

	<p>Universidad de la República - CSIC</p>	
	<p>Formulario de Informe final del Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil Edición 2014</p>	

<b>DATOS DEL PROYECTO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Título del proyecto: Estandarización de cultivo de <i>Baccharis trímpera</i>, <i>Baccharis articulata</i> y <i>Baccharis usteri</i> para potencial uso como antichagásicos.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Número ID del proyecto: 193</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Área de conocimiento: Básica, Salud</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Facultad o Servicio: Grupo de Química Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Nombre completo de los-as Integrantes del equipo: Bilat, Agustin. Bado, Agustina. Dabbisogno, Mateo. Nargoli, Javier.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Correo electrónico del/de la estudiante referente: javi_7_12@hotmail.com</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Nombre completo del/de la docente orientador-a: Javier Varela Ubillos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Correo electrónico del/de la docente orientador-a: jvarelaubillos@gmail.com</li> </ul>

## INFORME FINAL

### 1) **Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada.**

#### **Objetivo**

Estandarización del cultivo de *Hydrocotyle bonariensis*, *Baccharis trimera* y *Baccharis articulata* para potencial uso como antichagásicos.

#### **Objetivos específicos**

- 1 - Preparación de carriles de cultivo y suelos en el invernadero del CIN (Centro de Investigaciones Nucleares)
- 2 - Propagación de las especies en estudio y cultivo en los suelos preparados
- 3 - Caracterización de los suelos (pH, contenido de P, N y K, conductividad)
- 4 - Colecta de muestras para preparación de extractos
- 5 - Preparación de extractos etanólicos
- 6 - Evaluación de la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* de los extractos preparados
- 7 - Determinación del perfil químico de las especies en estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear

### 2) **Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto.**

- Búsqueda bibliográfica.
- Colecta del material vegetal.

Plantas silvestres de *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usteri* fueron recolectadas en la localidad de Villa Serrana (Fig 1) y transportadas al predio donde se realizó la propagación.

- Identificación Botánica

Se tomaron muestras de cada una de las especies y se efectuaron los cortes para observación al microscopio. Posteriormente se compararon con datos bibliográficos para su identificación.

- Preparación del suelo.

Se armaron camas altas colocando fardos en un cantero y por encima de estos la mezcla de tierra, arena y compost.

- Propagación de las especies en estudio y cultivo en los suelos preparados.

A partir de las plantas madre se realizaron los esquejes de 12-15 cm y se colocaron en la tierra a una profundidad tal que cubra 3 yemas, distribuidos según la especie y la región de la planta madre de la cual fueron obtenidos (apical, medio y basal) con excepción de *Baccharis articulata* que no se logró esta clasificación. A cada uno se le colocó firmemente un vaso invertido transparente de modo de generar un microclima que conserve la humedad evitando así la deshidratación previa al enraizamiento. Finalmente se regaron los canteros con EM (Efficient Microorganisms) disueltos en agua de lluvia.



Fig 1. Colecta de plantas silvestres

- Seguimiento del cultivo y mantenimiento de las condiciones.

Se realizó el seguimiento de los plantines en busca de brotes y/o raíces como indicadores de propagación exitosa (Fig 2). Adicionalmente se mantuvieron las condiciones del cantero regando y arrancando yuyos. Una vez establecidos los plantines se calculó el porcentaje de supervivencia para las diferentes especies.



Fig 2. Seguimiento del cultivo y proceso de enraizamiento

- Colecta de muestras para preparación de extractos etanólicos.

Luego que los plantines alcanzaron un crecimiento considerable se realizaron, para cada especie, cortes aleatorios de modo de obtener muestras representativas.

- Obtención de extractos etanólicos.

Para cada especie, se separaron las muestras en tres grupos a partir de los cuales obtuvimos sus respectivos extractos mediante maceración, filtrado y secado en evaporador rotatorio.

- Caracterización Química.

Para determinar si la estandarización fue exitosa se realizaron Cromatografías en capa fina "TLCs" (utilizando distintas fases móviles y reveladores) para hacer una comparación intraespecie y así verificar que el perfil químico es similar en todos los plantines. Adicionalmente se analizaron los extractos por Resonancia Magnética Nuclear con el mismo fin.

- Evaluación de Actividad Biológica

Se estudió la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* de los distintos extractos verificando si las distintas muestras de una misma especie presentan similar actividad.

3) **Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.**

- La estandarización de *Hydrocotyle bonariensis* no se realizó ya que pese a presentar actividad tripanosomicida se encontró que la misma es altamente tóxica. En contrapartida se realizó la estandarización de *Baccharis usteri* lo cual no estaba previsto en el cronograma.

- Por falta de instrumentos no se pudo realizar la caracterización de los suelos.

- Adicionalmente a lo previsto, se realizó la identificación botánica de las distintas plantas madre con el fin de determinar precisamente con qué especies se trabajó.

- Como complemento al estudio por resonancia magnética nuclear para determinar el perfil químico de las especies, se realizaron TLCs.

- 4) Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no – con los resultados esperados por parte del equipo.

**Identificación Botánica.**

Se realizó la identificación botánica mediante los cortes realizados en polietilenglicol los cuales posteriormente fueron observados al microscopio. (fig 3)

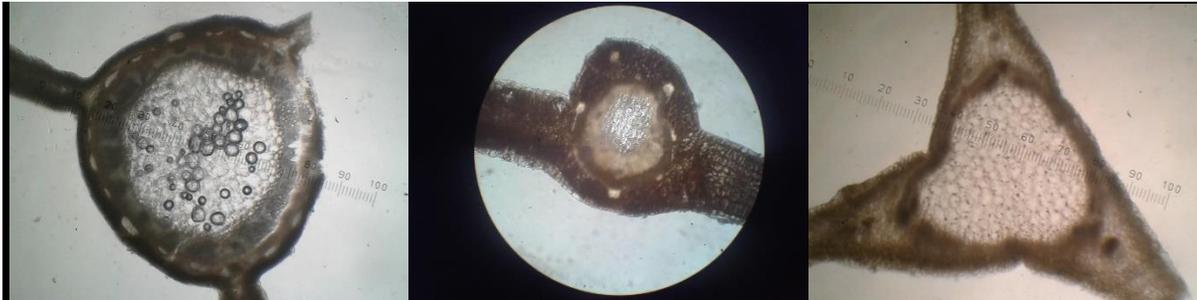


Figura 3. Cortes observados al microscopio (de izquierda a derecha): *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usteri*

**Éxito de propagación.**

El porcentaje de sobrevida fue alto en *B. trimera* y *B. usteri* mientras que para *B. articulata* el rendimiento de propagación fue considerablemente menor.

		Inicial	Final	% Sobrevida
<i>Trimera</i>	Basal	27	23	85
	Medio	41	34	83
	Apical	14	12	86
<i>Articulata</i>		36	3	8
<i>Usteri</i>	Basal	12	11	92
	Medio	17	16	94
	Apical	29	27	93

**Determinación del Perfil Químico**

**1-TLCs**

El patrón de bandas observado fue el mismo en los distintos grupos dentro de una misma especie, utilizándose distintas fases móviles y reveladores. A continuación, se muestran imágenes representativas. Fases móviles utilizadas: 2:8, 1:1 y 8:2 Hexano: Acetato de Etilo, 1:1:1 Hx: AcEt: cloroformo. Reveladores: Anisaldehído (An), UV 280nm (UV), Brady (Br). Sin revelar (Nat).

A= *Baccharis articulata*, U= *Baccharis usteri*, T= *Baccharis trimera*

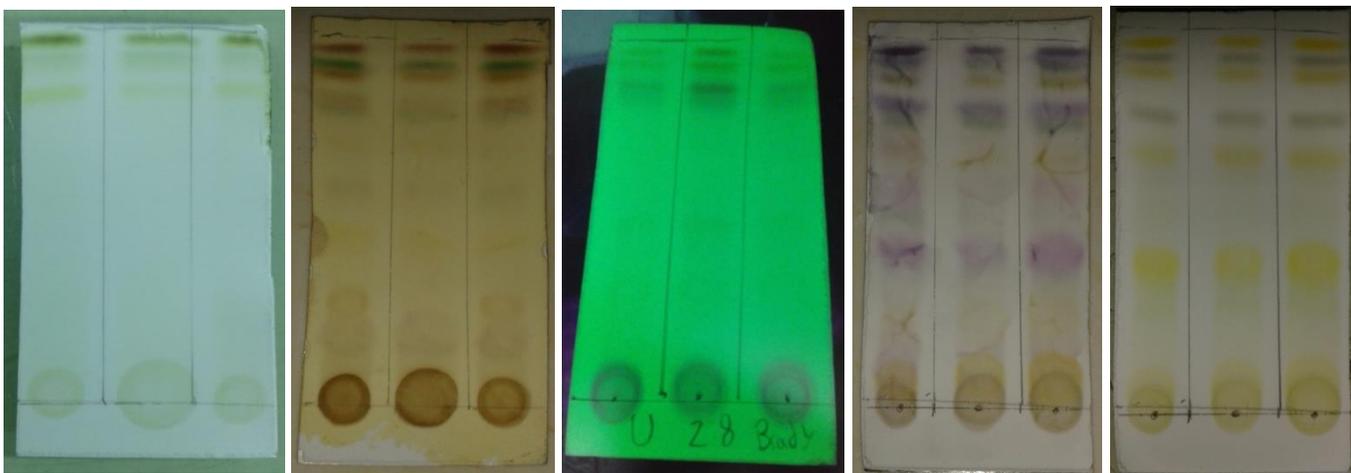


Figura 4. TLCs representativas

A/2:8/Nat

A/1:1/Br

U 2:8 UV

T/1:1:1/An

T 1:1:1 nat

## 2- RMNs

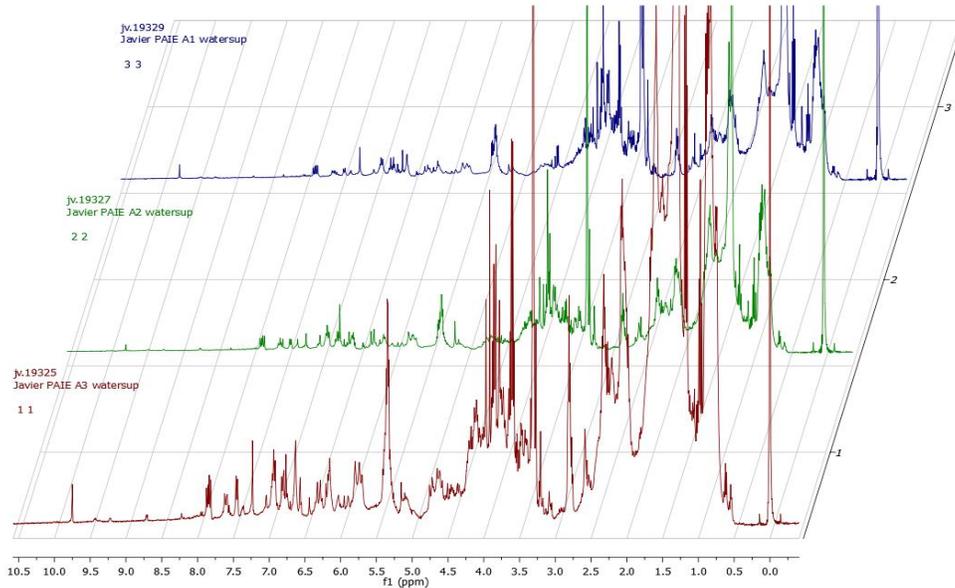


Figura 5 Espectros de resonancia magnética nuclear de los extractos etanólicos de *B. articulata*.

En forma representativa se muestran los espectros  $^1\text{H}$  RMN apilados de las tres muestras de *B. articulata* (fig. 5) utilizando TMS como estándar interno.

## Ensayo Biológico

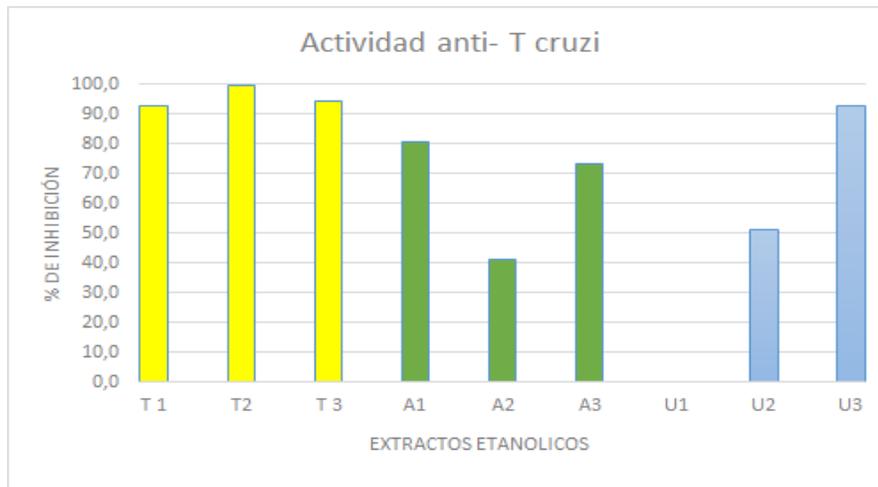


Figura 6: Actividad tripanosomicida de los extractos etanólicos de las distintas muestras

Los resultados del RMN y TLC muestran un perfil químico similar para muestras de una misma especie. Pese a ello se observaron diferencias en la intensidad de los picos lo cual puede atribuirse a que las plantas aún se encontrasen en diferente grado de desarrollo y presenten distintas concentraciones de sus compuestos.

Los resultados del ensayo biológico (fig. 6) confirman la actividad anti-*T. cruzi* previamente descrita. Pese a ello la estandarización del cultivo no se ve reflejada en la actividad biológica de los extractos a excepción de *Baccharis trimera* donde sí se observa similitud en los resultados.

Tanto en *B. trimera* como *B. articulata* se observó cierta correspondencia entre dicha actividad y el perfil de intensidad de aldehídos. En la especie *B. usteri* se observa bajo contenido de aldehídos lo cual puede deberse a que la planta no se encuentra en etapa de floración (donde la cantidad de los mismos aumenta). Pese al bajo contenido de aldehídos de *B. usteri* se logró observar actividad biológica, pero esta no se pudo correlacionar con los perfiles químicos.

- 5) Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).

No

- 6) En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.

No existieron dificultades

- 7) En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tenidos en cuenta en futuras ediciones del mismo.

Indicar una sección donde colocar la bibliografía consultada.

Nos fue imposible comprimir todos los resultados en una carilla como estaba establecido, aún reduciendo mucho la información disponible.

### **Resumen publicable:**

Las plantas son utilizadas con fines medicinales desde hace mucho tiempo. Solo algunos compuestos químicos son responsables de su actividad biológica, mientras que otros también presentes en la planta, pueden llegar a ser tóxicos. La acumulación del compuesto activo puede variar de una planta a otra, ya que la misma depende de muchas variables como ser: la época del año en cual se realizó la colecta del material biológico, la humedad y tipo de suelo entre otros factores. Todo ello hace que la actividad terapéutica deseada también sea variable. Es por ello que la estandarización de cultivos de plantas medicinales es fundamental si se desea realizar una caracterización de la droga vegetal y conseguir así la máxima eficacia. Nuestro proyecto consistió en obtener cultivos estandarizados de las distintas especies *Baccharis trimera*, *Baccharis usterii* y *Baccharis articulata* mediante propagación con esquejes en invernadero. La relevancia de ello es que se ha encontrado que dichas especies poseen actividad inhibitoria del crecimiento de *Trypanosoma cruzi*; agente causante de la enfermedad de Chagas para la cual no existe un tratamiento eficaz en su fase crónica. Se comprobó la uniformidad química de los cultivos mediante cromatografía en capa fina y Resonancia Magnética Nuclear, así como la actividad *in vitro* tripanosomicida de los extractos etanólicos. Los resultados obtenidos permiten confirmar el potencial de *Baccharis* spp. como nuevo tratamiento para la enfermedad de Chagas.

Servicio: Facultad de Ciencias, UdelaR, Grupo de Química Medicinal.

Integrantes del equipo: Bado Agustina, Bilat Agustin, D'Abbisogno Mateo, Nargoli Javier

Docente orientador: Lic. Javier Varela

- 9) En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción
6 m <sup>3</sup>	Tierra - compost
1	Pipeta automática p5000

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- Un CD con el **informe final** en formato .odt o .pdf. Y con el **póster** en su versión digital en formato .jpg o .pdf
- Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)



.....  
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

**Comentarios del docente orientador:**

La disposición y actuación de Javier, Agustina, Mateo y Agustín para llevar adelante el trabajo planteado fue muy buena. En todo momento se mostraron analíticos y críticos con su trabajo, considero que su primera actuación en investigación ha sido muy ejemplarizante de los desafíos a plantearse y querer alcanzar. Los resultados obtenidos son de gran valor para el desarrollo de nuevos tratamientos para la enfermedad de Chagas a partir de plantas medicinales del Uruguay. Se demostró que la clonación por esqueje es un método barato, simple y eficaz para la propagación de cultivos estandarizados de *Baccharis* spp. Además los estudiantes pudieron introducirse en la temática de la química de los productos naturales desde el estudio de las técnicas de cuantificación de principios activos. Todos ellos demostraron ser proactivos y capaces de llevar adelante un futuro proyecto de investigación.



.....  
FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR