

INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

I ANTECEDENTES GENERALES

CÓDIGO: FIA-ES-C-2005-1-A-040

NOMBRE DEL PROYECTO: Determinación de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristolelia chilensis* (maqui). Identificación de los compuestos activos

REGIÓN O REGIONES DE EJECUCIÓN: RM

AGENTE EJECUTOR: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

COORDINADOR DEL PROYECTO: DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

Costo Total (Programado y Real):

Programado:

Real:

Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total) (Programado y Real):

Programado: \$18.259.422

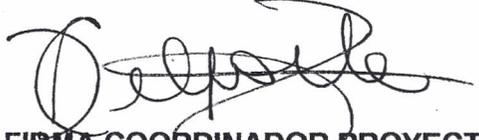
Real: \$ 15.523.803

Período de Ejecución (Programado y Real):

PERIODO PROGRAMADO: DIC 2005 A MARZO 2007

PERIODO REAL: DIC 2005 A JULIO 2007

FECHA DE PRESENTACIÓN: 6 de septiembre de 2007


FIRMA COORDINADOR PROYECTO

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	05 SET. 2007
Hora	13:44
Nº Ingreso	4120

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCION	

II. RESUMEN EJECUTIVO: El infuso de las hojas de maqui es utilizado en forma de gárgaras para calmar el dolor de garganta y la inflamación de las amígdalas. Además las hojas en forma de cataplasma son usadas para el dolor de riñones y los dolores de espalda. A las hojas secas pulverizadas se le atribuyen propiedades cicatrizantes de heridas o quemaduras, para úlceras y otras lesiones de la boca. Los usos descritos nos llevaron a plantear la siguiente **hipótesis** "las hojas de esta especie autóctona presentan efectos antiinflamatorio, analgésico, antioxidante y antimicrobiano por la vía tópica que es la vía de administración preferentemente utilizada por la población.

Los objetivos generales del proyecto fueron: validar el uso de las hojas de *A. chilensis* como antiinflamatoria y analgésica, y demostrar sus potenciales efectos antimicrobianos y antioxidantes. Contribuir al conocimiento de la composición química de nuestra flora autóctona. Identificar nuevas sustancias antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas. Para alcanzar estos objetivos, las hojas fueron recolectadas en el mes de diciembre, posteriormente secadas y molidas, a continuación se prepararon los diferentes extractos seriados de hexano (EH), diclorometano (EDM) y metanol (EM). Se analizó la composición química de cada extracto mediante cromatografías en capa fina (c.c.f.) y utilizando diferentes reactivos reveladores para determinar las familias de metabolitos secundarios presentes.

Los resultados de las evaluaciones de la actividad **antiinflamatoria tópica** en ratones, muestran que el infuso es el que presentó el mayor efecto frente a ácido araquidónico (AA), sin embargo éste extracto acuoso, no mostró efecto antiinflamatorio frente a 12-O-tetradecanoil forbol-13 acetato (TPA) y si mostró un efecto analgésico significativo (55,2%) frente al modelo de formalina en la cola. El EM que fue el más activo como antiinflamatorio frente al modelo del TPA (66%), no mostró un efecto significativo frente a AA. Los EH y EDM mostraron un efecto leve frente a AA. Sin embargo frente a TPA el EDM presentó un efecto importante (63,9%) no así el EH (28,3%). Los extractos no fueron activos como antiinflamatorios por vía oral frente al ensayo del edema plantar inducido por λ -carragenano en cobayos. Si fueron activos como analgésicos *p.o*, frente al ensayo de las contorsiones abdominales en ratones, siendo los más activos los EH y EDM. Respecto de los resultados de la evaluación de la **actividad analgésica** frente al ensayo de la formalina en la cola de ratón, los extractos más activos como analgésicos fueron los EDM (59,7%) y EM (74,1%), ambos a la concentración de 5% p/v. En relación a la actividad analgésica evaluada por el ensayo del latigazo de la cola en ratón, los efectos de los distintos extractos fue dosis dependiente siendo el EM el que presentó el mayor efecto máximo (55,2% a 10% p/v). El estudio de la **inocuidad** de los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM) a la dosis única más alta que fue posible de solubilizar (2g/kg *p.o*), muestran que ambos no fueron tóxicos. Además la aplicación tópica de los EDM y EM en conejos no produjo irritación dérmica.

La **actividad atrapadora de radicales libres** mediante el ensayo del DPPH, nos permitió demostrar que el EM fue el más activo con una CE_{50} de 9,7 μ g/mL. Frente a la **xantino oxidasa** el EM fue el más activo con un 62,7 % de inhibición de la enzima a 50 μ g/mL. La actividad antioxidante del EM podría ser atribuida a los compuestos fenólicos. Los resultados de la evaluación de la actividad **antimicrobiana** muestran que las hojas de maqui presentaron una leve actividad, siendo el EM el más activo frente a *Staphylococcus aureus*. Ninguno de los extractos exhibió actividad antifúngica frente a *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

Por fraccionamiento en columnas cromatográficas de los EDM y EM se obtuvo un crudo de alcaloides que contiene tres alcaloides mayoritarios, identificados por completos estudios espectroscópicos como: **protopina**, **aristolina** y un **derivado de la aristolina**. La protopina, que no había sido descrita para el maqui, es un alcaloide benzilisoquinolínico, típico representante de la familia Papaveraceae y que rompe el modelo estructural característico del género *Aristolina*. La irrupción de esta base, abre una nueva perspectiva en la interpretación biológica del maqui. El crudo de alcaloides presentó una significativa actividad analgésica, superior al ibuprofeno. La actividad analgésica de la protopina ha sido previamente reportada. El EM presentó una alta proporción de compuestos fenólicos, los que serían responsables de la capacidad atrapadora de radicales libre de este extracto. En relación a los resultados farmacológicos del EDM se puede plantear la hipótesis de que los **triterpenos** y **esteroides** contenidos en este extracto son los responsables en parte de la actividad antiinflamatoria y/o analgésica presentada por este extracto y la analgesia se debería a los alcaloides como la protopina. El infuso contiene **escopoletina**, cumarina con efectos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos previamente reportados y pigmentos antocianicos identificados como **delfidina-3-glucósido** y **cianidina-3-glucósido** los que fueron identificados por HPLC/masa, éstos serían los responsables de la actividad antioxidante. Además se evidenció la presencia de alcaloides y triterpenos.

Los resultados de las evaluaciones farmacológicas confirman que las hojas de esta especie presentarían las propiedades atribuidas por la medicina folclórica. La actividad antiinflamatoria de los EDM y EM podría llevarse a cabo preferentemente por inhibición de la ciclooxigenasa-2 ya que los efectos antiinflamatorios más importantes fueron frente a TPA. En relación a la actividad analgésica exhibida por los EDM y EM, frente a tres modelos distintos, ésta sería a través de un mecanismo principalmente periférico ya que los antagonista opiodes no afectaron en forma significativa los efectos antinociceptivos de los EDM y EM. **El uso de estos extractos obtenidos desde las hojas de maqui tiene muchas proyecciones en el campo de la dermatología y dermocosmética como antiinflamatorios, analgésicos y antioxidantes.**

III. INFORME TÉCNICO DE AVANCE (TEXTO PRINCIPAL)

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO:

Objetivos Generales

- ♦ Validar el uso de las hojas de *A. chilensis* proporcionando un respaldo científico a su uso como antiinflamatoria y analgésica, y demostrar sus potenciales efectos antimicrobianos y antioxidantes. Así se ampliará la información científica disponible sobre el maqui con miras a la completar su Monografía de calidad, seguridad y eficacia.
- ♦ Contribuir al conocimiento de la composición química de nuestra flora autóctona
- ♦ Identificar nuevas sustancias antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas
- ♦ Difundir los resultados que demuestren que esta especie nativa podría ser utilizada como fuente de nuevos fármacos y así fomentar el cultivo, explotación y comercialización de esta especie ya que se le dará un valor agregado al maqui

Objetivos Específicos

- 1) Recolección y obtención de los diferentes extractos a partir de las hojas
- 2) Determinar *in vivo* la actividad antiinflamatoria por vía tópica, de los diferentes extractos y sus fracciones.
- 3) Determinar la actividad analgésica tópica de los diferentes extractos y sus fracciones y determinar si la analgesia es por un mecanismo central o periférico.
- 4) Investigar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos y sus fracciones.
- 5) Determinar la actividad antioxidante de los diferentes extractos y sus fracciones
- 6) Identificar el **extracto farmacológicamente más activo** por vía tópica, y determinar sus potenciales efectos analgésicos y antiinflamatorio por vía oral con miras a futuro de un potencial uso *per os*.
- 7) Identificar en el **extracto farmacológicamente más activo** los principios activos
- 8) Demostrar la inocuidad del **extracto farmacológicamente más activo**.

2. METODOLOGÍA

2.1. Estudio anatómico de las hojas de maqui

(relacionado con el objetivo N° 1; Profesional responsable Dra. Carla Delporte)

Se realizaron cortes transversales de las hojas a mano alzada y en un micrótopo (espesor de los cortes 5 micrones) y fueron teñidos con rojo neutro. Se llevó a cabo un diafanizado de las hojas para obtener la epidermis. El diafanizado se realizó con hipoclorito de sodio (5% de cloro activo como hipoclorito de sodio en 95 % de agua blanda). Los cortes fueron observados en un microscopio óptico marca Zeiss.

2.2. Estudio químico:

(relacionado con el objetivo N° 7; profesional responsable Dr. Orlando Muñoz)

Se recolectaron e identificaron las hojas de maqui, después de secarlas y molerlas se prepararon los diferentes extractos seriados agotando el material vegetal a temperatura ambiente y en forma sucesiva, con hexano, diclorometano y metanol. De esta forma se obtuvieron los extractos de hexano (EH), diclorometánico (EDM) y metanólico (EM). La composición química de cada extracto fue analizada por c.c.f. y para identificar las principales familias de compuestos fueron utilizados los siguientes reactivos reveladores: Lieberman-Burchard (para identificar triterpenos, esteroides y flavonoides), Dragendorff (para identificar principalmente alcaloides) y vainillina / anisaldehído (para evidenciar la presencia de triterpenos). Los extractos fueron concentrados en un evaporador rotatorio (marca BÜCHI), a temperaturas de 50 a 60° C y a presión reducida; posteriormente fueron llevados sequedad (para eliminar completamente el disolvente antes de someterlos a los ensayos farmacológicos). Los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM) fueron fraccionados en repetidas columnas cromatográficas. A partir de otra cantidad de hojas (200 g) se preparó un infuso al 10% para someterlo a los ensayos farmacológicos. Con este fin se agregó agua hirviendo a las hojas frescas, se dejó macerar por 30 minutos, posteriormente fue filtrado y secado en corriente de aire tibio y estufa a presión reducida, su composición química fue determinada utilizando diferentes reactivos reveladores y por HPLC/masa.

2.3. Fraccionamiento y aislamiento de los principios activos

(relacionado con los objetivos N° 7; Profesionales responsables: Profesora Rosa Negrete y Orlando Muñoz)

Los extractos farmacológicamente activos fueron fraccionados por técnicas cromatográficas convencionales como: columnas de sephadex, columnas rápidas de gel de sílice, y preparativas de media presión, eluidas con mezclas de disolventes de polaridad creciente según sea el caso.

Se realizó un seguimiento de la composición química de las distintas fracciones por cromatografía en capa fina, usando distintos reactivos reveladores. Con el fin de aislar e identificar los principios activos, el estudio químico se realizó en forma bio-guiada y desde las fracciones farmacológicamente activas se aislaron, purificaron e identificaron los componentes mayoritarios, si no presentan estudios farmacológicos que permitan atribuirle los efectos encontrados y si hay cantidad disponible éstos serán sometidos a las evaluaciones farmacológicas para determinar si realmente son los responsables de los efectos farmacológicos encontrados en las fracciones.

La elucidación estructural de los diferentes compuestos aislados se realizó mediante estudios espectroscópicos, abarcando técnicas de resonancia magnética nuclear mono y bidimensional.

2.4. Estudio farmacológico

2.4.1. Evaluaciones farmacológicas *in vivo* por vía tópica de las actividades analgésicas y antiinflamatorias.:

Se llevaron a cabo las evaluaciones farmacológicas de:

- los extractos EH, EDM y EM.
- El infuso cuyos componentes mayoritarios fueron identificados como delfidina- 3 glucósido, cianidina 3- glucósido, alcaloides y en menor proporción escopoletina.
- una fracción denominada FADM obtenida del EDM constituida por principalmente por alcaloides, y en menor proporción presentó triterpenos y esteroides.
- un crudo de alcaloides (denominado C-ALC) obtenido de los EDM y EM cuyos componentes mayoritarios fueron identificados como protopina, aristotelina y un derivado de la aristotelina.

A.) Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía tópica:

(relacionado con los objetivos N° 2 y 7; Profesional responsable: Dra. Carla Delporte)

Se evaluó en ratones de 20 a 25 g de peso, a los que se les indujo inflamación dérmica con ácido araquidónico o 12-O-tetradecanoil forbol-13 acetato (TPA) (Lloret y Moreno, 1995). Los fármacos de referencia fueron la nimesulida e indometacina respectivamente. El ensayo de la actividad antiinflamatoria tópica frente a AA pesquiza los compuestos antiinflamatorios cuyo mecanismo de acción es principalmente por la inhibición de la ciclooxigenasa-1 y/o mieloperoxidasa y/o elastasa y/o NADPH oxidasa.

Por el contrario, la inflamación inducida por TPA es más lenta y se produce por activación del FN-kB, éste induce la síntesis de leucotrienos, además induce la expresión de iNOS y COX-2 enzimas que producen sustancias pro-inflamatorias como óxido nítrico y PGE₂ respectivamente, (Lloret y Moreno, 1995). Después de una hora de aplicado el AA y después de 4,5 horas de aplicado el TPA, se sacrificaron los animales y se les extrajeron porciones de orejas de 6 mm con un sacabocados tanto de la oreja derecha como de la oreja izquierda, y por diferencia de peso de ambas se determinó el peso del edema.

Los resultados son expresados como % de efecto \pm SEM. El efecto se calculó comparando la mediana de los pesos de los edemas de los animales que recibieron la muestra con la mediana de los pesos de los edemas de los animales controles (Delporte et al., 2003). La significancia de los efectos fue determinada por el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973).

- **Montaje del ensayo para evaluar *in vitro* de la participación de COX-2, iNOS en la acción antiinflamatoria y analgésica**

El mecanismo más importante involucrado en la respuesta antiinflamatoria y/o dolor asociado, es la inhibición de enzimas, como por ejemplo la COX-2 (productora de cantidades significativas de PGE₂) e iNOS (hiperproductora de óxido nítrico) (Serhan et al., 2005).

Es por esta razón que **estamos actualmente implementando** los ensayos para evaluar la potencial actividad de los EDM, EM, FADM, infuso y crudo de alcaloides en la expresión de estas enzimas proinflamatorias.

Se utilizarán células RAW264.7 de macrófagos de ratón obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection). Las células serán crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Se trabajará con diferentes grupos de células: **I)** células tratadas con LPS a 1 µg/ml (control positivo); **II)** células sin tratamiento con LPS (control negativo) y **III)** células tratadas con las muestras.

Viabilidad celular. La respiración celular se usará como indicador de la viabilidad celular en un ensayo basado en la reducción dependiente de la mitocondria de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) a formazán. Se realizarán en paralelo a los experimentos para evaluar la expresión enzimática. A cada pocillo se le adicionará 10 µL de solución de MTT y se incubarán por 4 h a 37 °C. Los cristales formazán formados en las células viables se disolverán con isopropanol acidificado (0,1 N HCl), después de 20 minutos de incubación, el índice de viabilidad celular se calculará midiendo la densidad óptica (OD) a 540 nm en un lector de microplacas. La viabilidad será expresada como % respecto al control (Mosnam, 1983)

Detección y cuantificación de COX-2 e iNOS. Para investigar el efecto de los EDM y EM sobre la expresión de COX-2 e iNOS las células de los grupos I, II y III se cultivarán en placas de 24 pocillos (5x10⁵ células/pocillo) y se realizarán curvas dosis-respuesta. Se pre-tratarán con cada una de las muestras a diferentes concentraciones entre 0 y 60 minutos, seguido de una estimulación con LPS (1 µg/ml) entre 6 y 24 hrs. Para cada condición se realizará un análisis inmunológico (immunowestern blot). Las células se lavarán y se les extraerán las proteínas con un amortiguador de lisis con los respectivos inhibidores de proteasas y fosfatasa.

El desecho celular se eliminará por centrifugación, al sobrenadante se le determinará el contenido de proteínas según Lowry et al., (1951) y se someterán a una electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7% según Laemmli (1970). El gel será electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa según Towbin et al., (1979). La membrana se tratará en forma secuencial con solución de bloqueo, lavado, el respectivo anticuerpo primario, lavado, anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y la reacción positiva se identificará usando el método de quimioluminiscencia (Walker et al., 1995), la membrana se expondrá frente a una placa fotográfica a diferentes tiempos.

Las señales resultantes serán escaneadas y cuantificadas mediante el programa "Uni-Scan-It Automated Digitizing System (USA)". Los resultados se visualizarán por la correspondencia del tamaño molecular para cada proteína. Como control de carga y para normalizar los datos se utilizará la detección constitutiva de β-actina en cada experimento, deshibridizando la membrana y sometiéndola al tratamiento con el anticuerpo anti-βactina, siguiendo el protocolo ya mencionado. El cambio en la expresión de las proteínas se determinará en relación al control de carga obtenido del análisis densitométrico.

B.) Evaluación de la actividad analgésica vía tópica:

- **Ensayo de la formalina en la cola**

(relacionado con los objetivos Nº 3 y 7; Profesional responsable: Dra. Carla Delporte)

Este ensayo identifica principalmente analgésicos periféricos. Se utilizaron ratones de la cepa CF/1 entre 20-25 g de peso de ambos sexos. La aplicación tópica consistió en sumergir durante 3 minutos la cola de los animales en una solución al 5% p/v de los extractos en DMSO y posteriormente se inyectaron 20 µL de formalina vía i.d. en el primer tercio de la cola. El efecto analgésico tópico fue calculado en base a la disminución del tiempo de lamidos de los animales tratados respecto del tiempo de lamidos de los animales controles (Kolesnikov et al., 2004). Con este fin, los ratones se observaron inmediatamente después de la inyección de formalina durante 5 minutos, en una cámara de vidrio, para contabilizar el tiempo de lamidos. Como fármaco de referencia se utilizó ibuprofeno. Los resultados son expresados como % de efecto analgésico ± SEM. La significancia de los efectos fue determinada por el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973).

- **Ensayo del latigazo de la cola del ratón (tail flick)**
(relacionado con los objetivos N° 3 y 7; profesional responsable Dr. Hugo Miranda)

Se utilizaron grupos de 6 ratones de ambos sexos, entre 28 ± 2 g, los cuales son ambientados a las condiciones del laboratorio dos horas previas al ensayo. Este ensayo identifica principalmente los analgésicos que actúan a nivel central. Se indujo un dolor agudo térmico mediante la aplicación de radiaciones I.R. que queman la cola del ratón en el punto de su incidencia. Este experimento se realizó mediante el uso de un algesiómetro (Ugo Basile, Italia), el que mide el tiempo que el animal es capaz de soportar el calor (tiempo de latencia), lo que es proporcional al efecto analgésico de la muestra (Miranda et al., 2003). Se determinaron y compararon los valores de los tiempos de latencia de los animales controles y los animales tratados.

Una vez administrada la muestra en estudio, la cual consistió en una solución del extracto al 5% p/v en DMSO, se sumergió la cola del animal por un tiempo de 3 minutos y posteriormente, se esperó 5 minutos antes de realizar la algesiometría. Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se construyeron curvas dosis-respuesta de las muestras administradas, las cuales se ensayaron a las concentraciones de 1,25% p/v; 2,5% p/v; 5% p/v y 10% p/v para cada uno de los extractos en estudio y para las FADM (fracción alcaloidea y triterpénica) y C-ALC (crudo de alcaloides) se utilizaron concentraciones menores.

Los resultados fueron expresados como la diferencia en el tiempo de latencia (media \pm S.E.M.) entre la media de las dos lecturas de controles y el tiempo de latencia experimental, datos con los cuales se calculó el MPE% (Maximun Possible Effect) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{MPE\%} = \frac{100 * (\text{Lat 2} - \text{Lat 1})}{(t \text{ cut-off} - \text{Lat 1})}$$

Donde: Lat 1 tiempo de latencia previo a la administración del extracto; Lat 2 tiempo de latencia posterior a la administración del extracto; T cut-off tiempo máximo de exposición de la cola al calor, el cual, es de 8 s.

Como fármaco de referencia se utilizó ibuprofeno (donado por el Laboratorio Basf-Chile S.A).

- **Determinación del mecanismo de acción de la actividad analgésica tópica por el ensayo del latigazo de la cola y utilizando fármacos antagonistas**
(relacionado con los objetivos N° 3 y 7; profesional responsable Dr. Hugo Miranda)

Los tres extractos de maqui fueron aplicados a la concentración que produce el 25 % de efecto analgésico (concentración efectiva 25 CE₂₅) y fueron las siguientes: EH al 3,5 %; EDM al 4,5 % y EM al 2,7 % , disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO).

Luego de administrar por vía i.p. los fármacos antagonistas de la actividad analgésica, se aplicó el extracto por vía tópica. Estos fármacos no presentan efecto analgésico significativo a las concentraciones utilizadas en este estudio. La diferencia entre el tiempo de la administración del antagonista y el extracto fue determinado previamente y esta relacionado con el tiempo en que el antagonista alcanza su efecto máximo. Todos los antagonistas fueron administrados 30 minutos antes del extracto, excepto el nor-binaltorfimina que debe ser administrado 60 minutos antes.

Los fármacos antagonistas utilizados fueron:

- Naltrexona (**NTX**) (1 mg/kg), antagonista no selectivo, pero con mayor afinidad a los receptores MOR de mayor potencia y duración de efecto entre los opioides
- Naltrindol (**NTI**) (1 mg/kg) antagonista selectivo de receptores DOR
- Nor-binaltorfimina (**nor-BNI**) (0,5 mg/kg) antagonista selectivo de receptores KOR, con tiempo de efecto máximo de 60 min

Antagonistas serotoninérgicos:

Tropisetron (**TROI**) (1mg/kg): inhibidor de receptores de serotonina 5-HT₃

Antagonistas adrenérgicos:

Prazosin (**PRAZO**) (0,1 mg/kg): antagonista de receptores adrenérgicos α_{1A}

Yohimbina (**YOH**) (0,01 mg/Kg): antagonista de receptores adrenérgicos α_2

Antagonista muscarínicos:

Atropina (**ATRO**) (1 mg/kg): antagonista de receptores muscarínicos colinérgicos

Antagonista no selectivo de NOS:

N-nitro- L-arginina metil ester (**L-NAME**) (5 mg/kg)

PROCEDIMIENTO:

Animales controles: son aquellos animales a los que se les administra el extracto y no el antagonista. Sólo se les inyecta suero fisiológico vía i.p. y posteriormente se procedió a sumergir la cola del animal en la solución del extracto de maqui a evaluar por un tiempo de 3 minutos y posteriormente a los 5 minutos se realizó la algesiometría.

Animales tratados: son aquellos animales a los que se les administró el fármaco antagonista, y posteriormente se procedió a sumergir la cola del animal en la solución del extracto correspondiente por un tiempo de 3 minutos y posteriormente se esperó 5 minutos antes de realizar la algesiometría.

ANALISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados fueron expresados como la diferencia en el tiempo de latencia (media \pm S.E.M) entre la media de las dos lecturas controles y el tiempo de latencia experimental, datos con los cuales se calculó el % (Maximun Possible Effect o MPE) mediante la siguiente fórmula:

$$MPE\% = \frac{100 * (Lat 2 - Lat 1)}{(t \text{ cut off} - Lat 1)}$$

Donde: Lat 1: tiempo de latencia previa de la administración del antagonista y del extracto

Lat 2: tiempo de latencia posterior de la administración del extracto, previo tratamiento con antagonista

T cut- off: tiempo máximo de exposición de la cola al calor, el cual es 8 seg.

Los resultados se presentaron como el promedio \pm SEM y fueron analizados estadísticamente mediante el test de student para datos no pareados. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

C.) Evaluación de las actividades antiinflamatorias y analgésica por vía oral

- Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral. Ensayo del edema plantar inducido por λ -carragenano**

(relacionado con el objetivo N° 6; Profesional responsable: Dra. Nadine Backhouse)

En la propuesta original este ensayo se realizaría en el extracto más activo, pero debido a que fueron dos los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM), fueron evaluados ambos. Las pruebas se realizaron en cobayos, cepa Pirbright, de 200-300 g de peso a los que se les indujo un edema plantar inyectando de 0,1 mL de una solución salina estéril de λ -carragenano al 1% en la aponeurosis. El porcentaje de inflamación se calculó con el volumen inicial y el volumen final que es medido a las 3 horas después de la inyección de λ carragenano.

El porcentaje de efecto antiinflamatorio se determinó en base al % de inflamación control promedio, vale decir al obtenido con 16 animales a los cuales se les inyectó λ -carragenano sin administrar la muestra y el % de inflamación promedio obtenido con los 8 animales tratados. El fármaco de referencia fue naproxeno sódico. La significancia de los efectos fue determinada por

el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973, Backhouse et al., 1994). Fueron evaluados los extractos farmacológicamente más activos como antiinflamatorios por vía tópica como lo fueron los EDM y EM.

- **Evaluación de la actividad analgésica vía oral. Ensayo de las contorsiones abdominales**

(relacionado con el objetivo N° 6 y 7; Profesional responsable: Dra. Carla Delporte)

En la propuesta original este ensayo se realizaría en el extracto más activo, pero debido a que fueron dos los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM), fueron evaluados ambos. Este ensayo pesquisa la actividad de sustancias analgésicas que actúan por vía periférica y central. En la propuesta original este ensayo se realizaría en el extracto más activo, pero debido a que fueron dos los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM) ambos extractos fueron evaluados.

La actividad analgésica se evaluó en ratones de 20-25 g, a los que se les indujo contorsiones abdominales por la administración intraperitoneal de 10 mL/kg de ácido acético al 0,6%. El dolor producido se determinó contando las contorsiones que presenta el animal después de 5 minutos de la inyección y durante 5 minutos. El número de animales en cada ensayo fue de 8 y se compararán las respuestas con 16 controles (Miranda et al., 2002; Nakamura y Shizimu, 1981).. Para los ensayos de analgesia se utilizará como fármaco de referencia naproxeno sódico (Delporte et al., 2005). La significancia de los efectos farmacológicos fue calculada por el método de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973).

D.) Evaluación de la inocuidad

En la propuesta original este ensayo se realizaría en el extracto más activo, pero debido a que fueron dos los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM), fueron evaluados ambos. Los extractos farmacológicamente más activo fueron sometido a los siguientes ensayos para determinar su inocuidad.

- **Evaluación del potencial irritante y sensibilizante. Método de Draize**

(relacionado con el objetivo N° 8; Profesionales responsables: Mg Olosmira Correa y Mg Edda Costa)

Este ensayo fue realizado en conejas albinas neozelandesas, si en este estudio los extractos farmacológicamente más activo no presentan efectos irritantes podrían ser evaluado a futuro en voluntarios sanos y sensibles con miras a desarrollar a partir de éstos un producto dermatológico.

Para realizar este ensayo se depiló la superficie dorsal de 6 conejos angora albinos de sexo femenino con un clipper eléctrico. Para la evaluación de cada muestra fueron utilizados 6 animales. Se desinfectó el lomo de cada uno de ellos con alcohol de 70°, y fueron inmovilizados en cepos.

Se trazó una línea central a lo largo de cada conejo con un lápiz quirúrgico para observar al animal desde la cabeza hasta el rabo desde dos áreas: la izquierda, denominada A y la derecha, denominada B. Se realizó sobre el área dorsal B de cada animal, una leve abrasión con una aguja 21G x 1½, desechando y cambiando la aguja entre cada animal.

Se colocaron 12 parches (Finn Chambers) sobre un mesón sanitizado con alcohol 70° en posición vertical con las cámaras de aluminio hacia abajo y se dibujó una línea recta a lo largo de cada parche, siendo A el área izquierda y B la derecha.

Se aplicaron sobre las cámaras 20 µL de cada uno de las muestras (la concentración a evaluar fue la concentración máxima posible de disolver en 20 µL en etanol o agua). Cada muestra se aplicó tanto en el área A (piel intacta) como en el área B (piel con abrasión). Además tanto en las áreas A y B se estableció la llamada zona control que fue la zona sin tratamiento (sin aplicar la muestra). Luego, se invirtió cada uno de los parches, se quitó el protector y se colocaron los parches sobre la mesa con las cámaras de aluminio hacia arriba. Se mantuvo una tira angosta de papel protector sobre la cinta hasta que ésta fue fijada sobre la piel.

Se aplicó el parche desde la parte inferior, presionando las cámaras desde abajo hasta arriba, para que salga el aire, haciendo coincidir la línea dibujada sobre el parche con la dibujada sobre el lomo del conejo. Una vez aplicada la cinta, se presionó cada una de las cámaras con las muestras con el dedo para que se distribuyesen uniformemente dentro de ésta.

Se presionó suave, pero firmemente con la palma de la mano contra el dorso del animal, especialmente en las esquinas, para asegurar una buena adherencia.

Se consignó la fecha y hora de aplicación de los parches y se mantuvieron a los animales en sus respectivas jaulas con temperatura adecuada a 20 ° C y permitiéndoles ingerir agua y comida durante el tiempo que duró el estudio.

Se removieron los parches después de 24 h de contacto con los productos y se evaluaron los resultados, usando una lupa, según la TABLA 1. Posterior al examen, se aplicaron las muestras nuevamente, usando la misma técnica descrita anteriormente.

La evaluación fue repetida a las 48 y 72 h después de iniciado el ensayo y se calculó el SPI (registro de irritación primaria) en cada conejo tanto en el área con la piel intacta y con abrasión.

TABLA 1. EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN PRIMARIA DE LA PIEL DE CONEJO

VALOR	ERITEMA	EDEMA
0	sin eritema	sin edema
1	eritema levemente perceptible	edema levemente perceptible
2	eritema bien definido	edema leve, con orillas bien definidas por un levantamiento de piel definido
3	eritema moderado a severo	edema moderado; levantamiento de piel de 1 mm aproximadamente
4	eritema severo y con llagas	edema severo; levantamiento de piel mayor a 1 mm, expandido en toda el área de exposición.

- **Determinación del valor de irritación primaria (SPI) e índice de irritación primaria (PII)**

En la TABLA 1 se resumen las categorías de las posibles respuestas de la piel de conejo al contacto con las muestras en estudio, dándose un valor de 0 a 4 según la intensidad del edema o del eritema desencadenado durante la prueba de irritación. El valor máximo posible de la sumatoria de ambos parámetros corresponde a un total de 8 (Mazzanty et al., 2005).

El valor de irritación primaria (SPI) en cada conejo, corresponde a la suma de los valores de eritema y edema (a las 24, 48 y 72 h), dividido por el número de observaciones, de la zona tratada menos los valores de eritema y edema, (a las 24, 48 y 72 h.), dividido por el número de observaciones de la zona control. Estos cálculos se pueden resumir en la siguiente ecuación:

$$\text{SPI} = \frac{[\sum (\text{Er.} + \text{Ed.})_{24 \text{ h}} + (\text{Er.} + \text{Ed.})_{48 \text{ h}} + (\text{Er.} + \text{Ed.})_{72 \text{ h}}] \text{Z.t}}{\text{Numero observaciones}} - \frac{[\sum (\text{Er.} + \text{Ed.})_{24 \text{ h}} + (\text{Er.} + \text{Ed.})_{48 \text{ h}} + (\text{Er.} + \text{Ed.})_{72 \text{ h}}] \text{Z.c}}{\text{Numero Observaciones}}$$

Ecuación. Cálculo del valor del SPI (irritación primaria) mediante el Test de Draize

Donde:

Er eritema; Ed edema; Z.t zona tratada; Z.c zona control.

El PII (índice de irritación primaria) fue calculado como la media aritmética de los valores de irritación primaria (SPI) determinada en los 6 animales. Se calculó un PII para cada una de las muestras en piel intacta y otro PII para la piel con abrasión

Según el valor del PII obtenido para cada muestra, ésta será clasificado de acuerdo con TABLA

TABLA 2. CATEGORÍAS DE PII (ÍNDICE DE IRRITACIÓN PRIMARIA)

VALOR	PII
0- 0,4	imperceptible
0,5 – 1,9	Levemente irritante
2- 4,9	Moderada irritación
5 - 8	irritación severa

- **Evaluación de la toxicidad aguda, reacciones adversas y efectos sobre los principales órganos**

(relacionado con el objetivo N° 8; Profesional responsable: Dra. Carla Delporte)

En la propuesta original este ensayo se realizaría en el extracto más activo, pero debido a que fueron dos los extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM), fueron evaluados ambos. Se evaluó la toxicidad de los **dos extractos** farmacológicamente más activo (EDM y EM) a través de la administración de una dosis alta (2 g/kg) de éste suspendido en goma arábica salina al 5% en volúmenes de 0,4 mL para ratones de 25 g de peso. Los animales se mantuvieron en observación por catorce días con alimentación y agua de forma habitual, controlando su peso diariamente (Delporte et al., 1998). Luego de la administración de los extractos, los animales fueron observados para determinar la aparición de signos clínicos y mortalidad teniendo como referencia al grupo control.

Los signos clínicos observados fueron siguientes:

Signos motores: movimientos, convulsiones, caída del tren posterior, somnolencia.

Signos respiratorios: jadeos y cianosis.

Signos gastrointestinales: diarrea y emesis

Salivación:

Pilo-erección:

Los animales fueron pesados diariamente, para comparar estadísticamente los pesos de los ratones tratados y los controles, con el fin de detectar si hubo diferencia entre ambos grupos.

Una vez culminado el período de observación todos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se realizó un análisis macroscópico de los diferentes órganos comparándolos con los órganos de los animales del grupo control (Jiménez y Padilla, 1999).

Las alteraciones patológicas ha observar fueron: cambios significativos de tamaño, coloración y de textura, acúmulo de líquidos en cavidades naturales (ascitis y/o hidrotórax) comparados con el grupo control (Burger, 2005). Los órganos observados fueron: esófago, estómago, intestino delgado, hígado, riñón, cerebro, bazo, páncreas, gónadas, corazón y pulmones.

Todos los ensayos in vivo se realizaron con la autorización del Comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Medicina y del Instituto de Salud Pública de Chile. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados cuyo valor de p es $\leq 0,05$.

2.4.2.) Evaluaciones farmacológicas *in vitro* para evaluar las actividades antioxidantes y antimicrobianas

A.) Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres. Ensayo de decoloración de DPPH.

(relacionado con los objetivos N° 5 y 7; Profesional Responsable Dra. Nadine Backhouse)

El bioensayo se fundamenta en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) de color violeta intenso, al ser capturado forma un compuesto estable incoloro. Es posible cuantificar la capacidad capturadora de radicales libres que poseen distintas sustancias mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH (Amié et al., 2003).

Para ello se utilizó una solución metanólica recién preparada del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) de 20 mg/L. Se prepararon soluciones metanólicas de las muestras dentro de un rango de concentraciones de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$ de acuerdo a la actividad encontrada. Se mezclaron volúmenes de 750 μL de DPPH y 375 μL de soluciones de las muestras por triplicado, para luego de cinco minutos leer la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, comparando éstas con la absorbancia del radical DPPH (A control).

El cálculo del % de decoloración se determinó según la fórmula:

$$\% \text{ decoloración} = 1 - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco de la muestra}) / (A \text{ control}) \times 100$$

El grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como captadoras de radicales libres. Como compuesto de referencia de captador de radicales libres se utilizó la quercetina usando concentraciones entre 1,25 a 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Para los compuestos aislados se determinó la CE50 (concentración efectiva cincuenta). Los valores son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones (Feresin *et al.*, 2002, Schmeda-H. *et al.*, 2003).

B.) Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la xantino oxidasa (relacionado con el objetivo N° 5 y 7; Profesional responsable Dra. Carla Delporte)

La xantino oxidasa (XO) de SIGMA, es una enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y ácido úrico, al mismo tiempo y en presencia de oxígeno se produce la reducción de éste, generando el radical libre anión superóxido. En la fase de reperfusión de un tejido previamente isquémico, XO produce grandes cantidades de anión superóxido capaces de producir la lipoperoxidación de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares conllevando a la lesión de ellas. Para evaluar la actividad de la XO, se midió la absorbancia (A) de su producto, el ácido úrico en un espectrofotómetro UNICAM, el que presenta una máxima A a una λ de 290 nm (Kalcklar, 1947).

La solución de xantina (X) se preparó a la concentración de 0,15 mM en agua bidestilada sonicando durante 2 a 3 horas a 60°C. La enzima se utilizó a la concentración de 0,006 U/mL a un pH = 7,5. Con este fin se utilizó un amortiguador constituido por Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 ambas a una concentración de 70 mM. Para determinar la concentración de enzima a utilizar se ensayó a distintas concentraciones para obtener el gráfico A vs concentración. La concentración de enzima que dió la A requerida para trabajar (0,300-0,400) fue de 0,006 U/mL.

Los extractos fueron evaluados a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Theoduloz *et al.*, 1991). A las muestras en estudio se les adicionó 3 a 4 gotas de DMSO y a continuación el agua bidestilada, sonicando cuando se requirió para lograr la solubilidad. Las muestras fueron evaluadas en duplicado. Para finalizar el ensayo se utilizó HCl 1 N (40,9 mL de ácido concentrado en 500 mL de agua bidestilada). El protocolo del ensayo se detalla en TABLA 3.

TABLA 3. Protocolo del ensayo de inhibición de la xantino oxidasa

REACTIVOS	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
1. Extracto	—	—	1 mL	1 mL
2. Agua bidestilada	1 mL	1 mL	—	—
3. Buffer	2,9 mL	3 mL	2,9 mL	3 mL
4. Xantino Oxidasa	0,1 mL	—	0,1 mL	—
Preincubación a 25 °C por 15 minutos.				
5. Xantina	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Incubación a 25° C por 30 minutos.				
6. HCl	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Medición de la A del ácido úrico a 290 nm	Ac. úrico total	Blanco de A	Ac. Úrico remanente	Blanco de C
VOLUMEN TOTAL	7 mL	7 mL	7 mL	7 mL

Una vez agregados los reactivos 1, 2, 3 y 4 se preincubaron las mezclas a 25°C por 15 minutos. A continuación se adicionó a todos los tubos X y se incubó a 25°C por 30 min (para que la X esté a la temperatura de las muestras se colocó en el baño junto con éstas). Para finalizar, la reacción fue detenida con HCl y se procedió a leer la absorbancia (A) del ácido úrico a 290 nm (Noro *et al.*, 1992) en un espectrofotómetro UNICAM (Kalcklar, 1947).

El porcentaje de inhibición de la XO (%I_{xo}) se calculó según la siguiente ecuación:

$$\%I_{xo} = [(Aa - Ab) - (Ac - Ad) / (Aa - Ab)] * 100$$

Donde: **A** absorbancia; **Aa** absorbancia del tubo a; **Ab** absorbancia del tubo b; **Ac** absorbancia del tubo c; **Ad** absorbancia del tubo d; **Aa-Ab**: absorbancia del ácido úrico total; **Ac-Ad** absorbancia del ácido úrico remanente

El fármaco de referencia utilizado fue el alopurinol y para determinar su concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) se ensayaron diferentes concentraciones de este fármaco. Del gráfico % Inhibición vs concentración se obtuvo el CI₅₀ que resultó ser 0,035 µg/mL. La significancia de los resultados se calculó con el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos para un p ≤ 0,05. Los resultados son expresados como % de inhibición ± D.S. y son calculados mediante el promedio de dos determinaciones.

C.) Evaluación de la actividad antimicrobiana

(relacionado con el objetivo N° 4 y 7; profesional responsable Prof. Silvia Erazo)

Se evaluó la actividad antimicrobiana por el bioensayo de siembra radial y bioautografía, frente a distintas cepas bacterianas Gram (+) y (-) y de hongos (Erazo et al., 2002).

Todas las cepas microbianas utilizadas fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) a excepción de *Klebsiella pneumoniae* que proviene de aislamientos clínicos. Dentro de las bacterias Gram negativas se incluyen *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella aviátum* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14207) y dentro de las Gram positivas se incluyen *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Micrococcus flavus* (ATCC 10290) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). El panel de hongos estuvo constituido por *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* (ATCC 10231) (Erazo et al., 2002).

3. ACTIVIDADES DEL PROYECTO:

No hubo discrepancias entre las actividades programadas y las efectuadas. Los logros alcanzados fueron mayores a los planteados en la propuesta original.

4. RESULTADOS DEL PROYECTO:

4.1.) DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DE LAS HOJAS DE MAQUI

En los cortes transversales de las hojas se observó las células epidérmicas constituidas por una capa de células (ambas epidermis monoestratificadas) con una membrana cuticular delgada y los estomas se presentaron a nivel de la superficie epidérmica. No presentó pelos tectores tanto en la epidermis superior como en la inferior. A continuación debajo de la epidermis en el haz se observó el parénquima en empalizada constituido por dos capas de células y a continuación se ve un abundante parénquima esponjoso con amplios espacios intercelulares. En el nervio medio se identificó colénquima laminar, ya que los engrosamientos celulósicos de la pared celular de las células colenquimáticas se ven distribuidos uniformemente. Sobre el floema se pudieron apreciar fibras lignificadas en forma abundante.

4.2.) ESTUDIO QUÍMICO

4.2.1.) PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS, RENDIMIENTOS Y FAMILIAS DE COMPUESTOS PRESENTES

Las hojas de *Aristolelia chilensis* fueron recolectadas en el mes de diciembre en el Campus Juan Gómez Millas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Se guardó un testigo en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (SQF 22257).

Se recolectaron un total de 3,805 kg de hojas de maqui (en la primera parte del proyecto fueron recolectadas 1,105 kg y en una segunda etapa 2,700 kg de hojas). Después de secarlas y molerlas se prepararon los diferentes extractos seriados agotando el material vegetal a temperatura ambiente y en forma sucesiva, con hexano, diclorometano y metanol. Los rendimientos fueron para el extracto hexánico (EH) 1,3 %, extracto diclorometano (EDM) 6,7 % y extracto metanólico (EM) 9,9 %. El infuso presentó un rendimiento de 25%.

Los sistemas de desarrollo de las c.c.f. de los distintos extractos fueron:

EH: diclorometano: acetato de etilo (8:2)

EDM: diclorometano: acetato de etilo (8:2)

EM: Acetato de etilo: metanol (9:1)

Infuso: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (10:1,2:1,2:2,6)

Los resultados del estudio químico por cromatografía en capa fina (c.c.f.) de los distintos extractos se presentan en la TABLA 1

TABLA 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO QUÍMICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (C.C.F.) DE LOS EH, EDM, EM e INFUSO

Metabolitos Secundarios	Revelador	EH	EDM	EM	FADM	Infuso
Alcaloides	Dragendorff	-	+	++	++	++
Triterpenos	Lieberman Burchard	+	++	-	+	+
Esteroides	Lieberman Burchard	+	+	-	+	-
Triterpenos	p-anisaldehído	+	++	-	+	+
Compuestos fenólicos	NP/PEG (UV 365 nm)	-	+	+++	-	+++
Cumarinas o flavonoides	Vapores de amoniaco (UV 365 nm)	-	-	-	-	+

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; FADM fracción alcaloidea, triterpénica y esteroidal obtenida desde el EDM; +++ presenta mayor cantidad del compuesto; ++ presenta menor cantidad del compuesto; + presenta escasa cantidad del compuesto; - no presenta el compuesto.

En el EM e infuso, los metabolitos encontrados en mayor cantidad fueron los compuestos fenólicos y alcaloides. El EDM concentró la mayor cantidad de compuestos del tipo triterpenos y en menor cantidad compuestos esteroidales, fenólicos y alcaloides.

4.2.3.) FRACCIONAMIENTO DE LOS EDM, EM E INFUSO E IDENTIFICACIÓN DE LOS POTENCIALES PRINCIPIOS ACTIVOS

Desde el EDM (45 g) se obtuvo una fracción constituida por alcaloides, triterpenos y esteroides (denominada FADM) por repetidas columnas cromatográficas de sílica gel (5 – 40 μ m) y sephadex y eluyendo con mezclas de polaridad creciente de n-hexano – EtOAc – MeOH. La cantidad obtenida de FADM a partir del EDM fue de 4,9 g lo que equivale a un rendimiento de 10,9%. El sistema de disolvente para la c.c.f. utilizada para cromatografiar la FADM fue diclorometano 100% y gotas de NH₃.

Desde los EDM y EM por fraccionamiento en columnas cromatográficas de sephadex, sílica gel y de óxido de aluminio y eluyendo con mezclas de hexano-acetato de etilo metanol se obtuvo un crudo de alcaloides denominado C-ALC (cuyo rendimiento fue de 50 mg/kg de hojas seca). Desde éste fueron aislados y purificados por placas preparativas de sílica gel y óxido de aluminio tres alcaloides mayoritarios, identificados inambiguamente por estudios espectroscópicos de RMN como: **protopina, aristotelina y un derivado de la aristotelina**. La protopina, que no había sido descrita para el maqui, es un alcaloide benzilisoquinólico, (N-metildibenz[c,g]azecina-13-ona) típico representante de la familia Papaveraceae y que rompe el modelo estructural característico del género *Aristolelia*. La característica estructural de las bases del género *Aristolelia*, es una unidad monoterpénica no reordenada conectada a una triptamina. La irrupción de esta base, abre una nueva perspectiva en la interpretación biológica del maqui. Este alcaloide fue identificado además por espectrometría de masas de baja y alta resolución, análisis de C-13 y por espectros bidimensionales heteronuclear: ROESY, HMQC y HMBC.

La actividad analgésica de la **protopina** ha sido previamente reportada por Zhongguo (1993) y el mecanismo de acción iría por vía opioide, canales de calcio y mecanismos adrenérgicos.

Los compuestos triterpénicos y esferoidales detectados en el EDM, están en proceso de identificación.

En el infuso fueron identificados por HPLC/masa dos pigmentos antociánicos: **delfidina-3 glucósido** y **cianidina -3 glucósido**. Ambos pigmentos están presentes en también en el EM de las hojas y en los frutos; además este extracto acuoso presentó una cumarina, identificada como **escopoletina**.

La escopoletina exhibe efectos antiinflamatorios tópicos, antipiréticos y analgésicos previamente reportados (Silván et al., 1996; Hussein y Samuelsson, 1992; Delporte et al., 1998).

4.3. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES POR VÍA TÓPICA DE LAS ACTIVIDADES ANTIINFLAMATORIAS

Como antiinflamatorio tópico frente a TPA los extractos presentaron los resultados mostrados en la TABLA 2.

TABLA 2. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA TÓPICA FRENTE A TPA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS Y FADM DE HOJAS DE MAQUI E INDOMETACINA

Muestra	Dosis mg/oreja	Mediana EDEt	n	Mediana EDEc	N	%EAIT ± SEM	p
EH	3	0,0038	8	0,0053	16	28,3 ± 15,4	0,0405
EDM	3	0,0018	8	0,0053	16	63,9 ± 10,3	0,0022
EM	3	0,0018	8	0,0049	16	66,0 ± 12,1	0,0046
Infuso	3	0,0048	8	0,0049	16	1,0 ± 13	0,5366
FADM	1	0,0097	8	0,0059	16	-64,4 ± 8,8	0,9813
Indometacina	0,5	0,0007	8	0,0099	16	↑92,9 ± 3,2	0,0003

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; FADM fracción alcaloidea, triterpénica y esteroidal de EDM; indometacina fármaco de referencia; mediana EDEt mediana del edema en el grupo muestra; mediana EDEc mediana del edema del grupo control; n número de animales tratados para cada ensayo; N número de animales controles para cada ensayo; % EAIT ± SEM porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico ± error estándar de la media; p significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$; ↑ efecto máximo.

Al analizar los resultados presentados de la TABLA 2, se puede concluir que el EM (66,0%) y el EDM (63,9%) son los extractos más activos como antiinflamatorios tópicos frente a TPA, mientras que el EH presenta baja actividad (28,3%). El Infuso y FADM no presentan actividad. Sin embargo el EM mostró un efecto menor al efecto máximo presentado por el fármaco de referencia (indometacina).

Los efectos antiinflamatorios tópicos frente a AA de los diferentes extractos se muestran en la TABLA 3.

TABLA 3. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA TÓPICA FRENTE A AA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS, INFUSO Y FADM DE ARISTOTELIA CHILENSIS Y NIMESULIDA

Muestra	Dosis mg/20µL/oreja	m.e.m	n	m.e.c	N	%EAIT ± SEM	p
EH	3	0,0046	8	0,0065	16	30 ± 26,8	0,0432
EDM	3	0,0052	8	0,0065	16	31,5 ± 8,7	0,0078
EM	3	0,0045	8	0,0065	16	20,0 ± 15,7	0,0890
Infuso	3	0,0029	8	0,0065	16	56,2 ± 6,6	0,0001
FADM	1	0,0078	8	0,0070	16	-11,5 ± 6,0	0,6433
nimesulida	1	0,0050	8	0,0085	16	↑48,8 ± 4	0,01

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; FADM fracción alcaloidea, triterpénica y esteroidal de EDM; nimesulida fármaco de referencia; m.e.m mediana del edema en el grupo muestra; m.e.c mediana del edema del grupo control; n número de animales tratados para cada ensayo; N número de animales controles para cada ensayo; % EAIT ± SEM porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico ± error estándar de la media; p significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$; ↑ efecto máximo

En relación a la evaluación de la actividad antiinflamatoria frente a AA, vemos en la TABLA 3, que es el Infuso (56,2%) el que alcanza el mayor efecto antiinflamatorio tópico (efecto mayor que el efecto máximo exhibido por el fármaco de referencia), seguido por EDM (31,5%) y EH (30%) que presentan efectos menores; el EM (20%) tiene una leve actividad, todos estos

valores son significativos por presentar un $p \leq 0,05$. La FADM no presentó actividad en este ensayo.

4.4. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES POR VÍA TÓPICA DE LAS ACTIVIDADES ANALGÉSICAS MEDIANTE EL ENSAYO DE LA FORMALINA EN LA COLA.

En la TABLA 4 se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de la actividad analgésica tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola.

TABLA 4. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA VÍA TÓPICA MEDIANTE ENSAYO DE LA FORMALINA EN LA COLA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE HOJAS DE MAQUI Y FÁRMACO DE REFERENCIA

EXTRACTO (dosis)	% p/v (DMSO)	Med TLM (seg)	N	Med TLC (seg)	N	% AT \pm SEM	p
EH	5	31,5	8	43,5	16	27,6 \pm 5,4	0,000134
EDM	5	15,5	8	43,5	16	59,7 \pm 11,3	0,000119
EM	5	11,0	8	43,5	16	74,1 \pm 7,6	4,44E-05
Infuso	5	19,5	8	43,5	16	55,2 \pm 5,3	0,000119
ibuprofeno	5	11,5	8	49,0	16	\uparrow 76,5 \pm 6,3	4,44E-05

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; % p/v (DMSO) concentración en p/v del extracto en dimetilsulfóxido; Med TLM mediana del tiempo de lamidas muestras; Med TLC mediana del tiempo de lamidas de controles; n número de animales tratados para cada ensayo; N número de animales controles para cada ensayo; % AT \pm SEM porcentaje de analgesia tópica \pm error estándar de la media; p significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$; \uparrow efecto máximo

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de la formalina en la cola (TABLA 4), muestran que el mayor efecto analgésico lo exhibió el EM (74,1 %), cuya actividad es cercana al efecto máximo del fármaco de referencia (ibuprofeno 76,5 %) seguido por el EDM (59,7 %) y el Infuso (55,2 %). El EH presentó baja actividad (27,6%).

4.5. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES POR VÍA TÓPICA DE LAS ACTIVIDADES ANALGÉSICAS POR EL MÉTODO DEL LATIGAZO DE LA COLA (TAIL FLICK)

Al analizar los resultados presentados en la TABLA 5, se puede concluir que todos los extractos presentaron un efecto analgésico dosis- dependiente frente al ensayo del latigazo de la cola. Los efectos máximos de los extractos se produjeron a la concentración de un 10% y para la FADM esta concentración fue de un 1%. El mayor efecto analgésico lo presentó la FADM (58,2%), y con efectos menores los EM (55,2 %), EH (46,5%) y EDM (37,8%).

TABLA 5. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA VÍA TÓPICA MEDIANTE ENSAYO LATIGAZO DE LA COLA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE MAQUI A DISTINTAS CONCENTRACIONES E IBUPROFENO

Muestra	n	% p/v (DMSO)	% AT \pm SEM	p
EH	6	1,25	9,3 \pm 3,6	0,000
	6	2,5	17,4 \pm 3,3	0,000
	6	5	26,6 \pm 2,4	0,000
	6	10	\uparrow 46,5 \pm 6,5	0,000
EDM	6	1,25	8,4 \pm 2,4	0,000
	6	2,5	15,9 \pm 4,5	0,000
	6	5	24,3 \pm 3,8	0,000
	6	10	\uparrow 37,8 \pm 3,8	0,000
EM	6	1,25	9,9 \pm 2,3	0,000
	6	2,5	21,1 \pm 1,4	0,000
	6	5	37,3 \pm 3,0	0,000
	6	10	\uparrow 55,2 \pm 4,3	0,000
FADM	6	1,25	12,0 \pm 3,8	0,000
	6	2,5	24,0 \pm 3,0	0,000
	6	5	40,5 \pm 5,2	0,000
	6	10	\uparrow 58,2 \pm 4,8	0,000
ibuprofeno	6	5	\uparrow 50,0 \pm 0,1	0,000

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; FADM fracción alcaloidea, triterpénica y esteroidea de EDM; ibuprofeno fármaco de referencia; n número de animales utilizados para cada ensayo; % p/v (DMSO) concentración en p/v del extracto en dimetilsulfóxido; % AT \pm SEM porcentaje de analgesia tópica \pm error estándar de la media; p significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$; \uparrow efecto máximo

TABLA 6. VALORES DE CE₂₅ PARA ANALGESIA TÓPICA MEDIANTE EL ENSAYO DEL LATIGAZO DE LA COLA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS, FADM E IBUPROFENO

Extracto	CE ₂₅ ± SEM.
EH	3,5 ± 0,5
EDM	4,5 ± 0,4
EM	2,7 ± 0,2
FADM	0,2 ± 0,0
ibuprofeno	0,8 ± 0,1

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; FADM fracción alcaloidea de EDM; **ibuprofeno** fármaco de referencia; CE₂₅ concentración a la que se produce el 25% del efecto máximo; SEM error estandar de la media

En la TABLA 6 se muestra el valor de la CE₂₅ de la FADM, y es la más baja, incluso menor que la del fármaco de referencia. **La FADM sería mejor analgésico que los extractos.**

El CE₂₅ del EM es la más baja en comparación con las CE₂₅ de los EH y EDM, lo que implica que EM exhibe un 25% efecto analgésico a una menor concentración en comparación con los otros extractos, sin embargo el CE₂₅ del EM es mayor que el del fármaco de referencia (ibuprofeno).

TABLA 7. ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL CRUDO DE ALCALOIDES (C-ALC) MEDIANTE ENSAYO TAIL FLICK

Concentración % p/v Crudo alcaloides	% MPE ± SEM
0,25	12,44 ± 3,47
0,50	28,8 ± 3,0
0,75	31,9 ± 3,0
1,0	39,2 ± 6,5

Donde: MPE efecto máximo posible

FIGURA 1: CURVA % EFECTO MÁXIMO POSIBLE (% MPE) VS CONCENTRACIÓN DEL CRUDO DE ALCALOIDES

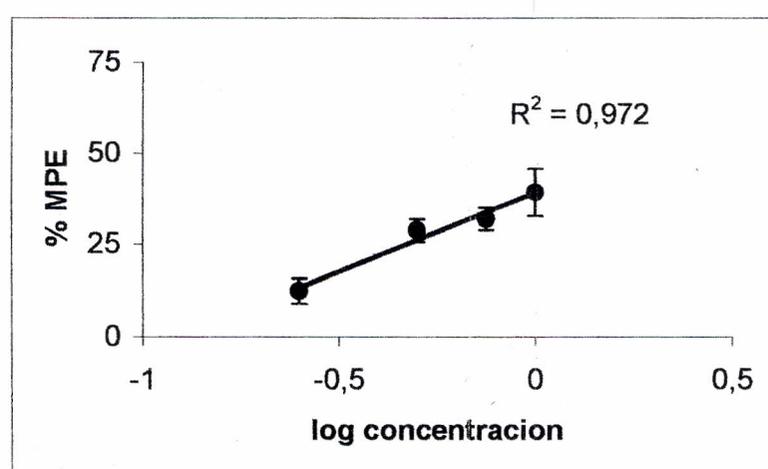


TABLA 8. CE₂₅ ANALGÉSICA DEL CRUDO DE ALCALOIDES E IBUPROFENO MEDIANTE ENSAYO DEL LATIGAZO DE LA COLA

muestra	CE ₂₅ (% p/v) ± SEM
crudo de alcaloides	0,5 ± 0,1
FADM	0,2 ± 0,0
ibuprofeno	0,8 ± 0,1

Como se ve en la TABLA 7 y FIGURA 1, la actividad analgésica del crudo de alcaloides es dependiente de la concentración y en la TABLA 8, se puede observar que la actividad del crudo de alcaloides fue mayor a la del ibuprofeno, lo que demuestra que los alcaloides son responsables en parte de la actividad analgésica. La FADM presentó mayor actividad que el C-ALC, y esto podría deberse a que el efecto analgésico de los alcaloides en la FADM se potenciaría con la presencia de los triterpenos y/o esteroides de esta fracción.

• **RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANALGÉSICO POR EL ENSAYO DEL LATIGAZO DE LA COLA FRENTE A DISTINTOS ANTAGONISTAS DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA**

En TABLAS 9, 10 y 11 se resumen los cambios de los efectos analgésicos de los extractos con el pretratamiento con los diferentes antagonistas de la actividad analgésica.

TABLA 9: EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS SOBRE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EH EN EL MODELO DEL LATIGAZO DE LA COLA

EH	% Efecto analgésico	
	% MPE	± SEM
EH(CE ₂₅) tópico	30,62	2,36
NTX _{i.p.} +EH _{tópico}	28,15	2,38
NTI _{i.p.} +EH _{tópico}	30,46	1,27
norBNI _{i.p.} +EH _{tópico}	31,38	4,41
TROPI _{i.p.} +EH _{tópico}	44,07*	4,82
PRAZ _{i.p.} +EH _{tópico}	38,30	2,67
YOH _{i.p.} +EH _{tópico}	35,46	2,56
ATRO _{i.p.} +EH _{tópico}	42,03*	1,53
L-NAME _{i.p.} +EH _{tópico}	38,65*	1,64

* = p < 0,05; CE concentración efectiva que produce el 25% del efecto analgésico; NTX Naltrexona; NTI Naltrindol; norBNI Norbinaltorfimina; PRAZ prazocin; YOH yohimbina; ATRO atropina; L-NAME N-nitro- L-arginina metil ester; TROPI tropisetron

Como se puede observar en la TABLA 9, los antagonistas opiodes no producen un cambio significativo en el efecto analgésico del EH, por lo que la analgesia producida por este extracto, no sería principalmente a través de receptores opiodes. Sin embargo el o los mecanismos de acción podrían ser por las vías:

- serotoninérgica 5-HT₃ ya que su efecto es modificado por el tropisetron
- muscarínicas colinérgicas ya que su efecto es modificado por la atropina
- del óxido nítrico ya que su efecto es modificado por la N-nitro- L-arginina metil éster

TABLA 10: EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS SOBRE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EDM EN EL MODELO DEL LATIGAZO DE LA COLA

EDM	%efecto analgésico	
	% MPE	± SEM
EDM(CE ₂₅) _{tópico}	25,37	1,30
NTX _{i.p.} +EDM _{tópico}	34,07	1,58
NTI _{i.p.} +EDM _{tópico}	30,53	2,34
norBNI _{i.p.} +EDM _{tópico}	31,36	3,43
TROPI _{i.p.} +EDM _{tópico}	33,84	4,02
PRAZ _{i.p.} +EDM _{tópico}	39,34	6,76
YOH _{i.p.} +EDM _{tópico}	32,40	3,16
ATRO _{i.p.} + DCM	24,66	± 3,29
L-NAME _{i.p.} + DCM	51,67*	± 4,86

* = p < 0,05; CE concentración efectiva que produce el 25% del efecto analgésico; NTX Naltrexona; NTI Naltrindol; norBNI Nor-binaltorfimina; pRAZ prazocin; YOH yohimbina; ATRO atropina; L-NAME N-nitro- L-arginina metil éster. TROPI tropisetron

Se puede observar en la TABLA 10, que los antagonistas opiodes no producen un cambio significativo en el efecto analgésico del EDM, por lo que la analgesia producida por este extracto, no sería a través de receptores opiodes. Pero si podría ir por la vía del óxido nítrico (NO) ya que su efecto es alterado significativamente por la N-nitro- L-arginina metil éster.

TABLA 11: EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS SOBRE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EM EN EL MODELO DEL LATIGAZO DE LA COLA

EM	% Efecto analgésico	
	% MPE	± SEM
EM(CE ₂₅) _{tópico}	25,08	4,82
NTX _{i.p.} +EM _{tópico}	29,43	3,93
NTI _{i.p.} +EM _{tópico}	32,49	2,43
norBNI _{i.p.} +EM _{tópico}	26,89	4,38
TROPI _{i.p.} +EM _{tópico}	30,37	4,39
PRAZ _{i.p.} +EM _{tópico}	51,95*	2,87
YOH _{i.p.} +EM _{tópico}	32,40	1,91
ATRO _{i.p.} +EM _{tópico}	47,58*	7,58
L-NAME _{i.p.} +EM _{tópico}	35,36	2,95

* = p < 0,05; CE concentración efectiva que produce el 25% del efecto analgésico; NTX Naltrexona; NTI Naltrindol; norBNI Nor-binaltorfimina; pRAZ prazocin; YOH yohimbina; ATRO atropina; L-NAME N-nitro- L-arginina metil éster; TROPI tropisetron

El efecto analgésico del EM (TABLA 11), al igual que los EH y EDM, no sería principalmente a través de los receptores opiodes ya que el efecto no fue modificado por los antagonistas opiodes. naltrexona naltrindol y nor-binaltorfimina

Por otra parte, se observa que la analgesia del EM podría ir por la vía vía adrenérgica α_{1A} ya que el prazocin modifica el efecto analgésico del EM en forma significativa, y/o a través de receptores muscarínicos colinérgicos por el efecto de la atropina. Lo que podría ser explicado por una inhibición de los mecanismos que inducen el dolor por vía neural.

Como conclusión se puede señalar:

- La actividad analgésica de ninguno de los extractos sería principalmente a través de receptores opioides. La actividad analgésica del EM podría ir por la vía adrenérgica, una de las vías por la que la protopina ejerce su efecto analgésico (Zhongguo, 1993).

4.6. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES POR VÍA ORAL DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA POR EL ENSAYO DEL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR Λ -CARRAGENANO

En la TABLA 12 se detallan los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral de los diferentes extractos y FADM.

TABLA 12. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA ORAL INDUCIDA POR Λ -CARRAGENANO DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS, FADM y NAPROXENO SÓDICO

Muestra	Dosis mg/ kg	Im \pm SEM	N	Ic \pm SEM	N	%EAIO \pm SEM	p
EH	200	55,4 \pm 3,1	8	47,9 \pm 4,4	12	-15,6 \pm 6,5	0,9474
EDM	200	59,2 \pm 4,4	8	47,9 \pm 4,4	12	-23,6 \pm 9,2	0,8915
EM	200	47,1 \pm 4,9	8	47,9 \pm 4,4	12	1,7 \pm 10,4	0,4385
FADM	100	70,6 \pm 4,1	8	47,9 \pm 4,4	12	-47,3 \pm 8,5	0,9945
naproxeno sódico	4	17,1 \pm 1,3	12	37,7 \pm 1,3	96	\uparrow 54,6 \pm 0,8	0,0001

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; FADM fracción alcaloidea del EDM; naproxeno sódico fármaco de referencia; Ic \pm SEM mediana de la inflamación de grupo control \pm error estándar de la media; Im \pm SEM mediana de inflamación de grupo muestra \pm error estándar de la media; n número de animales tratados para cada ensayo; N número de animales controles para cada ensayo; % EAIO \pm SEM porcentaje de efecto antiinflamatorio oral \pm error estándar de la media; p significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$; \uparrow efecto máximo

En relación a los resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral (TABLA 12), todas las muestras evaluadas fueron inactivas a las dosis ensayadas.

4.7. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES POR VÍA ORAL DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA MEDIANTE EL ENSAYO DE LAS CONTORSIONES ABDOMINALES

A continuación en la TABLA 13 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad analgésica vía oral de los diferentes extractos.

TABLA 13. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA VÍA ORAL MEDIANTE ENSAYO DE CONTORSIONES ABDOMINALES DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE MAQUI Y NAPROXENO SÓDICO

Extracto	Dosis (mg/kg)	c.m \pm SEM	n	c.c \pm SEM	N	% AO \pm SEM	p
EH	200	2,0 \pm 0,4	8	18,5 \pm 2,7	16	89,2 \pm 1,6	0,0012
EDM	200	2,2 \pm 2,5	8	18,5 \pm 2,7	16	89,2 \pm 4,9	0,0001
EM	200	8,5 \pm 6,4	8	18,5 \pm 2,7	16	54,1 \pm 12,1	0,0103
naproxeno sódico	12,5	6,0 \pm 1,8	8	20,0 \pm 1,4	16	\uparrow 70,0 \pm 4	0,00

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; naproxeno sódico fármaco de referencia; c.m \pm SEM mediana de contorsiones de grupo muestra \pm error estándar de la media; c.c \pm SEM mediana de contorsiones de grupo control \pm error estándar de la media; n número de animales tratados para cada ensayo; N número de animales controles para cada ensayo; % AO \pm SEM porcentaje de efecto analgésico vía oral \pm error estándar de la media; p significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$; \uparrow : efecto máximo

Al analizar los resultados presentados en la TABLA 13, podemos concluir que los EH y EDM exhibieron un efecto mayor a la del naproxeno sódico. El EM es el que mostró un menor efecto. El hecho de que los distintos extractos presentaron efecto analgésico frente a los distintos métodos utilizados (latigazo de la cola, formalina en la cola, contorsiones abdominales), nos permite plantear la hipótesis de que los principios activos responsables de la analgesia podrían actuar tanto a nivel central como periférico (Kolesnikov et al, 2004; Miranda et al, 2002; Pinardi et al., 2003).

4.8. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INOCUIDAD

- **RESULTADOS DEL POTENCIAL IRRITANTE Y SESIBILIZANTE POR EL ENSAYO DE DRAIZE**

A continuación en la TABLA 14, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del potencial de irritación dérmica de los EDM y EM.

TABLA 14. RESULTADOS DEL ÍNDICE DE IRRITACIÓN PRIMARIA (PII)

Extracto	Zona con Abrasión (PII)	Zona sin Abrasión (PII)
EDM	0	0
EM	0	0

Donde: EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; PII índice de irritación primaria

Como se observa en la TABLA 14, los PII fueron iguales a cero tanto en la zona sin abrasión y con abrasión, es decir no hubo ni irritación ni edema después de aplicar los EDM o EM. Por lo que se puede concluir que son inocuos por vía tópica.

- **RESULTADOS DE LA TOXICIDAD AGUDA Y EFECTOS SOBRE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS**

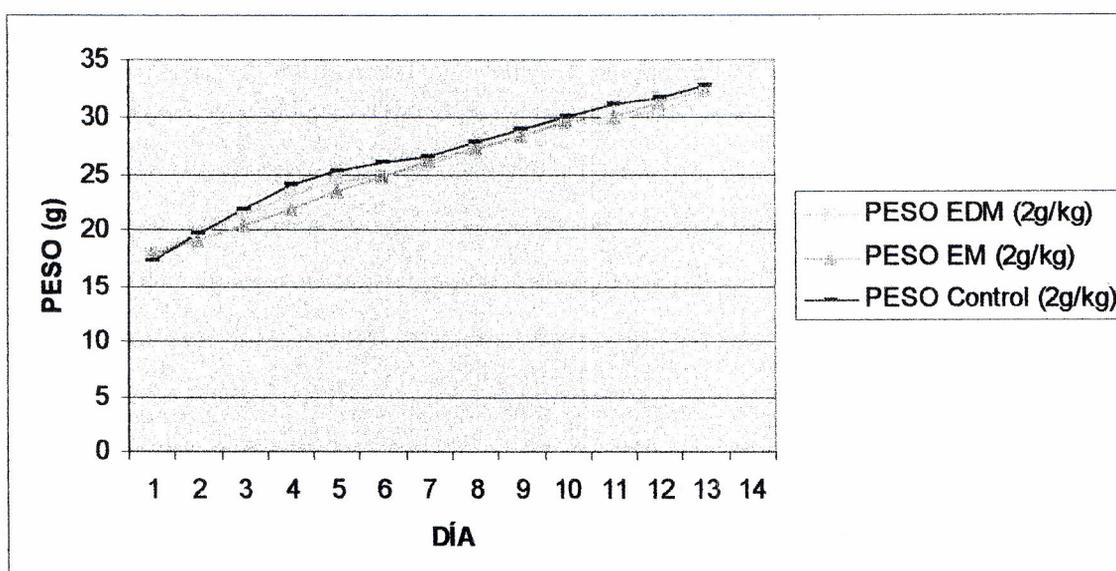
Se evaluaron los dos extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM), y por lo tanto, con mayores proyecciones de ser utilizados en el desarrollo de productos dermatológicos y/o dermocosméticas. Después de administrar la dosis única más alta que fue posible de solubilizar (2g/kg) no se produjo muerte de los animales. Estos subieron de peso en forma normal como se ve en la TABLA 15.

TABLA 15. REGISTRO COMPARATIVO DE LOS PESOS DE LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EDM Y EM PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA Y REACCIONES ADVERSAS

DIA*	EDM peso (g) ± SEM	n**	EM Peso (g) ± SEM	n	CONTROL Peso (g) ± SEM	N
1	17,8 ± 0,3	8	17,8 ± 0,6	8	17,3 ± 0,7	6
4	23,2 ± 1,4	8	21,8 ± 1,5	8	24,1 ± 0,6	6
5	24,5 ± 1,6	8	23,5 ± 1,6	8	25,3 ± 0,7	6
6	24,8 ± 2,0	8	24,8 ± 1,7	8	26,0 ± 0,7	6
7	25,8 ± 2,2	8	26,3 ± 1,8	8	26,6 ± 0,9	6
10	30,5 ± 3,2	8	27,9 ± 1,9	8	27,4 ± 1,0	6
11	29,6 ± 3,0	8	29,7 ± 2,3	8	30,1 ± 1,0	6
12	29,9 ± 3,1	8	30,1 ± 2,4	8	31,1 ± 1,3	6
13	30,7 ± 3,1	8	31,3 ± 2,6	8	31,8 ± 1,3	6
14	32,0 ± 3,1	8	32,4 ± 2,6	8	32,8 ± 1,5	6

*Días 2, 3, 8, 9 corresponden a fines de semana, período en que no se registró el peso. Donde: EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; **Peso (g) ± SEM** peso de los ratones en gramos ± error estándar de la media; **n**** número de animales tratados para el ensayo con el EDM; **n** número de animales tratados para el ensayo con el EM; **N** número de animales controles para cada ensayo

FIGURA 2. CURVA COMPARATIVA DEL CAMBIO DE PESO DE LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EDM Y EM Y DE LOS ANIMALES CONTROLES



A analizar y comparar las curvas presentadas en la FIGURA 2 se puede concluir que los animales tratados con EDM o EM, subieron de peso en forma normal y no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar el aumento de peso de los animales tratados y de los animales controles. Durante las primeras horas no se observaron alteraciones fisiológicas en los animales, siendo los signos motores, respiratorios y gastrointestinales normales, además no se observó salivación o pilo-erección.

Todos los animales vivieron hasta el período final del ensayo, seleccionando al azar a aquellos que se les realizó la necropsia. Después de analizar los distintos órganos entre los animales del grupo muestra y grupo control, se puede concluir que los EDM y EM no alteraron los distintos órganos ya que su tamaño, forma, color y textura fueron iguales a las de los animales controles, no se presentó acúmulo de líquidos en cavidades naturales (ascitis y/o hidrotórax) en ambos grupos. Los órganos observados fueron: esófago, estómago, intestino delgado, hígado, riñón, cerebro, bazo, páncreas, gónadas, corazón y pulmones.

4.7. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES

En la TABLA 16 se puede observar que la concentración efectiva cincuenta del EM es la más baja, lo que implica que a menor concentración se obtiene el 50% de efecto, por lo tanto el EM es el extracto que presentó la mayor capacidad para atrapar radicales libres ($CE_{50} \text{ EM} < CE_{50} \text{ EDM} < CE_{50} \text{ EH}$). Sin embargo su capacidad atrapadora de radicales libres es menor que la exhibida por el compuesto de referencia (quercetina).

TABLA 16. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES MEDIANTE EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DE DPPH PARA LOS DIFERENTES EXTRACTOS Y QUERCETINA

Extracto	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EH	410,3
EDM	142,4
EM	9,7
Quercetina	3,6

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto diclorometano; EM extracto metanólico; quercetina fármaco de referencia; CE_{50} concentración que produce el 50 % del efecto

TABLA 17. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES MEDIANTE EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DE DPPH PARA EH, EDM Y EM DE MAQUI A DISTINTAS CONCENTRACIONES Y QUERCETINA

Extracto hexánico		
concentración (ug/mL)	% decoloración	± SD
0	0	0
54,2	7,7	0,9
108,4	7,6	2,3
216,7	26,9	0,8

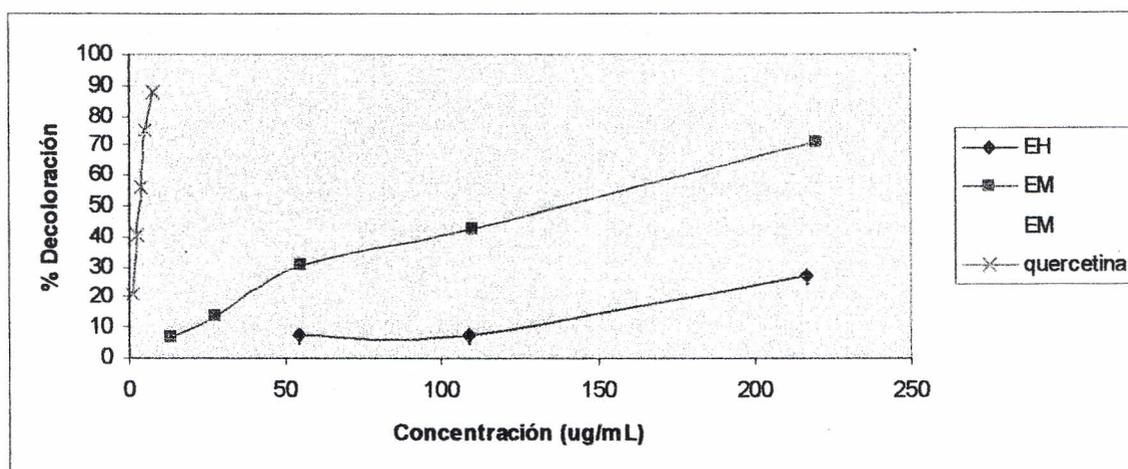
Extracto de diclorometano		
concentración (ug/mL)	% decoloración	± SD
0	0	0
13,6	7,0	0,4
27,5	13,7	0,3
55	30,1	1,0
110	42,3	4,4
220	71,2	2,0

Extracto metanólico		
concentración (ug/mL)	% decoloración	± SD
0	0	0
3,5	18,1	1,8
6,9	46,3	3,8
11,1	61,4	3,2
13,9	78,9	4,8
27,9	88,4	0,6
55,8	88,7	0,2
111,5	89,2	1,2
223,3	88,5	1,2

quercetina		
concentración (ug/mL)	% decoloración	± SD
0	0	0
1,25	20,8	1,3
2,5	40,5	3,7
3,75	56,3	0,9
5	74,8	1,5
7,5	88,1	0

Con respecto a la actividad atrapadora de radicales libres del EM, ésta actividad podría deberse a los compuestos polifenólicos presentes en este extracto (que podrían ser similares a los contenidos en los frutos e infuso) y para los cuales se demostró la actividad antioxidante (Miranda-Rottmann et al., 2002; Owen et al., 2003; Sanzana, 2001).

FIGURA 3. GRÁFICO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES VS CONCENTRACIÓN DE LOS EH, EDM Y EM Y DEL COMPUESTOS DE REFERENCIA QUERCETINA



En la FIGURA 3 se puede apreciar que la capacidad atrapadora de radicales libres es dependiente de la concentración de los diferentes extractos.

• **RESULTADOS DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DE LA XANTINO OXIDASA**

En la TABLA 18 se detallan los resultados de la actividad antioxidante de los EH, EDM y EM; además del fármaco de referencia, alopurinol.

TABLA 18. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA XANTINO OXIDASA

EXTRACTO	Concentración (µg/mL)	% de Inhibición ±SD	p
EH	50	28,06 ± 4,5	0,000
EDM	50	8,0 ± 0,1	0,000
EM	50	62,7 ± 4,3	0,000
alopurinol	0,035	50,0 ± 2,4	0,002

Donde: EH extracto hexánico; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; alopurinol fármaco de referencia; SD desviación estandar; p significancia; resultado significativo si $p \leq 0,05$

Como vemos en la TABLA 18, la evaluación realizada en este ensayo determinó que todos los extractos inhibieron la enzima xantino oxidasa, pero con marcadas diferencias. Respecto del EM, el porcentaje de inhibición fue más alto que el del fármaco de referencia alopurinol, en cambio el EH presentó una leve inhibición. Los compuestos polifenólicos presentes en el EM podrían ser los inhibidores de la XO (Lin et al., 2002).

4.8. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

TABLA 19. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

BACTERIAS	EH	EDM	EM
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-
<i>Pseudomina aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Salmonella aviatum</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	++
<i>Micrococcus flavus</i>	-	-	-
<i>Bacilis subtilis</i>	+	-	-

Hongos	EH	EDM	EM
<i>Candida albicans</i>	-	-	-

Levaduras	EH	EDM	EM
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-

Donde: EH extracto hexánico.; EDM extracto de diclorometano; EM extracto metanólico; +++ presenta mayor actividad; ++ presenta mediana actividad; + Presenta escasa actividad; - no presenta actividad.

Al analizar los resultados (TABLA 19) de la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a distintas cepas, podemos concluir, en forma general, que los extractos no exhiben una importante actividad; exceptuando al EM, el cual presentó una moderada actividad frente a *Staphylococcus aureus*, resultado que confirma los estudios previos de las hojas de maqui (Silva et al., 1992, 1995). Ninguno de los extractos exhibió actividad frente a las levaduras ni antifúngica.

5. IMPACTOS Y LOGROS DEL PROYECTO:

Lo más relevante de este estudio son los resultados farmacológicos *in vivo* en los que se demostraron los significativos efectos antiinflamatorios y analgésicos tópicos de los EM y EDM frente a distintos modelos farmacológicos. Además el EM exhibió una importante capacidad atrapadora de radicales libre e inhibidora de la xantina oxidasa, lo que potencia su efecto antiinflamatorio.

Los resultados de los estudios de inocuidad *p.o.* muestran que los EDM y EM (a la dosis de 2g/kg) son inocuos por vía oral ya que no produjeron muerte de los ratones, ni cambios en su peso corporal ni daño en sus órganos. Además por vía tópica no produjeron ni edema ni irritación.

Estos resultados tienen buenas proyecciones en el ámbito de la medicina ya que a partir de las hojas de maqui se podría llegar a un producto dermatológico o dermocosmético, indicados como antiinflamatorio, analgésico y antioxidante.

Es importante señalar también que el trabajo de investigación aquí presentado ha dado origen a una memoria de título para optar al título de químico farmacéutico, además de 4 unidad de investigación de alumnos de pre-grado de las carreras de química y farmacia, bioquímica y licenciatura en química (ver punto 7).

6. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE EL PROYECTO:

Los objetivos específicos 6, 7 y 8 fueron pensados para un extracto (el extracto farmacológicamente más activo), sin embargo los extractos farmacológicamente más activos fueron dos (el extracto de diclorometano y el extracto metanólico), por lo tanto, el número de animales, reactivos y accesorios médicos a utilizar fueron más altos que los contemplados en el proyecto original. Por ejemplo para dos extractos (y no uno) debió ser determinada:

- la toxicidad aguda y los efectos sobre los principales órganos,
- la capacidad de producir irritación dérmica y sensibilización,
- las actividades antiinflamatorias y analgésicas ambas *vía oral*.

En la propuesta original no se había contemplado determinar el mecanismo de acción analgésico, sin embargo debido a que la actividad analgésica presentada por estos extractos fue muy importante, fue necesario estimar si el mecanismo de acción era central y/o periférico, por lo que ambos fueron evaluados frente a diferentes antagonistas de la actividad analgésica mediante el ensayo del latigazo de la cola, lo que se tradujo en un mayor número de animales, reactivos y accesorios médicos.

En relación a la actividad antioxidante (objetivo específico N°5), propusimos originalmente el método del DPPH que determina la capacidad atrapadora de radicales libres, en este ensayo sólo el extracto metanólico presentó una importante actividad. Por esta razón, decidimos utilizar un ensayo adicional como es el método de la xantino oxidasa cuyos resultados se adjuntan en el informe final. Estos dos ensayos son complementarios ya que la actividad antioxidante puede ocurrir por distintas vías. Es así como fueron evaluadas la capacidad inhibitoria de la xantino oxidasa de los tres extractos (hexánico, diclorometano y metanol).

Respecto de la actividad antiinflamatoria tópica, ésta fue muy significativa, en especial frente al TPA, por lo que fue necesario implemetar el ensayo para determinar si el mecanismo de acción era por la inhibición de la expresión de la ciclooxigenasa-2 y/o la óxido nítrico sintasa. Estos estudios están actualmente en desarrollo.

En relación al estudio químico, que originalmente fue planteado para el extracto farmacológicamente más activo (Objetivo 7), éste fue llevado a cabo en los extractos metanólico, diclorometánico e infuso.

Quisiera además destacar otro logro importante alcanzado en este estudio, y que no había sido planteado en la propuesta original, como es la descripción anatómica de las hojas de maqui, información importante para la identificación del material vegetal,

Finalmente debo señalar que todas las actividades adicionales se enmarcaron dentro del objetivo principal de esta investigación como es "**Ampliar la información científica disponible sobre el maqui con miras a la completar su Monografía de calidad, seguridad y eficacia**".

7. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

Este estudio contribuyó a la formación de estudiantes dando origen a una **memoria de título** recientemente finalizada y a **unidades de investigación** contribuyendo de esta manera a la formación de nuevos profesionales. Además se realizaron dos charlas: una dictada a investigadores y empresarios del rubro agronómico y la segunda a profesionales del área farmacéutica.

7.1. Título de la Memoria: Evaluación de las actividades analgésicas y antiinflamatoria *in vivo* de *Aristolelia chilensis* y de sus potenciales efectos tóxicos.

Nombre alumna: Vanesa Torres

Carrera: Química y Farmacia

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Lugar de desarrollo: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

7.2. UNIDADES DE INVESTIGACIÓN

Título de la unidad: Estudio comparativo de las propiedades analgésicas de *B. globosa* y *Aristolelia chilensis* con fármacos AINES y opioides.

Nombre alumna: Mariela Farías

Carrera: Química y Farmacia

Lugar de desarrollo: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

Título de la unidad: análisis químico de las hojas de maqui

Nombre alumno: Claudio Pérez

Carrera: licenciatura en química

Lugar de desarrollo: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

Título de la unidad: Estudio químico, farmacológico y toxicológico de las hojas de maqui

Nombre alumno: Pablo Marambio

Carrera: bioquímica

Lugar de desarrollo: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Título de la unidad: Estudio químico y evaluación de la actividad antioxidante de especies medicinales (

Nombre alumna: Consuelo Castro

Carrera: Química y Farmacia

Lugar de desarrollo: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

Las proyecciones de los resultados de esta investigación son:

- ✓ *promover el uso racional del maqui*
- ✓ *aportar a su conocimiento químico y fármaco-toxicológico*
- ✓ *demostrar que las hojas de esta especie son susceptible de ser explotada económicamente y desarrollar a partir de sus extractos, productos farmacéuticos dermatológicos y dermocosméticos.*
- ✓ *validar el uso de las hojas de maqui como analgésicas y antiinflamatorias, especialmente por vía tópica.*

OTRAS CONCLUSIONES:

Del EM e infuso:

- fueron los de mayor rendimiento en el proceso de extracción a los que fueron sometidas las hojas de *Aristolelia chilensis*.
- presentaron alcaloides en mayor proporción y pigmentos antociánicos como **delfidina-3 glucósido** y **cianidina -3 glucósido**.
- El EM exhibió las actividades más importantes como inhibidor de la xantino oxidasa y atrapador de radicales libres, lo que podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos del tipo antociánicos.
- El importante efecto antiinflamatorio tópico presentado por el infuso frente a AA, podría deberse en parte a la **escopoletina**, y este efecto podría ser potenciado por la actividad antioxidante de los pigmentos antociánicos identificados como: **delfidina-3 glucósido** y **cianidina -3 glucósido**.

De la FADM y crudo de alcaloides:

- presentaron la mayor actividad analgésica tópica frente al ensayo latigazo de la cola (efectos mayores al fármaco de referencia). Los efectos fueron dependientes de la dosis.
- La **protopina**, alcaloide que no había sido descrito para el maqui, sería responsable en parte de los efectos analgésicos del crudo de alcaloides y de la FADM.

De los EH y EDM:

- fueron los extractos que exhibieron mayor actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA, en cambio frente a AA sus efectos fueron leves.
- por vía oral exhibieron una importante actividad analgésica superior a la del fármaco de referencia (naproxeno sódico).
- por vía oral no presentaron toxicidad aguda, ni reacciones adversas, ni alteraciones en los diferentes órganos estudiados.
- por vía tópica fueron inocuos, no produjeron edema ni irritación dérmica.

Resultados de las evaluaciones farmacológicas por vía oral:

- Los diferentes extractos seriados no presentaron efecto antiinflamatorio por vía oral. **Es por esto que la vía tópica debería ser la vía preferentemente usada por los preparados desarrollados en base a extractos obtenidos desde las hojas de maqui**

IV INFORME DE DIFUSIÓN

PUBLICACIONES:

- ✓ Delporte C. Determinación de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristolelia chilensis* (maqui). Identificación de los compuestos activos. 2007. *BLACPMA* 5(6): 135.
- ✓ Delporte C., Torres V., Erazo S., Silva X., Negrete R., Muñoz O., Backhouse N. 2006. Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de *Aristolelia chilensis*, especie nativa Chilena. *Revista Cubana de Farmacia* 40: 123.

PRESENTACIONES DE CONGRESOS:

- Protopina, inusual alcaloide de *Aristolelia chilensis*. Orlando Muñoz, Carla Delporte, Nadine Backhouse, Silvia Erazo, Hugo Miranda, Sergio Alegría. VI Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 24 al 26 de octubre de 2007, Chillán, CHILE.
- Especies chilenas con actividad antioxidante: *Buddleja globosa* Hope, *Aristolelia chilensis* Stuntz, *Ugni molinae* Turcz. Consuelo Castro, León Goñy Rosa Negrete, María Cristina Aguirre, Vanesa Torres, Patricia González, Nadine Backhouse, Carla Delporte.
XVI Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina, 4 al 8 de septiembre de 2007, La Plata, Argentina.
- Las 3 M en productos naturales (maqui, murtilla, matico). Farías M., Backhouse N., Peredo N., Goñy L., Negrete R., Aguirre M.C., Silva X., Erazo S., Miranda H.F., Apablaza C., García R., Torres V., Delporte C. IV Congreso de Químicos Farmacéuticos de la Industria Centro de eventos Casa Piedra los días 18, 19 y 20 de abril del 2007. Santiago, Chile.
- Actividad analgésica de las hojas de *Aristolelia chilensis*. Societa Italo Americana Di Etnomedicina (SILAE) Torres V., Erazo S., Inostroza V., Silva X., Backhouse N., Miranda H., Negrete R., Muñoz O., Delporte C. Perugia, Italia, 23 al 28 de septiembre de 2006
- Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de *Aristolelia chilensis*, especie nativa chilena. Delporte C., Torres V., Erazo S., Silva X., Negrete R., Muñoz O., Backhouse N. Simposio FAPRONATURA 20 al 24 de noviembre de 2006, Varadero, Cuba

CHARLAS EN MESA REDONDA

✓ TÍTULO DE LA CHARLA:

Determinación de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristolelia chilensis* (maqui). Identificación de los compuestos activos. Primer Simposio Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas

ORGANIZÓ: Universidad Santo Tomás, 14 al 14 de noviembre de 2006

LUGAR : Los Ángeles, Chile.

CONFERENCISTA: Dra. Carla Delporte.

✓ TÍTULO DE LA CHARLA:

Investigación pre-clínica en productos naturales. Búsqueda de nuevos principios activos con potencial uso por la industria farmacéutica.

IV CONGRESO SOQUIFICH 2007 (

Organizó: SOCIEDAD DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA CHILENA)

LUGAR: Casa Piedra, 18, 19 y 20 de abril del 2007

CONFERENCISTA: Dra. Carla Delporte.

V. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- AMIÉ D., Davidovié-Amié D., Beslo D. y Trinajstić N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. **76**(1): 55-61. 2003.
- BACKHOUSE N., Delporte C., Negrete R., Muñoz O., Ruiz R. (1994). Antiinflammatory and antipyretic activities of *Maytenus boaria* Mol. Int. J. Pharmacog. **32**: 239-244
- BURGER C.; Fischer D.R.; Cordenunzzi D.A.; De Borba A.O.; Cechinel V.; Dos Santos A.D. (2005). Acute and subacute toxicity of the hidroalcoholic extract from the *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*), Asteracea, in mice. Pharm. Pharmaceut. Sci. **8**(2):370-373.
- DELPORTE C., Backhouse N, Salinas P, San Martín A, Bohórquez J, Loyola A. (2003). Pharmacotoxicological study of new diterpenoids. Bioorganic & Medicinal Chemistry. **11**: 1187-1190. . ISI=1.795
- DELPORTE C., Backhouse, N., Negrete, R., Salinas, P., Rivas, P., Cassels, B.K., San Feliciano, A. (1998). Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytotherapy Research* **12**: 118-122.
- DELPORTE C., Backhouse N., Erazo S., Negrete R., Vidal P., Silva X., López-Pérez J.L., San Feliciano A., Muñoz O. (2005). Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**(1): 119-124.
- HOLLANDER M., Wolfe D. (1973). Nonparametric Statistical Methods. J. Wiley and Sons, New York, pp 27-32; 62-70.
- ERAZO S., Negrete R., Zaldívar M., Backhouse N., Delporte C., Silva I., Belmonte E., López-Perez J.L., San Feliciano A. (2002). Methyl psilalate: A new antimicrobial metabolite from *Psila boliviensis*. *Planta Medica* **68**: 66-67.
- FERESIN G., Tapia A., Gutiérrez A., Delporte C., Backhouse N., Schmeda-Hirschmann G. (2002). Free radical scavengers, antiinflammatory and analgesic activity of *Acaena magellanica*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **54**(6): 835-844.
- Goodman A., Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W. (1996). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Vol I, Novena Ed. MacGraw-Hill Interamericana, p.644
- HUSSEIN M., Samuelsson G. (1992). Pharmacologically active phenylpropanoids from *Senna incana*. *Planta Med.* **58**: 14-18.
- HOLLANDER M., Wolfe D. (1973). Nonparametric Statistical Methods. J Wiley and sons, New York, p 27-321, 62-70.
- JIMÉNEZ I., Padilla C., (1999) Toxicidad aguda oral del *Xanthium strumarium* L. (guizajo de caballo). Rev. Cubana Plant. Med. **1**(4): p 30- 40
- KALCKAR H.M. (1947). Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *J. Biol. Chem.*, **167**: 429- 443
- KOLESNIKOV Y., Cristea M., Oksman G., Torosjan A., Wilson R. (2004). Evaluation of the tail formalin test in mice as a new model to assess local analgesic effects, *Brain Research*, **1029**: 217-223.
- LAEMMLI, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- LIN C.M., Chen C.S., Chen C.S. Chen C.T., Liang Y.C., Lin J.K. (2002) Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*
- LLORET, S and Moreno, G (1995). Effects of an antiinflammatory peptide (antiinflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorpol topical application. *Biochemical Pharmacology*, **50** (3): 347- 353.
- LOWRY OH., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MAZZANTI G.; Daniele C.; Tita B.; Vitali F.; Signore A. Biological evaluation of a polyvinyl siloxane impression material. 2005. *Dental Materials* **21**:371-374.
- MIRANDA H.F., Sierraalta F., Pinardi G. (2002). Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br. J. Pharmacol*, **135**: 1591- 1597.

- MIRANDA-ROTTMAN S., Aspillaga A., Pérez D., Vásquez L., Martínez A., Leighton F. (2002). Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation *in vitro* and protected human endothelial cells against oxidative stress. *J. Agric. Chem* 50: 7542-7547
- MIRANDA H.F., Lemus I, Pinardi G. (2003). Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res Bull* 61(4):417-25.
- MOSNAM T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*. 65: 55-63
- Nakamura, H., Shizimu, M. (1981). Site of analgesic action of a non-steroidal, antiinflammatory drug, tolmetin sodium, in rats. *Br. J. Pharmacol.* 73: 779-785.
- NORO., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A., Fukushima, S (1992)., Inhibitors of Xantine oxidase from the flowers and bud of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.*, 31 (11): 3984- 3987,
- Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoids compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 41: 703-717.
- PINARDI G., Sierralta F., Miranda H. (2003). Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail- flick test of mice. *Pharmazie*, 60 (7), 593- 43.
- SANZANA E. (2001). Evaluación de la actividad antioxidante e inhibitoria de la formación de cataratas de *Amomyrtus meli* y *Aristotelia chilensis*. Tesis para optar al título de Químico farmacéutico. Universidad de Concepción.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN G., Rodríguez J., Theodoluz C., Astudillo L., Feresin G., Tapia A. (2003). Free radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. (Boldo). *Free Radical Research* 37(4): 447-452.
- SILVA M. (1992) En: Química de la Flora de Chile. O. Muñoz, O. Ed.. Andes y Andes S.A. Santiago, p 153.
- SILVA M, Alarcón J, Bittner, Becerra J, Sanhueza L, y Marticorena C. (1995). En: 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Gupta M, Ed. Presencia Ltda., Colombia, p 261.
- SERHAN CN y Savill J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* 6(12): 1191-1196.
- SILVÁN AM., Abad MJ., Bermejo P., Sollhuber M., Villar A. (1996). Antiinflammatory Activi of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J. Nat. Prod.* 59(12): 1183-5.
- THEODOLUZ, C, Pacheco, P, Schmeda- Hirshmann, G (1991). Xantine oxidase inhibitory activity of Chilean myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology.* 33: 253- 255.
- TOWBIN, H., Staehelin, T, Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- WALKER GR, Feather KD, Davis PD, Hines KK. (1995). SuperSignalTMCL-HRP: a new enhanced chemiluminiscent substrate for the development of the horseradish peroxide label in Western blotting applications. *J. of NIH Research* 7, 76.
- ZHONGGUO Yao Li Xue Bao. (1993). Opiod, calcium, and adrenergic receptor involvement in proptopine analgesia. *Acta Pharmacologica Sinica* 14(6): 495-500.