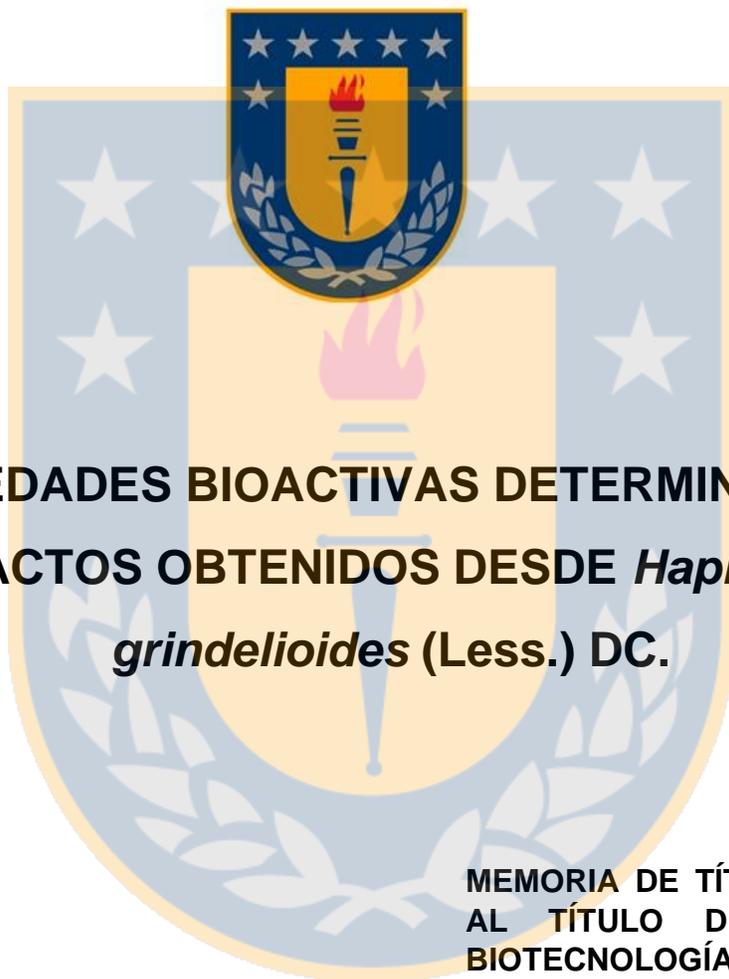


UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL



**PROPIEDADES BIOACTIVAS DETERMINADAS EN
EXTRACTOS OBTENIDOS DESDE *Haplopappus
grindelioides* (Less.) DC.**

**MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

**POLETTE ALEJANDRA ACEVEDO TARI
LOS ÁNGELES - CHILE**

2022

**PROPIEDADES BIOACTIVAS DETERMINADAS EN EXTRACTOS OBTENIDOS DESDE
Haplopappus grindelioides (Less.) DC.**

Alumna

*Polette Alejandra Acevedo Tari
Ingeniero en Biotecnología Vegetal*

Profesor Guía

*Dr. Carlos Schneider Barrera
Profesor Asociado
Químico Farmacéutico*

Jefe de Carrera

*Ing. Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de Ejecución Forestal*

Directora Departamento

*Dra. Marely Cuba Díaz
Profesora Titular
Bióloga*



Agradecimientos

Quiero agradecer con todo mi corazón a mi madre, Oriana, por todo su amor, paciencia y apoyo que me ha entregado a lo largo de este proceso.

A mi alma gemela, Katherine, por ser la mas bonita coincidencia en esta carrera.

A mis amigos, los de siempre, por su apoyo a soportar la vida y ser mi lugar seguro.

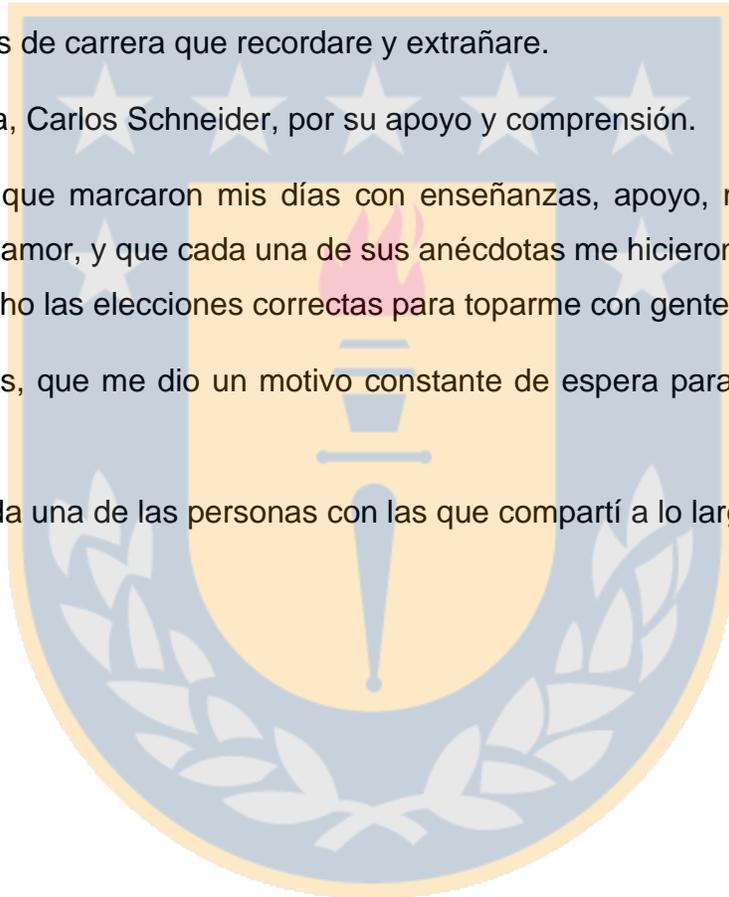
A mis compañeros de carrera que recordare y extrañare.

A mi profesor guía, Carlos Schneider, por su apoyo y comprensión.

A los profesores que marcaron mis días con enseñanzas, apoyo, motivación, consejos, chistes, paseos y amor, y que cada una de sus anécdotas me hicieron sentirme demasiado feliz de haber hecho las elecciones correctas para toparme con gente tan maravillosa.

A Patrick Rothfuss, que me dio un motivo constante de espera para continuar, y a quien gane en escribir.

Y por último a cada una de las personas con las que compartí a lo largo de estos años.



En memoria de Lechuga.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Hipótesis	4
Hipótesis 1	4
Hipótesis 2	4
3. Objetivos	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos específicos	4
4. Marco Teórico	5
4.1 Descripción del género <i>Haplopappus</i> y la especie <i>Haplopappus grindelioides</i> (Less.) DC	5
4.2 Actividad antioxidante	6
4.3 Determinación de actividad antioxidante	7
4.4 Metabolitos secundarios	9
4.5. Polifenoles	10
4.5.1 Ácidos fenólicos	10
4.5.2 Flavonoides	11
4.5.3 Lignanos	11
4.5.4 Estilbenos	11
4.5.5 Taninos	12

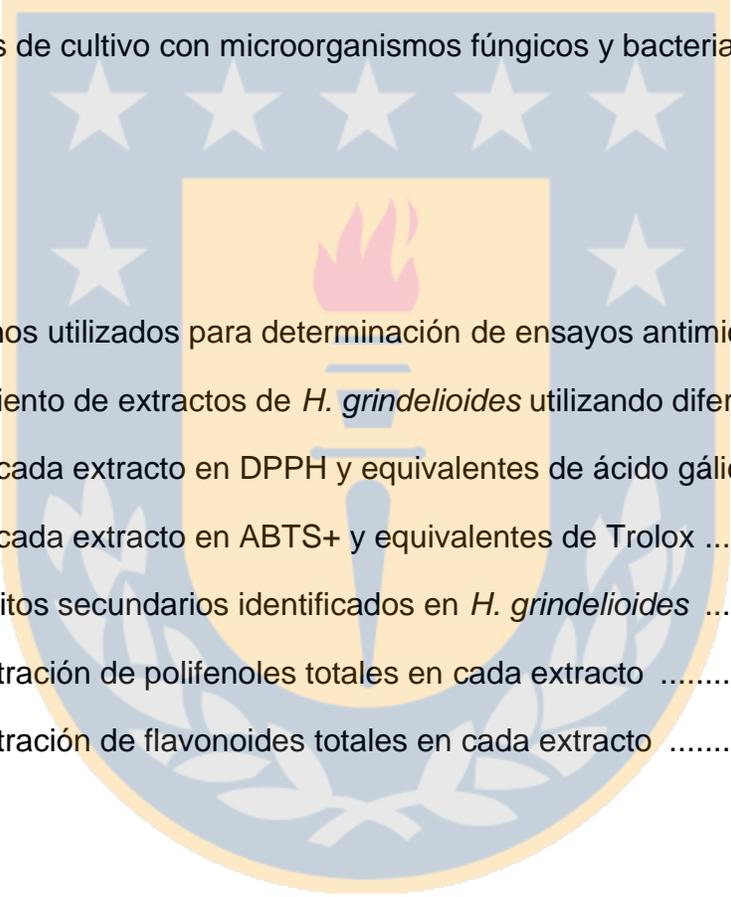
4.6. Actividad antimicrobiana	12
5. Materiales y métodos	13
5.1 Material vegetal.....	13
5.2 Extracción acuosa y metanólica.....	13
5.3 Actividad antioxidante	14
5.3.1 Determinación de actividad antioxidante utilizando el radical libre DPPH	14
5.3.2 Equivalentes de Ácido gálico según ensayo de DPPH.....	14
5.3.3 Efecto durante el tiempo medido con DPPH	15
5.3.4 Determinación de actividad antioxidante utilizando ABTS+.....	15
5.3.5 Equivalentes de Trolox según ensayo de ABTS+	15
5.3.6 Efecto durante el tiempo medido con ABTS+	16
5.4 Análisis fitoquímico	16
5.4.1 Saponinas	16
5.4.2 Taninos.....	17
5.4.3 Antraquinonas	17
5.4.4 Flavonoides	17
5.4.5 Alcaloides	17
5.4.6 Triterpenos	17
5.5 Determinación de contenido total de Fenoles	18
5.6 Determinación cuantitativa de Flavonoides totales	18
5.7 Determinación de actividad antimicrobiana.....	19
5.8 Análisis estadístico.....	19
6. Resultados.....	20
6.1 Rendimiento de los extractos	20
6.2 Actividad antioxidante	20
6.3 Cinética del porcentaje de inhibición de los radicales ABTS+ y DPPH.....	23

6.4 Análisis fitoquímico	24
6.5 Contenido de polifenoles totales	25
6.6 Determinación de flavonoides totales	25
6.7 Actividad antimicrobiana	26
7. Discusión	27
8. Conclusiones	31
Bibliografía.....	32
Anexos	43



ÍNDICE DE FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

Contenido	Página
Figura 1. Curvas de porcentaje para inhibición de DPPH para cada extracto	21
Figura 2. Curvas de porcentaje para inhibición de ABTS+ para cada extracto acuoso	22
Figura 3. Curvas de porcentaje para inhibición de ABTS+ para cada extracto metanólico	22
Figura 4. Curvas promedio de cinética del porcentaje de inhibición en DPPH para cada extracto	23
Figura 5. Curvas promedio de cinética del porcentaje de inhibición en ABTS+ para cada extracto	24

Imagen 1. <i>H. grindelioides</i> . Nevados de Chillán. Región de Ñuble	6
Imagen 2. Mecanismos de eliminación de DPPH por un antioxidante (Munteanu y Apetrei 2021)	8
Imagen 3. Reacción química del ABTS+ con un compuesto antioxidante (Hernández-Rodríguez et al. 2019)	9
Imagen 4. Determinación de algunos metabolitos en <i>H. grindelioides</i>	24
Imagen 5. Placas de cultivo con microorganismos fúngicos y bacterianos	26
	
Tabla 1. Patógenos utilizados para determinación de ensayos antimicrobianos	19
Tabla 2. Rendimiento de extractos de <i>H. grindelioides</i> utilizando diferentes solventes ...	20
Tabla 3. IC ₅₀ de cada extracto en DPPH y equivalentes de ácido gálico	21
Tabla 4. IC ₅₀ de cada extracto en ABTS+ y equivalentes de Trolox	23
Tabla 5. Metabolitos secundarios identificados en <i>H. grindelioides</i>	25
Tabla 6. Concentración de polifenoles totales en cada extracto	25
Tabla 7. Concentración de flavonoides totales en cada extracto	26

Lista de abreviaturas

H. grindelioides: *Haplopappus grindelioides*

mg: Miligramos

ml: Mililitros

μl: Microlitros

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

GAE: Equivalentes de ácido gálico

IC₅₀: Concentración inhibitoria media (50%)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

K₂S₂O₈: Persulfato de potasio

Folin-C: Folin-Ciocalteu

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

NaNO₂: Nitrito de sodio

AlCl₃: Cloruro de aluminio

NaOH: Hidróxido de sodio

HNO₃: Ácido nítrico

NH₄OH: Hidróxido de amonio

NH₃: Amoniac

MetAer: Extracto metanólico parte aérea

MetRa: Extracto metanólico raíz

AcuAer: Extracto acuoso parte aérea

AcuRa: Extracto acuoso raíz

MS: Metabolitos secundarios

FGAE: μg de ácido gálico equivalente en 1 g del extracto para fenoles

FCAT: mg equivalentes de catequina en 1 g del extracto para flavonoides

Resumen

Haplopappus grindelioides (Less.) DC. es una especie nativa de Chile y Argentina, distribuida desde la región Metropolitana hasta a la Araucanía, caracterizada por las condiciones poco favorables a las cuales se enfrenta en su desarrollo, y por no poseer investigación sobre sus propiedades biológicas. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos acuosos y metanólicos obtenidos desde diferentes partes de *H. grindelioides*. El ensayo con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y el radical ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) fueron utilizados para determinar actividad antioxidante. Se determinó la cantidad de Polifenoles Totales mediante el método de Folin-Ciocalteu expresados en equivalentes de Ácido Gálico, y Flavonoides Totales expresados en equivalentes de Catequina, además, se practicó una serie de pruebas fitoquímicas para detectar grupos de metabolitos secundarios importantes. Adicionalmente, se estudió el efecto antimicrobiano de los extractos frente a patógenos fúngicos y bacterianos. Los resultados mostraron una eficiente inhibición de los radicales, obteniendo diferencias significativas entre sus valores de IC₅₀, siendo el valor más bajo para el extracto metanólico de raíz en ambos radicales (0,66 mg/ml en DPPH; 0,32 mg/ml en ABTS+). Las pruebas fitoquímicas de reconocimiento de metabolitos practicados destacan la abundante presencia de dos grupos de metabolitos secundarios en la raíz de *H. grindelioides*, saponinas y taninos. El contenido de Polifenoles y contenido de Flavonoides Totales presentó diferencias significativas entre los extractos. En cuanto a la actividad antimicrobiana, no se observó inhibición en ningún patógeno estudiado. Con los resultados obtenidos, se concluyó que los extractos de diferente polaridad y obtenidos de diferentes partes vegetales de *H. Grindelioides* poseen efecto antioxidante relacionado con su contenido de metabolitos secundarios, aunque no se observó capacidad antimicrobiana en la concentración estudiada. Este es el primer estudio realizado en *H. grindelioides*, comparando propiedades entre raíz y parte aérea.

Abstract

Haplopappus grindelioides (Less.) DC. is a native species from Chile and Argentina, distributed from the Metropolitan region to the Araucanía region, which is characterized by the unfavorable conditions which it faces in its development, and by the lack of research on its biological properties. The objective of this study was to determine the antioxidant and antimicrobial capabilities of aqueous and methanolic extracts obtained from different parts of *H. grindelioides*. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical and ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assays were used to determine antioxidant activity. The amount of Total Polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu method expressed in Gallic Acid equivalents, and Total Flavonoids expressed in Catechin equivalents. In addition, a series of phytochemical tests were performed to detect groups of important secondary metabolites. Additionally, the antimicrobial effect of the extracts against fungal and bacterial pathogens was studied. The results showed an efficient inhibition of the radicals, obtaining significant differences between their IC₅₀ values, being the lowest value for the methanolic root extract in both radicals (0.66 mg/ml in DPPH; 0.32 mg/ml in ABTS+). The phytochemical metabolite recognition tests performed highlighted the abundant presence of two groups of secondary metabolites in the root of *H. grindelioides*, saponins and tannins. The content of polyphenols and total flavonoids showed significant differences between extracts. As for the antimicrobial activity, no inhibition was observed in any of the pathogens studied. With the results obtained, it was concluded that the extracts of different polarity and obtained from different plant parts of *H. Grindelioides* have an antioxidant effect related to its content of secondary metabolites, but no antimicrobial capacity was observed in the studied concentration. This is the first study performed on *H. grindelioides* comparing properties between root and aerial parts.

1. Introducción

Los estudios etnobotánicos, a lo largo de los años, han permitido asociar plantas muy diversificadas con actividades biológicas a partir de la observación, descripción e investigación experimental, lo que ha contribuido en gran medida al descubrimiento de productos naturales con acción biológica, convirtiendo a las plantas en la primera fuente de sustancias para el desarrollo de nuevos fármacos, y una parte considerable de los medicamentos que se recetan en el mundo, actualmente proceden de ellas (Nunes et al. 2020).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas durante el metabolismo aeróbico, son mediadores esenciales de importantes funciones, al ser especies pequeñas con electrones no apareados, altamente reactivas y perjudiciales para ciertas macromoléculas (di Meo y Venditti 2020). Estudios han demostrado que los daños oxidativos generados por la excesiva producción de ROS se ven implicados en una serie de trastornos, tales como Alzheimer, aterosclerosis, diabetes, inflamación y enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Qasim et al. 2017).

La investigación en torno a los antioxidantes ha crecido de forma exponencial, y el uso de antioxidantes naturales provenientes de plantas ha tenido un aumento en los últimos años, debido a la búsqueda de reemplazo de antioxidantes sintéticos a causa del constante debate sobre su seguridad (Villanueva y Kross 2012).

El género *Haplopappus*, perteneciente a la familia *Asteraceae* (Rodríguez et al. 2008), se encuentra ampliamente distribuido en Chile, presentando diversas especies con propiedades benéficas ampliamente conocidas y estudiadas, tales como digestivas, antiespasmódicas y antisépticas (Padilla et al. 2021). *Haplopappus grindelioides* (Less.) DC. es un subarbusto nativo y que, a diferencia de otras especies del género, no ha sido estudiada ni se describen propiedades en la literatura.

En este trabajo se pretende determinar propiedades que puedan tener extractos de diferente polaridad de *H. grindelioides*, tales como capacidad antioxidante y efecto antimicrobiano, efectuando además, una comparación entre las diferentes partes vegetales usualmente utilizadas en medicina tradicional.

2. Hipótesis

Hipótesis 1.

La especie *H. grindelioides* presenta efecto antioxidante, relacionado con el contenido de fenoles, siendo este mayor en la parte aérea en comparación con la raíz.

Hipótesis 2.

La especie *H. grindelioides* posee efecto antimicrobiano relacionado con su contenido de metabolitos secundarios, tanto en la parte aérea como en la raíz.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos acuosos y metanólicos obtenidos desde diferentes partes de *H. grindelioides*.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Evaluar actividad antioxidante mediante las técnicas del radical libre DPPH y radical catiónico ABTS+ a partir de los extractos de diferente polaridad.
- 3.2.2 Identificar cualitativamente diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en *H. grindelioides*.
- 3.2.3 Valorar la capacidad antimicrobiana de los extractos frente a patógenos bacterianos y fúngicos de origen aislado.

4. Marco Teórico

4.1 Descripción del género *Haplopappus* y la especie *Haplopappus grindelioides* (Less.) DC.

El género *Haplopappus* en Chile está compuesto por 56 especies nativas (Urzua et al. 2012) comercializadas todas comúnmente como "bailahuen", siendo la especie oficial *Haplopappus baylahuen* J. Remy, donde otras especies del género también se utilizan en diferentes regiones bajo el mismo nombre vernáculo oficial (Faini et al. 2011). El género se caracteriza por poseer subarbustos y arbustos rizomatosos con forma de cojín resinoso. Las hojas tienen una textura coriácea y una superficie brillante, profundamente aserradas a pinnatisectas, presentando flores amarillas liguladas agrupadas en capítulos solitarios (Tortosa y Bartoli 2002). Las especies del género suelen encontrarse en suelo de texturas ligeras, en general, en lugares rocosos, con una baja concentración de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio, crecen en terrenos despejados, con alta radiación y en condiciones de alto estrés como la sequía, baja fertilidad del suelo y pastoreo, condiciones que limitan la regeneración natural (Pastene 2021).

H. baylahuen es conocida por sus propiedades digestivas, antiespasmódicas y antisépticas (Morales et al. 2009), y es una de las especies vegetales más utilizadas en fitoterapia como medicinalmente en Chile (Pastene 2021), esto se ha utilizado como base para realizar diversas investigaciones que indican las propiedades de más especies dentro del género, entre ellas, *H. taeda*, *H. multifolius* y *H. remyanus* (Vogel et al. 2005; Torres et al. 2006a; Morales et al. 2009), presentando propiedades tales como efecto cicatrizante, antiséptico general para tratar infecciones gastrointestinales y del tracto urinario, tratar dolencias estomacales, hepáticas y renales, además de su uso como antifúngico y bactericida (Vogel et al. 2005; Urzua et al. 2012; Elgueta et al. 2021a; Padilla et al. 2021).

Haplopappus grindelioides (Less.) DC. (Imagen 1) es un subarbusto siempreverde perenne nativo de Chile y Argentina, perteneciente de la familia Asteraceae (Rodríguez et al. 2008), conocida comúnmente como acerosa, hierba del chivato o cuernicabra, presenta una distribución desde la región Metropolitana hasta a la Araucanía, creciendo en sitios abiertos y suelos pedregosos, de preferencia asoleados, de la precordillera andina, entre los 600 – 2.500 m de altitud (Rodríguez et al. 2018). Se caracteriza por medir hasta 50 cm de altura, presentando hojas coriáceas, obovadas, de hasta 5 cm de longitud de característico borde

aserrado y ondulado. Presenta flores en cabezuelas sobre pedúnculos, flores marginales liguladas y centrales tubulares amarillas, que florecen entre primavera y verano, por lo que su uso se remonta a cubre suelo floral o en macetas (Riedemann et al. 2014). Hasta el momento no se conocen estudios relacionados con esta especie, ni se han descrito propiedades.



Imagen 1. *H. grindelioides*. Nevados de Chillán. Región de Ñuble.

4.2 Actividad antioxidante

Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que estando a una concentración baja, comparada con las de un sustrato oxidable, retrasa o impide significativamente la oxidación de ese sustrato (Henriksen 2019).

Los antioxidantes son los principales eliminadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las ROS y las RNS son generadoras de estrés oxidativo y productos del metabolismo celular normal, estableciendo además, que las ROS y las RNS juegan un doble papel como especies beneficiosas y perjudiciales en función de su concentración (Ifeanyi 2018). Si los radicales libres superan la capacidad del organismo para controlarlos, aparece un caso conocido como estrés oxidativo, a consecuencia del cual se propagan en el organismo una serie de enfermedades humanas (Di Meo y Venditti 2020), tales como cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus, hipertensión, entre otras (Fu et al. 2011). El equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes es un aspecto importante para el funcionamiento fisiológico adecuado, pudiendo estos contribuir a afrontar el estrés oxidativo (Oldoni et al. 2016).

Las plantas poseen una variedad de metabolitos secundarios (MS) asociados a una amplia gama de propiedades biológicas y farmacológicas que se traduce en beneficios para la salud, donde mayoritariamente los efectos terapéuticos están asociados a sus potenciales efectos antioxidantes (Pozo-Martínez et al. 2022). Los compuestos fenólicos son los que más contribuyen a la capacidad antioxidante de estas plantas, de manera interesante, la síntesis y acumulación de polifenoles y otros metabolitos antioxidantes aumentan cuando la planta sufre estrés biótico/abiótico, por lo tanto, es importante caracterizar las plantas sometidas a diversos tipos de estrés en la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes (Qasim et al. 2017).

Las propiedades antioxidantes en el género *Haplopappus* se han estudiado apuntando a su contenido de fenoles, Voguel et al. (2005) estudiaron la actividad antioxidante en cuatro especies de *Haplopappus*, descubriendo que si bien difieren en sus respectivos compuestos principales, las especies de *H. remyanus*, *H. multifolius* y *H. taeda* presentan mayor actividad antioxidante que *H. baylahuen*, destacando además, presencia de flavonoides y cumarinas que pueden estar relacionadas con propiedades tales como antibacterianas (Padilla et al. 2021).

4.3 Determinación de actividad antioxidante

Debido al amplio interés en la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes, se pueden encontrar diversas metodologías para medir la eficacia de amplias sustancias químicas. Una de las más usadas es el secuestro de radicales de oxígeno, método popular debido a su factibilidad, facilidad y velocidad. Los métodos más usados con este fin son los radicales ABTS+ y DPPH (Ali et al. 2008).

El radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es característico por su intenso color violáceo, usado por su facilidad y notable estabilidad. Es susceptible a reaccionar frente a compuestos antioxidantes, por lo que la prueba de neutralización se basa en la donación de electrones del sustrato antioxidante para neutralizar el radical, acompañando la reacción de un cambio del color del compuesto (Munteanu y Apetrei 2021) (Imagen 2). El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente a 517 nm y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Deng et al. 2011). Los resultados de este ensayo son presentados como el valor IC₅₀, definido como la cantidad

de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%. Este valor se calcula trazando el porcentaje de inhibición frente a la concentración del extracto (Ani et al. 2006).

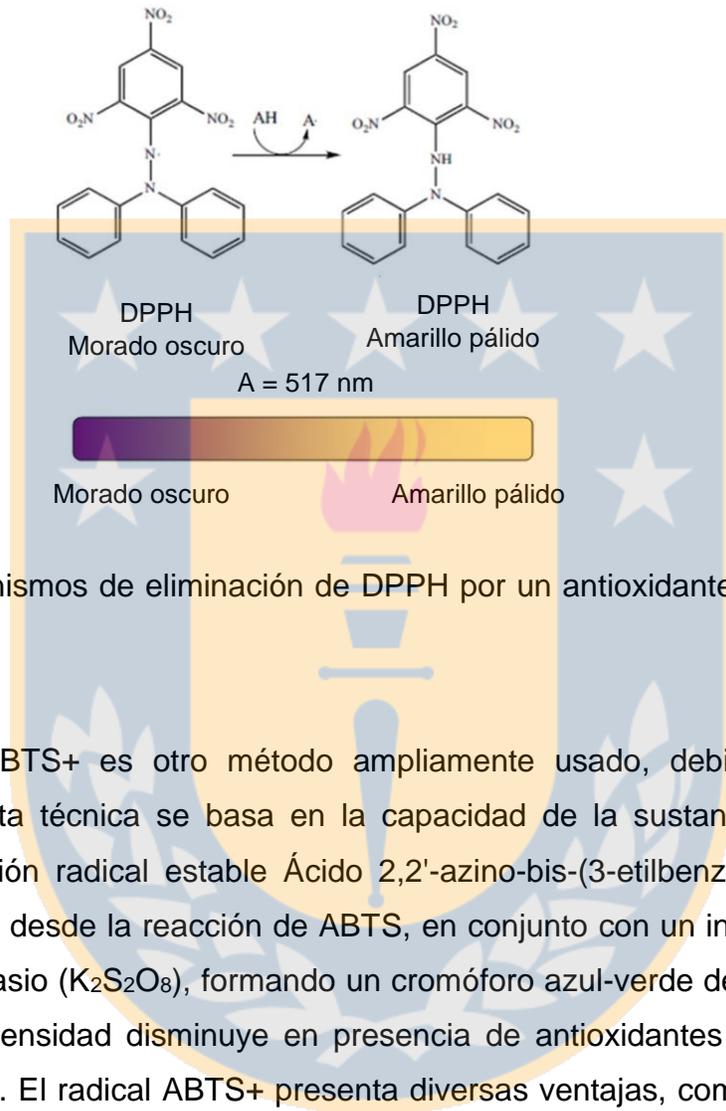


Imagen 2. Mecanismos de eliminación de DPPH por un antioxidante (Munteanu y Apetrei 2021).

La prueba de ABTS⁺ es otro método ampliamente usado, debido a su simpleza y conveniencia. Esta técnica se basa en la capacidad de la sustancia antioxidante para neutralizar el catión radical estable Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) generado desde la reacción de ABTS, en conjunto con un iniciador, como lo es el persulfato de potasio (K₂S₂O₈), formando un cromóforo azul-verde de máxima absorción a 734 nm, cuya intensidad disminuye en presencia de antioxidantes (Munteanu y Apetrei 2021) (Imagen 3). El radical ABTS⁺ presenta diversas ventajas, como lo es su capacidad de ser soluble en agua y en disolventes orgánicos, lo que permite determinar la capacidad antioxidante de compuestos, tanto hidrofílicos como lipofílicos, reaccionando rápidamente con antioxidantes tanto sintéticos como naturales, como lo son fenoles, aminoácidos, péptidos, vitamina E y vitamina C (Ilyasov et al. 2018).

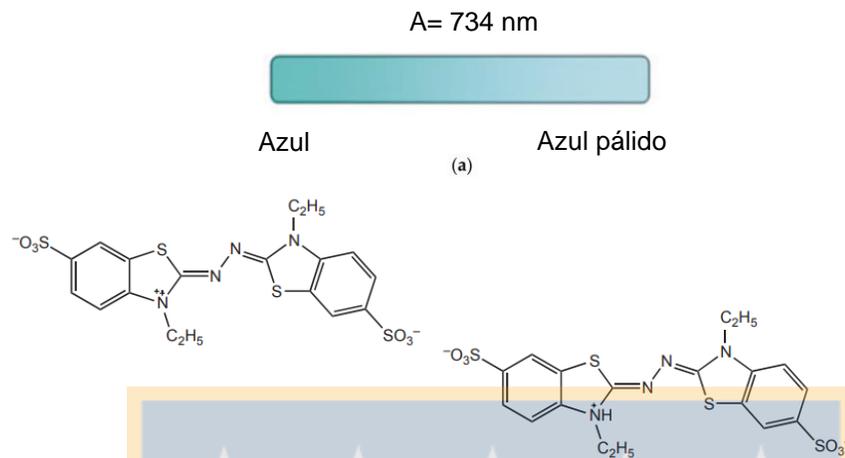


Imagen 3. Reacción química del ABTS⁺ con un compuesto antioxidante (Hernández-Rodríguez et al. 2019).

4.4 Metabolitos secundarios

Como defensa frente a los ataques de patógenos y para adaptarse al estrés medioambiental, las plantas han desarrollado sofisticados procesos para mejorar su supervivencia, como la producción de sustancias químicas dotadas de actividad biológica (Nunes et al. 2020). Estas pequeñas moléculas orgánicas provienen del metabolismo secundario y sirven para diversos propósitos, como lo son las respuestas de defensa contra herbívoros y patógenos, en la protección contra la luz ultravioleta, entre otras (Shitan 2016). Muchos MS además, tienen actividades biológicas útiles para el ser humano, lo que los vuelve la principal fuente de fármacos, intensificando el interés de las industrias en la búsqueda de sustancias obtenidas a partir de fuentes vegetales, sobre todo, debido a la abundante cantidad de especies que no han sido estudiadas química o biológicamente (Nunes et al. 2020).

Los metabolitos son clasificados en dos grupos de acuerdo con su composición química: nitrogenados y no nitrogenados. Entre los nitrogenados se encuentran alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Waterman y Mole 2019).

La producción de MS está influenciada por diversas tensiones ambientales, provocando variabilidad que difiere incluso entre especies, género u órganos de un individuo, provocada por las modificaciones químicas dentro de las estructuras básicas, lo que es parte de la estrategia de adaptación y supervivencia de las plantas (Li et al. 2020).

4.5. Polifenoles

Los polifenoles son moléculas, consideradas como MS, ampliamente distribuidas en diversas plantas (Valencia et al. 2017). El nivel de polifenoles varía de acuerdo con diversos factores tales como genotipo, especie, composición del suelo e incluso condiciones de almacenamiento (Haminiuk et al. 2012). Este tipo de MS cumplen una función protectora dentro de la planta, participando en actividades como la asimilación de nutrientes, formación de componentes estructurales y defensa de factores adversos, entre otros (Cacique et al. 2021). Los fenoles son los antioxidantes más abundantes entre las plantas, y además, se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y anticancerígenas (Phuyal et al. 2020).

Los polifenoles disminuyen los niveles de ROS y RNS mediante un mecanismo donde atrapan y disipan los electrones libres de los radicales a través de la donación de un átomo de hidrógeno, generándose como consecuencia la formación de un radical fenoxilo menos dañino para las células (Maleki et al. 2019). La mayoría de estos compuestos presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o más anillos aromáticos, además de poseer al menos un grupo hidroxilo enlazado, variando su estructura ampliamente, desde el punto de vista del número de anillos fenólicos en su composición, los polifenoles se han clasificado en las siguientes categorías distintas: ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos, flavonoides y taninos (Alara et al. 2021).

4.5.1 Ácidos fenólicos

Los compuestos fenólicos de las plantas tienen una estructura molecular diversa y se caracterizan por tener anillos aromáticos hidroxilados (Rashmi y Negi 2020). En muchas plantas los compuestos fenólicos se polimerizan en moléculas más grandes, como las proantocianidinas y las ligninas, además, los ácidos fenólicos pueden aparecer en las plantas alimenticias como glucósidos o ésteres, con otros compuestos naturales como

esteroles, alcoholes, glucósidos y ácidos grasos hidroxilados (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh 2011).

4.5.2 Flavonoides

Los flavonoides se sintetizan por la vía polipropanoide y el componente inicial es la molécula de fenilalanina, comparten el esqueleto estructural básico formado por dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno. Se han clasificado en seis: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianinas. Otros grupos comunes de flavonoides son las auronas, xantonas y taninos condensados (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh 2011). En las plantas los flavonoides desempeñan importantes funciones como protectores contra la radiación ultravioleta B (UV-B), como pigmentos de atracción para polinizadores como fitoalexinas, entre otras funciones (Yonekura-Sakakibara et al. 2019).

4.5.3 Lignanos

Los lignanos son un amplio grupo de compuestos naturales derivados de la vía biosintética del ácido shikímico, estructuralmente contienen un andamiaje básico de dos o más unidades fenilpropanoides, y los monómeros que forman los lignanos son el ácido cinámico, el alcohol cinámico, el propenilbenceno y el alilbenceno (Cui et al. 2020). La actividad biológica de los lignanos incluye actividad antioxidante, antitumoral, antimetabólica y antiviral (Teponno et al. 2016).

4.5.4 Estilbenos

Los estilbenos son una clase pequeña, pero importante de polifenoles no flavonoides, que comparten una estructura común caracterizada por un esqueleto de 14 carbonos compuestos por dos anillos bencénicos unidos por un puente de etileno (Valletta et al. 2021) Estos compuestos actúan como fitoalexinas, desempeñando un papel crucial en la defensa de las plantas contra los fitopatógenos, además de estar implicados en la adaptación de las plantas a los factores ambientales abióticos (Biais et al. 2017). Dado su valor nutracéutico, el contenido y la composición de estilbenos se han investigado principalmente en plantas

alimenticias, y el conocimiento de la distribución de estilbenos en la naturaleza es todavía escaso (Valletta et al. 2021).

4.5.5 Taninos

Los taninos se encuentran en la mayoría de las especies del reino vegetal y su función es proteger a la planta de la depredación y ayudar a regular su crecimiento, como productos naturales de las plantas, actúan como barrera natural contra insectos, patógenos y animales, debido a su capacidad para reaccionar con las proteínas y a sus propiedades antioxidantes (Watrelet y Norton 2020).

En términos generales, los taninos se clasifican en dos grupos principales, taninos condensados y taninos hidrolizables (Sharma 2019). Entre los diferentes tipos de taninos, los taninos hidrolizables tienen fuentes limitadas en la naturaleza en comparación con los taninos condensados. Dependiendo de su estructura química, pueden encontrarse en fuentes botánicas y/o partes de plantas específicas. Los taninos hidrolizables suelen encontrarse en la madera o los tallos, mientras que los taninos condensados se encuentran sobre todo en frutas y hojas (Farha et al. 2020).

4.6. Actividad antimicrobiana

Existe una urgente necesidad de descubrir nuevos compuestos o extractos antimicrobianos para abordar el creciente problema de resistencia microbiana contra los antibióticos actuales, donde la diversidad de las plantas se convierte en un valioso recurso. Aunque los compuestos vegetales se utilizan como base de varios fármacos de uso humano, todavía no se ha descubierto ningún antibiótico de éxito comercial a partir de plantas (Eloff 2019).

Se han realizado diversos estudios en plantas nativas pertenecientes al género *Haplopappus* sobre diferentes tipos de microorganismos para analizar su potencial antimicrobiano. Padilla et al. (2021) descubrieron que ciertos productos naturales obtenidos a partir de extractos etanólicos, infusiones y sub-extractos de *H. multifolius* y *H. taeda* tienen capacidad antibacteriana sobre diferentes especies de bacterias patógenas Gram-positivas, esto debido a compuestos bioactivos como la esculetina, por otro lado, Urzua et al. (2012) analizaron exudados resinosos de *H. litoralis*, *H. chrysantemifolius* y *H. scrobiculatus*,

encontrando potencial antimicrobiano de igual forma contra bacterias Gram-positivas, esta vez, asociada a los flavonoles presentes en los exudados.

5. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

Las muestras de *H. grindelioides* fueron recolectadas en época otoñal, con fecha 20 de marzo de 2022, desde la zona de Nevados de Chillán y sus alrededores, ubicados en la provincia de Diguillín, Comuna de Chillán, región de Ñuble (coordenadas 36°51'48"S 71°22'36"O). El material fue llevado en bolsas cerradas hasta el Laboratorio de Extractos Vegetales, Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Al llegar se procedió a lavar las muestras con abundante agua y se dejó secar por una semana a temperatura ambiente en mesón, para posteriormente cortarlas, separando parte aérea y raíz.

5.2 Extracción acuosa y metanólica

Se realizaron extracciones desde la parte aérea y desde la raíz de forma separada en dos diferentes solventes: agua destilada y metanol (Equilab, grado técnico). La muestra fue pesada en una balanza analítica (Mettler toledo, Ab204-5), y posteriormente se depositó un peso conocido en dedales de celulosa para llevar a cabo el proceso de extracción en un equipo Soxhlet (Glassco, 304918) a una temperatura de extracción 70 ± 5 °C. La extracción del equipo se mantuvo alrededor de 8 horas hasta que el solvente no presentara color en el sifón del equipo extractor.

Una vez completada la extracción, el solvente se extrajo desde el balón utilizando un rotavapor (Heidolph, Laborata 4001 efficiennt) a 65 ± 5 °C, con una rotación de 30-90 rpm. El extracto obtenido se depositó en placa Petri y se secó en estufa (Memmert, UFB 500) a 35°C hasta obtener un peso constante, para posteriormente almacenarlo en refrigerador a 2 - 8°C para su análisis. Del extracto obtenido se determinó el rendimiento promedio de extracción según la fórmula 1:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{PE (g)}{PMV(g)} * 100$$

Fórmula 1. PE = Peso del extracto. PMV = Peso del material vegetal

5.3 Actividad antioxidante

5.3.1 Determinación de actividad antioxidante utilizando el radical libre DPPH

La actividad antioxidante *in vitro* de los extractos se determinó utilizando el ensayo de eliminación de radicales libres DPPH descrito por Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones (Gaviria et al. 2009). Se preparó una solución stock del radical DPPH (Merck) a una concentración de 36 µg/ml, utilizando como solvente metanol, para luego ajustar a una absorbancia entre 0,8 – 0,9, medida a una longitud de onda de 517 nm en espectrofotómetro (Termo Scientific Genesis 10UV). Simultáneamente, se preparó una solución madre de cada extracto de 5 mg/ml, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 mg/ml, para los extractos acuosos y metanólicos. De cada disolución se tomaron alícuotas de 175 µl y se mezclaron con 2 ml de solución de DPPH, se incubó en agitación constante durante 1 minuto y se leyó su absorbancia a 517 nm utilizando una muestra control de 175 µl de metanol y 2 ml de solución de DPPH. La concentración inhibitoria del 50% del radical (valor IC₅₀) se calculó a partir del gráfico de concentración frente a porcentaje de inhibición del radical DPPH calculado bajo la ecuación de la fórmula 2 (Zhou et al. 2019):

$$\% \text{ de inhición} = \frac{(AB - AE)}{AB} * 100$$

Fórmula 2. AB = Absorbancia del control. AE = Absorbancia de la muestra

5.3.2 Equivalentes de Ácido gálico según ensayo de DPPH

Se determinó la equivalencia en ácido gálico para la reducción del radical DPPH obtenida desde el ensayo de actividad antioxidante. Para obtener esta equivalencia, se mezcló 2 ml de radical DPPH con 175 µl de cada extracto, en concentración IC₅₀ que fue leído a 517 nm transcurrido 1 minuto de agitación constante.

El resultado fue comparado con una curva de calibración de ácido gálico con la finalidad de comparar y expresar la capacidad antioxidante de los extractos. Fue preparada una solución stock de ácido gálico en concentración 0,5 mg/ml en un matraz de 100 ml, desde la cual se realizaron diluciones en concentraciones 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 mg/ml. Se utilizó el reactivo DPPH previamente preparado, ajustado a un rango de absorbancia entre 0,8 – 0,9

a 517 nm. Se tomaron 2 ml de DPPH + 175 μ l de cada una de las diluciones de ácido gálico, se incubó durante un minuto y se leyó en el espectrofotómetro. Una vez realizada la curva de calibración, los valores obtenidos de los extractos se interpolaron en la misma. Los resultados se expresaron como GAE (equivalentes de ácido gálico en mg contenidos en 1 g de extracto).

5.3.3 Efecto durante el tiempo medido con DPPH

El ensayo de cinética fue llevado a cabo para evaluar el comportamiento de los extractos durante el tiempo. Para esto se mezclaron 175 μ l de cada extracto en concentración IC₅₀ con 2 ml de DPPH y se midió su absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro en intervalos de 5 minutos durante 150 minutos. Para calcular el porcentaje de inhibición se empleó la fórmula 2. Como control negativo fueron utilizados 2 ml de DPPH + 175 μ l de metanol.

5.3.4 Determinación de actividad antioxidante utilizando ABTS+

Se empleó la metodología según Zhou et al. (2019) con modificaciones. Se utilizó el radical ABTS+ obtenido mediante la reacción de 180 mg de ABTS (Merck) con 33,11 mg de K₂S₂O₈ en un matraz de 50 ml, aforando con agua o metanol según con el tipo de extracto, dejando incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 16 h. La solución madre de ABTS+ se diluyó para obtener la concentración de trabajo a una absorción de 0,7 (\pm 0,02) a 734 nm. Desde una solución madre de cada extracto de 5 mg/ml se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 0,05; 0,2; 0,35; 0,5; 0,65; 0,8; 0,95; 1,1; 1,25 y 1,4 mg/ml para los extractos acuosos, y concentraciones de 0,05; 0,12; 0,19; 0,26; 0,33; 0,4; 0,47; 0,54; 0,61 y 0,68 mg/ml para los extractos metanólicos. Se agregó 2 ml de radical a 175 μ l de extracto, se incubó en agitación constante durante 1 minuto y se midió su absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro (Termo Scientific Genesis 10UV), utilizando una muestra control de 175 μ l del solvente del extracto y 2 ml de solución de ABTS+. Para calcular % de inhibición se utilizó la fórmula 2.

5.3.5 Equivalentes de Trolox según ensayo de ABTS+

Los resultados obtenidos de IC₅₀ del ensayo ABTS+ se compararon con una curva de Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carbóxico) y se expresaron como TEAC

(equivalentes de Trolox en mg contenidos en 1g de extracto). Para esto se midió la absorbancia de los extractos en concentración IC_{50} , mezclando 175 μ l de cada extracto junto con 2 ml de ABTS+ para leer su absorbancia a 734 nm. Se preparó una solución stock de Trolox en concentración 0,5 mg/ml desde la cual se realizaron diluciones en concentraciones 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045; 0,050 y 0,055 mg/ml. Se ajustó el reactivo ABTS+ de igual manera que el ensayo anterior, fueron mezclados 2 ml de ABTS+ con 175 μ l de cada dilución de Trolox, dejando incubar durante un minuto para leer su absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro (Termo Scientific Genesis 10UV). Una vez obtenida la curva de calibración, los valores obtenidos de los extractos se interpolaron en la misma.

5.3.6 Efecto durante el tiempo medido con ABTS+

Se evaluó el efecto antioxidante del extracto a través del tiempo, para el ensayo se mezclaron 175 μ l de cada extracto en concentración IC_{50} con 2 ml de ABTS+ y se midió su absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro en intervalos de 5 minutos durante 150 minutos. Para calcular el porcentaje de inhibición se empleó la fórmula 2. Como control negativo se utilizaron 2 ml de ABTS+ con 175 μ l de agua destilada o metanol puro de acuerdo con el solvente del extracto.

5.4 Análisis fitoquímico

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar para determinar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en parte aérea y raíz de *H. grindelioides* analizados desde el material vegetal (MV) directamente.

5.4.1 Saponinas

Para detectar saponinas se utilizó la prueba de espuma. Se sometió a agitación vigorosa durante 30 segundos una solución acuosa de MV. La presencia de las saponinas es indicada por la formación de una espuma persistente durante 3 minutos (García et al. 2003). Se utilizó un control positivo con hojas y corteza de *Quillaja saponaria* Molina.

5.4.2 Taninos

Fue ocupada la reacción con FeCl_3 . Se agregaron dos a tres gotas de solución de FeCl_3 al 5% a soluciones acuosas del MV. La transición colorimétrica a un color verde-negroso indica la presencia de taninos (Bulugahapitiya 2013). Las soluciones fueron comparadas con un control positivo de una variedad comercial de *Camelia Sinensis* (L.) Kuntze, variedad té negro.

5.4.3 Antraquinonas

Se llevó a cabo la reacción de Borntraeger. Las muestras de MV fueron sometidas en tubos de ensayo a 10 ml de NH_3 Al 10% a baño maría, para posteriormente filtrar y tratar con 5 ml de NaOH 1M, agitando vigorosamente. El color rojo cereza o rosado indica resultado positivo (Shaikh y Patil 2020). Simultáneamente se realizó la prueba con *Aloe spp.* como control positivo.

5.4.4 Flavonoides

Mediante prueba alcalina las muestras de MV se trataron con 1 ml de solución de NaOH al 40%, provocando una fuerte coloración amarilla. Al agregar 1 ml de HCl al 10% debe ocurrir una decoloración ante presencia de flavonoides (Bulugahapitiya 2013). Se comparó la reacción con una variedad comercial de *C. sinensis*, variedad té verde.

5.4.5 Alcaloides

Para la determinación de alcaloides se agregó NH_3 y CHCl_3 a tubos de ensayo con MV, se filtró y decantó la fase orgánica en un vidrio reloj para evaporar solvente. El residuo fue tratado con 3 gotas de HCL al 1% y 5 gotas de Lugol. La presencia de alcaloides se determina por la aparición de un precipitado oscuro (García et al. 2003). El control positivo se llevó con una variedad comercial de Yerba mate.

5.4.6 Triterpenos

Se llevó a cabo la prueba de Salkowski, cada muestra de MV se disolvió en 10 ml de CHCl_3 , las soluciones se filtraron y se les agregó de dos o tres gotas de H_2SO_4 concentrado para

luego agitar y mantener en reposo. La presencia de triterpenos es positiva por el viraje de la solución a amarillo (Shaikh y Patil 2020). Simultáneamente se realizó la prueba con *Lavandula angustifolia* Mill como control positivo.

5.5 Determinación de contenido total de Fenoles

La concentración total de compuestos fenólicos fue determinada espectrofotométricamente mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC) según Hudz et al. (2019), con modificaciones.

Se procedió a realizar una curva estándar de ácido gálico (Merck) en concentraciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/ml}$, a cada matraz de 25 ml se agregó 1,25 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (Merck), 5 ml de Na_2CO_3 (20% v/v) y se aforó con agua destilada. Las soluciones fueron agitadas y se dejaron en reposo en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente, se realizó la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Se realizó un control negativo utilizando agua destilada.

Se determinó la concentración de los extractos para interpolar resultados en la curva definida en 0,05 mg/ml, realizando el mismo procedimiento del método colorimétrico de FC. Los resultados obtenidos se expresaron en μg de ácido gálico equivalente en 1 g del extracto (FGAE).

5.6 Determinación cuantitativa de Flavonoides totales

El método utilizado fue el propuesto por Agbo et al. (2015). Se utilizaron los extractos en concentración 0,1 mg/ml en un matraz volumétrico de 10 ml, donde se añadieron 300 μl de NaNO_2 al 5%, se agito y se dejó reposar durante 6 minutos, a continuación, se añadieron 600 μl de solución de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar por 5 minutos para continuar con la adición de 2 ml de NaOH 1.0 M y aforar con de agua destilada. Se leyó la absorbancia a 510 nm con un espectrofotómetro UV/Visible. En paralelo se realizó una curva de calibración de catequina en concentraciones 2,5; 5; 10; 15; 20; y 30 $\mu\text{g/ml}$ preparados de la misma forma que la descrita para los extractos. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de catequina en 1 g del extracto (FCAT).

5.7 Determinación de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos fue determinada frente a diferentes patógenos de origen bacteriano y fúngicos (Tabla 1) facilitados por el Laboratorio de Microbiología y Micología aplicada de la Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Tabla 1. Patógenos utilizados para determinación de ensayos antimicrobianos.

Bacterias	Hongos
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Salmonella spp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Penicillium spp.</i>
<i>Escherichia coli MRSA</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	

Los ensayos se llevaron a cabo usando el método de difusión en agar sólido (Khan et al. 2007). Bajo cámara de flujo se prepararon placas Petri con medios y patógeno de acuerdo con estándares de trabajo del propio laboratorio, utilizando medio papa-dextrosa agar (PDA) para hongos y medio Caseína-peptona (CASO) para bacterias. Se utilizaron medios estériles ya preparados con el patógeno. Bajo cámara de flujo laminar, de cada placa utilizando un sacabocado, se extrajo un disco de agar (5 mm de diámetro) por cada extracto. En cada perforación fueron depositados 20 µl de una solución madre de 10 mg/ml de cada extracto.

Para evaluar el efecto antibacteriano y antimicrobiano se usó como control positivo una concentración con antibióticos específicos para cada bacteria y fungicida comercial. Las placas ya selladas se dejaron cultivar en incubadora durante 24 h a 37 °C para bacterias y 26° C en el caso de hongos, para posteriormente medir halos de inhibición.

5.8 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron en triplicado, incluyendo curvas de calibración. Los resultados se expresaron en relación al control correspondiente (media ± desviación estándar). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %

para los datos experimentales utilizando el programa Statistica v10 (Statsoft). La significación estadística se determinó usando la prueba de Tukey, valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significativas.

6. Resultados

6.1 Rendimiento de los extractos

Se llevó a cabo la determinación del rendimiento en cada extracto de *H. grindelioides* utilizando como solventes agua y metanol por separado, realizando una serie de extracciones consecutivas en equipo Soxhlet (Anexo 15). La tabla 2 presenta el porcentaje de rendimiento obtenido, observándose con mayor eficiencia el extracto acuoso de raíces con un 33,30 % de rendimiento, obteniendo como contraparte al extracto acuoso de la parte aérea con el menor rendimiento (20,91%)

Tabla 2. Rendimiento de extractos de *H. grindelioides* utilizando diferentes solventes.

Extracto	% Rendimiento
MetAer	28,60
MetRa	29,11
AcuAer	20,91
AcuRa	33,30

MetAer: extracto metanólico parte aérea; MetRa: extracto metanólico raíz; AcuAer: extracto acuoso parte aérea; AcuRa: extracto acuoso raíz.

6.2 Actividad antioxidante

Se compararon los cuatro extractos mediante el método de secuestro de radicales libre ABTS+ y DPPH (Anexo 1-8), para ambos se determinó que existe actividad antioxidante, logrando una inhibición eficaz de los radicales, mostrando porcentajes de inhibición superiores al 50% en las máximas concentraciones estudiadas (Figuras 1, 2 y 3). A partir del ensayo realizado con radical DPPH, en donde se evaluaron las concentraciones entre el rango 0,2 a 2 mg/ml en los cuatro extractos, se obtuvo un porcentaje máximo de inhibición de 86,88% en el extracto MetRa, en cambio, la menor inhibición se produjo en el extracto AcuAer con un 64,48%.

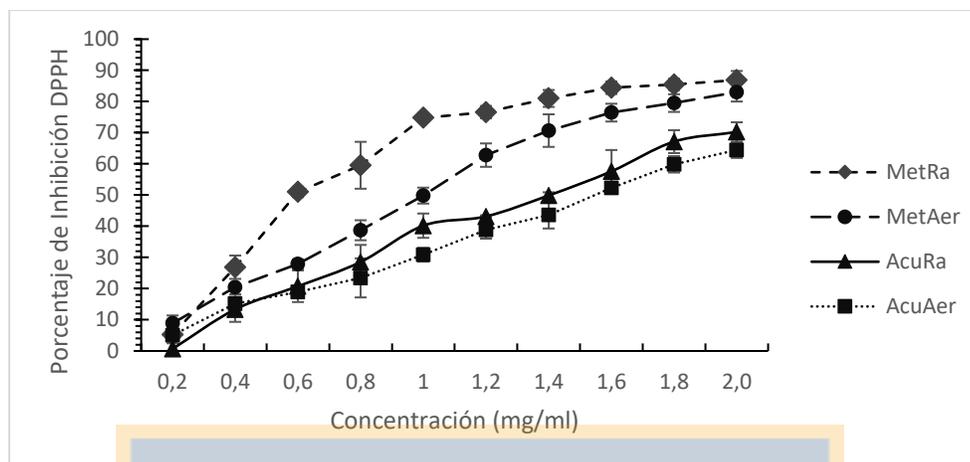


Figura 1. Curvas de porcentaje para inhibición de DPPH para cada extracto.

El cálculo del IC_{50} se realizó a partir de la ecuación de la curva como la concentración requerida para obtener un 50% de disminución. De acuerdo con los análisis estadísticos, los extractos presentan diferencia significativa entre sí en sus valores de IC_{50} (Tabla 3).

Tabla 3. IC_{50} de cada extracto en DPPH y equivalentes de ácido gálico.

Extracto	IC_{50}	GAE	Ecuación de la curva	R^2
MetAer	0,96±0,07 c	16,36±0,31	$y = -12,492x^2 + 70,869x - 6,8976$	0,9921
MetRa	0,66±0,01 d	29,60±1,88	$y = -36,44x^2 + 121,92x - 14,815$	0,9859
AcuAer	1,54±0,05 a	9,39±0,18	$y = 32,824x - 0,8522$	0,9947
AcuRa	1,39±0,03 b	12,15±0,29	$y = 37,059x - 1,8146$	0,9894

*Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar

**Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Se obtuvo un IC_{50} menor en raíces en ambos extractos, siendo más eficiente el extracto MetRa con un valor más bajo (0,66 mg/ml). Los valores fueron expresados como GAE, utilizando los valores IC_{50} para cada extracto (Anexo 9), donde se determinó que para el extracto MetRa existe en promedio $29,6 \pm 1,88$ mg de equivalentes de ácido gálico en 1 g de extracto.

El ensayo realizado con el radical ABTS+ se determinó en concentraciones entre 0,05 a 1,4 mg/ml en extractos acuosos, y en concentraciones de 0,05 a 0,68 mg/ml en extractos metanólicos, debido a una eficiente inhibición del radical en concentraciones más elevadas.

Los extractos acuosos presentaron porcentaje de inhibición cercano al 90% en la mayor concentración evaluada, siendo esta de 93,3% para parte aérea (Figura 2).

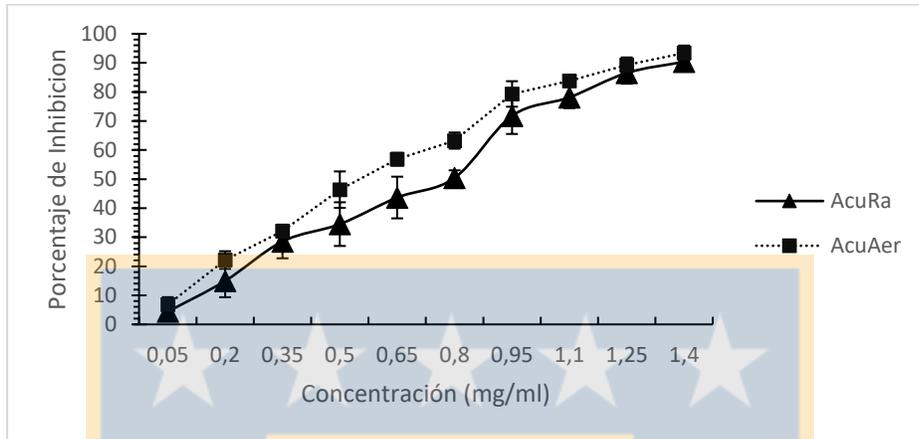


Figura 2. Curvas de porcentaje para inhibición de ABTS+ para cada extracto acuoso.

En el caso de los extractos metanólicos se observó un porcentaje de inhibición del 95,3% para raíz a la mayor concentración estudiada (Figura 3).

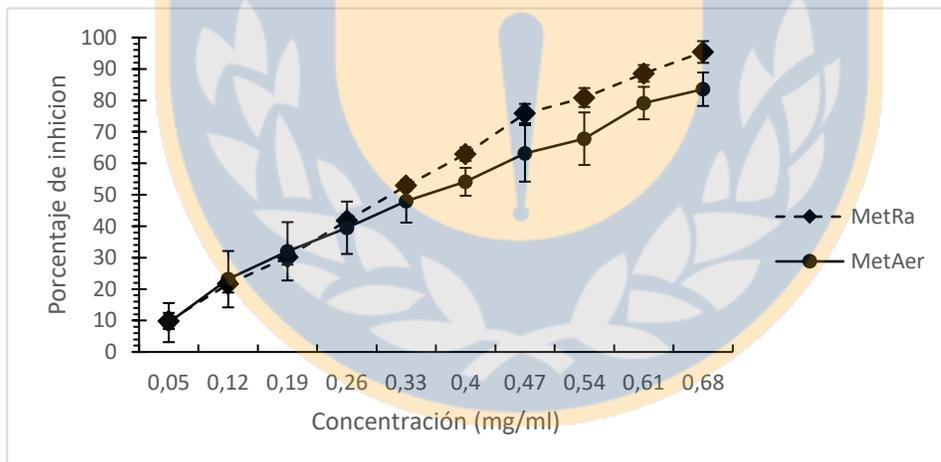


Figura 3. Curvas de porcentaje para inhibición de ABTS+ para cada extracto metanólico.

Los valores fueron expresados como IC_{50} , donde se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre extractos acuosos y metanólicos (Tabla 4), pero no así entre las partes de la planta estudiadas. Los valores fueron expresados como TLX (Anexo 10), donde se determinó que para el extracto MetRa (menor IC_{50}) existe en promedio $108,97 \pm 2,37$ mg de equivalentes de Trolox en 1 g de extracto.

Tabla 4. IC₅₀ de cada extracto en ABTS+ y equivalentes de Trolox.

Extracto	IC 50	TLX	Ecuación de la curva	R ²
MetAer	0,36±0,05 b	108,97±2,37	y = 113,94x + 8,3869	0,9912
MetRa	0,32±0,01 b	130,02±1,67	y = 138,94x + 5,2782	0,9918
AcuAer	0,61±0,00 a	71,23±6,81	y = 65,136x + 10,095	0,9747
AcuRa	0,72± 0,05 a	68,94±0,31	y = 66,317x + 2,2459	0,9862

*Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar

**Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

6.3 Cinética del porcentaje de inhibición de los radicales ABTS+ y DPPH

Con la concentración determinada del IC₅₀ para ambos radicales se llevó a cabo un ensayo de cinética en el tiempo, en el cual, se observó una mayor actividad con base en el porcentaje de inhibición dentro de los primeros 15 min, esta disminución se mantiene progresiva durante todo el tiempo que se estuvo en estudio, pero a partir del minuto 90, la disminución se produce con mínimas variaciones en la absorbancia (Figura 4 y 5), se destaca el caso del extracto MetRa para el radical ABTS+, que obtuvo un valor inicial de 53,5% de inhibición el cual aumento en los dos primeros intervalos de 5 minutos, y luego se mantuvo constante alcanzado un valor de 61,1% como máximo (Figura 5).

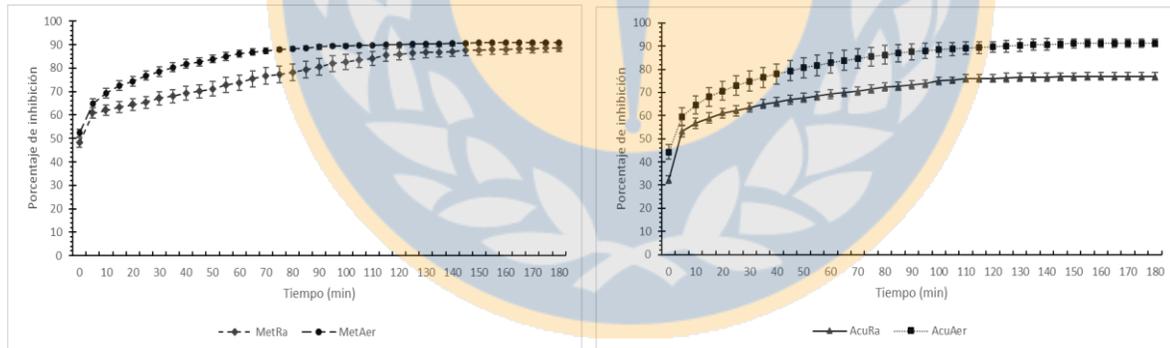


Figura 4. Curvas promedio de cinética del porcentaje de inhibición en DPPH para cada extracto.

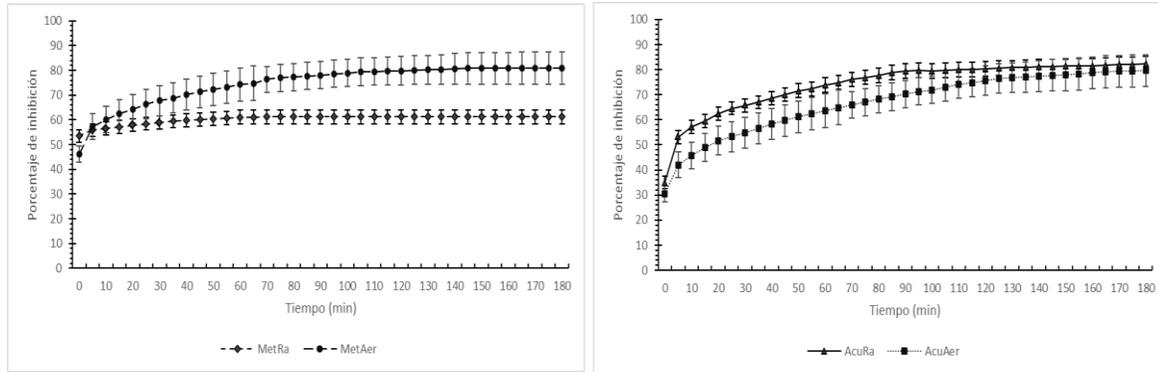


Figura 5. Curvas promedio de cinética del porcentaje de inhibición en ABTS+ para cada extracto.

6.4 Análisis fitoquímico

Los resultados de los ensayos de reacciones de reconocimiento de MS indican la presencia de diversos compuestos en mayor abundancia en raíces, tales como saponinas y taninos (Imagen 4).



Imagen 4. Determinación de algunos metabolitos en *H. grindelioides*. C: control; R: raíz; PA: parte aérea.

Para interpretar resultados obtenidos se utilizó un sistema de cruces donde “+++” denota presencia abundante, “++” representa presencia relativamente abundante, “+” significa presencia escasa y “-” denota reacción negativa (Tabla 5).

Tabla 5. Metabolitos secundarios identificados en *H. grindelioides*.

Constituyentes	Prueba química	Raíces	Parte Aérea
Saponinas	Emulsión	+++	-
Taninos	FeCl ₃	+++	-
Antraquinonas	Borntraeger.	-	-
Flavonoides	Reacción alcalina	++	+
Alcaloides	Reacción alcalina	+	+
Triterpenos	Salwoski	+	+

6.5 Contenido de polifenoles totales

Mediante el ensayo de Folin-C se procedió a realizar mediciones de absorbancia de los extractos en concentración 0,05 mg/ml, correspondiente a la más adecuada dentro del rango de absorbancia obtenida a través de la curva de calibración con ácido gálico para el ensayo (Anexo 11). Se identificaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes extractos, destacando los valores de fenoles totales en el extracto MetRa que corresponden a $265 \pm 10,50$ mg de FGAE en 1 g de extracto.

Tabla 6. Concentración de polifenoles totales en cada extracto.

Extracto	Absorbancia			FGAE
MetAer	0,687	0,653	0,681	$215 \pm 6,43$ b
MetRa	0,852	0,790	0,823	$265 \pm 10,50$ a
AcuAer	0,357	0,349	0,364	$42,8 \pm 1,00$ c
AcuRa	0,468	0,46	0,464	$57,5 \pm 0,5$ a

*Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar

**Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

6.6 Determinación de flavonoides totales

Se determinó la cantidad de flavonoides totales utilizando una curva estándar de calibración de catequina (Anexo 12). De acuerdo con las mediciones realizadas, se encontraron diferencias significativas entre los extractos, destacando el valor del extracto AcuAer que corresponden a $148,3 \pm 12,6$ mg de FCAT en 1 g de extracto.

Tabla 7. Concentración de flavonoides totales en cada extracto.

Extracto	Absorbancia			FCAT
MetAer	0,220	0,223	0,231	84,6 ± 2,50 c
MetRa	0,267	0,262	0,265	102,1 ± 1,10 b
AcuAer	0,364	0,376	0,372	148,3 ± 2,60 a
AcuRa	0,192	0,163	0,171	63,2 ± 6,50 d

*Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar

**Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

6.7 Actividad antimicrobiana

No se observó inhibición de patógenos, ni fúngicos ni bacterianos, frente a la concentración utilizada en el ensayo para cada extracto, observable en la Imagen 5, donde se visualiza la comparación versus los controles positivos utilizados.

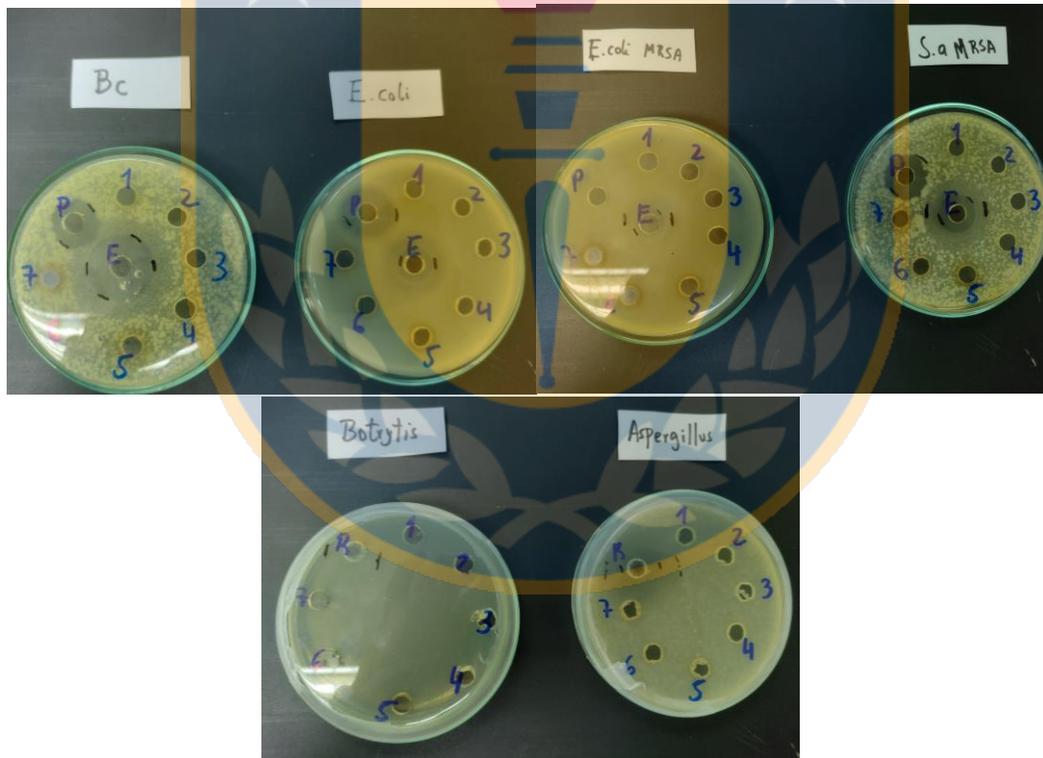


Imagen 5. Placas de cultivo con microorganismos fúngicos y bacterianos utilizados en el ensayo. Los números corresponden a celdas donde fue depositado el extracto. P, E y R corresponden a controles positivos.

7. Discusión

Los antioxidantes han despertado un interés creciente debido a su función contra el deterioro oxidativo en el organismo y contra los procesos patológicos mediados por este. La evaluación de las propiedades antioxidantes que pueden llegar a tener ciertas especies vegetales y de los compuestos derivados de las mismas requiere métodos adecuados, que aborden el mecanismo de la actividad y se centren en la cinética de las reacciones que incluyen los antioxidantes (Faridi et al. 2018). Además, la actividad antioxidante no debe concluirse basándose en un único modelo de ensayo antioxidante, deben llevarse a cabo varios procedimientos antioxidantes *in vitro* para evaluar las actividades antioxidantes con las muestras de interés (Alam et al. 2013). En este trabajo de investigación, se evaluó el potencial antioxidante de los extractos de diferentes partes de la planta obtenidos desde de *H. grindelioides*.

Los resultados de la actividad antioxidante fueron satisfactorios, presentando secuestro de radicales en todos los extractos evaluados, destacando los extractos metanólicos, los cuales presentaron una mayor actividad antioxidante en comparación con los acuosos, evidenciando valores de IC_{50} más bajos basándose en los reactivos DPPH Y ABTS+. Estudios anteriores caracterizaron especies del género *Haplopappus* para establecer sus potenciales antioxidantes, concordando con lo obtenido, *Haplopappus spp.* fue la especie con los mayores índices antioxidantes entre 13 hierbas medicinales seleccionadas, así, esta planta mostró superioridad en la capacidad de atrapar el radical libre ABTS+ (Speisky et al. 2006). Se ha evaluado con anterioridad la actividad neutralizante del radical DPPH de extractos acuosos y metanólicos de *H. multifolius*, *H. taeda*, *H. baylahuen* y *H. rigidus* (Schmeda-Hirschmann et al. 2015). Los autores encontraron para las infusiones de *H. multifolius* y *H. taeda* un IC_{50} de 19,5 y 20,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, por otro lado, los extractos de metanol de *H. multifolius* y *H. taeda* muestran un IC_{50} de 21,3 $\mu\text{g/ml}$. Torres et al. (2006) informaron que las cumarinas aisladas de *H. multifolius* también tienen un efecto antioxidante sobre DPPH, estableciendo un valor IC_{50} 45,5 mg/ml , valores superiores a los encontrados por Faini et al. (2007) donde los exudados resinosos de *H. Taeda* fueron reportados con IC_{50} 75,5 $\mu\text{g/ml}$.

La diferencia entre los valores obtenidos entre los diversos estudios presentados enfocados en antioxidantes, y el actual puede ser justificado bajo limitaciones técnicas no menos

problemáticas. Los ensayos se desarrollaron para un cribado rápido, sin investigaciones detalladas de los iniciadores subyacentes, los objetivos, las interacciones antioxidantes, la cinética, los efectos de los disolventes, los efectos de la concentración, entre otros (Granato et al. 2018). A falta de una comprensión completa de la química, se ignoran sistemáticamente cuestiones de control como el oxígeno (disuelto y atmosférico), la luz, la temperatura, las concentraciones de reactivos, el disolvente, el pH y los blancos de análisis, por ejemplo, algunos compuestos absorben en el mismo rango de longitud de onda que el DPPH (Schaich et al. 2015), como es el caso las antocianinas, las cuales tienen una fuerte absorción en el rango de longitud de onda similar (500-550 nm) al del DPPH, por lo que pueden introducir interferencias en los resultados y su interpretación (Shahidi y Zhong 2015), por lo tanto, ningún ensayo único de "actividad antioxidante" *in vitro* reflejará la capacidad antioxidante total (Berker et al. 2013). La mayoría de los ensayos miden la estequiometría (capacidad) en lugar de la cinética de las reacciones antioxidantes, es decir, cuánto reacciona en lugar de con qué rapidez, además, cada laboratorio ha adaptado los procedimientos para trabajar con la instrumentación y las capacidades disponibles. Como resultado, en la actualidad existe una falta casi total de normalización en los procedimientos experimentales de los ensayos, sobre todo a la hora de expresar los resultados (Shahidi y Zhong 2015).

Como se nombró anteriormente, las actividades de los antioxidantes no solo dependen de sus características estructurales, por ejemplo, de sus reactividades químicas hacia el peróxido y otras especies activas, sino también de muchos otros factores, como la concentración, la temperatura, el nivel de luz, el tipo de sustrato, el estado físico del sistema, así como de los numerosos componentes que actúan como prooxidantes o sinérgicos (Berker et al. 2013). Los resultados de la marcha fitoquímica detectaron diversos compuestos en material vegetal de *H. grindelioides* como alcaloides, flavonoides y triterpenos, estos últimos dos caracterizados ampliamente dentro del género *Haplopappus*, los cuales son apuntados como los principales responsables de sus propiedades biológicas (Torres et al. 2004). Es de interés destacar la detección cualitativa de saponinas en la raíz de *H. grindelioides* en el presente trabajo de investigación, pues las saponinas se destacan por sus múltiples actividades biológicas como posibles fungicidas, antivirales,

antiinflamatorias y anticancerígenas (Juang y Liang 2020), además de haber detectado taninos, estudiados últimamente por sus funciones antiinflamatorias (Tong et al. 2021).

Los compuestos fenólicos han mostrado prometedoras propiedades antioxidantes, estando su potencial directamente relacionado con el tipo de disolvente utilizado en la extracción, pero también con el origen de la planta, las condiciones de cultivo, el tiempo de recolección y las condiciones de almacenamiento (Avello et al. 2013). La actividad antioxidante es directamente proporcional al contenido total de fenoles, lo que indica que los compuestos fenólicos presentes en los extractos son eficaces antioxidantes e inhibidores de radicales libres (Shahidi y Zhong 2015). De acuerdo con el trabajo realizado por Behera et al. (2005), comparando el uso de diferentes solventes, en donde se indica que el uso de metanol presenta mejor arrastre y mayor extracción de fenoles en comparación a otros solventes, coincidente con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, donde la concentración de polifenoles fue estadísticamente superior con relación a los extractos acuosos.

Las plantas son una fuente inagotable de flavonoides, y el paso más importante en su procesamiento es la extracción y el aislamiento de los compuestos objetivo, cuando las plantas son una fuente rica en flavonoides, los extractos obtenidos también lo son (Tzanova et al. 2020). No existe un método de extracción universal y cada procedimiento optimizado es individual para las respectivas plantas, para que una técnica de extracción sea selectiva, debe combinar un disolvente o una mezcla de disolventes óptimos con una técnica adecuada (Sammani et al. 2021). Los resultados obtenidos reflejan una mayor cantidad de flavonoides en extractos Acuer, contrario a la literatura, donde los alcoholes son reconocidos como los extractantes de mejor rendimiento (Pluempanupat et al. 2013). Una de las desventajas generales de la extracción Soxhlet para flavonoides es la termoestabilidad de los compuestos dependientes de la temperatura y del tiempo de tratamiento. Las subclases de flavonoides y sus matrices son muy diversas, por lo que no existe un pretratamiento de muestras ni una técnica analítica ideales para determinarlos en su variedad de matrices (Tzanova et al. 2020). En este sentido, realizar mayor control sobre el proceso de extracción, cuidando variables como temperatura y tiempo, puede mejorar procesos de extracción más eficientes que puedan extraer selectivamente los flavonoides objetivo y minimizar las

interferencias de la matriz, aumentando así la sensibilidad y la selectividad del análisis de flavonoides.

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos fue determinada en una sola concentración, lo que pudo haber limitado posibles descubrimientos de efectos, además, se ha de mostrado que la actividad bactericida no es proporcional al contenido en fenoles ni a la actividad antioxidante, comparando entre *H. baylahuen* y cedrón (*Aloysia citrodora*), ya que el cedrón es el más eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano, aunque es el extracto con menor actividad antioxidante. Esto indica que existen MS en el extracto de cedrón con actividad bactericida pero no con actividad antioxidante (Elgueta et al. 2021). Otros estudios apuntan directamente a la composición química de la especie como responsable de la actividad antimicrobiana, como la presencia de cumarinas en *H. multifolius* (Chiang et al. 1982) y diterpenos en el caso de *H. uncinatus* (Urzua et al. 2006). Estudios preliminares informan que nueve especies de Haplopappus presentes de Chile, *H. diplopappus*, *H. anthylloides*, *H. schumannii*, *H. cuneifolius*, *H. velutinus*, *H. multifolius*, *H. illinitus* y *H. foliosus*, comparten actividades antimicrobianas similares, aunque difieren drásticamente en la composición química (Urzua et al. 1995). Otros estudios apuntan a la selectividad, como *H. uncinatus* selectivo contra bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*) con una actividad superior, en algunos casos a la de los antibióticos comerciales, utilizando bajas concentraciones (1000 hasta 2 µg/ml) (Urzua y Mendoza 2001), o el caso del aceite esencial de *H. greenei* aplicado en estudios de actividad antimalárica, antimicrobiana y antifúngica en muestras de 20 mg/ml, donde sólo se observó actividad antifúngica contra los hongos patógenos de frutillas (*Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*) (Demirci et al. 2006). De acuerdo con estos antecedentes se recomendaría un nuevo estudio con distintas concentraciones y patógenos.

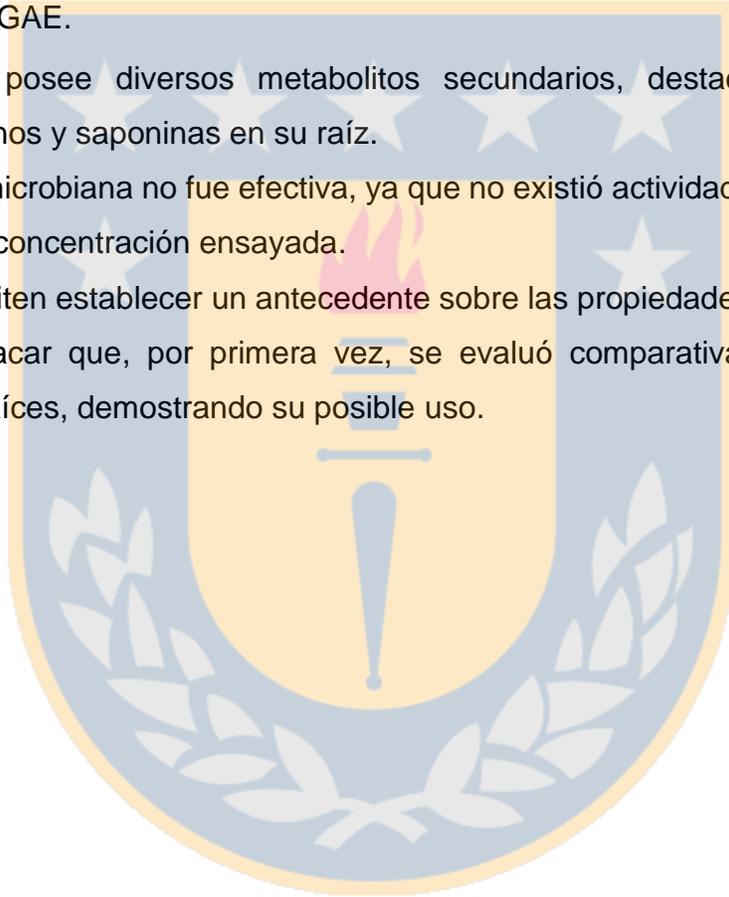
8. Conclusiones

Los extractos acuosos y metanólicos de *H. grindelioides* poseen una actividad antioxidante demostrada en ensayos con radicales DPPH y ABTS+, siendo el resultado estable en el tiempo. El efecto antioxidante de ambos órganos vegetales estudiados (raíz y parte aérea) es comparable, debido a la presencia de MS que confieren sus actividades biológicas e inhiben los radicales de forma similar, sin embargo, es en el extracto MetRa donde se detectó mejor inhibición de ambos radicales y mayor presencia de MS evidenciados en los valores FCAT y FGAE.

H. grindelioides posee diversos metabolitos secundarios, destacando la abundante presencia de taninos y saponinas en su raíz.

La actividad antimicrobiana no fue efectiva, ya que no existió actividad de inhibición fúngica o bacteriana a la concentración ensayada.

Estos datos permiten establecer un antecedente sobre las propiedades de *H. grindelioides*, además de destacar que, por primera vez, se evaluó comparativamente la capacidad antioxidante de raíces, demostrando su posible uso.



Bibliografía

Agbo MO, Uzor PF, Akazie-Nneji UN, Eze-Odurukwe CU, Ogbatue UB, Mbaoji EC (2015) Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Content of Selected Nigerian Medicinal Plants. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 14:35–41.

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M (2013) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21:143–152.

Alara O, Abdurahman H, Ukaegbu C (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4: 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, Bora U (2008) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International* 41:1–15. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2007.10.001>

Ani V, Varadaraj MC, Naidu KA (2006) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology* 224:109–115. <https://doi.org/10.1007/S00217-006-0295-Z/FIGURES/6>

Avello MA, Pastene ER, Bustos ED, Bittner ML, Becerra JA (2013) Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23:44–50. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000122>

Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U (2005) Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnology Letters* 27:991–995. <https://doi.org/10.1007/S10529-005-7847-3/METRICS>

Berker KI, Ozdemir Olgun FA, Ozyurt D, Demirata B, Apak R (2013) Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:4783–4791.

Biais B, Krisa S, Cluzet S, da Costa G, Waffo-Teguo P, Mérillon JM, Richard T (2017) Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4952–4960.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Bulugahapitiya V (2013) *Plants Based Natural products Extraction, Isolation and Phytochemical screening methods*. 1th ed. Indika Graphics. Matara. Sri Lanka.

Cacique AP, Barbosa ÉS, de Pinho GP, Silvério FO (2021) Miniaturized Methodologies for Determining the Total Phenol and Flavonoid Concentrations and the Antioxidant Activity. *Food Analytical Methods* 14:1110–1120.

Chiang MT, Bittner M, Silva M, Mondaca A, Zemelman R, Sammes PG (1982) A prenylated coumarin with antimicrobial activity from *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry* 21:2753–2755. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)83119-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83119-1)

Cui Q, Du R, Liu M, Rong L (2020) Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules* 2020, Vol 25, Page 183 25:183. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010183>

Demirci B, Baser KHC, Tabanca N, Wedge DE (2006) Characterization of volatile constituents of *Haplopappus greenii* and studies on the antifungal activity against phytopathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:3146–3150. <https://doi.org/10.1021/JF053222V>

Deng J, Cheng W, Yang G (2011) A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry* 125:1430–1435. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.10.031>

Di Meo S, Venditti P (2020) Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>

Elgueta E, Mena J, Orihuela PA (2021) Hydroethanolic Extracts of *Haplopappus baylahuen* Remy and *Aloysia citriodora* Palau Have Bactericide Activity and Inhibit the Ability of *Salmonella Enteritidis* to Form Biofilm and Adhere to Human Intestinal Cells. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2021/3491831>

Eloff JN (2019) Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19:1–8. <https://doi.org/10.1186/S12906-019-2519-3/TABLES/1>

Faini F, Labbé C, Torres R, Rodilla JM, Silva L, Monache FD (2007) New phenolic esters from the resinous exudate of *Haplopappus taeda*. *Fitoterapia* 78:611–613. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2007.06.006>

Faini F, Torres R, Rodilla JM, Labbé C, Delported C, Jaña F (2011) Chemistry and bioactivity of *Haplopappus remyanus* (bailahuen), a chilean medicinal plant. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22:2344–2349. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001200015>

Farha AK, Yang QQ, Kim G, Li H bin, Zhu F, Liu HY, Gan RY, Corke H (2020) Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience* 38:100751. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2020.100751>

Faridi A, Assadpour E, Jafari SM (2018) Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. *Trends in Food Science and Technology* 76:56–66. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.04.002>

Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, Li H bin (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 129:345–350. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.04.079>

García D, Ojeda F, Montejo I (2003) Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. *Pastos y forrajes* 26:335–345

Gaviria C, Ochoa C, Sanchez N, Medina C, Lobo M, Galeano P, Mosquera A, Tamayo A, Lopera Y, Rojano B (2009) Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas* 8:519–528

Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:6697–6703. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1404>

Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, Miyashita K, Camp J van, Alasalvar C, Ismail AB, Elmore S, Birch GG, Charalampopoulos D, Astley SB, Pegg R, Zhou P, Finglas P (2018) Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food Chemistry* 264:471–475. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.012>

Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM (2012) Phenolic compounds in fruits – an overview. *Food Science and Technology International* 47:2023–2044. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2012.03067.X>

Henriksen EJ (2019) Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* 3–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813822-9.00001-1>

Hernández-Rodríguez P, Baquero LP, Larrota HR (2019) Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* 265–288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1>

Hudz N, Yezerska O, Shanaida M, Sedláčková VH, Wieczorek PP (2019) Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia* 66:209–215. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e38976>

Ifeanyi Oe (2018) A Review on Free Radicals and Antioxidants. *International Journal of Current Research in Medical Sciences* 4:123–133. <https://doi.org/10.22192/ijcrms.2018.04.02.019>

Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA (2018) Three ABTS•+ radical cation-based approaches for the evaluation of antioxidant activity: fast- and slow-reacting antioxidant behavior. *Chemical Papers* 72:1917–1925. <https://doi.org/10.1007/S11696-018-0415-9/TABLES/4>

Juang YP, Liang PH (2020) Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25214974>

Khan A, Rahman NM, Islam S (2007) Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Tuberos Roots of *Amorphophallus campanulatus*. *Turkish Journal of Biology* 31:167–172.

Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H (2020) The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 148:80–89. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006>

Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B (2019) Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry* 299.

Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA (2009) Cytotoxicity , scavenging and lipid peroxidation - inhibiting activities of 5,3',4'-trihydroxy - 7 - methoxyflavanone isolated from *Haplopappus rigidus*. *Journal of the Chilean Chemical Society* 54:105–107.
<https://doi.org/10.4067/S0717-97072009000200001>

Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 3380 22:3380.
<https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>

Nunes C dos R, Arantes MB, de Faria Pereira SM, da Cruz LL, de Souza Passos M, de Moraes LP, Vieira IJC, de Oliveira DB (2020) Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, Vol 25, 3726 25:3726. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163726>

Oldoni TLC, Melo PS, Massarioli AP, Moreno IAM, Bezerra RMN, Rosalen PL, da Silva GVJ, Nascimento AM, Alencar SM (2016) Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. *Food Chemistry* 192: 306–312.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.07.004>

Padilla C, Lobos O, Poblete-Tapia P, Carrasco-Sánchez V (2021) Antimicrobial activity of bioactive compounds of *Haplopappus multifolius* and *Haplopappus taeda* against human pathogenic microorganisms. *Iranian Journal of Microbiology* 13:98.
<https://doi.org/10.18502/IJM.V13I1.5498>

Pastene E (2021) *Haplopappus baylahuen* J. Rémy. In: *Medicinal and Aromatic Plants of the World*. Springer, Cham, pp 251–260

Phuyal N, Jha PK, Raturi PP, Rajbhandary S (2020) Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. Scientific World Journal 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8780704>

Pluempanupat S, Kumrungsee N, Pluempanupat W, Ngamkitpinyo K, Chavasiri W, Bullangpoti V, Koul O (2013) Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Industrial Crops and Products 44:653–658. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.09.006>

Pozo-Martínez J, Vázquez-Rodríguez S, Olea-Azar C, Moncada-Basualto M (2022) Evaluation of ORAC methodologies in determination of antioxidant capacity of binary combinations of quercetin and 3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl) coumarin derivatives. Arabian Journal of Chemistry 15:104298. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104298>

Qasim M, Abideen Z, Adnan MY, Gulzar S, Gul B, Rasheed M, Khan MA (2017) Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. South African Journal of Botany 110:240–250. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.005>

Rashmi HB, Negi PS (2020) Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. Food Research International 136:109298. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109298>

Riedemann P, Teillier S, Aldunate G (2014) Arbustos nativos ornamentales del Centro Sur de Chile. Corporación Chilena de la Madera (CORMA) 192

Rodríguez R, Grau J, Baeza C, Davies A (2008) Lista comentada de las plantas vasculares de los nevados de Chillán, Chile. Gayana Botánica. 65:153–197. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432008000200005>

Rodríguez R, Marticorena C, Alarcón D, Baeza C, Cavieres L, Finot VL, Fuentes N, Kiessling A, Mihoc M, Pauchard A, Ruiz E, Sanchez P, Marticorena A, Rodríguez R, Marticorena C, Alarcón D, Baeza C, Cavieres L, Finot VL, Fuentes N, Kiessling A, Mihoc M, Pauchard A, Ruiz E, Sanchez P, Marticorena A (2018) Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica* 75:1–430. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432018000100001>

Sammani MS, Clavijo S, Cerdà V (2021) Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. *Trac Trends in Analytical Chemistry* 138:116220. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2021.116220>

Schaich KM, Tian X, Xie J (2015) Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* 14:111–125. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.043>

Schmeda-Hirschmann G, Quispe C, González B (2015) Phenolic Profiling of the South American “Baylahuen” Tea (*Haplopappus* spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Molecules* 2015, Vol 20, Pages 913-928 20:913–928. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES20010913>

Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18:757–781. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.047>

Shaikh JR, Patil M (2020) Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemistry Studies* 8:603–608. <https://doi.org/10.22271/CHEMI.2020.V8.I2I.8834>

Sharma KP (2019) Tannin degradation by phytopathogen’s tannase: A Plant’s defense perspective. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21:101342. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.101342>

Shitan N (2016) Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80:1283–1293. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1151344>

Speisky H, Rocco C, Carrasco C, Lissi EA, López-Alarcón C (2006) Antioxidant screening of medicinal herbal teas. *Phytotherapy Research* 20:462–467. <https://doi.org/10.1002/PTR.1878>

Teponno RB, Kusari S, Spiteller M (2016) Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural Product Reports* 33:1044–1092. <https://doi.org/10.1039/C6NP00021E>

Tong Z, He W, Fan X, Guo A (2021) Biological Function of Plant Tannin and Its Application in Animal Health. *Frontiers in Veterinary Science* 8:803657. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.803657>

Torres R, Faini F, Delle Monache F, Delle Monache G (2004) Two new O-geranyl coumarins from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Fitoterapia* 75:5–8. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2003.06.003>

Torres R, Faini F, Modak B, Urbina F, Labbé C, Guerrero J (2006) Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry* 67:984–987. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2006.03.016>

Tortosa R, Bartoli Adriana (2002) Two New Species of *Haplopappus* (Astereae, Asteraceae) from Mendoza, Argentina on JSTOR. In: *Brittonia* 54. <https://www.jstor.org/stable/3218485>. Accessed 1 Nov 2022

Tzanova M, Atanasov V, Yaneva Z, Ivanova D, Dinev T (2020) Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. *Processes*, Vol 8, Page 1222 8:1222. <https://doi.org/10.3390/PR8101222>

Urzua A, Echeverria J, Espinoza J, Wilkens M (2012) Lipophilicity and antibacterial activity of flavonols: Antibacterial activity of resinous exudates of *Haplopappus litoralis*, *H. chrysantemifolius* and *H. scrobiculatus*. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas 11:369–376

Urzua A, Jara F, Tojo E, Wilkens M, Mendoza L, Rezende MC (2006) A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudate of *Haplopappus uncinatus*. Journal of Ethnopharmacology 103:297–301. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2005.09.042>

Urzua A, Mendoza L (2001) Antibacterial activity of the resinous exudates from *Haplopappus uncinatus* and *Haplopappus foliosus*. Fitoterapia 72:418–420. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00332-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00332-4)

Urzua A, Torres R, Muñoz M, Palacios Y (1995) Comparative antimicrobial study of the resinous exudates of some Chilean *Haplopappus* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology 45:71–74. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01196-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01196-7)

Valencia E, Figueroa I, Sosa E, Bartolome M, Martinez H, Garcia M (2017) Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas 16:15–29

Valletta A, Iozia LM, Leonelli F (2021) Impact of Environmental Factors on Stilbene Biosynthesis. Plants 2021, Vol 10, Page 90 10:90. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10010090>

Villanueva C, Kross RD (2012) Antioxidant-Induced Stress. International Journal of Molecular Sciences,13:2091–2109. <https://doi.org/10.3390/ijms13022091>

Vogel H, González M, Faini F, Razmilic I, Rodríguez J, Martín JS, Urbina F (2005) Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus*-species known

as bailahuén. Journal of Ethnopharmacology 97:97–100.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.027>

Waterman PG, Mole S (2019) Extrinsic Factors Influencing Production of Secondary Metabolites in Plants. Insect-Plant Interactions 107–134.
<https://doi.org/10.1201/9780429290916-4>

Watrelet AA, Norton EL (2020) Chemistry and Reactivity of Tannins in *Vitis* spp.: A Review. Molecules, Vol 25, Page 2110 25:2110. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25092110>

Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y, Nakabayashi R (2019) The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. Frontiers in Plant Science 10:943.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00943/BIBTEX>

Zhou J, Braun M, Wetterauer P, Wetterauer B, Wink M (2019) Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of *Glycyrrhiza glabra* L., *Paeonia lactiflora* Pall., and *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. Extracts. Medicines (Basel) 6:43.
<https://doi.org/10.3390/MEDICINES6020043>

Anexos

Anexo 1. Datos de absorbancia de extracto AcuRa de *H. grindelioides* utilizando el radical DPPH.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	desvest
0,2	0,681	0,665	0,711	4,755	0,746	-3,493	0,669	4,125
0,4	0,609	0,611	0,574	14,825	8,806	16,448	13,36	4,026
0,6	0,525	0,547	0,568	26,573	18,358	17,322	20,751	5,069
0,8	0,484	0,462	0,534	32,308	31,045	22,271	28,541	5,467
1	0,448	0,371	0,422	37,343	44,627	38,574	40,181	3,899
1,2	0,409	0,381	0,388	42,797	43,134	43,523	43,151	0,363
1,4	0,35	0,34	0,348	51,049	49,254	49,345	49,883	1,011
1,6	0,331	0,311	0,237	53,706	53,582	65,502	57,597	6,847
1,8	0,246	0,238	0,197	65,594	64,478	71,325	67,132	3,674
2	0,236	0,198	0,184	66,993	70,448	73,217	70,219	3,118
Control -	0,715	0,67	0,687					
DPPH	0,848	0,838	0,88					

Anexo 2. Datos de absorbancia de extracto AcuAer de *H. grindelioides* utilizando el radical DPPH.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	Desvet
0,2	0,7	0,715	0,739	7,773	4,667	2,763	5,068	2,529
0,4	0,633	0,646	0,646	16,601	13,867	15	15,156	1,374
0,6	0,618	0,622	0,6	18,577	17,067	21,053	18,899	2,012
0,8	0,556	0,587	0,594	26,746	21,733	21,842	23,44	2,863
1	0,485	0,555	0,528	36,1	26	30,526	30,875	5,059
1,2	0,441	0,497	0,45	41,897	33,733	40,789	38,807	4,428
1,4	0,4	0,444	0,434	47,299	40,8	42,895	43,665	3,317
1,6	0,351	0,383	0,348	53,755	48,933	54,211	52,3	2,924
1,8	0,302	0,299	0,31	60,211	60,133	59,211	59,852	0,556
2	0,266	0,263	0,277	64,954	64,933	63,553	64,48	0,803
Control -	0,759	0,75	0,76					
DPPH	0,826	0,854	0,854					

Anexo 3. Datos de absorbancia de extracto AcuRa de *H. grindelioides* utilizando el radical ABTS+.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	Desvest
0,05	0,64	0,632	0,622	4,335	5,247	3,566	4,383	0,842
0,2	0,607	0,566	0,513	9,268	15,142	20,465	14,958	5,601
0,35	0,515	0,48	0,422	23,019	28,036	34,574	28,543	5,794
0,5	0,493	0,426	0,38	26,308	36,132	41,085	34,508	7,521
0,65	0,403	0,405	0,31	39,761	39,28	51,938	43,66	7,173
0,8	0,348	0,333	0,302	47,982	50,075	53,178	50,412	2,614
0,95	0,222	0,202	0,137	66,816	69,715	78,76	71,764	6,230
1,1	0,143	0,172	0,119	78,625	74,213	81,55	78,129	3,694
1,25	0,099	0,109	0,06	85,202	83,658	90,698	86,519	3,700
1,4	0,061	0,08	0,05	90,882	88,006	92,248	90,379	2,165
Control -	0,669	0,667	0,645					
ABTS	0,718	0,719	0,715					

Anexo 4. Datos de absorbancia de extracto AcuAer de *H. grindelioides* utilizando radical ABTS+.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	Desvest
0,05	0,581	0,611	0,609	9,783	5,124	5,435	6,781	2,605
0,2	0,515	0,479	0,51	20,031	25,621	20,807	22,153	3,028
0,35	0,443	0,446	0,422	31,211	30,745	34,472	32,143	2,031
0,5	0,299	0,373	0,364	53,571	42,081	43,478	46,377	6,270
0,65	0,283	0,289	0,262	56,056	55,124	59,317	56,832	2,201
0,8	0,252	0,241	0,217	60,87	62,578	66,304	63,251	2,779
0,95	0,157	0,102	0,141	75,621	84,161	78,106	79,296	4,393
1,1	0,109	0,104	0,101	83,075	83,851	84,317	83,747	0,628
1,25	0,065	0,055	0,088	89,907	91,46	86,335	89,234	2,628
1,4	0,041	0,027	0,06	93,634	95,807	90,683	93,375	2,572
Control -	0,644	0,644	0,644					
ABTS	0,706	0,706	0,706					

Anexo 5. Datos de absorbancia de extracto MetRa de *H. grindelioides* utilizando el radical DPPH.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	desvest
0,2	0,733	0,726	0,723	3,553	5,714	6,589	5,285	1,563
0,4	0,574	0,530	0,581	24,474	31,169	24,935	26,859	3,739
0,6	0,366	0,392	0,371	51,842	49,091	52,067	51,000	1,657
0,8	0,242	0,337	0,354	68,158	56,234	54,264	59,552	7,518
1	0,198	0,193	0,190	73,947	74,935	75,452	74,778	0,765
1,2	0,195	0,174	0,170	74,342	77,403	78,036	76,594	1,975
1,4	0,161	0,123	0,154	78,816	84,026	80,103	80,982	2,714
1,6	0,134	0,105	0,120	82,368	86,364	84,496	84,409	1,999
1,8	0,125	0,099	0,110	83,553	87,143	85,788	85,495	1,813
2	0,123	0,080	0,099	83,816	89,610	87,209	86,878	2,911
Control -	0,760	0,770	0,774					
DPPH	0,859	0,821	0,828					

Anexo 6. Datos de absorbancia de extracto MetAer de *H. grindelioides* utilizando el radical DPPH

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	desvest
0,2	0,639	0,706	0,697	11,373	6,366	8,889	8,876	2,504
0,4	0,569	0,605	0,608	21,082	19,761	20,523	20,455	0,663
0,6	0,509	0,544	0,562	29,404	27,851	26,536	27,930	1,435
0,8	0,426	0,451	0,497	40,915	40,186	35,033	38,711	3,207
1	0,381	0,360	0,382	47,157	52,255	50,065	49,826	2,557
1,2	0,294	0,251	0,287	59,223	66,711	62,484	62,806	3,754
1,4	0,251	0,184	0,220	65,187	75,597	71,242	70,675	5,228
1,6	0,189	0,155	0,183	73,786	79,443	76,078	76,436	2,845
1,8	0,159	0,130	0,170	77,947	82,759	77,778	79,495	2,828
2	0,106	0,120	0,156	85,298	84,085	79,608	82,997	2,997
Control -	0,721	0,754	0,765					
DPPH	0,834	0,826	0,813					

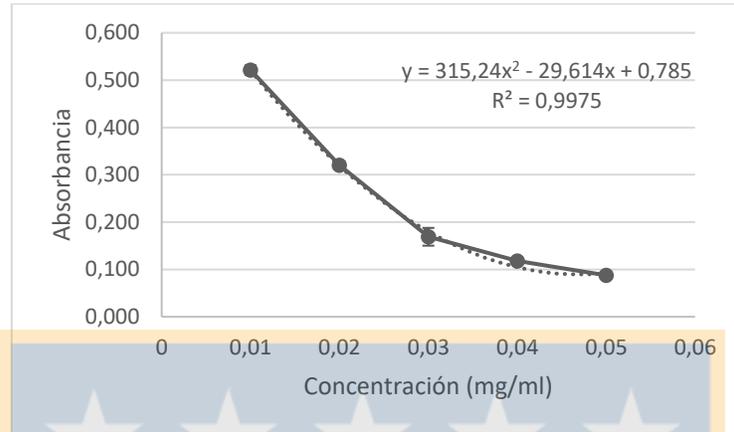
Anexo 7. Datos de absorbancia de extracto MetRa de *H. grindelioides* utilizando el radical ABTS+.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	desvest
0,05	0,608	0,65	0,58	12,392	7,275	9,938	9,868	2,559
0,12	0,526	0,569	0,504	24,207	18,83	21,739	21,592	2,692
0,19	0,474	0,509	0,442	31,7	27,389	31,366	30,152	2,398
0,26	0,4	0,422	0,366	42,363	39,8	43,168	41,777	1,759
0,33	0,331	0,338	0,293	52,305	51,783	54,503	52,864	1,443
0,4	0,262	0,272	0,223	62,248	61,198	65,373	62,94	2,171
0,47	0,152	0,194	0,148	78,098	72,325	77,019	75,814	3,069
0,54	0,14	0,15	0,101	79,827	78,602	84,317	80,915	3,009
0,61	0,08	0,098	0,056	88,473	86,02	91,304	88,599	2,644
0,68	0,015	0,06	0,02	97,839	91,441	96,894	95,391	3,454
Control -	0,694	0,701	0,644					
ABTS	0,72	0,715	0,703					

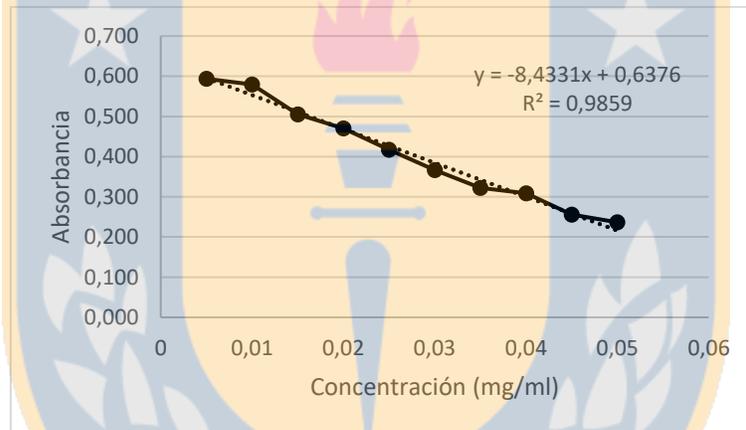
Anexo 8. Datos de absorbancia de extracto MetAer de *H. grindelioides* utilizando radical ABTS+.

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inh 1	% inh 2	% inh 3	Promedio % de inh	desvest
0,05	0,619	0,57	0,58	3,583	15,929	8,517	9,343	6,215
0,12	0,544	0,455	0,499	15,265	32,891	21,293	23,15	8,958
0,19	0,496	0,398	0,431	22,741	41,298	32,019	32,019	9,278
0,26	0,44	0,352	0,387	31,464	48,083	38,959	39,502	8,323
0,33	0,381	0,311	0,323	40,654	54,13	49,054	47,946	6,806
0,4	0,323	0,281	0,291	49,688	58,555	54,101	54,115	4,433
0,47	0,302	0,204	0,212	52,96	69,912	66,562	63,144	8,978
0,54	0,263	0,165	0,198	59,034	75,664	68,77	67,823	8,355
0,61	0,145	0,102	0,158	77,414	84,956	75,079	79,15	5,162
0,68	0,128	0,07	0,121	80,062	89,676	80,915	83,551	5,321
Control -	0,642	0,678	0,634					
ABTS	0,697	0,72	0,682					

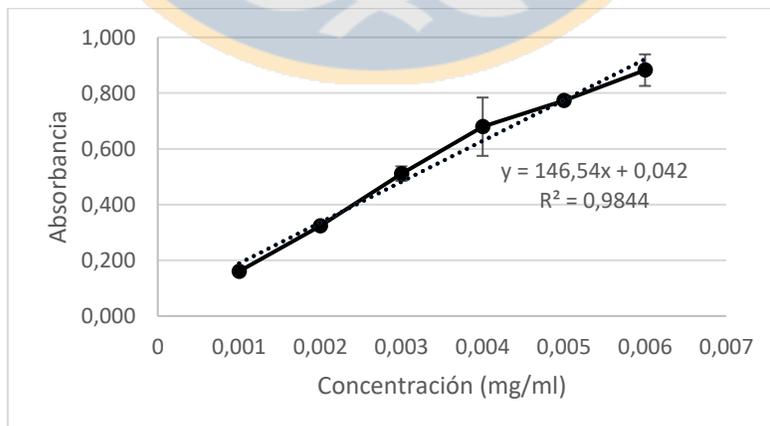
Anexo 9. Curva de calibración equivalentes de Acido gálico (GAE).



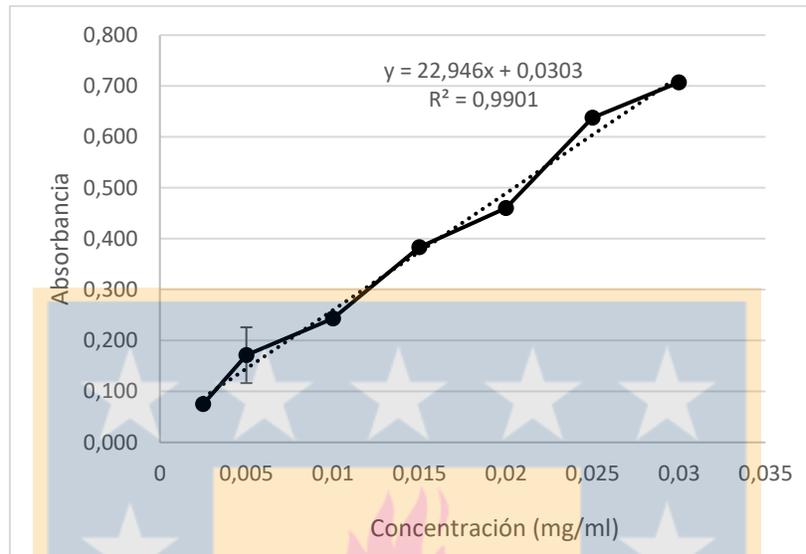
Anexo 10. Curva de calibración equivalentes de trolox (TLX).



Anexo 11. Curva de calibración de ácido gálico para Folin C. (FGAE).



Anexo 12. Curva de calibración de Catequina para Flavonoides (ECAT).

Anexo 13. Absorbancia IC₅₀ de los extractos para equivalentes de ácido gálico (GAE).

Extracto	IC ₅₀	Absorbancia		
MetAer	0,96±0,07 d	0,391	0,397	0,385
MetRa	0,66±0,01 c	0,352	0,317	0,312
AcuAer	1,54±0,05 a	0,423	0,412	0,414
AcuRa	1,39±0,03 b	0,385	0,375	0,32

Anexo 14. Absorbancia IC₅₀ de los extractos para equivalentes de Trolox (TLX).

Extracto	IC ₅₀	Absorbancia		
MetAer	0,36±0,05 b	0,315	0,301	0,307
MetRa	0,32±0,01 b	0,282	0,201	0,287
AcuAer	0,61±0,00 a	0,236	0,28	0,299
AcuRa	0,72± 0,05 a	0,22	0,22	0,216

Anexo 15. Gramos utilizados para cada extracto vegetal.

Extracto	Extracto obtenido (g)	Material vegetal seco (g)
MetAer	11.18	39.08
MetRa	11.41	39.20
AcuAer	8.44	40.36
AcuRa	13.24	39.76

