	33	32	0	0	0	0
D	37	0	29	29	43	10	0	0
E	27	42	9	21	0	0	5	0
F	37	32	36	28	42	3	3	0
G	36	34	25	37	45	0	14	0
H	37	37	36	27	0	21	3	0
I	35	28	40	39	50	5	0	0
J	22	35	22	37	3	22	0	0
TOT	327	323	294	285	301	84	42	0
PROM	32,7	32,3	29,4	28,5	30,1	8,4	4,2	0
	p = 0,4142				p = 0,0075			

C: Control

Tabla 2.5: N° de neonatos de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de 17β -estradiol durante 15 días de exposición, para 1° y 2° Generación

GEN. mg/L	1ª GEN				2ª GEN			
	C	0,6	0,8	1	C	0,6	0,8	1
A	7	0	0	0	21	7	24	17
B	6	5	5	0	14	13	24	20
C	10	5	0	7	10	9	6	19
D	6	5	0	0	13	10	14	22
E	8	0	0	0	0	9	16	19
F	2	0	0	0	16	10	8	20
G	3	2	0	0	5	11	21	22
H	0	0	0	0	5	10	7	17
I	2	0	0	0	8	9	25	18
J	4	2	0	1	11	8	5	10
TOT	48	19	5	8	103	96	150	184
PROM	4,8	1,9	0,5	0,8	10,3	9,6	15	18,4
	p = 0,0046				p = 0,0093			

C: Control

Tabla 2.6: Tamaño de la camada de neonatos de *D. magna* en primera generación y segunda generación expuestas durante 15 días a diversas muestras y concentraciones

	Tratamiento	Tamaño camada Primera Generación	Tamaño camada Segunda Generación
EMATst	control	12	12
	3 mg/L	12	0
	6 mg/L	7	0
	12 mg/L	7	0
Verbascósido	control	11	10
	3 mg/L	11	9
	6 mg/L	10	7
	12 mg/L	10	0
17 β -estradiol	control	3	6
	0,6 mg/L	11	9
	0,8 mg/L	10	7
	1,0 mg/L	10	0

Tabla 2.7: N° de mudas de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de EMATst durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª Generación

GEN. mg/L	1ª GEN				2ª GEN			
	C	3	6	12	C	3	6	12
A	6	6	6	5	4	3	2	0
B	5	5	5	5	5	3	1	0
C	5	6	5	6	5	0	0	0
D	6	6	5	4	6	1	0	0
E	7	6	5	4	5	6	1	0
F	4	5	5	5	5	3	5	0
G	7	5	5	7	3	2	0	0
H	7	4	4	5	3	1	0	0
I	6	6	4	5	5	3	1	0
J	6	6	5	5	3	1	0	0
TOT	59	55	49	51	44	23	10	1
PROM	5,9	5,5	4,9	5,1	4,4	2,3	1,0	0,1
	p = 0,1238				p = 0,0001			

C: Control

Tabla 2.8: N° de mudas de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de Verbas-
cosido durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

GEN. mg/L	1ª GEN				2ª GEN			
	C	3	6	12	C	3	6	12
A	6	6	7	6	5	0	3	0
B	6	6	7	5	5	4	1	1
C	6	7	7	7	2	4	0	0
D	6	2	7	8	5	4	2	0
E	8	7	6	6	4	4	3	0
F	6	7	7	6	5	7	4	0
G	8	8	8	6	6	2	3	0
H	8	9	6	6	3	5	4	0
I	8	8	6	6	5	3	1	0
J	8	9	6	8	6	5	1	0
TOT	70	69	67	64	46	38	22	1
PROM	7,0	6,9	6,7	6,8	4,6	3,8	2,2	0,1
	p = 0,4298				p = 0,0001			

C: Control

Tabla 2.9: N° de mudas de *D. magna* expuestas a diversas concentraciones de 17β estradiol durante 15 días de exposición, para 1ª y 2ª generación

GEN. mg/L	1ª GEN				2ª GEN			
	C	0.6	0.8	1	C	0.6	0.8	1
A	4	3	2	0	4	5	5	4
B	4	3	5	0	4	6	4	4
C	4	4	4	7	3	4	4	5
D	4	10	10	0	4	5	3	5
E	3	3	2	0	4	5	3	5
F	3	2	1	0	5	5	3	4
G	3	2	3	0	3	5	4	4
H	4	3	3	0	4	7	4	5
I	4	0	3	0	3	5	6	3
J	4	3	3	1	3	4	6	4
TOT	37	33	36	33	37	51	42	43
PROM	3,7	3,3	3,6	3,3	3,7	5,1	4,2	4,3
	p = 0,2180				p = 0,0488			

C: Control

Anexo 3

Estudio químico

Metodología para identificar el verbascósido y el 7-o-glucósido de luteolina

En esta tesis se aisló el verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina, siguiendo la metodología desarrollada por Backhouse et al. (2008) y se comprobó la identificación de los productos aislados por c.c.f. y co-cromatografía con su respectivo patrón de referencia en distintos medios (acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6; y acetato de etilo: metanol 8: 2). Las c.c.f. fueron observadas a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y revelando con NP/PG. En la Figura I se muestra la c.c.f. realizada en cromatofolios de gel de sílice con indicador de fluorescencia de las fracciones que contienen ambos compuestos, éstos presentaron fluorescencia al UV-365 nm y dieron reacción positiva con NP/PG. En la Figura II se muestra el verbascósido recién aislado.

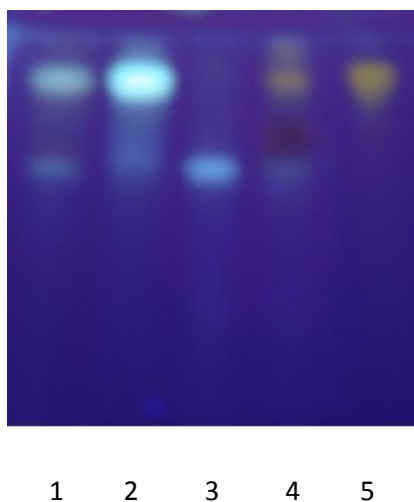


Figura I: Cromatografía en capa fina (c.c.f.) de fracciones con verbascósido y 7-O-glucósido luteolina
1: fracción rica en verbascósido; 2 verbascósido; 3 fracción rica en luteolina 7-O-glucósido; 4 luteolina 7-O-glucósido. Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6
Reactivo revelador: NP/PG y se observó la c.c.f. al UV: 365nm



Figura II. Verbascosido aislado de la CC₅Seph

Los cromatogramas CLAE del verbascósido y de la luteolina 7-O-glucósido aislados con sus respectivos espectros UV obtenidos realizando un barrido entre 200 y 400 nm se muestran en las Figuras III y IV respectivamente, en éstas se pueden observar las dos bandas de absorción UV de ambos compuestos.

Identificación de verbascósido

Previamente en nuestro laboratorio se identificó en el EMAT el verbascósido por completos estudios espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C (Backhouse et al., 2008). Dicho estudio fue realizado en un equipo Bruker de 300 para el RMN de ^1H en metanol deuterado y el RMN de ^{13}C fue obtenido desde un equipo de 100Mhz en DMSOy comparando los datos obtenidos con los de la literatura (Calis et al.,1987, Gross et al., 1987)

Cabe destacar en el ^1H -RMN del verbascósido (Figura V) la presencia a 7,59 y 6,28 ppm, señales correspondientes a los H-8'' α y H-7'' β del grupo arilo, con una constante de acoplamiento de 15,85 Hz característica de una sustitución trans. Como también el multiplete a 2,79 ppm integrado para 2H correspondiente a los protones del C7 del grupo etilo, a 4,0 ppm un multiplete correspondiente a uno de los protones H-8 del grupo etilo y centrado a 3,5 ppm, otra señal multiplete, pero enmascarado por las señales de otros protones correspondiente al otro H-8'. A 1,10 ppm se observa una señal integrado para 3H correspondiente al grupo CH_3 de la ramnosa. Las señales correspondientes a los protones aromáticos de los anillos cafeoil y feniletanoide aparecen entre 6,4 y 7,2 ppm. La señal del protón anomérico de la glucosa aparece a 4,3 ppm.

En el espectro de ^{13}C - DEPT-135 (Figura VI) se distinguen las señales correspondientes a los carbonos del grupo CH_3 de la ramnosa a 16,2 ppm y de los grupos CH_2 del grupo feniletanoide a 34,3 y 70,1 ppm y de la glucosa a 60,1 ppm.

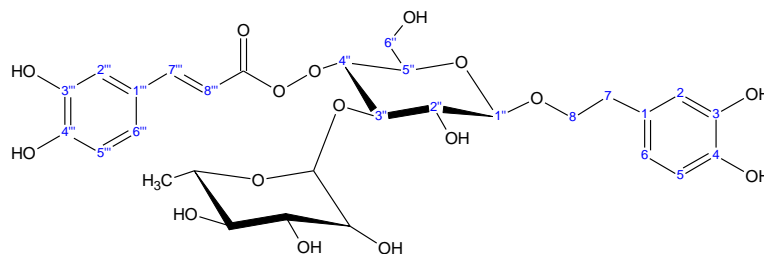


Figura V. Verbascósido

Identificación del 7-O-glucósido de luteolina

Previamente en nuestro laboratorio se identificó en el EMAT el 7-O-glucósido de luteolina por completos estudios espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C (Backhouse et al., 2008). Dicho estudio fue realizado en un equipo Bruker de 300/75 Mhz en DMSO deuterado y comparando los datos obtenidos con los de la literatura (Harbone et al., 1982 y Mabry et al., 1979)

Las señales de un ^1H -RMN confirman la presencia de los protones del anillo A de los carbonos 6 (6,4 ppm) y 8 (6,7 ppm) que aparecen como singuletes, de los protones del anillo B de los carbonos en 2' (7,41 ppm), 5' (6,8 ppm), 6' (7,4 ppm), y del C 1'' de la glucosa (5,05 ppm) (Figura VII).

El espectro de ^{13}C -RMN (Figura VIII) permite confirmar la presencia del doble enlace entre los C-2 y C-3 (164,6 y 103,3 ppm respectivamente) propio de un derivado de flavona. Se confirmó la presencia de un C-OH en el anillo A (en C5) en 160,5 ppm y los C unidos a OH en orto en el anillo B (153,6y 149,3ppm en C3' y C4' respectivamente). El C del CH₂OH de la glucosa aparece a 64,1ppm.

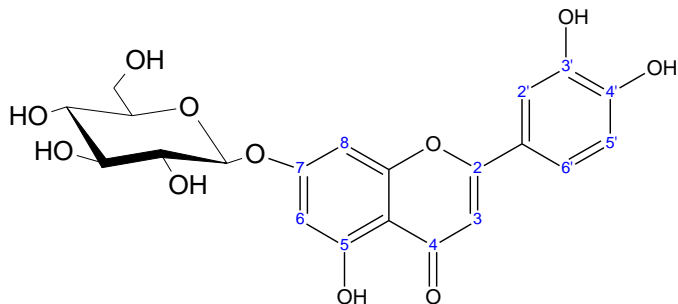


Figura VII: 7-O-glucósido de luteolina

Referencias:

- Backhouse N., Rosales L., Apablaza C., Erazo. S., Negrete R., Theodoluz C., Rodríguez J., Delporte C. 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddlejaglobosa*, Buddlejaceae. *J Ethnopharmacology* 116(2): 263-269.
- Calis I., Gross G.A., Sticher O. 1986. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophulariascopoli*. *Phytochemistry* 26(7): 2057-2061.
- Gross GA., Lahloub M.F., Anklin C., Schulten H.R., and Sticher O. 1987. Teucroside, A phenylpropanoid glycoside from *Teucriumchamaedry*. *Phytochemistry* 27(5): 1459-1463.
- Harborne J.B., Mabry T.J. 1982. *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London, New York, 744 pp.
- Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. 1979. *The systematic Identification of flavonoids*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York. 262 p.

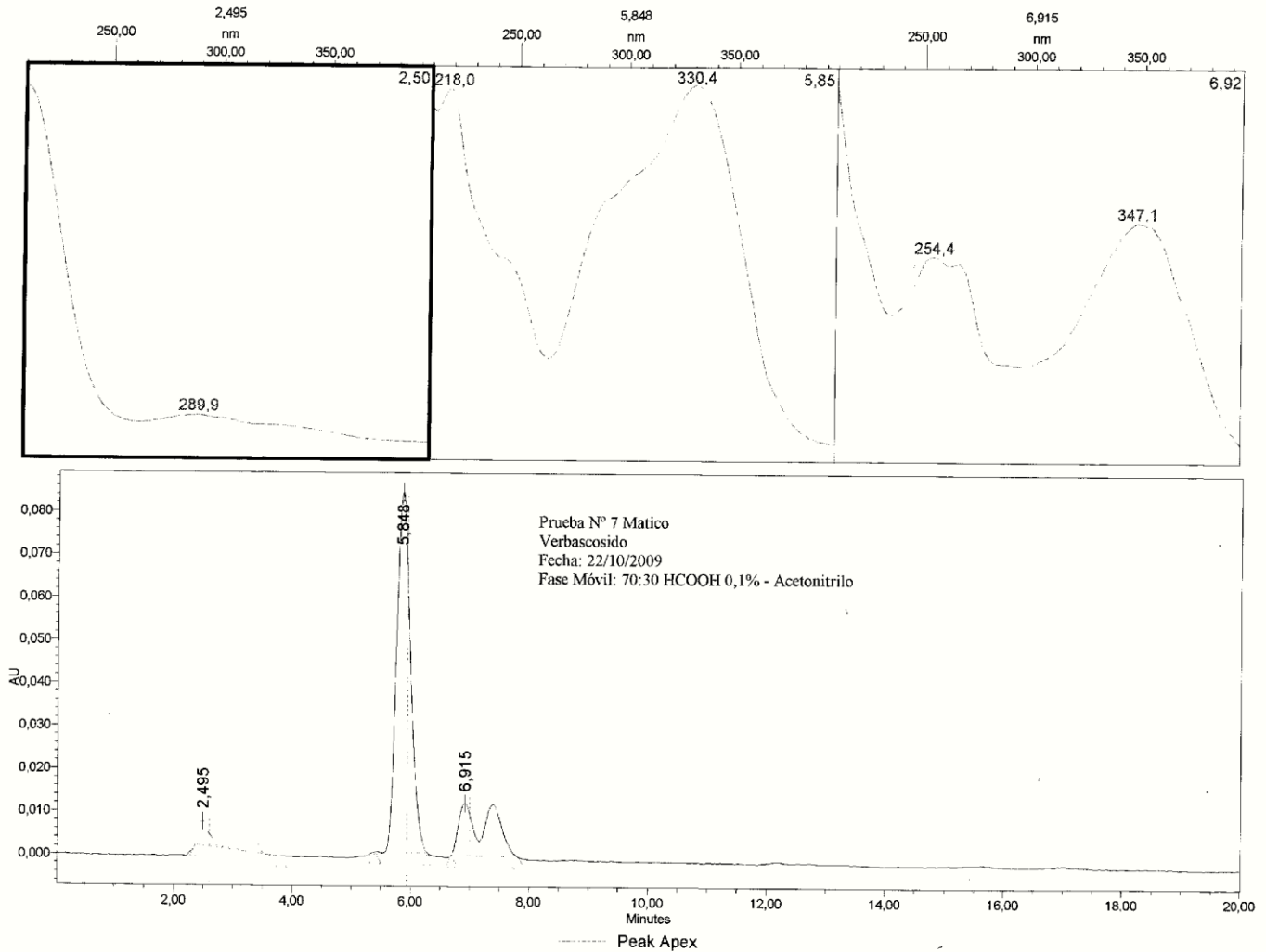


Figura III: Cromatograma CLAE del verbascósido. Equipo Waters 600 acoplado a un detector de fotodiodos Waters 996.
 Columna: C₁₈ 4,6 x 250 mm, Inertsil ODS-35,0 µm GL Sciences Inc. (4DI86103), Japón
 Flujo: 1,5 mL/min; Fase móvil: ácido fórmico 0,1%: acetonitrilo = 75: 25; Volumen de inyección: 20 µL.; Longitud de onda: 365 nm.

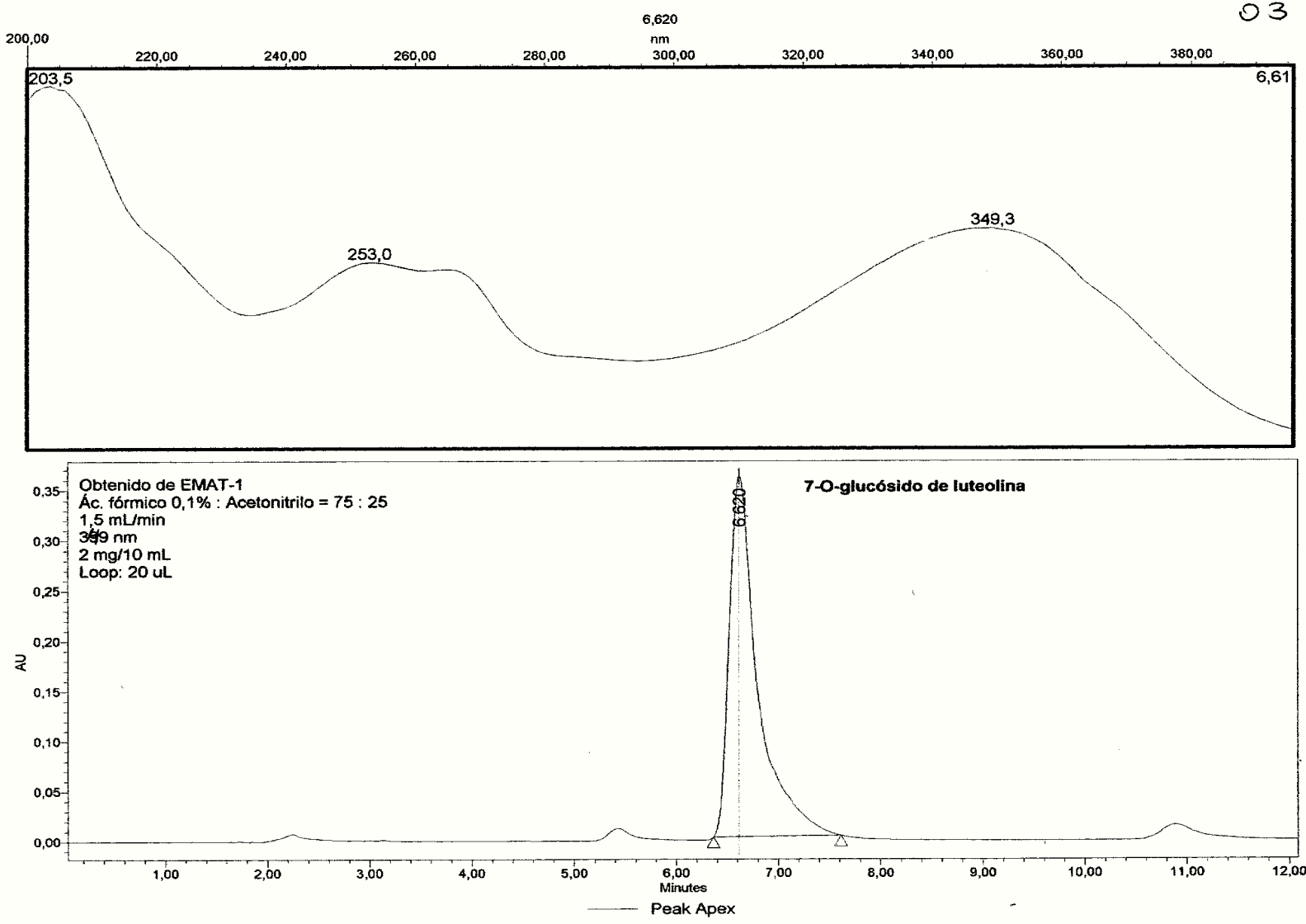
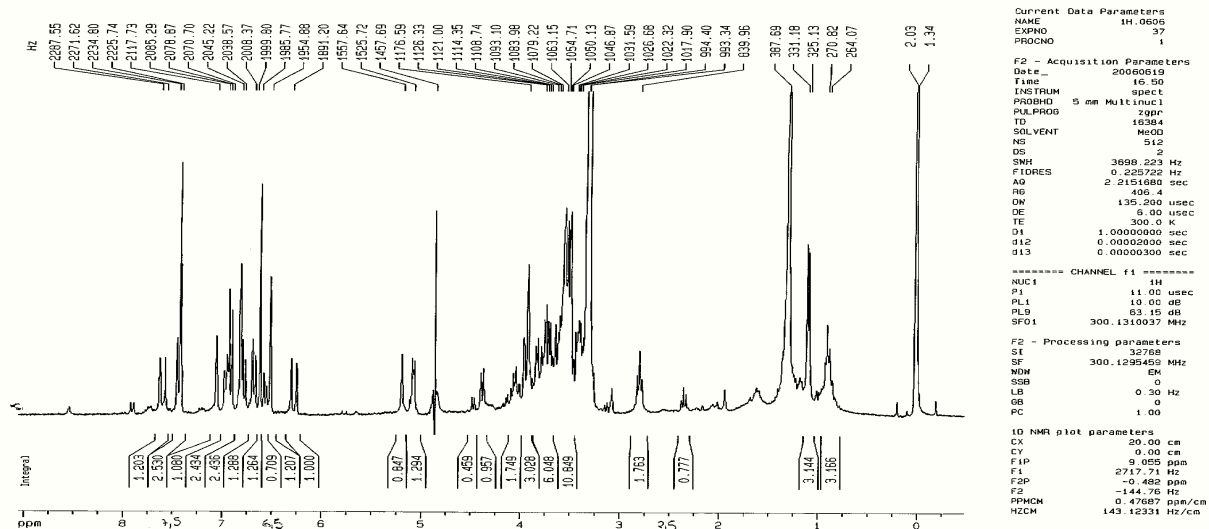


Figura IV: Cromatograma CLAE del 7-O-glucósido de luteolina. Equipo Waters 600 acoplado a un detector de fotodiodos Waters 996. Columna: C₁₈ 4,6 x 250 mm, Inertsil ODS-35 µm GL Sciences Inc. (4DI86103), Japón
Flujo: 1,5 mL/min; Fase móvil: ácido fórmico 0,1%: acetonitrilo = 75: 25; Volumen de inyección: 20 µL; Longitud de onda: 365 nm.



```

Current Data Parameters
NAME      IH_0005
EXPNO    37
PROCNO   1

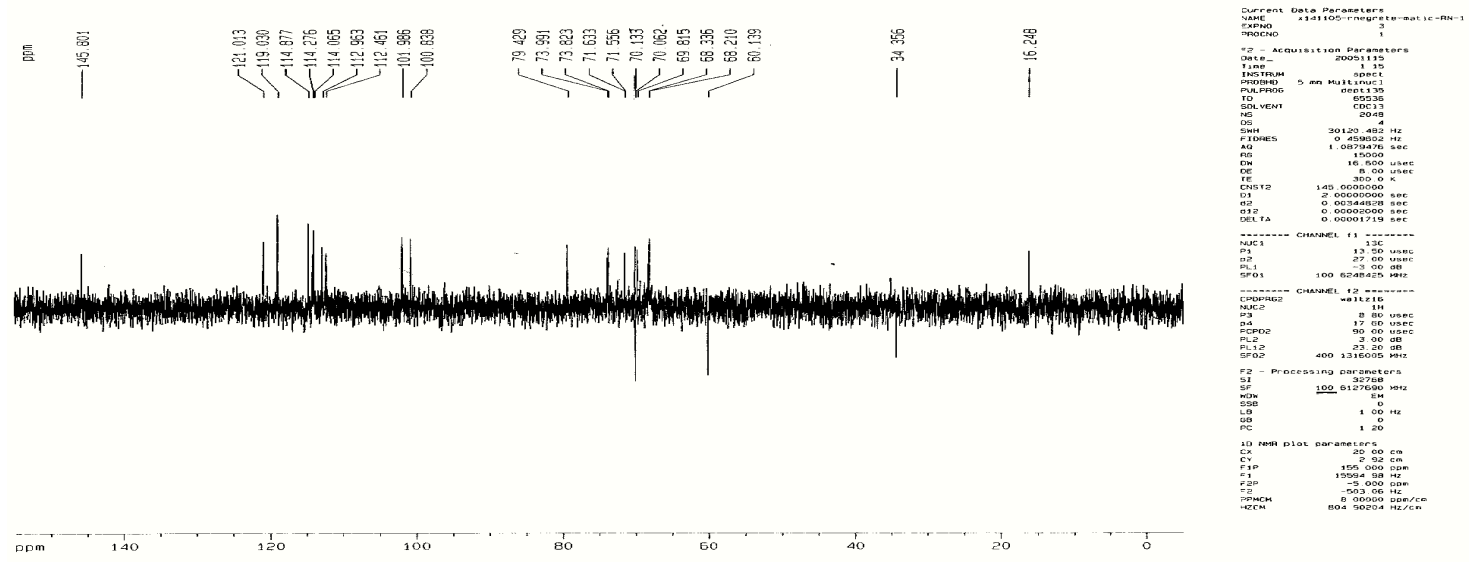
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20060119
Time     16.50
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG zgpr
TD        65536
SOLVENT  H2O
NS        512
DS        2
SMH       3699.223 Hz
FIDRES    0.225722 Hz
AQ        2.2151680 sec
RG        406.4
DE        135.200 usec
TE        300.0 K
D1        1.00000000 sec
d12       0.00002000 sec
d13       0.00003000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        11.00 usec
PL1       19.00 dB
RG1       63.15 dB
SFO1      300.1310037 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        300.1295459 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00

ID NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        0.00 cm
F1P       2717.71 Hz
F2P       -0.482 ppa
F3        -144.76 Hz
F4        0.47687 ppm/cm
PRFCHM    143.12331 Hz/cm
  
```

Figura V. Espectro ¹H-RMN del verbascósido aislado desde el EMAT



```

Current Data Parameters
NAME      13C1000-mnemat-ic-RN-1
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20061115
Time     1.35
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG zgpg30
TD        65536
SOLVENT  DMS
NS        30120.485 Hz
DS        2
SMH       30120.485 Hz
FIDRES    0.459932 Hz
AQ        1.0879476 sec
RG        15000
DE        16.800 usec
TE        300.0 K
D1        2.00000000 sec
d2        0.00344828 sec
d12       0.00000000 sec
DELTA    0.00001719 sec

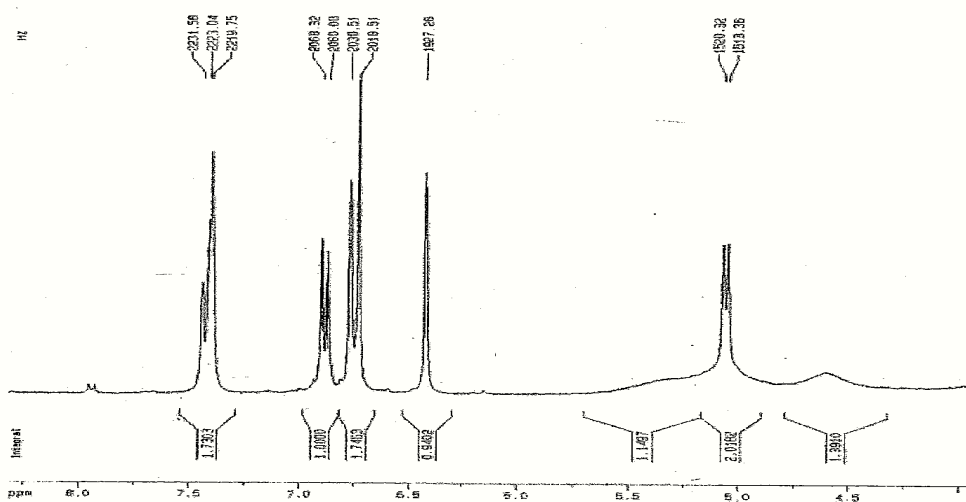
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        13.50 usec
PL1       19.00 dB
RG1       3.00 dB
SFO1      100.6264625 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
P2        8.80 usec
PL2       17.00 usec
RG2       90.00 usec
SFO2      3.00 MHz
PL12     23.20 dB
SFO12    400.1316000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        100.6127690 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.20

ID NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        7.92 cm
F1P       15594.98 Hz
F2P       -5.00000 ppa
F3        -503.00 Hz
F4        0.00000 ppm/cm
PRFCHM    804.50204 Hz/cm
  
```

Figura VI. Espectro ¹³C-RMN del verbascósido aislado desde el EMAT



```

CURRENT DATA PARAMETERS
NAME          7c.0000
EXPNO         48
PROCNO        1

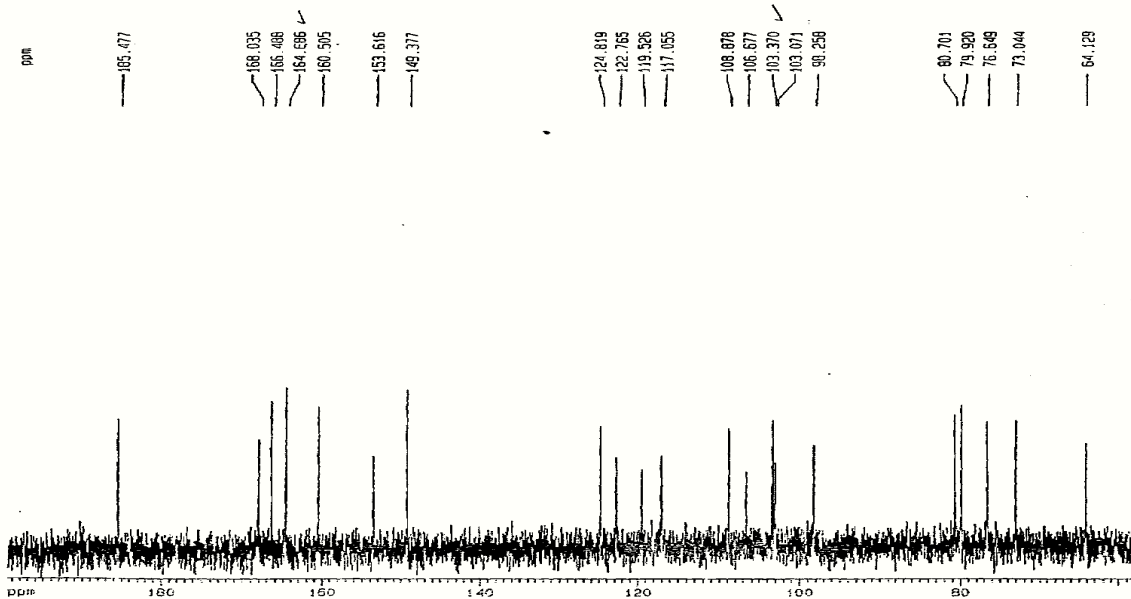
F2 - Acquisition Parameters
Date_         20060222
Time          17 29
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Multicore1
PULPROG       zg30
TE            300.2
SOLVENT       DMSO
NS            120
DS            2
SFO1          478.6272 MHz
FIDRES        0.252814 Hz
AQ            1.71253466 sec
RG            287.4
SM            164.400 usec
DE            6.00 usec
TE            300.2 K
SFO2          1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            14.00 usec
PL1           0.00 dB
SFO1         300.132005 MHz

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            300.132005 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.20 Hz
GB            0
PC            1.00

ID NR01 plot parameters
CX            20.00 cm
CY            0.00 cm
FIP           8.516 ppm
F1            15067.66 Hz
F2P          57.609 ppm
F2           4347.58 Hz
PRMCH        7.0552 ppm/cm
HZCM         60.02151 Hz/cm
  
```

Figura VII. Espectro ¹H-RMN del 7-O-glucósido de luteolina aislado desde el EMAT



```

Current Data Parameters
NAME          13c.105
EXPNO         68
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20060713
Time          9:27
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Multicore1
PULPROG       zgpg30
TE            327.66
SOLVENT       CDCl3
NS            30882
DS            2
SFO1          129.6272 MHz
FIDRES        0.545877 Hz
AQ            0.5110004 sec
RG            456.1
SM            27.800 usec
DE            6.00 usec
TE            300.0 K
SFO2          1.00000000 sec
SFO3          0.00000000 sec
SFO4          0.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            9.00 usec
PL1           0.00 dB
SFO1         75.4752653 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CROPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPRG2       100.00 usec
PL2           10.00 dB
PL12         30.00 dB
PL13         30.00 dB
SFO2         300.132005 MHz

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            75.4752653 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40

ID NR01 plot parameters
CX            20.00 cm
CY            0.00 cm
FIP           199.525 ppm
F1            15067.66 Hz
F2P          57.609 ppm
F2           4347.58 Hz
PRMCH        7.0552 ppm/cm
HZCM         535.50376 Hz/cm
  
```

Figura VIII. Espectro ¹³C-RMN del 7-O-glucósido de luteolina aislado desde el EM

Anexo 4

Determinación de plomo

ANEXO 2

Recalculation

02-05-2011 11:34 Page 1/2

ZEEnit 700**Graphite tube**

Report file: C:\Program Files\WinAAS\Abril 2011\Pro_018
Program version: 4.7.0 Printed on: 02-05-2011 11:34
Recording started on 02-05-2011 11:33 GMT-3.0
Operator: Fernando Squella
Laboratory: Toxicología Ocupacional
Code:
Technique: Graphite tube/ Platform
Remarks:

Sample table: Means of abs./emis. values Peak area**Pb**

No	Name	Pos	Peak area			Peak height		
			Abs	SD	RSD/%	Abs	SD	RSD/%
1	L08-03	8	0.00724	0.00058	8.086	0.02004	0.00203	10.14
2	L10-04	9	0.05077	0.00107	2.121	0.1668	0.00192	1.156
3	verbascosido	11	0.02730	0.00004	0.153	0.08653	0.00468	5.416
4	st 300	5	0.04053	0.00057	1.418	0.09406	0.00049	0.522

Sample table: Concentration/content**Pb**

A: analysed sample O: original sample

No	Name	Rec. date	Pos	weight/g SV/mL	ASDF Pre-DF	Conc.		CI	SD	RSD/%	Rem
						A: µg/L	O: µg/L				
1	L08-03	02-05-2011 11:34	8		---	A: 45.95	O: 45.95	14.14	4.627	10.07	
					1.000			14.14	4.627	10.07	
2	L10-04	02-05-2011 11:34	9		---	A: 389.6	O: 519.3	14.02	8.501	2.182	
					1.333			18.69	11.33	2.182	
3	verbascosido	02-05-2011 11:34	11		---	A: 204.3	O: 817.1	12.63	0.3300	0.162	
					4.000			50.51	1.320	0.162	
4	st 300	02-05-2011 11:34	5		---	A: 308.8	O: 308.8	13.01	4.537	1.470	
					1.000			13.01	4.537	1.470	

Calibration standards**Pb**

No	Name	State Vol. [µl]	Pos	Conc./ µg/L	Abs	SD	RSD/%
1	Cal-Zero	(-)	1	0.000	A: 0.001834 H: 0.004961	0.001286 0.001946	70.14 39.22
2	Cal-Std1	(-)	2	50.000	A: 0.008423 H: 0.01776	0.000030 0.000139	0.359 0.787
3	Cal-Std2	(-)	3	100.000	A: 0.01344 H: 0.03322	0.000127 0.001317	0.946 3.964

ZEEnit 700

4	Cal-Std3	(--)	4	200.000	A: 0.02548 H: 0.06083	0.001229 0.000628	4.825 1.034
5	Cal-Std4	(--)	5	300.000	A: 0.03988 H: 0.08742	0.000382 0.001598	0.960 1.828
6	Cal-Std5	(--)	6	400.000	A: 0.05264 H: 0.1185	0.000075 0.002970	0.143 2.507
7	Cal-Std6	(--)	7	500.000	A: 0.06462 H: 0.1508	0.001277 0.002213	1.976 1.468

Calibration function 1 02-05-2011 11:34 Calibration (Peak area)

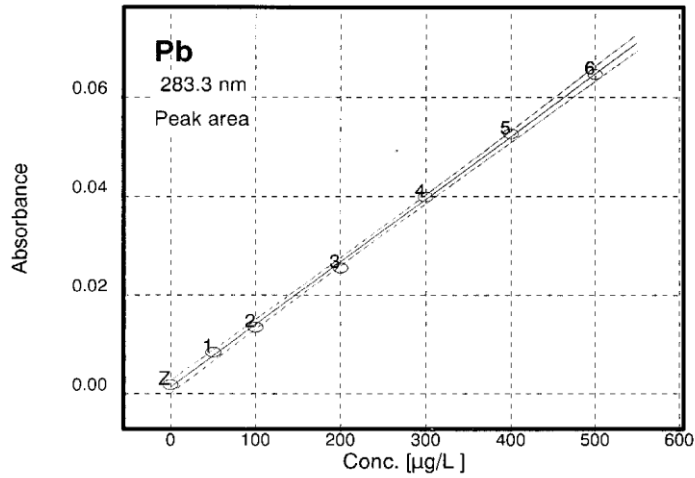
Abs=k1+k2*conc

k1=0.001428

k2=0.000127

Recal. factor: ---

Slope	0.00013 Abs/(µg/L)	R2-adjusted	0.9986
sc0	6.31905 µg/L	Charact. conc.	34.4238 (µg/L)/1%A
Lower limit	0 µg/L	Upper limit	550. µg/L
Detection limit	---	Deter. limit	---



Anexo 5

Preparación de alga

Alimento (*Selenastrum capricornutum*).

Selenastrum capricornutum es una microalga verde (Chlorophyta) unicelular con forma de media luna y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos (Alveal et al., 1995)

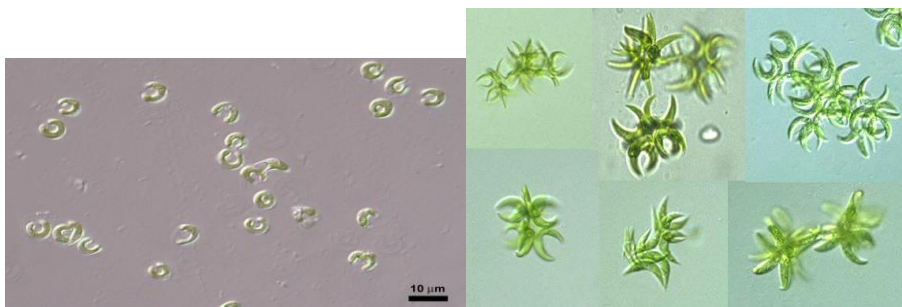


FIGURA 5 y 6: Aspecto de *Selenastrum capricornutum* al observar al microscopio

Los cultivos de *Selenastrum capricornutum* fueron obtenidos de la algoteca de la Universidad de Coímbra, Facultad de Botánica, Portugal. Son mantenidos en cultivos según Stein (1973) de acuerdo a lo descrito en la Tabla N° 6.

TABLA 6 Medio de cultivo para *Selenastrum capricornutum*

Solución Micronutrientes	
Cantidad por cada 500 mL	
Cloruro Magnesio	6,08 g
Cloruro Calcio	2,2 g
Ácido Bórico	0,0928 g
Cloruro de Manganeso	0,208 g
Cloruro de Zinc	0,164 g
Cloruro de Hierro	0,080 g
Cloruro de Cobalto	0,0714 g
Molibdato de Sodio	0,363 g
Cloruro de Cobre	0,06 g
EDTA	0,15

Solución Macronutrientes	
Cantidad por cada 1000 mL	
Nitrato de Sodio	25,5 g
Sulfato de Magnesio	14,7 g
Fosfato de Potasio	1,044 g
Bicarbonato de sodio	15 g

(1-5) cuatro soluciones contienen los Macronutrientes y una los micronutrientes.

A partir de estas cepas se preparó un cultivo “stock” el cual fue inoculado en las dependencias del laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, a fin de obtener un cultivo en fase temprana de crecimiento exponencial, a temperatura de 24 ± 2 °C, con iluminación continua (2300 lux),

utilizando tubos fluorescentes del tipo luz blanca. La agitación se realizó mediante bombas de aire de baja potencia, las cuales mantenían en constante agitación el cultivo, evitando la precipitación y la fotoinhibición de las células, además de mantener un cultivo homogéneo en cuanto a la circulación de nutrientes. Las cepas son desdobladas semanalmente mediante resiembras en medio fresco contenidos en recipientes erlenmayer de 500 ml de capacidad, manteniendo la población en la fase exponencial de crecimiento. Luego son inoculados en recipientes de 2 L y 5 L. Los parámetros evaluados generalmente son: número de células, tasa de crecimiento, tiempo de generación, datos obtenidos mediante recuento de cámara de Neubauer y analizados estadísticamente.

$$\text{Partículas por } \mu\text{l volumen} = \frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidad cámara (mm)} \cdot \text{dilución}}$$



FIGURA 7: *Cultivo de algas en el Laboratorio Botánica, Biotecnología en Microalgas, Universidad de Chile (Dra Carla Delporte Vergara. Colaborador Gabriel Castro, ficólogo)*

Anexo 6

Protocolos ensayo agudo

PROTOCOLO DE ENSAYO AGUDO CON EL EMATst

ENSAYO AGUDO CON EXTRACTO (ETANOL)

Pesar 0,5 g de extracto y disolverlo en una mezcla de 99 mL de Dulce estándar (Dst.) y 0,08 mL de etanol (Concentración soluto: 0,5%, Concentración solvente: 0,08%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 0,5%

Conc. Inicial: 0,08%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 0,5\% = 50 \text{ mL} \times (0,032 \dots\dots 0,5\%)$$

$$(3,2 \dots 50 \text{ mL}) \times 0,08\% = 50 \text{ mL} \times C$$

1) 320 mg/L (0,032%) = **3,2 mL**

1) 320 mg/L (0,032%) = **0,05 mL/L**

2) 625 mg/L (0,0625%) = **6,25 mL**

2) 625 mg/L (0,0625%) = **0,1 mL/L**

3) 1250 mg/L (0,125%) = **12,5 mL**

3) 1250 mg/L (0,125%) = **0,2 mL/L**

4) 2500 mg/L (0,25%) = **25 mL**

4) 2500 mg/L (0,25%) = **0,4 mL/L**

5) 5000 mg/L (0,5%) = **50 mL**

5) 5000 mg/L (0,5%) = **0,8 mL/L**

ENSAYO AGUDO CON EXTRACTO (DMSO)

Pesar 5 g de extracto y disolverlo en una mezcla de 49 mL de Dulce estándar (Dst.) y 1 mL de DMSO (Concentración soluto: 10%, Concentración solvente: 2%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 10%

Conc. Inicial: 2%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 10\% = 50 \text{ mL} \times (0,032 \dots\dots 0,5\%)$$

$$(0,16 \dots 2,5 \text{ mL}) \times 2\% = 50 \text{ mL} \times C$$

1) 320 mg/L (0,032%) = **0,16 mL (160 µL)**

1) 320 mg/L (0,032%) = **0,06 mL/L**

2) 625 mg/L (0,0625%) = **0,32 mL (313 µL)**

2) 625 mg/L (0,0625%) = **0,13 mL/L**

3) 1250 mg/L (0,125%) = **0,63 mL (630 µL)**

3) 1250 mg/L (0,125%) = **0,25 mL/L**

4) 2500 mg/L (0,25%) = **1,25 mL (1250 µL)**

4) 2500 mg/L (0,25%) = **0,5 mL/L**

5) 5000 mg/L (0,5%) = **2,5 mL (2500 µL)**

5) 5000 mg/L (0,5%) = **1 mL/L**

PROTOCOLO DE ENSAYO AGUDO CON VERBASCOSIDO

ENSAYO AGUDO CON VERBASCÓSIDO (ETANOL)

Pesar 0,5164 g (516,4 mg) de extracto rico en Verbascósido y disolverlo en una mezcla de 3 mL de Dulce estándar (Dst.) y 1 mL de etanol (Concentración soluto: 12,91%, Concentración solvente: 25%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 12,91%

Conc. Inicial: 25%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 12,91\% = 50 \text{ mL} \times (0,032 \dots\dots 0,5\%)$$

$$(0,24 \dots 1,3 \text{ mL}) \times 25\% = 50 \text{ mL} \times C$$

1) 625 mg/L (0,063%) = **0,24 mL**

1) 320 mg/L (0,063%) = **1,2 mL/L**

2) 875 mg/L (0,088%) = **0,34 mL**

2) 875 mg/L (0,088%) = **1,7 mL/L**

3) 1225 mg/L (0,123%) = **0,48 mL**

3) 1225 mg/L (0,123%) = **2,4 mL/L**

4) 1715 mg/L (0,172%) = **0,67 mL**

4) 1715 mg/L (0,172%) = **3,3 mL/L**

5) 2401 mg/L (0,24%) = **0,93 mL**

5) 2401 mg/L (2,4%) = **4,7 mL/L**

6) 3360 mg/L (0,336%) = **1,3 mL**

ENSAYO AGUDO CON VERBASCÓSIDO (DMSO)

Pesar 1,9537 g (1953,7 mg) de extracto rico en Verbascósido y disolverlo en una mezcla de 19 mL de Dulce estándar (DS) y 1 mL de DMSO (Concentración soluto: 9,8%, Concentración solvente: 5,3%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 9,8%

Conc. Inicial: 5,3%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 9,8\% = 50 \text{ mL} \times (0,063 \dots\dots 0,24\%)$$

$$(0,32 \dots 1,2 \text{ mL}) \times 5,3\% = 50 \text{ mL} \times C$$

1) 625 mg/L (0,063%) = **0,32 mL (320 µL)**

1) 320 mg/L (0,063%) = **0,3 mL/L**

2) 875 mg/L (0,088%) = **0,45 mL (450 µL)**

2) 875 mg/L (0,088%) = **0,5 mL/L**

3) 1225 mg/L (0,123%) = **0,63 mL (630 µL)**

3) 1225 mg/L (0,123%) = **2,5 mL/L**

4) 1715 mg/L (0,172%) = **0,88 mL (880 µL)**

4) 1715 mg/L (0,172%) = **3,5 mL/L**

5) 2401 mg/L (0,24%) = **1,2 mL (1200 µL)**

5) 2401 mg/L (2,4%) = **5 mL/L**

PROTOCOLO DE ENSAYO AGUDO CON 17-β ESTRADIOL

ENSAYO CON ESTRADIOL

Pesar 0,025 g (25 mg) de 17-β ESTRADIOL y disolverlo en 0,5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) (Concentración soluto: 5%), tomar una alícuota de 10 µL de esta solución stock y disolver en 0,25 mL (250 µL) de DMSO en tubo eppendorf (conc = 0,2%), partiendo de esta solución preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

Conc. Inicial: 0,2%

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 100%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 0,2\% = 50 \text{ mL} \times (0,032 \dots 0,5\%)$$

$$V \times C = V \times C$$

$$(0,023 \dots 0,74 \text{ mL}) \times 100\% = 50 \text{ mL} \times C$$

1) 0,92 mg/L (0,00009%) = 0,023 mL

2) 1,84 mg/L (0,00018%) = 0,046 mL

3) 3,68 mg/L (0,00068%) = 0,184 mL

4) 7,36 mg/L (0,00074%) = 0,184 mL

5) 14,7 mg/L (0,0015%) = 50 mL

1) 0,92 mg/L (0,00009%) = 1,2 mL/L

2) 875 mg/L (0,0625%) = 1,7 mL/L

3) 1225 mg/L (0,125%) = 2,4 mL/L

4) 1715 mg/L (0,25%) = 3,3 mL/L

5) 2401 mg/L (0,5%) = 4,7 mL/L

PROTOCOLO DE ENSAYO AGUDO CON DICROMATO DE POTASIO

ENSAYO CON DICROMATO DE POTASIO

Preparar una solución de 30g/L, pesar 0,03 g (30 mg) de K₂Cr₂O₇ y disolverlo en 1 mL de Dulce Estandar (Dst) (Concentración soluto: 3%), tomar una alícuota de 25 µL de esta solución stock y disolver en 1 mL de Dst en tubo eppendorff (Conc = 0,075%), partiendo de esta solución preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

Conc. Inicial: 0,0075%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 0,075\% = 50 \text{ mL} \times (0,000015 \text{} 0,00024\%)$$

- 1) 0,15 mg/L (0,000015%) = 10 µL
- 2) 0,3 mg/L (0,00003%) = 20 µL
- 3) 0,6 mg/L (0,00006%) = 40 µL
- 4) 1,2 mg/L (0,00012%) = 80 µL
- 5) 2,4 mg/L (0,00024%) = 160 µL

Anexo 7

Protocolos ensayo crónico

ENSAYO CRÓNICO CON EXTRACTO

EC50(24h): 715,6 mg/L

A partir de los resultados obtenidos (EC50) y de los parámetros de NOEC y LOEC, se define trabajar con las siguientes tres concentraciones:

1) 117 mg/L (0,0117%)

2) 158 mg/L (0,0158%)

3) 194 mg/L (0,0194%)

Pesar 5 g de extracto y disolverlo en una mezcla de 49 mL de Dulce estándar (Dst.) y 1 mL de DMSO (Concentración soluto: 10%, Concentración solvente: 2%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 10%

Conc. Inicial: 2%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 10\% = 440 \text{ mL} \times (0,0117 \dots\dots 0,125\%)$$

$$(1,03 \dots 1,7 \text{ mL}) \times 2\% = 440 \text{ mL} \times C$$

$$1) 117 \text{ mg/L (0,0117\%)} = 0,52 \text{ mL}$$

$$1) 117 \text{ mg/L (0,0117\%)} = 0,024 \text{ mL/L}$$

$$2) 158 \text{ mg/L (0,0158\%)} = 0,7 \text{ mL}$$

$$2) 158 \text{ mg/L (0,0158\%)} = 0,032 \text{ mL/L}$$

$$3) 194 \text{ mg/L (0,0194\%)} = 0,9 \text{ mL}$$

$$3) 194 \text{ mg/L (0,125\%)} = 0,04 \text{ mL/L}$$

ENSAYO CRÓNICO CON VERBASCÓSIDO

EC50(24h): 1780 mg/L

A partir de los resultados obtenidos (EC50) y de los parámetros de NOEC y LOEC, se define trabajar con las siguientes tres concentraciones:

1) 63 mg/L (0,0063%)

2) 125 mg/L (0,0125%)

3) 250mg/L (0,025%)

Pesar 1,9537 g de extracto rico en verbascósido y disolverlo en una mezcla de 19 mL de Dulce estándar (Dst.) y 1 mL de DMSO (Concentración soluto: 9,8%, Concentración solvente: 5,3%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 9,8%

Conc. Inicial: 5,3%

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times C = V \times C$$

$$V \times 9,8\% = 440 \text{ mL} \times (0,0063 \dots\dots 0,025\%)$$

$$(0,3 \dots 1,1 \text{ mL}) \times 5,3\% = 440 \text{ mL} \times C$$

$$1) 63 \text{ mg/L (0,0063\%)} = 0,3 \text{ mL}$$

$$1) 63 \text{ mg/L (0,0063\%)} = 0,04 \text{ mL/L}$$

$$2) 125 \text{ mg/L (0,0125\%)} = 0,6 \text{ mL}$$

$$2) 125 \text{ mg/L (0,0125\%)} = 0,07 \text{ mL/L}$$

$$3) 250 \text{ mg/L (0,025\%)} = 1,1 \text{ mL}$$

$$3) 250 \text{ mg/L (0,025\%)} = 0,1 \text{ mL/L}$$

ENSAYO CON ESTRADIOL

EC50(24h): 3,67 mg/L

A partir de los resultados obtenidos (EC50) y de los parámetros de NOEC y LOEC, se define trabajar con las siguientes tres concentraciones:

1) 1 mg/L (0,0001%)

2) 0,8 mg/L (0,00008%)

3) 0,6 mg/L (0,00006%)

Pesar 0,05 g (50 mg) de ESTRADIOL y disolverlo en 0,5 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido)
(Concentración soluto: 10%, concentración del solvente 100 %)

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 10%

Conc. Inicial: 100%

$V \times C = V \times C$

$V \times C = V \times C$

$V \times 10\% = 440 \text{ mL} \times (0,0001 \dots\dots 0,00006\%)$

$(1,03 \dots 1,7 \text{ mL}) \times 100\% = 440 \text{ mL} \times C$

1) 0,6 mg/L (0,00006%) = 0,003 mL

1) 0,6 mg/L (0,00006%) = 0,006 mL/L

2) 0,8 mg/L (0,00008%) = 0,004 mL

2) 0,8 mg/L (0,0158%) = 0,008 mL/L

3) 1 mg/L (0,0001%) = 0,005 mL

3) 1 mg/L (0,0117%) = 0,01 mL/L

ENSAYO CRÓNICO CON ÁCIDO CAFEICO

EC50(24h): 481 mg/L

A partir de los resultados obtenidos (EC50) y de los parámetros de NOEC y LOEC, se define trabajar con las siguientes tres concentraciones:

1) 79 mg/L (0,0079%)

2) 106 mg/L (0,0106%)

3) 130 mg/L (0,013%)

Pesar 2 g de ácido cafeico y disolverlo en 20 mL de DMSO (Concentración soluto: 10%, Concentración solvente: 100%). Partiendo de esta solución stock preparar las siguientes diluciones:

VOLUMEN SOLUCIÓN DE PRUEBA (V)

CONCENTRACIÓN SOLVENTE (C)

Conc. Inicial: 10%

Conc. Inicial: 100%

$V \times C = V \times C$

$V \times C = V \times C$

$V \times 10\% = 440 \text{ mL} \times (0,0063 \dots\dots 0,025\%)$

$(0,4 \dots 1,1 \text{ mL}) \times 100\% = 440 \text{ mL} \times C$

1) 79 mg/L (0,0079%) = 0,4 mL

1) 63 mg/L (0,0063%) = 0,9 mL/L

2) 106 mg/L (0,0106%) = 0,5 mL

2) 125 mg/L (0,0125%) = 1,2 mL/L

3) 130 mg/L (0,013%) = 0,6 mL

3) 250 mg/L (0,025%) = 1,3 mL/L